

## SHORT COMMUNICATION

### SUR L'ORIGINE DE LA DOUBLE LIAISON EN POSITION 22,23 DES PHYTOSTÉROLIS

A. ALCAIDE, M. DEVYS et M. BARBIER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France

(Received 20 November 1969)

**Abstract**—The radioactivity of the propionate of  $\alpha$ -spinasterol-3<sup>3</sup>H (I) is incorporated with a yield of 0.7 per cent in the  $\Delta^5$ -sterols of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*).  $\beta$ -Sitosterol (II) is much more radioactive than stigmasterol (III). These results indicate that  $\beta$ -sitosterol is the precursor of stigmasterol, i.e. that the double bond in the 22 position is introduced by desaturation of the side chain.

## INTRODUCTION

A LA SUITE des travaux de Bennett et Heftmann<sup>1</sup> et de ceux de Waters et Johnson,<sup>2</sup> une incertitude est apparue concernant l'origine de la double liaison 22,23 du stigmastérol, chez les végétaux supérieurs. Au cours d'une incorporation de mévalonate chez *Dioscorea spiculiflora*, Bennett et Heftmann<sup>1</sup> ont constaté que le stigmastérol est moins radioactif que le  $\beta$ -sitostérol, ce qui permet de supposer que ce dernier est précurseur du premier. Les expériences de Waters et Johnson (*Glycine soja*)<sup>2</sup> ont amené ces auteurs à considérer que le  $\beta$ -sitostérol et le stigmastérol ne peuvent provenir l'un de l'autre, mais d'un précurseur commun. Johnson et Heftmann<sup>3</sup> ont montré ensuite que le mévalonate est d'abord incorporé dans le  $\beta$ -sitostérol et que la formation de stigmastérol marqué est plus tardive; ceci est un nouvel argument en faveur de la formation de la chaîne insaturée à partir de la chaîne saturée. Selon Akhtar et coll.<sup>4</sup> la double liaison en position 22,23 de l'ergostérol est introduite après la méthylation de la chaîne latérale du lanostérol; Katsuki et Bloch<sup>5</sup> émettent une hypothèse opposée (formation de l'insaturation avant la méthylation de la chaîne latérale). Ellouz et Lenfant<sup>6</sup> ont étudié la formation de la double liaison 22,23 dans le cas de la biosynthèse du stigmastène-7 ol-3 $\beta$  chez le myxomycète *Dictyostelium discoideum*. Le stigmastanol est précurseur de ce stérol et non l'inverse. Dernièrement, Kasprzyk et Wojciechowski<sup>7</sup> ont étudié l'incorporation d'acétate chez *Calendula officinalis*; leurs résultats sont en accord avec la séquence  $\Delta^7 \rightarrow \Delta^5 \rightarrow \Delta^5, 22$ .\*

\* Nous venons d'avoir connaissance d'une note de Bennett et Heftmann<sup>14</sup> établissant que le sitostérol est précurseur du stigmastérol chez *Digitalis lanata*.

<sup>1</sup> R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 74 (1963).

<sup>2</sup> J. A. WATERS et D. F. JOHNSON, *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 387 (1965).

<sup>3</sup> D. F. JOHNSON et E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 102 (1964).

<sup>4</sup> M. AKHTAR, M. A. PARVEZ et P. F. HUNT, *Biochem. J.* **106**, 623 (1968).

<sup>5</sup> H. KATSUKI et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **242**, 222 (1967).

<sup>6</sup> R. ELLOUZ et M. LENFANT, *Tetrahedron Letters* 609 (1969).

<sup>7</sup> Z. KASPRZYK et Z. WOJCIECHOWSKI, *Phytochem.* **8**, 1921 (1969).

