Eur. J. Biochem. 23 (1971) 544–550

Biosynthèse de la chaîne latérale éthyle du stigmastanol et du stigmastèn-22,ol-3β du myxomycète *Dictyostelium discoïdeum*

Radhouane Ellouz et Maryse Lenfant

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Reçu le 7 mai/12 octobre 1971)

Several laboratories have shown that the two carbon atoms C-28 and C-29 of the ethyl or ethylidene side chains of phytosterols are introduced on to a C-24 unsaturated side chain by two methylation steps. A scheme based on previous work suggests the various intermediates which can be formed by stabilisation of the carbonium ion *3*. We have shown previously that in the biosynthesis of 5α-stigmastan-3β-ol (*11a*) and 5α-stigmast-22-en-3β-ol (*12a*), sterols of the myxomycete *Dictyostelium discoideum*, routes h and i could be excluded.

In the present paper we describe the *in vivo* conversion, by the myxomycete, of differently labelled lanosterol (*13*), stigmastanol (*11c*), and 5α-stigmast-22-en-3β-ol (*12c*), into the sterols *12a* and *11a*, and discuss the possible biosynthetic routes for the two sterols.

After incorporation of a mixture of [26,27-$^{14}C_2$]lanosterol and [24-^{3}H]lanosterol ($^3H/^{14}C = 5.60 \pm 0.25$), the isolated sterols *11a* and *12a* were converted into *11b* ($^3H/^{14}C = 5.54 \pm 0{,}28$) and *14b* ($^3H/^{14}C = 5.61 \pm 0.28$).

By ozonisation followed by oxidation in neutral or basic medium, *12a* was converted into the esters *15* ($^3H/^{14}C = 5.54 \pm 0.28$) and *16* ($^3H/^{14}C = 5.55 \pm 0.3$), respectively. These results show that during the C-24 methylation, H-24 is not lost; the hydrogen which is lost is located neither at C-24 nor at C-23 and must therefore be at C-25. This excludes routes a and b for sterol *12*.

After incorporation of a mixture of [26,27-$^{14}C_2$]lanosterol and [23-^{3}H]lanosterol ($^3H/^{14}C = 4.36 \pm 0.1$) the isolated sterols *11a* and *12a* were converted into *11b* ($^3H/^{14}C = 4.12 \pm 0.2$) and *14b* ($^3H/^{14}C = 3.32 \pm 0.14$); a fraction of *12b* was degraded into *15* ($^3H/^{14}C = 2.28 \pm 0.31$) and *16* ($^3H/^{14}C = 3.44 \pm 0.15$).

These results show that during the conversion of *13* into *12a*, 50% of the H-23 atoms migrate from C-23 to C-24 and 25% remain on C-23; the other 25% are eliminated. During the conversion of *13* into *11a* both H-23 atoms are retained. These results excluded route g for the two sterols. Since we have demonstrated that the conversion of *11c* into *12a* is possible in high yields (4.6%) with an efficiency eight times greater than the conversion of *12c* into *11a*, we propose that the sterol *11a* is synthesized *in vivo* according to route e with migration of H-23 from C-23 to C-24. The sterol *12a* is biosynthetized either by route d, f, the 22,23 double bond being introduced during the alkylation step, or by desaturation of the sterol *11a*, the C-22, C-23 double bond being introduced after the C-24 alkylation.

Les études de biosynthèse des chaînes éthyle et éthylidène en C-24 des phytostérols ont montré que les deux atomes de carbone proviennent de la méthionine [1–3,3a]. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette double méthylation [1–8] (voir schéma): la première méthylation du précurseur stérolique *1* conduit à la formation d'un intermédiaire méthylénique *2*, qui peut servir de substrat à une deuxième méthylation pour donner le carbocation intermédiaire *3*. Le carbocation *3* peut, après stabilisation, soit par élimination d'un proton, soit par fixation d'un ion hydrure, conduire à des composés portant deux atomes de carbone dérivant du groupe méthyle de la méthionine. Si l'on considère que l'isomérisation du carbocation *3* par migration d'un des protons portés par les carbones voisins est possible, plusieurs voies de biosynthèse (a,i) peuvent être envisagées. Dans le cas de la stabilisation par élimination d'un proton, on admet que la double liaison formée peut être reduite pour conduire à un stérol à chaîne latérale saturée et que d'autre part l'introduction de la double liaison C-22, C-23 peut avoir lieu par désaturation de la chaîne latérale saturée de *6*.

