

SHORT COMMUNICATION

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

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 α -spinasterol-3 ^3H (I) is incorporated with a yield of 0.7 per cent in the Δ^5 -sterols of tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*). β -Sitosterol (II) is much more radioactive than stigmasterol (III). These results indicate that β -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 Heftmann¹ et de ceux de Waters et Johnson,² 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 Heftmann¹ ont constaté que le stigmastérol est moins radioactif que le β -sitostérol, ce qui permet de supposer que ce dernier est précurseur du premier. Les expériences de Waters et Johnson (*Glycine soja*)² ont amené ces auteurs à considérer que le β -sitostérol et le stigmastérol ne peuvent provenir l'un de l'autre, mais d'un précurseur commun. Johnson et Heftmann³ ont montré ensuite que le mévalonate est d'abord incorporé dans le β -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.⁴ la double liaison en position 22,23 de l'ergostérol est introduite après la méthylation de la chaîne latérale du lanostérol; Katsuki et Bloch⁵ émettent une hypothèse opposée (formation de l'insaturation avant la méthylation de la chaîne latérale). Ellouz et Lenfant⁶ ont étudié la formation de la double liaison 22,23 dans le cas de la biosynthèse du stigmastène-7 ol-3 β chez le myxomycète *Dictyostelium discoideum*. Le stigmastanol est précurseur de ce stérol et non l'inverse. Dernièrement, Kasprzyk et Wojciechowski⁷ 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 Heftmann¹⁴ établissant que le sitostérol est précurseur du stigmastérol chez *Digitalis lanata*.

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

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

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

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

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

⁶ R. ELLOUZ et M. LENFANT, *Tetrahedron Letters* 609 (1969).

⁷ Z. KASPRZYK et Z. WOJCIECHOWSKI, *Phytochem.* **8**, 1921 (1969).

