

LE FUCOSTEROL-24,28 EPOXYDE, INTERMEDIAIRE DANS LA BIODEGRADATION OXYDATIVE DU FUCOSTEROL EN CHOLESTEROL PAR LE CRIQUET *LOCUSTA MIGRATORIA* (R. ET F.)

Jean-Pierre ALLAIS* et Michel BARBIER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190-Gif-sur-Yvette, France

Received 4 July 1977

SUMMARY

β -Sitosterol 1 is metabolised to cholesterol 5 by phytophagous insects. It has been previously shown that fucosterol-24,28 epoxide 3 is transformed into 5 in *Locusta migratoria*, desmosterol 4 being an intermediate. It is now established that locusts transform [3-³H]fucosterol propionate into the corresponding labelled epoxide 3, recovered as such or as an oxazoline derivative 11.

1. Introduction

Si les Insectes sont incapables de synthétiser de novo le cholestérol 5 indispensable à leur survie, les phytophages se le procurent en dégradant le β -sitostérol 1 présent dans leur nourriture [1]. Nous avons précédemment émis l'hypothèse selon laquelle cette biotransformation s'effectuerait selon le schéma: fucostérol 2 \rightarrow époxyde 3 \rightarrow desmostérol 4. On a pu montrer en effet que l'époxyde 3 était dégradé in vivo en cholestérol par le criquet *Locusta migratoria*, le desmostérol 4 étant intermédiaire [1,2]. La même désalkylation de 2 en 5 est observée in vitro avec des extraits acellulaires de *Bombyx mori* [3]; seul l'isomère 24S,28S de l'époxyde 3 est utilisé [4] ce qui est un argument en faveur d'une ouverture enzymatique. Chez *Tenebrio molitor* [5] et chez *Bombyx mori* [6] la transformation du fucostérol en cholestérol se fait avec migration d'un hydrogène de 25 en 24, ce qui est en accord avec le mécanisme 9a \rightarrow 9b que nous avons proposé [2]. Rappelons qu'une telle élimination simultanée des atomes de carbone 28 et

29 pour conduire au desmostérol, peut être obtenue chimiquement par traitement de l'époxyde par des acides forts [7-9]. L'imino-24,28 fucostérol 6 et les deux allènes 7 et 8 sont des inhibiteurs de cette réaction enzymatique [10-13]. Cependant, à notre connaissance, l'existence in vivo de l'époxyde 3 n'a jamais été établie. Dans le présent travail, nous démontrons la formation de cet époxyde lors de la biodégradation oxydative du fucostérol en cholestérol chez le criquet *Locusta migratoria*.

2. Matériel et méthodes

Nous avons injecté dans un premier temps à des criquets au début de leur 5ème stade larvaire, le propionate de [3-³H]fucostérol [1,2] (50 μ g par criquet soit $1,5 \cdot 10^5$ dpm) puis au 6ème jour, le propionate de l'époxy-24,28 fucostérol (mélange des deux isomères) non radioactif [1,2] soit 150 μ g par individu. Les animaux sont tués vers le 9ème jour, soit juste après la mue imaginale et les lipides sont extraits par l'éthanol-éther et repris par l'acétone selon la méthode habituelle.

