

IDENTIFICATION DES STÉROLS DE *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

M. LENFANT, M. F. LECOMPTE et G. FARRUGIA

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/Yvette (91), France

(Received 16 December 1969)

Résumé—La composition en stérols d'une souche axénique de *Physarum polycephalum* M. F. a été déterminée: six stérols ont pu être identifiés: le stigmastérol, le β -sitostérol, le stigmastanol, le campesterol, le campestanol et le cholestérol. Le lanostérol et le 24-méthylène dihydrolanostérol ont pu être mis en évidence dans la fraction triterpénique de ce myxomycète. Il semblerait que ce soit la première fois que l'on ait trouvé ces deux triterpènes dans un organisme produisant des "phytostérols" en C_{29} .

Abstract—The sterols of an axenic strain of *Physarum polycephalum* M. F. have been examined and six components, namely stigmasterol, β -sitosterol, stigmastanol, campesterol, campestanol and cholesterol, have been identified. Lanosterol and 24-methylene dihydrolanosterol were found in the triterpene fraction of this organism. This seems to be the first time that these triterpenes have been identified in an organism producing C_{29} "phytosterols".

LES MYXOMYCÈTES ont fait l'objet de nombreuses études concernant leur croissance et leur différenciation cellulaire.^{1,2} Cependant, la composition en stérols de ces organismes semble avoir été déterminée uniquement dans le cas du *Dictyostelium discoideum*: Heftmann et coll.³ ont mis en évidence la présence de stigmasten-22-ol-3 β dans ce myxomycète et ont montré l'importance de ce composé dans le phénomène d'aggrégation des cellules. Par ailleurs, cet organisme s'est révélé un outil précieux, permettant l'étude de la biosynthèse de ces stérols.⁴⁻⁸

Afin d'effectuer une étude comparative concernant la biosynthèse des phytostérols, nous nous sommes intéressés au myxomycète "vrai", *Physarum polycephalum*, dans lequel la présence de stérols, sans être précisée, avait été avancée par Emmanuel.⁹ Dans le présent mémoire, nous présentons l'analyse des stérols et des triterpènes d'une souche de *Physarum polycephalum*.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les cultures d'une souche axénique de *Physarum polycephalum* M. F. ont été effectuées dans le milieu liquide de Brewer et al.¹⁰ Les cellules ont été récoltées par centrifugation, puis soumises à un traitement alcalin à la potasse. La partie neutre chromatographiée sur colonne

¹ B. E. WRIGHT, *Science* **153**, 830 (1966).

² E. GUTTES and S. GUTTES, *Methods in Cell Physiology*, **1**, 43 (1964), Academic Press, New York.

³ E. HEFTMANN, B. E. WRIGHT and C. U. LIDDEL, *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 266 (1960).

⁴ D. F. JOHNSON, B. E. WRIGHT and E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* **97**, 252 (1962).

⁵ M. LENFANT, E. ZISSMANN and E. LEDERER, *Tetrahedron Letters* 1049 (1967).