L'étude de l'incorporation de la méthionine méthyl-CD_3 dans les stérols d'*Ochromonas malhamensis* [8] et d'*Ochromonas danica* [9] a montré la présence de quatre atomes de deuterium dans la

ramification éthyle de ces stérols. Ce résultat est en accord avec la voie de biosynthèse i. Par contre, dans le cas du stigmastanol (*11a*) et du stigmastèn-22,ol-3β (*12a*) du myxomycète *Dictyostelium discoïdeum*, nous avons mis en évidence [10,11] une incorporation de cinq atomes de deuterium dans la ramification éthyle de ces deux stérols. Il en est de même des stérols de *Physarum polycephalum* [9] et de *Chlorella vulgaris* [12]. Ce résultat exclut pour ces composés les voies de biosynthèse h et i du schéma.

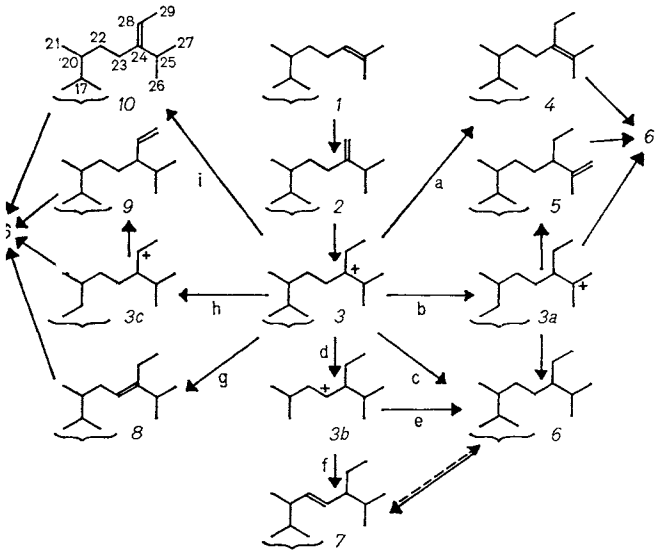


Schéma des voies de biosynthèse des chaînes latérales des phytostérols C-24 éthyle ramifiées [8 et 11]

Afin de préciser le mode de formation des stérols *11a* et *12a* du myxomycète *Dictyostelium discoïdeum* nous avons successivement incubé des cellules de cet organisme en présence de divers précurseurs radioactifs: mélange de [24-^{3}H]lanostérol et de [26,27-^{14}C]-lanostérol, mélange de [23-^{3}H]lanostérol et de [26,27-^{14}C]lanostérol, de [3α-^{3}H]stigmastanol et de [3α-^{3}H]stigmastèn-22,ol-3β. La répartition et la localisation des atomes de tritium dans les composés *11a* et *12a* biosynthétisés indiquent que dans les deux composés un des atomes d'hydrogène du précurseur stérolique migre de la position 23 en 24; d'autre part elles montrent que le stérol saturé *11a* peut être formé après la double méthylation par introduction d'un ion hydrure en C-23 (voie d,e) et que le stérol insaturé *12a* peut être obtenu soit par élimination d'un des atomes d'hydrogène 22 du précurseur *1* (voie d,f), soit par introduction de la double liaison C-22, C-23 à partir du stérol saturé *11a*[1].

[1] Ces résultats ont fait l'objet de communications préliminaires [13—15].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CULTURES DE *Dictyostelium discoïdeum* EN PRÉSENCE DU MÉLANGE DE [24-^{3}H]LANOSTÉROL ET [26,27-$^{14}C_2$]LANOSTÉROL (13)

20 litres de milieu de culture (peptone Difco, 15,6 g/l; *yeast extract* Difco, 2,8 g/l; NaCl 5,6 g/l; glucose, 1 g/l; pH 7,4 ajusté avec KOH; stérilisation, 15 min à 120 °C) sont ensemencés par une préculture d'une souche de *Escherichia coli* B. Après 24 heures à 37 °C, les cultures sont centrifugées, lavées à l'eau distillée stérile et les cellules microbiennes humides sont mises en suspension dans un litre de tampon Sörensen M/60, pH 6 [16]. Le nombre des cellules contenues dans la suspension est déterminé par la mesure de l'arsorbance au spectrophotomètre (Spectronic 20 Bausch et Lomb) étalonné au préalable avec des échantillons de cultures sur lesquels ont été effectué des numérations à l'aide d'une cellule compte-germes.

