

SUR LA FORMATION IN VIVO DE LA DOUBLE LIAISON EN
POSITION 22, 23 D'UN STEROL DE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM.

Radhouane ELLOUZ et Maryse LENFANT

Avec la collaboration technique de Mme J. Varenne
Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S.,
91-Gif-sur-Yvette, France.

(Received in France 12 December 1968; received in UK for publication 13 January 1969)

Smith, Goad et Goodwin (1, 2) ont étudié récemment la formation de la double liaison en position 22, 23 de la chaîne latérale d'un phytostérol d'Ochromonas malhamensis et ont déterminé la stéréochimie des atomes d'hydrogène éliminés au cours de cette formation. Cependant, l'étape à laquelle cette double liaison est formée n'a pu être précisée. Dans le cas de l'ergostérol de Saccharomyces cerevisiae les travaux d'Akhtar et coll. (3) montrent que la double liaison C-22, C-23 peut être introduite après la méthylation, notamment dans le méthyl-24 dihydro-25, 26 lanostérol. Par contre, les expériences de Katsuki et Bloch (4) conduisent à l'hypothèse d'une formation de la double liaison C-22, C-23 à un stade précédant celui de la méthylation en C-24. Les études de Heftmann et coll. (5, 6) sur la biosynthèse du β -sitostérol (IIa) et du stigmastérol (IIIa) suggèrent, par ailleurs, que (IIa) serait le précurseur de (IIIa).

Nous nous sommes proposés d'étudier la formation de la double liaison C-22, C-23 dans le cas de la biosynthèse du stigmastanol (IIb) et du stigmasten-22 ol-3 β (IIIb) du myxomycète Dictyostelium discoideum (7, 8).

La présence de cycloarténol et de lanostérol, les deux précurseurs possibles de (IIb) et de (IIIb) n'a pas encore été décelée dans cette souche. Les études de Russel et coll. (9) sur les tissus de petits pois et de Hewlins et coll. (10) sur les tissus de tabac ont montré qu'indifféremment le lanostérol ou le cycloarténol peuvent être incorporés et transformés en stérols (IIa) et (IIIa). Dans le cas présent, nous avons étudié l'incorporation du lanostérol dans les stérols de Dictyostelium discoideum.

Des cellules entières de Dictyostelium discoideum ont été incubées pendant 21 heures sous une atmosphère d'azote, puis pendant 72 heures sous air, avec un mélange de lanostérol ($[26^{14}\text{C}-27^{14}\text{C}]$ (3) et de lanostérol $[23\text{T}]$ (radioactivité du lanostérol ^{14}C introduit: 10^6 dpm).

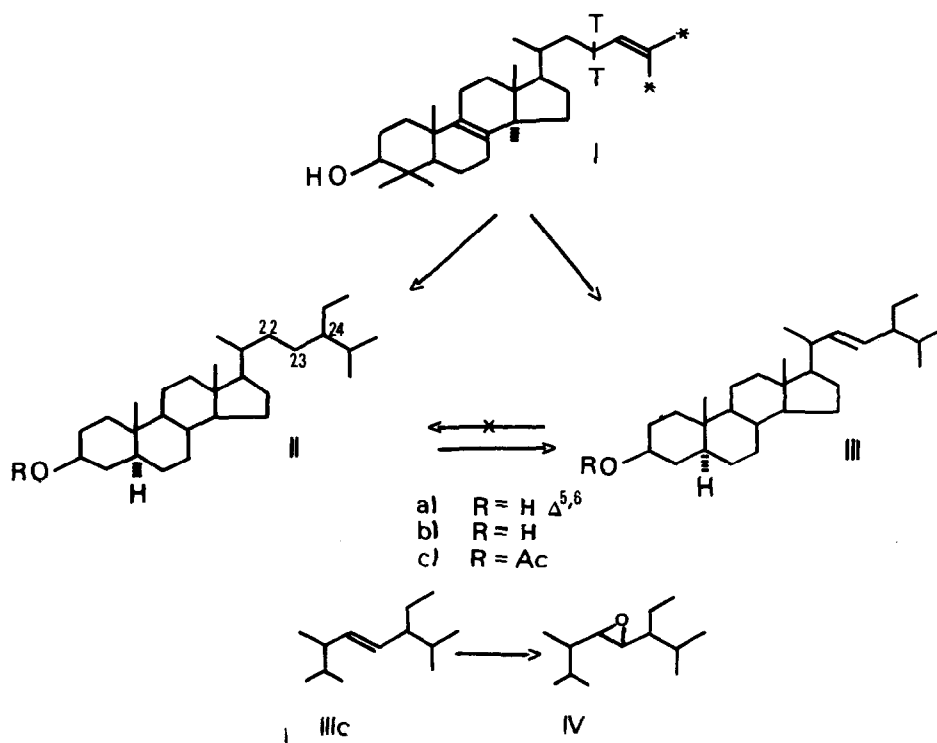
Les cellules récoltées ont été saponifiées et la fraction correspondant aux phytostérols isolée par chromatographie sur colonne (8) ($T/^{14}\text{C} = 4,06$; 2,4% d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité en ^{14}C du lanostérol introduit). Cette fraction a été acétylée et époxydée et l'acétate de stigmastanol (IIc) a été séparé par chromatographie sur