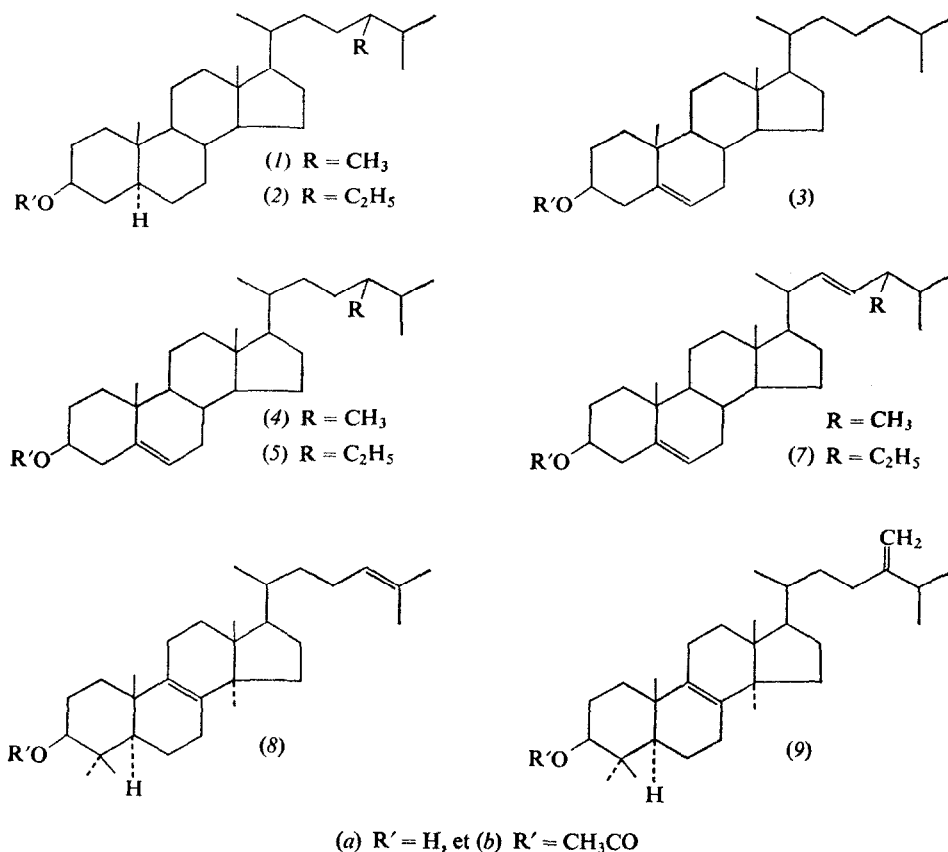
⁶ M. LENFANT, R. ELLOUZ, B. C. DAS, E. ZISSMANN and E. LEDERER, *European J. Biochem.* **7**, 139 (1969).

⁷ R. ELLOUZ and M. LENFANT, *Tetrahedron Letters* 609 (1969).

⁸ R. ELLOUZ and M. LENFANT, *Tetrahedron Letters* 2655 (1969).

⁹ C. F. EMMANUEL, *Nature* **162**, 734 (1958).

¹⁰ E. N. BREWER, S. KURAISHI, J. C. GARVER and F. M. STRONG, *Appl. Microbiol.* **12**, 161 (1964).



d'alumine permet d'obtenir une fraction stérolique, séparée de la fraction triterpénique tétracyclique.

Etude de la Fraction Stérolique

La fraction stérolique analysée par spectrométrie de masse présente, dans la région des ions moléculaires, cinq pics à m/e 416, 414, 412, 402 et 400. L'analyse des acétates correspondants, par chromatographie en phase vapeur sur colonne OV₁ à 1 %, confirme la présence d'au moins cinq stérols.

Ce mélange d'acétates, hydrogéné en présence de palladium sur charbon, conduit à deux composés entièrement saturés. L'analyse par spectrométrie de masse et chromatographie en phase vapeur a permis de conclure qu'il s'agit des acétates de campestanol 1b et de stigmastanol 2b. Les squelettes carbonés des stérols étudiés correspondent donc à ceux du cholestane portant sur le carbone C-24 une ramification à un ou deux atomes de carbone.

La fraction stérolique a été chromatographiée sur colonne de gel de silice imprégné de nitrate d'argent à 50 %. Une fraction peu polaire F_1 , correspondant aux stérols saturés, a été ainsi séparée d'une fraction F_2 , plus polaire, correspondant au mélange des stérols insaturés.

La chromatographie en phase vapeur des acétates de la fraction F_1 montre deux pics dont les volumes de rétention correspondent à ceux de deux échantillons authentiques d'acétates de campestanol 1b et de stigmastanol 2b. Le spectre de masse du mélange de stérols libres présente les ions moléculaires à m/e 402 (M_1) et 416 (M_2) et les ions de fragmentations indiqués au Tableau 1. Ces résultats indiquent que les stérols 1 et 2 ont des structures qui correspondent à celles du campestanol 1a et du stigmastanol 2a.