Les cultures et la récolte des spores de *Dictyostelium discoïdeum* sont effectuées comme précédemment [11]. Les spores de *Dictyostelium discoïdeum* récoltées et les cellules de *Escherichia coli* B sont mises dans un fermenteur contenant 10 litres de solution tampon Sörensen M/60, pH 6. Au début de la phase végétative, on ajoute une solution contenant 10 mg de lanostérol marqué ($2{,}5 \times 10^6$ dés./min de ^{14}C)[2]. La culture laissée sous agitation et sous azote pendant 24 heures est ensuite aérée (débit d'air 3 litres/min), agitée à 200 tours/min et incubée à 23 °C pendant 48 heures environ. A la fin de la phase végétative, on recueille 52 g de cellules humides.

Extraction des stérols 11a *et* 12a

Les cellules humides sont hydrolysées dans les conditions précédemment décrites [11]. La fraction neutre (600 mg, ^{3}H/^{14}C = 5,5; taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 50%) est chromatographiée sur 30 g d'acide silicique. La fraction correspondant aux phytostérols (83 mg, ^{3}H/^{14}C = 5,55, 2,2% d'incorporation calculée par rapport à la radioactivité en ^{14}C introduite) est acétylée [11].

Préparation de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (14b)

80 mg du mélange des acétates des composés *11a* et *12a*, en solution dans 10 ml de chloroforme sont traités par 250 mg d'acide *p*-nitroperbenzoïque. Après 3 heures d'agitation à froid, la solution est lavée avec une solution saturée de sulfite de sodium, de bicarbonate de soude puis à l'eau jusqu'à neu-

[2] Le lanostérol (10 mg) est dissous dans 3 ml d'éthanol auxquels sont ajoutées 5 gouttes de Tween 80 et 13 ml d'eau distillée stérile.

tralité. On isole, après évaporation du solvant, 76 mg de produits qu'on purifie sur une plaque d'acide silicique. L'acétate de stigmastanol (*11b*), (14 mg; F = 145—148 °C; $^3H/^{14}C$ = 5,54) est séparé de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*), (56 mg; F = 75—78 °C; $^3H/^{14}C$ = 5,61); le spectre de masse présente un pic moléculaire à *m/e* 472.

Dégradation de la chaîne latérale du stérol 12a

80 mg du mélange des stérols *11a* et *12a* sont dissous dans 5 ml d'acétate de méthyle et 5 ml de méthanol refroidis à — 80 °C et soumis pendant 30 min à un courant d'ozone (100 cm^3/min à 4%). On agite quelques minutes et on soumet à nouveau à l'ozonolyse pendant 15 min. La solution est ramenée à la température ambiante, le solvant est évaporé à froid et sous vide.

a) Une première fraction de l'ozonide dissoute dans l'acétone est oxydée par 0,5 ml de réactif de Jones [17]. L'acétone est alors évaporée, l'acide extrait à l'éther est distillé sous vide (110 °C sous 30 mm de Hg) puis estérifié par 25 mg de bromure de *p*-phényl phénacyle [11]. L'ester *p*-phényl phénacylique *15*: (70 mg, $^3H/^{14}C$ = 5,54) est purifié deux fois sur plaque d'acide silicique puis cristallisé dans le méthanol.

b) La seconde fraction de l'ozonide est traitée par 0,5 ml de diméthyl sulfure [18] en présence de 2 ml de méthanol puis par une solution contenant 1,4 ml de soude aqueuse à 100 g/l et 5 ml d'éthanol pendant 15 heures sous azote. Après oxydation par 3 ml de réactif de Jones, l'acide isolé par distillation sous vide est estérifié. L'ester *p*-phényl phénacylique *16* (5 mg, $^3H/^{14}C$ = 5,55) est cristallisé dans le méthanol.

CROISSANCE DES CELLULES DE *Dictyostelium discoïdeum* EN PRÉSENCE DU MÉLANGE DE [23-^{3}H]LANOSTÉROL ET DE [26,27-$^{14}C_2$]LANOSTÉROL (*13*)

Les cultures des spores de *Dictyostelium discoïdeum* et de *E. coli* B sont effectuées comme précédemment. Au début de la phase végétative, on ajoute la solution contenant 4 mg du mélange de [23-^{3}H]-lanostérol et de [26,27-$^{14}C_2$]lanostérol ($^3H/^{14}C$ = 4,36, activité en ^{14}C = 10^6 dés./min). On recueille 50 g de cellules humides.

Extraction des stérols 11a *et* 12a

Les cellules humides sont hydrolysées, la fraction neutre (464 mg, $^3H/^{14}C$ = 4,25, activité en ^{14}C = $3{,}95 \times 10^5$ dés./min, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 39,5%) est chromatographiée. La fraction correspondant aux phytostérols (100 mg, $^3H/^{14}C$ = 4,06, 2,5% d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité en ^{14}C) est acétylée.