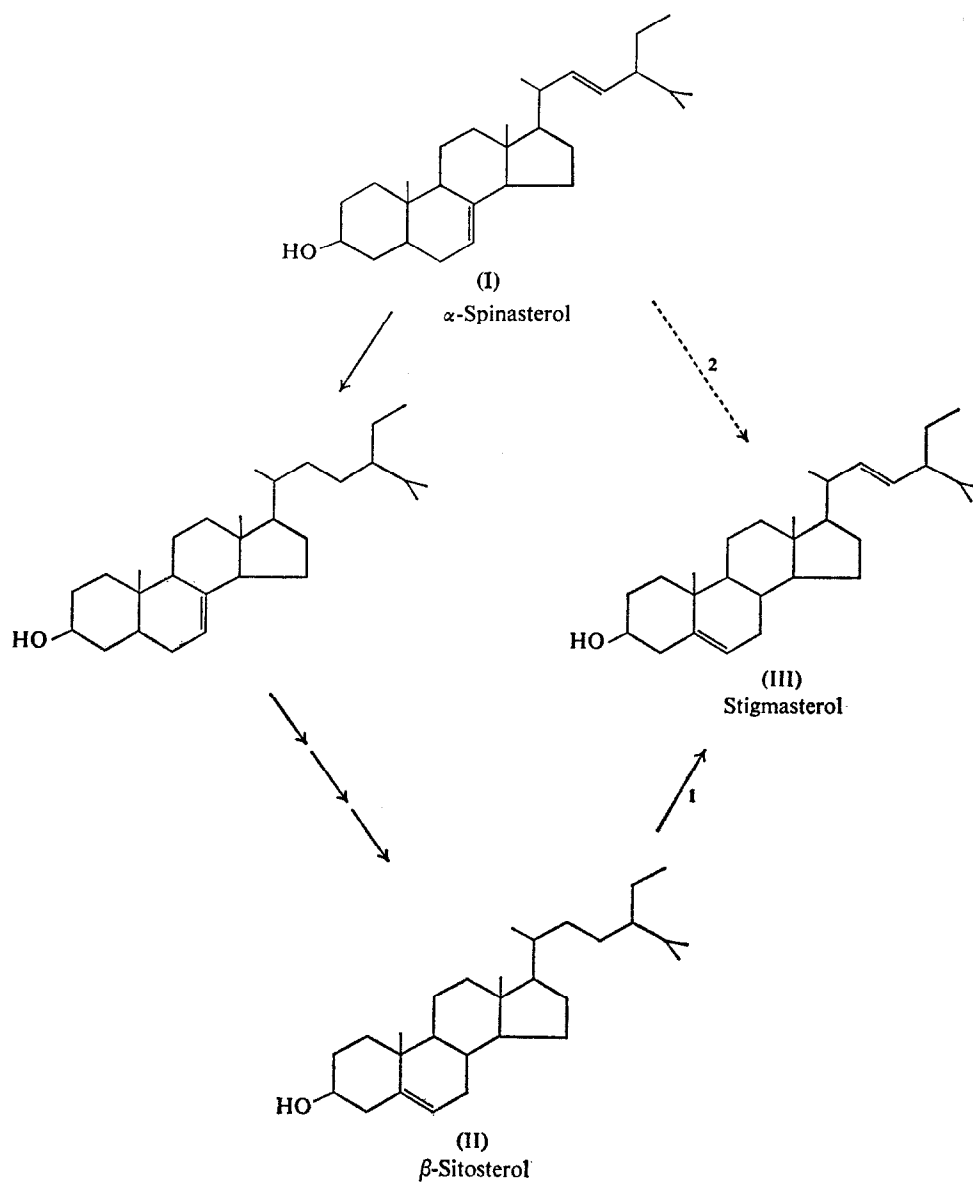


FIG. 1.

Dans une expérience précédente, avec des feuilles de tabac, nous avons remarqué que l'incorporation de stigmastène-7 ol-3 β conduisait non seulement au β -sitostérol mais aussi au stigmastérol.⁸ 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 α -spinastérol-3 ^3H .

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

RESULTATS OBTENUS

L' α -spinastérol tritié en position 3 a été incorporé dans les feuilles du tabac *Nicotiana tabacum* wisconsin. Une incorporation de 0,7% dans les stérols Δ^5 a été obtenue. Ce résultat confirme la transformation stérols $\Delta^7 \rightarrow$ stérols Δ^5 précédemment observée chez ce même végétal.⁸ Les stérols Δ^5 ont été isolés et analysés par chromatographies sur couches minces et par chromatographies en phase gazeuse. Rappelons la composition des stérols Δ^5 du tabac telle que nous l'avons déjà publiée:⁸ cholestérol 9%, campesterol 28%; stigmastérol 49% et β -sitostérol 14%; ($\pm 10\%$ des valeurs indiquées). Le cholestérol et le campesterol, isolés après cette expérience, sont dénués de radioactivité. La radioactivité spécifique du β -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 déshydrogénation d'une chaîne saturée.

DETAILS EXPERIMENTAUX

Obtention du Précurseur

5 mg d' α -spinastérol pur (pureté contrôlée par chromatographies sur couche mince, en phase gazeuse et par spectrométrie de masse) sont oxydés selon Jones.⁹ 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 NaBH_4 .¹⁰ L' α -spinastérol-3- ^3H a été propionylé^{8,11} 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' α -spinastérol-3- ^3H

2 mg de propionate d' α -spinastérol-3- ^3H 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.^{8,12,13} 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 CHCl_3 -éther de pétrole-acétone, 11:8:1, R_f 0,33); ce qui conduit à 0,020 g de stérols Δ^5 incolores de radioactivité $2,5 \cdot 10^3$ c/mn/mg; les stérols Δ^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 Δ^5 de radioactivité $2,8 \cdot 10^3$ c/mn/mg.

Fractionnement des Stérols Δ^5

Nous avons préparé les propionates^{8,11} 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 Δ_5 mono-insaturés: 2 mg ($5,5 \cdot 10^3$ c/mn/mg); propionates des stérols Δ^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%.

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

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

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

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

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

¹⁴ 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 β -sitostéryle: 760 c/mn

Le β -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 β -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.