TABLEAU 1. FRAGMENTATIONS OBSERVÉES DANS LE SPECTRE DE MASSE DE LA FRACTION F_1 (STÉROLS SATURÉS) DE *Physarum polycephalum*

Fragmentations	Pics observés (m/e)	
	Stérol 1	Stérol 2
Ion moléculaire (M^+)	402	416
$M^+ - CH_3$	387	401
$M^+ - (CH_3 + H_2O)$	369	
$M^+ - (\text{chaîne latérale} + H_2O)$		257
$M^+ - (\text{chaîne latérale} + 27)^*$		248
$M^+ - (\text{chaîne latérale} + 42)^\dagger$		233
$M^+ - (\text{chaîne latérale} + 42 + H_2O)^\dagger$		215

* , \dagger Fragmentation impliquant le départ de la chaîne latérale et d'une partie du cycle D, *voir référence,¹¹ \dagger voir.¹²

La chromatographie en phase vapeur des acétates de la fraction F_2 (Fig. 1) indique la présence de quatre ou cinq pics (selon les cultures) dont les volumes de rétention correspondent à ceux d'échantillons authentiques d'acétates de cholestérol* 3b, campesterol 4b, stigmastérol 5b, et de β -sitostérol 5b; le deuxième pic, qui apparaît en proportion variable, a un volume de rétention correspondant à celui de l'acétate de brassicastérol† 6b.

L'analyse par spectrométrie de masse des stérols libres indique la présence des ions moléculaires à m/e 386 (de faible importance), m/e 402, 412 et 414, accompagnés de celle des ions de fragmentations présentés au Tableau 2. La présence d'un pic à m/e 300 indique qu'un des constituants du mélange au moins présente une double liaison dans la chaîne latérale en C-22, C-23.^{6,13}

Les fragmentations correspondant au départ de la chaîne latérale et à une partie du cycle D conduisent à la formation d'ions communs aux quatre stérols (voir Tableau 2) et indiquent que les quatre composés ont une insaturation dans l'un des trois cycles A, B ou C.

D'autre part, l'absence d'ions moléculaires dans le spectre de masse des acétates correspondants et la présence d'un ion très important à m/e 129 dans le spectre de masse du dérivé triméthylsilylé de ce même mélange indiquent que la double liaison est très probablement localisée en C-5 pour les quatre constituants.¹¹ Cette hypothèse a été confirmée par oxydation

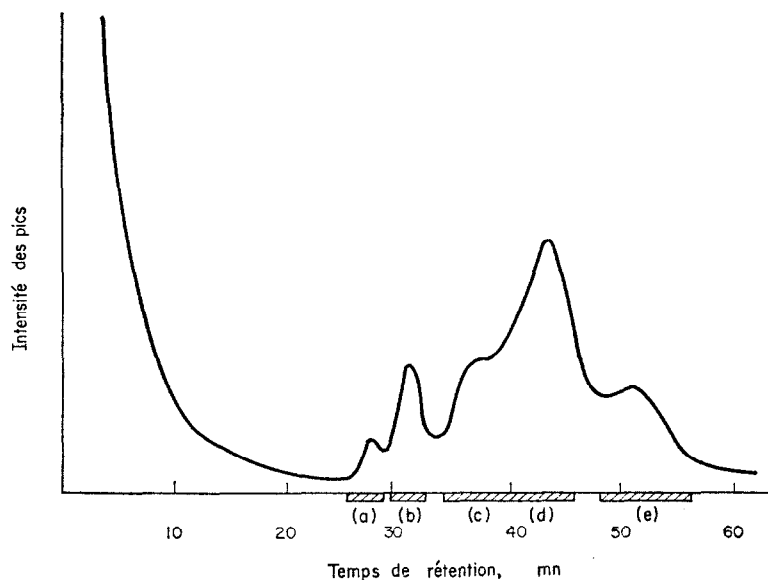
* Ce composé est présent en quantité très faible.

† La présence de ce composé n'a jamais pu être caractérisée par spectrométrie de masse des stérols libres ou de leurs dérivés acétates et époxy-acétates.

¹¹ B. A. KNIGHTS, *J. Gas Chromatog.* 273 (1967).

