

MISE EN EVIDENCE DE L'EPOXYDE-2:3 DE SQUALENE DANS LES TISSUS DE TABAC
CULTIVES-IN VITRO

P. Benveniste et R.A. Massy-Westropp

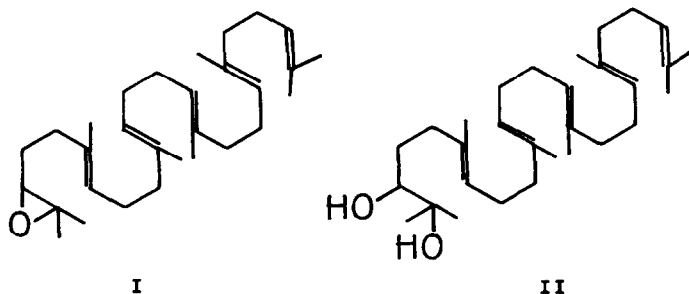
Centre de Recherches Nucléaires et Institut de Chimie

Strasbourg 67, France

(Received in Belgium 27 June 1967)

Dans le cadre d'une étude concernant la cyclisation non-enzymatique d'époxydes d'isoprénoïdes, van Tamelen et coll. ont préparé l'époxyde-2:3 de squalène I (1). Par la suite, ces auteurs, ainsi que Corey et coll. (2,3), ont montré que l'époxyde de squalène est activement métabolisé par un système enzymatique provenant de foie de rat. En anaérobiose, il se forme du lanostérol et du dihydrolanostérol, et on doit admettre un processus de cyclisation non-oxydatif; en aérobie, on obtient du cholestérol. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont mis en évidence l'époxyde de squalène dans leur matériel grâce à une incubation d'un homogénat de foie de rat en présence de squalène-¹⁴C; après addition d'époxyde non radioactif et séparation par chromatographie, la radioactivité reste associée au produit entraîneur. Les auteurs ont donc conclu que l'époxyde-2:3 de squalène est, au moins dans le foie de rat, un intermédiaire dans la chaîne métabolique conduisant au cholestérol.

Dans le cadre d'une étude effectuée sur le biosynthèse des stérols des tissus de Tabac cultivés in vitro (4), nous avons recherché l'époxyde de squalène dans notre matériel, de manière à éprouver la généralité des observations de van Tamelen et Corey.



Matériel et Méthodes

Les tissus de Tabac anergiés cultivés in vitro ont été décrits précédemment (5). Les techniques d'utilisation des éléments marqués, ainsi que les techniques d'extraction, de séparation et d'identification des terpénoïdes, ont été décrites dans des articles précédents (4,6). En ce qui concerne la mesure de la radioactivité des terpénoïdes isolés, nous avons utilisé d'une part un lecteur de chromatogrammes Berthold, et d'autre part un spectromètre à scintillation liquide Packard

Résultats

On procède pendant 30 min à une incubation de 12 cultures de tissus de Tabac (20g de poids frais) dans un milieu contenant 200 μ C (0,55mg) d'acétate de sodium $1-^{14}$ C. Après extraction à l'éther de pétrole des tissus lyophilisés, on ajoute à l'extrait brut 1mg de squalène, 2mg de lanostérol, 2mg de cycloarténol et 2mg d'époxyde-2:3 de squalène. On saponifie le tout pendant 1h. La fig. 1 indique la répartition de la radioactivité dans l'insaponifiable après chromatographie en couche mince. On voit un petit pic correspondant à une substance plus polaire que le squalène. Ce pic est superposable à la bande correspondant, après révélation à l'iode, à l'époxyde-2:3 de squalène entraîneur. La substance correspondant à ce pic est éluée et rechromatographiée en couche mince. Le pic de radioactivité observé est unique, symétrique, et superposable à la bande obtenue après révélation à l'iode de l'époxyde de squalène entraîneur. Pour confirmer ce résultat, la substance correspondant au pic précédent est dissoute dans le dioxanne aqueux (30% H₂O), on ajoute une goutte d'acide perchlorique N/25, et on chauffe à 90° pendant 10min; dans ces conditions, l'époxyde est transformé en un diol identifié comme étant le squalène-glycol II (7). Cette dernière substance est chromatographiée en couche mince; la substance radioactive obtenue est unique, le pic correspondant est symétrique et superposable à la bande correspondant au squalène glycol entraîneur. Par acétylation pyridinée, à chaud, ce glycol donne un mélange de mono- et de di-acétates; la radioactivité reste associée à ces deux produits.