Préparation de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (14b)

90 mg du mélange des acétates *11b* et *12b* sont traités comme précédemment par l'acide *p*-nitroperbenzoïque. L'acétate de stigmastanol (*11b*), (17 mg, $^3H/^{14}C$ = 3,91) est séparé de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*) (67 mg, $^3H/^{14}C$ = 3,73).

Dégradation de la chaîne latérale du stérol 12a

50 mg du mélange des stérols *11a* et *12a* sont ozonisés comme précédemment. On isole l'ester *p*-phényl phénacylique *15* préparé comme précédemment selon (a): 5 mg, $^3H/^{14}C$ = 2,28, et l'ester *16* préparé selon (b): 4 mg, $^3H/^{14}C$ = 0,44.

Préparation du [3α-^{3}H]stigmastanol (11c)

100 mg de stigmastanol (*11a*) en solution dans 10 ml d'acétone sont traités par 0,5 ml de réactif de Jones. Après 30 min d'agitation, on détruit l'excès de réactif par le méthanol et on extrait la phase organique à l'éther: 96 mg. La stigmastanone (*17*) obtenue est identifiée: par chromatographie sur couche mince d'acide silicique, par chromatographie en phase vapeur (T_f: 240 °C, colonne SE 30 à 1%, débit d'azote 55 cm^3/min) et par spectrométrie de masse.

A 25 mg de stigmastanone (*17*) en solution dans 10 ml de méthanol, on ajoute du borohydrure de sodium tritié (1 mcurie); après 30 min d'agitation sous azote, on ajoute 15 mg de borohydrure de sodium non marqué. Cette solution maintenue sous atmosphère d'azote et sous agitation pendant une heure, est ensuite extraite à l'éther. Le [3α-^{3}H]-stigmastanol (*11c*) soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique, est cristallisé dans le méthanol: 20 mg, $10{,}7 \times 10^6$ dés. $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1}.

Préparation du [3α-^{3}H]stigmastèn-22,ol-3β (12c)

60 mg du stérol insaturé *12a* sont oxydés en 5α-stigmastèn-22 one-3. 50 mg de la stigmastènone sont réduits par un mcurie de borohydrure de sodium tritié. Le stérol *12c* soumis à deux purifications successives sur plaque d'acide silicique est cristallisé dans le méthanol: 40 mg, activité spécifique $14{,}7 \times 10^6$ dés. $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1}.

CROISSANCE DES CELLULES DE *Dictyostelium discoïdeum* EN PRÉSENCE DU STIGMASTANOL (*11c*)

Les cellules de *Dictyostelium discoïdeum* sont incubées en présence de 5 mg de [3α-^{3}H]stigmastanol

(*11c*) (5×10^7 dés./min). On recueille 22 g de cellules humides.

Extraction des stérols 11a *et* 12a

Les cellules humides sont hydrolysées dans les mêmes conditions que précédemment. La fraction neutre (288 mg, $9{,}2\times10^6$ dés./min) est chromatographiée comme précédemment. La fraction correspondant aux phytostérols (80 mg, $4{,}18\times10^6$ dés./min) est acétylée.

*Préparation de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*)*

80 mg du mélange des acétates *11b* et *12b* sont traités comme précédemment. L'acétate de stigmastanol (*11b*) (20,8 mg, $3{,}57\times10^6$ dés./min) est séparé de l'acétate d'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*), (55,6 mg, $4{,}23\times10^5$ dés./min taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite dans les cellules: 4,7%). Ce dernier, après addition d'entraîneur 200 mg, a été cristallisé jusqu'à obtention d'une radioactivité spécifique constante.

Préparation de l'époxy-22,23 stigmastanone (8)

15 mg de l'acétate *14b* sont hydrolysés par 100 mg d'hydrure de lithium aluminium dans l'éther anhydre à chaud. L'alcool *14a* obtenu après purification sur plaque d'acide silicique présente la même radioactivité spécifique que l'acétate correspondant. 10 mg de l'alcool *14a* sont oxydés par 0,5 ml de réactif de Jones. La cétone obtenue, 7 mg, est purifiée sur une plaque d'acide silicique puis cristallisée dans le méthanol.

CROISSANCE DES CELLULES DE *Dictyostelium discoïdeum* EN PRÉSENCE DE [3-^{3}H]STIGMASTÈN-22,OL-3β (*2c*)

Les cellules de *Dictyostelium discoïdeum* sont incubées en présence de 4 mg du stérol *12c*, (radioactivité introduite $5{,}9\times10^7$ dés./min). On recueille 55 g de cellules humides.