¹² H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI and D. M. WILLIAMS, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass spectrometry*, Vols I and II, Holden-Day, San Francisco (1964).

¹³ M. C. GERSHENGORN, A. R. H. SMITH, G. GOULSTON, L. J. GOAD, T. W. GOODWIN and T. H. HAINES, *Biochem.* 7, 1698 (1968).

FIG. 1. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR SUR OV-1 À 1% DE LA FRACTION F_2 ACÉTYLÉE.

Témoins en hachuré: (a) acétate de cholestérol 3b, (b) acétate de brassicastérol 6b, (c) acétate de campestérol 4b, (d) acétate de stigmastérol 7b, (e) acétate de β -sitostérol 5b.

TABLEAU 2. FRAGMENTATIONS OBSERVÉES DANS LE SPECTRE DE MASSE DE LA FRACTION F_2 (STÉROL INSATURÉS) DE *Physarum polycephalum*

Fragmentations	Pics observés (m/e)			
	Cholestérol 3a	Campestérol 4a	Stigmastérol 7a	β -sitostérol 5a
Ion moléculaire (M^+)	386	400	412	414
$M^+ - CH_3$		385	397	399
$M^+ - H_2O$		382	394	396
$M^+ - (15 + H_2O)$		367	379	381
$M^+ -$ groupe isopropyl terminal	343		369	
$M^+ - (43 + H_2O)$			351	
$M^+ -$ partie de chaîne latérale*			300	
$M^+ - (H_2O + 67)^\dagger$	301	315	327	329
$M^+ - (H_2O + 93)^\dagger$	275	289	301	303
$M^+ - (H_2O + 121)^\dagger$	247	261	273	275
$M^+ - (H_2O + 108)^\dagger$	260	274	286	288
$M^+ -$ chaîne latérale‡	273	273	271	273
$M^+ -$ (chaîne latérale + H_2O)			255	
$M^+ -$ (chaîne latérale + 27)			246	
$M^+ -$ (chaîne latérale + 27 + OH)			229	
$M^+ -$ (chaîne latérale + 42)			231	
$M^+ -$ (chaîne latérale + 42 + H_2O)			213	

* Fragmentation caractéristique des stérols présentant une double liaison en C-22, C-23.^{6, 13}

† Fragmentations caractéristiques de stérols présentant une insaturation en C-5, C-6.¹¹

‡ Rupture de la liaison C-17, C-20. Dans le cas du stigmastérol cette fragmentation est accompagnée de la perte de deux atomes d'hydrogène du fragment tetracyclique.¹²

de la fraction F_2 par le réactif de Jones,¹⁴ qui conduit à un mélange de cétones α, β insaturées.* Ces résultats sont donc en faveur des structures du β -sitostérol $5a$, du stigmastérol $7a$, du campesterol $4a$ et du cholestérol $3a$, pour les constituants de la fraction F_2 .

Ceci a été confirmé par la formation du mélange des époxy-acétates de la fraction F_2 . La chromatographie sur couche mince du mélange obtenu permet de séparer deux fractions, dont les analyses, par chromatographie en phase vapeur, indiquent pour la moins polaire la présence de composés majeurs dont les volumes de rétention sont ceux des acétates du monoépoxyde de $4a$ et de $5a$ et, pour la plus polaire, celui de l'acétate du diépoxyde de $7a$. La configuration absolue du carbone C-24 du stérol diinsaturé $7a$ a été identifiée à celle du stigmastérol, par comparaison des courbes de dichroïsme circulaire des acides éthyl-2, méthyl-3 butyrique, obtenus par dégradation de la chaîne latérale de ces deux composés. Les courbes obtenues (Fig. 2) sont semblables et présentent une bande d'absorption à 288 ± 5 nm., de même signe positif. On admet, pour les autres stérols $1a, 2a, 4a, 5a$, une stéréochimie identique du carbone C-24.