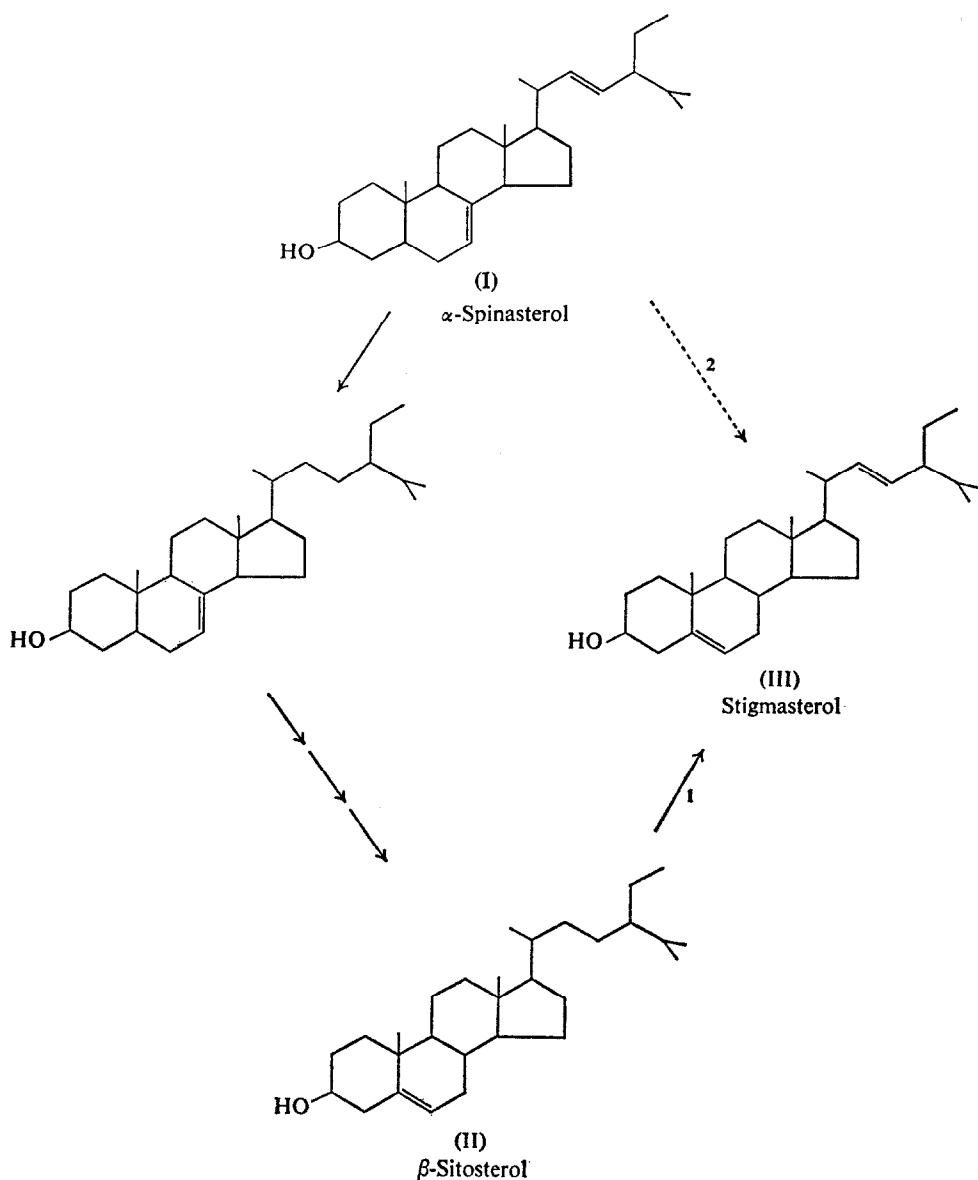


FIG. 1.

Dans une expérience précédente, avec des feuilles de tabac, nous avions remarqué que l'incorporation de stigmastène-7 ol- $3\beta$  conduisait non seulement au  $\beta$ -sitostérol mais aussi au stigmastérol.<sup>8</sup> Le précurseur utilisé étant marqué au tritium en 22,23 les comparaisons de radioactivité entre ces deux stérols étaient difficiles. Nous avons été amenés à répéter une expérience semblable en employant comme précurseur un  $\alpha$ -spinastérol- $3$ <sup>3</sup>H.

<sup>8</sup> M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1751 (1968).

## RESULTATS OBTENUS

L' $\alpha$ -spinastérol tritié en position 3 a été incorporé dans les feuilles du tabac *Nicotiana tabacum* wisconsin. Une incorporation de 0,7% dans les stérols  $\Delta^5$  a été obtenue. Ce résultat confirme la transformation stérols  $\Delta^7 \rightarrow$  stérols  $\Delta^5$  précédemment observée chez ce même végétal.<sup>8</sup> Les stérols  $\Delta^5$  ont été isolés et analysés par chromatographies sur couches minces et par chromatographies en phase gazeuse. Rappelons la composition des stérols  $\Delta^5$  du tabac telle que nous l'avons déjà publiée:<sup>8</sup> cholestérol 9%, campestérol 28%; stigmastérol 49% et  $\beta$ -sitostérol 14%; ( $\pm 10\%$  des valeurs indiquées). Le cholestérol et le campestérol, isolés après cette expérience, sont dénués de radioactivité. La radioactivité spécifique du  $\beta$ -sitostérol est de  $1,98 \cdot 10^4$  c/mn/mg et celle du stigmastérol  $2,5 \cdot 10^2$  c/mn/mg. Nous concluons que dans les conditions de notre expérience, la voie I (schéma) selon laquelle le stigmastérol (III) se formerait à partir de précurseurs à chaîne latérale saturée est la plus vraisemblable; nos résultats sont un nouvel argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle la double liaison en 22,23 des stérols de végétaux supérieurs provient de la déshydrogénération d'une chaîne saturée.