Conclusion

L'époxyde-2:3 de squalène est donc présent dans notre matériel; il se forme de plus en quantités importantes et semble avoir un renouvellement très rapide. Des travaux sont en cours pour étudier sa conversion éventuelle dans les stérols contenus dans notre matériel.

Ainsi le phénomène mis en évidence dans le foie de rat se reproduit dans le cas des tissus de Tabac énergisés cultivés in vitro: les premières étapes de la biosynthèse des phytostérols sont les mêmes que celles de la biosynthèse du cholestérol. Rappelons qu'un doute plane encore sur la nature de l'intermédiaire triterpénique mis en jeu: le lanostérol dans le second cas, peut-être le cycloarténol dans le premier (4,6,8).

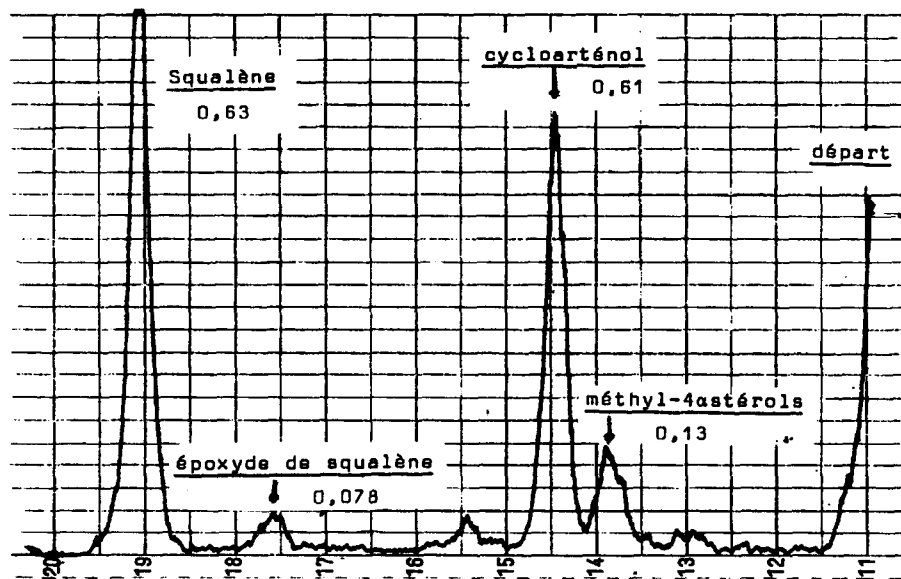


fig. 1 Lecture de la répartition de la radioactivité sur une chromatographie en couche mince correspondant à l'insaponifiable extrait de tissus de Tabac cultivés in vitro. En ordonnée la radioactivité, en abscisse et de droite à gauche la direction de migration du solvant (cyclohexane 90, acétate d'éthyle 10), deux migrations. Le chiffre situé au dessous du nom de chaque substance indique la radioactivité mesurée en 10⁶ d.p.m.

Références

1. E.E. van Tamelen et T.J. Curphy, Tetrahedron Letters, 121 (1962).
2. E.E. van Tamelen, J.D. Willett, R.B. Clayton et K.E. Lord, J. Amer. Chem. Soc., 88, 4752 (1966).
3. E.J. Corey, W.E. Russey et P.R. Ortiz de Montellano, J. Amer. Chem. Soc., 88, 4750 (1966).
4. P. Benveniste, L. Hirth et G. Ourisson, Phytochemistry, 5, 31 (1966).
5. L. Hirth, Thèse Dr. ès-Sc., Paris (1958).
6. J.D. Ehrhardt, L. Hirth et G. Ourisson, Phytochemistry, 6, 815 (1967).
7. R.A. Massey-Westropp, résultats non publiés.
8. M.J. Bernard et W.W. Reid, Chem. and Ind., 997 (1967).
L.J. Goad et T.W. Goodwin, European J. Biochem., 1, 357 (1967).

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la Recherche Coopérative sur Programme N° 34 du CNRS : "Utilisation des tissus végétaux cultivés in vitro pour l'étude des produits naturels".