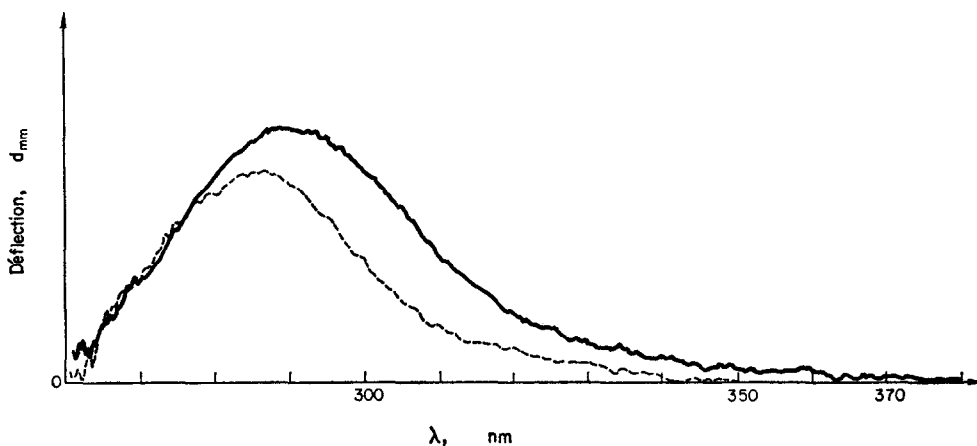


FIG. 2. COURBES DE DICHROÏSME CIRCULAIRE DES ACIDES 2-ETHYL, 3-METHYL BUTYRIQUE, OBTENUS PAR DÉGRADATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU STÉROL $7a$ (-----) ET D'UN TÉMOIN AUTHENTIQUE DE STIGMASTÉROL (—).

Etude de la Fraction Triterpénique

Ces dernières années, différents auteurs¹⁵⁻¹⁷ ont avancé l'hypothèse que, dans les végétaux supérieurs, le cycloartenol serait le précurseur des phytostérols. Ce triterpène jouerait, dans ce cas, un rôle équivalent à celui du lanostérol au cours de la biosynthèse des stérols chez les animaux et les levures. Il était donc intéressant, d'un point de vue phylogénétique, de déterminer la composition en triterpènes tétracycliques du myxomycete *Physarum polycephalum*.

La fraction triterpénique, isolée par chromatographie sur colonne, est très peu abondante (3 mg). L'analyse de cette fraction par chromatographie sur couche mince et par spectrométrie de masse des acétates correspondants montre la présence d'un 4-méthyl stérol

* Les cétones α, β insaturées formées ont été caractérisées par les spectres i.r. et u.v.

¹⁴ K. BOWDEN, I. M. HEILBRON, E. R. H. JONES and B. C. L. WEEDON, *J. Chem. Soc.* 39 (1946).

¹⁵ P. BENVENISTE, L. HIRTH and G. OURISSON, *Phytochem.* 5, 45 (1966).

¹⁶ L. J. GOAD, *Terpenoids in Plants* (edited by J. B. PRIDHAM), p. 159, Academic Press, London (1967).

¹⁷ U. EPPENBERGER, L. HIRTH and G. OURISSON, *European J. Biochem.* 8, 180 (1969).

(m/e 470)* et celle de deux 4,4-diméthyl-14-méthyl stérols (m/e 468 et 482). L'analyse par chromatographie sur couche mince des produits formés par époxydation du mélange des acétates indique la formation entre autres de deux diépoxy-acétates, correspondant à celui du lanostérol 8a et du 24-méthylène dihydrolanostérol 9a.¹⁸

L'analyse par chromatographie en phase vapeur sur colonne OV-17 confirme la présence de lanostérol 8a; cependant, un deuxième pic mal résolu†, dû, vraisemblablement, au mélange des deux autres constituants, couvre en partie une région correspondant au volume de rétention de l'acétate de 24-méthylène dihydrolanostérol 9b ainsi que celle de l'acétate de cycloartenol, ce qui ne permet pas d'exclure la présence éventuelle de faible quantité de ce dernier composé, dans la souche de *Physarum polycephalum*. D'ailleurs, une autre tâche du chromatogramme sur couche mince pourrait correspondre au mélange du mono-époxy acétate du lanostérol et du cycloartenol.