Nous avons travaillé avec deux séries de 4 animaux

*ERA 227, Université Paris-sud, 91405-Orsay, France

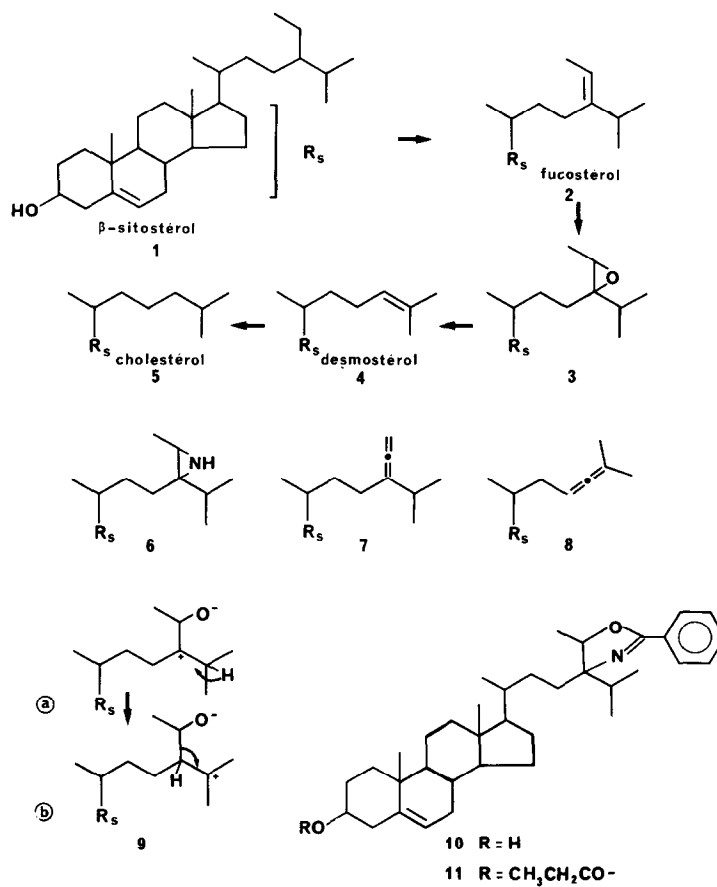


Fig.1.

Tableau 1
Séparations sur colonne de Séphadex LH20

Fractions éluées	A		B	
	dpm	%	dpm	%
Stérols estérifiés				
par des acides gras	2800	3,92	700	1,25
Propionates de stérols	53 000	74,33	44 000	77,75
Stérols libres	15 500	21,75	9900	17,5
Bilan	71 300	100	54 600	96,5

(A) 105 mg de lipides acétono-soluble; radioactivité $7,13,10^4$ dpm, extraits de 4 criquets *Locusta migratoria* préalablement injectés avec un propionate de $[3\text{-}^3\text{H}]$ -fucostérol et un propionate d'époxy-24,28 fucostérol non radioactif.
(B) 108 mg de lipides acétono-solubles ($5,66.10^4$ dpm) obtenus dans les mêmes conditions que (A) et traités par $\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}/\text{BF}_3$ pendant 30 min. à 0°C

chacune. Dans la première (A) les lipides acétono-solubles sont fractionnés sur une colonne de Séphadex LH20 (diam. 2,4 cm, long. 130 cm) en éluant par le mélange CH_2Cl_2 /hexane/éthanol 16:4:1. Dans la seconde série (B) les lipides acétono-solubles en solution dans 0,5 ml de CH_2Cl_2 et 0,5 ml de benzonitrile, sont traités par une goutte d'éthérate de BF_3 à 48% pendant 30 s à 0°C, ce qui permet de transformer les époxydes en oxazolines [14,15]. Après lavage par une solution 0,1 N de NaHCO_3 , les lipides sont chromatographiés comme ci-dessus sur colonne de Séphadex LH20. Dans les deux cas, les stérols estérifiés par des acides gras sortent en premier (volume d'élution compris entre 165 ml et 175 ml) puis viennent les stérols propionylés élués avec l'époxyde et l'oxazoline (volume d'élution compris entre 180 ml et 220 ml) et enfin les stérols libres (volume d'élution: 250–300 ml).

Les propionates de l'expérience (A) sont co-chromatographiés avec 6 mg de propionate d'époxy-24,28 fucostérol sur couche mince (CCM) d'acid silicique Schleicher et Schüll fluorescent en développant par le mélange hexane-acétate d'éthyle 9:1 (propionates de stérols, R_F 0,85; propionate d'époxy-24,28 fucostérol, R_F 0,60).

Les propionates de l'expérience (B) sont chromatographiés directement en CCM comme ci-dessus; le propionate de l'oxazoline a un R_F de 0,41. La purification est poursuivie par CCM sur alumine Merck T imprégnée de nitrate d'argent (22%) en développant par le mélange hexane-acétate d'éthyle 9:2 (R_F 0,27).

Les mesures de radioactivité sont effectuées sur un appareil Nuclear Chicago Mark I, rendement moyen 35% à 38%. Les spectres de masse ont été mesurés sur un appareil AEI MS 50 sous la direction du Dr B. C. Das.

3. Résultats

Les résultats des séparations sur colonne de Séphadex LH20 figurent au tableau 1. Dans la série (A) on récupère 100% de la radioactivité mise sur la colonne, dans les trois fractions stéroliques; dans la série (B) (réaction avec le benzonitrile et BF_3) on note une perte de 3,5% par suite de la formation de produits secondaires. Nous avons vérifié dans ce

dernier cas que les fractions lipidiques non stéroliques ne présentaient pas de radioactivité.

Les propionates de (A) chromatographiés en CCM avec 6 mg de propionates d'époxyde 3 non radioactif donnent 5 mg de ce dernier (352 dpm/mg); une répétition fournit 3,5 mg (340 dpm/mg). Ainsi, dans les conditions expérimentales, après injection de propionate de $[3\text{-}^3\text{H}]$ fucostérol à des criquets, nous retrouvons environ 2,85% de la radioactivité dans le propionate de l'époxyde 3.