Tableau

| Composés | Rapports T/ ¹⁴ C | | | | | Radioactivité en ¹⁴ C dpm/mmmole |
|---|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
| | Avant cristallisation | 1ère cristallisation | 2ème cristallisation | 3ème cristallisation | 4ème cristallisation | |
| Lanostérol | 4,36 ± 0,1 | 4,36 ± 0,1 | | | | 5,03 · 10 ⁸ |
| Acétate destigmastanol (IIc) | 3,91 ± 0,19 | 4,15 ± 0,19 | 4,08 ± 0,2 | 4,14 ± 0,23 | 4,12 ± 0,21 | 34.043 ± 860 |
| Acétate d'époxy-22,23 stigmastanol (IV) | 3,73 ± 0,19 | 3,43 ± 0,13 | 3,37 ± 0,15 | 3,34 ± 0,14 | 3,32 ± 0,14 | 19.859 ± 340 |

Toutes les mesures de radioactivité ont été effectuées avec un compteur à scintillation Mark I, Nuclear Chicago, équipé d'un standard externe.

Les rendements en ¹⁴C et T obtenus dans le cas des échantillons doublement marqués, sont respectivement de 49 et 40%. Les erreurs ont été évaluées selon (12).



couche mince de l'acétate d'époxy-22, 23 stigmastanol (IV) et d'une fraction très polaire non caractérisée. Les acétates de stigmastanol (IIc) (0,08% d'incorporation) et d'époxy-22, 23 stigmastanol (IV) (0,4% d'incorporation) ont été recristallisés jusqu'à obtention de rapports de radioactivité $T/^{14}C$ constants.

Les résultats obtenus (voir Tableau ci-dessus) montrent que l'acétate de stigmastanol (IIc) a un rapport $T/^{14}C$ comparable à celui du lanostérol introduit et supérieur à celui de (IV), ainsi qu'une activité spécifique par m.mole supérieure à celle de (IV). Nous en concluons que (IIb) est formé à partir de (I) sans la perte des atomes d'hydrogène portés par le carbone C-23, et que (IIIb) ne peut être le précurseur de (IIb) ; par contre, ces résultats sont en accord avec une voie de biosynthèse où (IIb) serait le précurseur de (IIIb). Pour le cas étudié, l'alkylation en C-24 se fait indépendamment de la formation de la double liaison C-22, C-23.

Il faut noter que le rapport des radioactivités ($T/^{14}C = 3,34 \pm 0,14$) obtenu pour le composé (IV) est supérieur à celui attendu pour un composé qui dériverait du lanostérol (I) par perte d'un atome d'hydrogène en position 23 ($T/^{14}C = 2,18$). Ceci pourrait s'expliquer par un important effet isotopique qui aurait lieu au cours de la rupture des liaisons C-H et C-T, si cette coupure est l'étape déterminant la vitesse de la réaction (11), ou par l'existence de plusieurs voies de formation de la double liaison C-22, C-23, dont l'une impliquerait la migration d'un des atomes d'hydrogène de la position 23 à la position 24 (8). Afin de confirmer nos résultats, nous étudions actuellement la localisation des atomes de tritium dans (IIIc), ainsi que l'hypothèse selon laquelle (IIb) serait le précurseur de (IIIb).

Remerciements - Nous remercions M. le Professeur E. Lederer pour l'aide constante apportée à ce travail et le Dr. J.F. Biellmann pour des discussions très fructueuses. Nous remercions également Mlle E. Zissmann, qui a effectué les cultures de Dictyostelium discoideum, M. le Professeur M. Akhtar et le Dr. P.F. Hunt, qui nous ont fourni les échantillons de lanostérol 23T, et enfin le Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, pour une subvention ayant facilité l'achat des produits marqués.

Références

1. A.R.H. Smith, L.J. Goad et T.W. Goodwin, Chemical Commun., 1259 (1968).
2. A.R.H. Smith, L.J. Goad et T.W. Goodwin, Chemical Commun., 926 (1968).
3. M. Akhtar, M.A. Parvez et P.F. Hunt, Biochemical J., 106, 623 (1968).
4. H. Katsuki et K. Bloch, J. Biol. Chem., 242, 222 (1967).
5. D.F. Johnson, E. Heftmann et G.V.C. Houghland, Arch. Biochem. Biophys., 104, 102 (1964).
6. R.D. Bennet, E. Heftmann, W.H. Preston et D.R. Mann, Arch. Biochem. Biophys., 103, 74 (1963).

7. D.F.Johnson, B.E.Wright et E.Heftmann, Arch.Biochem.Biophys., 97, 232 (1962).
8. M.Lenfant, E.Zissmann et E.Lederer, Tetrahedron Letters, 1049 (1967).
M.Lenfant, R.Ellouz, B.C.Das, E.Zissmann et E.Lederer, Europ.J.Biochem., sous
presse.
9. P.T.Russel, R.T.van Aller et W.R.Nes, J.Biol.Chem., 242, 5802 (1967).
10. M.E.Hewlins, J.D.Ehrhardt, P.Benvéniste et G.Ourisson, travaux en cours de publi-
cation.
11. H.Simon et D.Palm, Angew.Chem.Intern.Ed., 5, 920 (1966).
12. "Preparation of samples for liquid scintillation counting", Ed. Nuclear Chicago Corpo-
ration, 333 East Howard Av., Des Plaines, Illinois.