C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on rencontre, dans un même organisme, des phytostérols à chaîne éthylique en C-24 et du lanostérol. Ce fait distingue le *Physarum polycephalum* des végétaux supérieurs¹⁹ et des algues,²⁰ où le cycloartenol accompagne seul les phytostérols.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les chromatographies en phase vapeur ont été effectuées sur un appareil Chromagas modèle C.G.1 sur colonne de 1,80 m de gas chrom Q (GD 2702) à 100–120 mesh, imprégné de OV-1 à 1 % ou à 4 %. Les acétates des stérols ont été analysés à 200°, les époxy-acétates de la fraction F_2 à 255°. Débit d'azote: 40 cm³/mn. La fraction triterpénique acétylée a été analysée à 250° sur une colonne semblable, imprégnée de OV-17 à 1 %. Débit d'azote: 100 cm³/mn. L'acide éthyl-2, méthyl-3 butyrique a été analysé à 120° sur colonne de cérite (1,20 m) à 100–120 mesh, imprégnée de Tween 80 (20 %) et d'acide phosphorique à 85 % (2 %). Débit d'azote: 70 cm³/mn.

Les chromatographies sur couche mince d'acide silicique (Merck, F 254) ont été effectuées par deux migrations dans un système de solvant: acétate d'éthyle, éther de pétrole (15:85) pour les époxy-acétates de la fraction F_2 et de la fraction triterpénique. Pour les stérols libres nous avons employé le système de solvant: acétate d'éthyle, hexane (25:75).

Les spectres de masse ont été effectués sur un spectromètre de masse MS-9 (A.E.I.).

Les courbes de dichroïsme circulaire ont été enregistrées sur un dichrographe II Roussel-Jouan, Paris, à partir des échantillons liquides purs, dans des cuves de 0,1 mm.

Culture de *Physarum polycephalum*

Une souche axénique de *Physarum polycephalum* a été cultivée dans le milieu de Brewer *et al.*¹⁰ Les cultures effectuées dans des erlenmeyers de 2000 ml, contenant chacun 200 ml de milieu, ont été agitées (180 tours/min) à 26° c et à l'obscurité pendant 4 jours. 3 l. de milieu nous ont permis d'obtenir 190 g de cellules humides.

Extraction des Stérols

190 g de cellules en suspension dans 400 ml du mélange EtOH-H₂O (1:1) sont saponifiés par chauffage à reflux pendant 4 hr en présence de 190 g de KOH. La fraction neutre est extraite au CH₂Cl₂ (4 × 500 ml); la phase organique est lavée à neutralité, séchée (Na₂SO₄), puis le solvant est évaporé. Le résidu (700 mg) est chromatographié sur 70 g d'Al₂O₃. Par éluions au benzène on isole des fractions correspondant aux triterpènes (3 mg) et par éluions au mélange benzène-Et₂O (95:5) on isole la fraction stérolique (110 mg), homogène sur plaque d'acide silicique.

* Ce composé n'a pu être identifié avec certitude. Cependant l'étude par spectrométrie de masse de la fraction correspondante, provenant d'une culture effectuée en présence de méthionine méthyle-CD₃, indique par la présence d'un pic isotopique à m/e (470 + 5) que ce constituant porte une chaîne latérale C-24 éthylique ramifiée^{5,6} et est vraisemblablement un 4 α -méthyl-24-éthyl cholesténol.

† Des chromatographies effectuées à différentes températures et sur des colonnes chargées, à des pourcentages variables, en OV-17 n'ont pas permis d'obtenir une meilleure résolution.

¹⁸ C. MATHIS and G. OURISSON, *J. Chromatog.* **12**, 94 (1963).

¹⁹ G. OURISSON, P. CRABBÉ and O. R. RODIG, *Tetracyclic Triterpenes* (edited by HERMANN), Paris (1964).

²⁰ L. J. GOAD and T. W. GOODWIN, *European J. Biochem.* **7**, 502 (1969).