## DETAILS EXPERIMENTAUX

*Obtention du Précurseur*

5 mg d' $\alpha$ -spinastérol pur (pureté contrôlée par chromatographies sur couche mince, en phase gazeuse et par spectrométrie de masse) sont oxydés selon Jones.<sup>9</sup> La cétone obtenue est purifiée par chromatographie sur couche mince d'acide silicique dans le système pentane-acétate d'éthyle 85:15 ( $R_f$ , 0,75). Nous avons isolé 4 mg de cétone qui ont été réduits par  $\text{NaBH}_4$ .<sup>10</sup> L' $\alpha$ -spinastérol-3- $^3\text{H}$  a été propionylé<sup>8,11</sup> et chromatographié sur couche mince. Le produit obtenu (3 mg) possède une radioactivité de  $4 \cdot 10^6$  c/mn/mg\* et cette radioactivité est inchangée après une seconde chromatographie.

*Incorporation du Propionate d' $\alpha$ -spinastérol-3- $^3\text{H}$* 

2 mg de propionate d' $\alpha$ -spinastérol-3- $^3\text{H}$  de radioactivité totale  $8 \cdot 10^6$  c/mn ont été déposés sur les feuilles d'un jeune pied de tabac *Nicotiana tabacum* wisconsin suivant la technique déjà décrite.<sup>8,12,13</sup> Après une incubation d'une semaine, les stérols sont extraits et isolés. Nous avons obtenu 1,290 g de fraction insaponifiable de radioactivité  $7,5 \cdot 10^6$  c/mn (cette valeur est très approximative par suite de la coloration). La fraction stérolique totale (0,037 g) a été purifiée par chromatographie sur couche mince d'alumine imprégnée de nitrate d'argent (système  $\text{CHCl}_3$ -éther de pétrole-acétone, 11:8:1,  $R_f$ , 0,33); ce qui conduit à 0,020 g de stérols  $\Delta^5$  incolores de radioactivité  $2,5 \cdot 10^3$  c/mn/mg; les stérols  $\Delta^7$  ont dans ces conditions un  $R_f$  de 0,53; le précurseur est donc bien séparé. Après deux cristallisations dans le méthanol, nous avons récupéré 0,007 g de stérols  $\Delta^5$  de radioactivité  $2,8 \cdot 10^3$  c/mn/mg.

*Fractionnement des Stérols  $\Delta^5$* 

Nous avons préparé les propionates<sup>8,11</sup> et séparé les stérols mono-insaturés et di-insaturés par chromatographie sur couche mince (alumine/nitrate d'argent). Après une cristallisation dans le méthanol, nous avons obtenu: propionates de stérols  $\Delta_5$ , mono-insaturés: 2 mg ( $5,5 \cdot 10^3$  c/mn/mg); propionates des stérols  $\Delta^5$  di-insaturés: 1 mg ( $2,5 \cdot 10^2$  c/mn/mg). Les analyses habituelles ont montré que le stérol di-insaturé était uniquement constitué de stigmastérol comme attendu. L'analyse des propionates mono-insaturés a été poursuivie par chromatographie en phase gazeuse en recueillant les fractions à la sortie de l'appareil et mesurant

\* Les radioactivités sont mesurées sur un appareil à scintillation Nuclear Chicago Mark 1 de rendement 47%.

<sup>9</sup> R. G. CURTIS, I. HEILBRON, E. R. H. JONES et G. F. WOODS, *J. Chem. Soc.* 457 (1953).

<sup>10</sup> M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Phytochem.* 8, 1441 (1969).

<sup>11</sup> J. P. ALLAIS et M. BARBIER, *Qualitas Plant. Mater. Veget.* 16, 215 (1968).

<sup>12</sup> M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Phytochem.* 7, 613 (1968).

<sup>13</sup> A. ALCAIDE, M. DEVYS et M. BARBIER, *FEBS Letters* 3, 257 (1969).

<sup>14</sup> R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Steroids* 14, 403 (1969).

séparément leur radioactivité; (pour les conditions, voir par exemple Ref. 10). La radioactivité comparée de ces fractions est:

propionate de cholestéryle: 18 c/mn  
propionate de campestéryle: 20 c/mn  
propionate de  $\beta$ -sitostéryle: 760 c/mn

Le  $\beta$ -sitostérol est donc le seul stérol radioactif du mélange analysé en phase gazeuse. En tenant compte du pourcentage des différents stérols présents (voir ci-dessus) on peut calculer approximativement la radioactivité spécifique du  $\beta$ -sitostérol qui est:

$$5,5 \cdot 10^3 \times \frac{(9 + 28 + 14)}{14} = 1,98 \cdot 10^4 \text{ c/mn/mg}$$

*Remerciements*—Nous remercions le CEA pour une subvention ayant facilité l'achat de borohydrure de sodium tritié et M. J. P. Nitsch (Phytotron) qui nous a fourni un pied de tabac. Nous remercions Monsieur le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.