Dans la série expérimentale (B), nous avons obtenu après chromatographie des propionates en CCM d'acid silicique, un composé que nous avons caractérisé comme étant le propionate de l'oxazoline 11; (R_F 0,41, λ_{max} . 205, 227 nm dans l'éthanol; coloration orange avec le réactif de Dragendorff; spectre de masse: ion moléculaire à m/e 587 et principaux fragments à m/e 572, 544, 410, 395, 368, 255, 213). La préparation et les propriétés d'un échantillon authentique utilisé pour les comparaisons, seront publiées ailleurs.

L'oxazoline isolée contient 0,78% de la radioactivité totale. Après adjonction de produit non radioactif, on chromatographie 2 mg (85 dpm/mg) en CCM/ SiO_2 ce qui donne 1,7 mg (93 dpm/mg); on continue par une CCM/ AgNO_3 et on obtient finalement 1 mg (100 dpm/mg). Ainsi, l'oxazoline 11 est bien formée à partir du propionate de l'époxyde 3 radioactif.

La différence que nous observons entre la radioactivité du propionate de l'époxyde 3 (2,85% essai (A)) et celle de l'oxazoline 11 (0,78%, essai (B)) est principalement due au rendement de la réaction de formation de l'oxazoline, qui ne dépasse pas 40% à 50%.

4. Conclusions

Les deux séries d'expériences reportées dans ce travail montrent que le fucostérol est transformé en époxyde de fucostérol par le criquet *Locusta migratoria*. Cet intermédiaire dans la dégradation oxydative conduisant au cholestérol, a été isolé comme tel dans une première expérience et sous forme d'un dérivé oxazolinique dans une deuxième. L'hypothèse que nous avons précédemment émise [2] est ainsi vérifiée. Le schéma proposé, permettant aux criquets d'obtenir le cholestérol 5 à partir du β -sitostérol 1, passe par le

fucostérol 2, son époxyde 3 et le desmostérol 4. Le sort des atomes de carbone 28 et 29 dans ce processus, reste à établir. On se trouve ainsi devant un nouvel exemple d'un époxyde venant jouer un rôle primordial dans une voie métabolique en série alicyclique. Il n'est pas encore possible de savoir si la réaction porte préférentiellement sur les esters de stérols ou sur les stérols libres; son observation sur un propionate amène cependant à penser qu'elle peut avoir lieu sur les esters.

Remerciements

Nous remercions les Professeurs E. Lederer et J. Bergerard pour leur intérêt et le CEA, Saclay pour une subvention ayant facilité l'achat des molécules marquées.

Références

- [1] Allais, J. P. (1974) Thèses de doctorat es sciences, Orsay, 135 pp.
- [2] Allais, J. P., Alcaide, A. et Barbier, M. (1973) *Experientia* 29, 944–945.
- [3] Awata, N., Morisaki, M. et Ikekawa, N. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 157–161.
- [4] Chen, S. M. L., Nakanishi, K., Awata, N., Morisaki, M., Ikekawa, N. et Shimizu, Y. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 5297–5299.
- [5] Pettler, P. L., Lockley, W. J. S., Rees, H. H. et Goodwin, T. W. (1974) *J. C. S. Chem. Commun.* 844–846.
- [6] Fujimoto, Y., Awata, N., Morisaki, M. et Ikekawa, N. (1974) *Tetrahedron Lett.* 4335–4338.
- [7] Ikekawa, N., Morisaki, M., Ohtaka, H. et Chiyoda, Y. (1971) *J. C. S. Chem. Commun.* 1498.
- [8] Morisaki, M., Ohtaka, H., Okubayashi, M. et Ikekawa, N. (1972) *J. C. S. Chem. Commun.* 1275–1276.
- [9] Ohtaka, H., Morisaki, M. et Ikekawa, N. (1973) *J. Org. Chem.* 38, 1688–1691.
- [10] Fujimoto, Y., Morisaki, M., Ikekawa, N., Horie, Y. et Nakasone, S. (1974) *Steroids*, 24, 367–375.
- [11] Morisaki, M., Awata, N., Fujimoto, Y. et Ikekawa, N. (1975) *J. C. S. Chem. Commun.* 362–363.
- [12] Fujimoto, Y., Morisaki, M. et Ikekawa, N. (1975) *J. C. S. Perkin Trans. I*, 2302–2307.
- [13] Awata, N., Morisaki, M., Fujimoto, Y. et Ikekawa, N. (1976) *J. Insect Physiol.* 22, 403–408.
- [14] Wohl, R. A. et Cannie, J. (1973) *J. Org. Chem.* 38, 1787–1790.
- [15] Lindsay, J. R., Norman, R. O. et Stilling, M. R. (1975) *J. C. S. Perkin Trans I*, 1200–1202.