Séparation des Fractions F₁ et F₂ des Stérols

105 mg de la fraction stérolique sont chromatographiés sur une colonne de 24 g de gel de silice-célite (1:1) imprégné de AgNO₃ à 50%. Par élution avec un mélange de solvants: ether de pétrole-benzène (60:40), on sépare une fraction F₁ (8 mg) (stérols saturés) d'une fraction légèrement plus retenue F₂ (95 mg) (stérols insaturés).

Formation des Acétates

Les acétates des différents stérols ont été obtenus par traitement pendant 12 hr à froid des stérols libres (10 mg) par le mélange pyridine (0,3 ml), anhydride acétique (0,4 ml).

Formation des Dérivés Triméthylsilylés

Ces dérivés ont été obtenus par traitement pendant 24 hr des stérols libres (3,5 mg), dissous dans 1 ml de pyridine, par 1 ml d'hexaméthylidisilane et de 0,2 ml de triméthylchlorosilane.²¹

Hydrogénation des Acétates

7,9 mg d'acétates de stérols, dissous dans 5 ml de cyclohexane, sont hydrogénés à pression et température ambiantes, en présence de 47,5 mg de Pd/C à 5%.

Formation des Époxy-Acétates

Les acétates de la fraction F₂ (20 mg) sont dissous dans 1 ml de CHCl₃, puis agités en présence de 40 mg d'acide paranitroperbenzoïque, à la température ambiante, pendant 21 hr. Après extraction au CHCl₃, la phase organique est lavée au Na₂SO₃, Na₂CO₃, puis à H₂O. La solution CHCl₃, après avoir été séchée (Na₂SO₄), est évaporée (21 mg). Les acétates de la fraction triterpénique (2 mg) sont traités d'une façon semblable.

Oxydation de la Fraction F₂

5 mg de la fraction F₂ sont dissous dans 1 ml d'acétone; on ajoute 1 goutte de réactif de Jones préparé selon.¹⁴ Le mélange est agité 30 min à la température ambiante; la solution devient verte. La phase organique, extraite à Et₂O, est lavée (NaHCO₃), à l'eau. Elle est ensuite séchée (Na₂SO₄) puis le solvant est évaporé (4 mg). Le spectre u.v., dans EtOH, du produit obtenu présente une forte absorption à $\lambda = 246$ nm et le spectre i.r. une bande caractéristique de cétone α - β insaturée à 1690 cm⁻¹.

Dégradation de la Chaîne Latérale du Composé 7a

320 mg du mélange de stérols, provenant de 300 g de cellules, sont dissous dans 15 ml d'acétate de méthyle et 15 ml de MeOH, puis ozonisés à -70° jusqu'à ce que la solution conserve une coloration bleue.²² Les solvants sont évaporés à température ambiante sous vide (15 mm) puis les produits de la réaction, dissous dans l'acétone, sont oxydés par l'acide chromique, jusqu'à obtention d'une coloration marron.²³ L'acétone est alors évaporée; les acides sont extraits à l'éther et fractionnés par distillation sous vide (15 mm). On obtient 258 mg d'acide éthyl-2, méthyl-3 butyrique, E = 110° (15 mm Hg), dont la pureté a été contrôlée par chromatographie en phase vapeur.

Remerciements—Nous remercions très vivement M. le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail ainsi que Mr le Professeur Fetizon pour de fructueuses discussions; nous tenons également à adresser nos remerciements au Dr Joyce Mohberg qui nous a fourni les souches de *Physarum polycephalum*, à Mme Picot et au Dr Shechter qui ont enregistré les courbes de dichroïsme circulaire et à Mme J. Varenne pour sa collaboration technique.

²¹ H. E. CARTER and R. C. GAVER, *J. Lipid Res.* **8**, 391 (1967).

²² J. W. CORNFORTH, F. R. S., R. H. CORNFORTH, C. DONNINGER, G. POPJAK, G. RYBACK and G. J. SCHROEPFER, *Proc. R. Soc. (B.)* **163**, 462 (1965).

²³ A. S. NARULA and S. DEV, *Tetrahedron Letters* 1733 (1969).