Extraction du stérol 11a

Les cellules humides sont hydrolysées dans les mêmes conditions que précédemment. La fraction neutre (395 mg, $17{,}7\times10^6$ dés./min, taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 30%) est chromatographiée. La fraction correspondant aux phytostérols (50 mg, $6{,}7\times10^6$ dés./min) est acétylée.

Isolement de l'acétate de stigmastanol (11b)

50 mg du mélange des acétates sont époxydés. L'acétate de stigmastanol (8 mg, $1{,}13\times10^5$ dés./min) est séparé par chromatographie sur couche mince de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*), (38 mg, $6{,}52\times10^6$ dés./min). Après addition d'entraîneur (20 mg), l'acétate de stigmastanol (*11b*) est cristallisé jusqu'à obtention d'une radioactivité spécifique constante.

Préparation de la stigmastanone (17)

10 mg de l'acétate *11b* sont hydrolysés par l'hydrure de lithium aluminium. L'alcool *11a* obtenu a la même radioactivité spécifique que l'acétate *11b*. 5 mg de l'alcool *11a* sont oxydés par 0,5 ml de réactif de Jones. La cétone *17* obtenue, 3,5 mg, soumise à deux purifications succesives sur une plaque d'acide silicique est dépourvue de radioactivité.

DISCUSSION ET RÉSULTATS

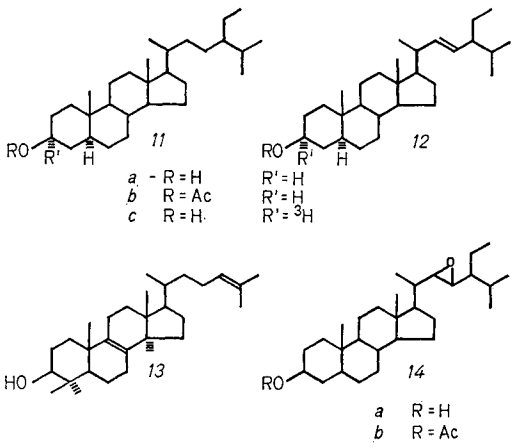
Les voies de biosynthèse des stérols *11a* et *12a* présentés dans le schéma diffèrent entre elles par le mode de stabilisation du carbocation *3*. Nous examinerons successivement les voies a, b, c, d, e, f, g, les voies de biosynthèse h et i ayant été exclues par les résultats obtenus précédemment [11].

Les voies a et b font intervenir l'atome d'hydrogène porté par le carbone 24 du précurseur *1*. Il a été démontré que cet atome d'hydrogène migre de la position C-24 à C-25 lors de la formation de l'intermédiaire méthylénique *2* [19—21], alors que la voie de biosynthèse a implique son élimination, la voie de biosynthèse b implique son retour du carbone 25 au carbone 24. Nous avons étudié ces deux possibilités en incorporant un mélange de [26,27-^{14}C]-lanostérol et de [24-^{3}H]lanostérol (^{3}H/^{14}C = 5,6 $\pm$ 0,25) préparé selon Akhtar et coll. [19].

Les cellules de *Dictyostelium discoïdeum* ont été récoltées et la fraction correspondant aux phytostérols isolée. Cette fraction a été acétylée et époxydée; les acétates de stigmastanol (*11b*) (^{3}H/^{14}C = 5,54 $\pm$ 0,28) et d'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*) (^{3}H/^{14}C = 5,61 $\pm$ 0,28) obtenus ont des rapports de radioactivité comparables à celui du lanostérol introduit (^{3}H/^{14}C = 5,6 $\pm$ 0,15). Pour localiser l'atome de tritium résiduel dans le stérol *12a*, une fraction de *12a* a été soumise à une dégradation par ozonolyse en milieu neutre. Après oxydation de l'ozonide par le réactif de Jones [17] l'acide éthyl-2 méthyl-3 butyrique a été isolé sous forme de son ester *p*-phenyl phenacylique *15*. La deuxième fraction soumise à la même dégradation a été échangée en milieu basique[3] oxydée selon Jones et l'acide a été isolé sous forme de son ester *16*. Les deux esters *15*

[3] Un échantillon d'éthyl-2 tritio-2 méthyl-3 butyraldéhyde (1660 dés. $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1}) a été traité dans les mêmes conditions d'échange; après oxydation par le réactif de Jones, l'acide a été isolé sous forme de son ester *p*-phenyl phénacyclique d'activité spécifique 490 dés. $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1} et a perdu environ 70% de la radioactivité.

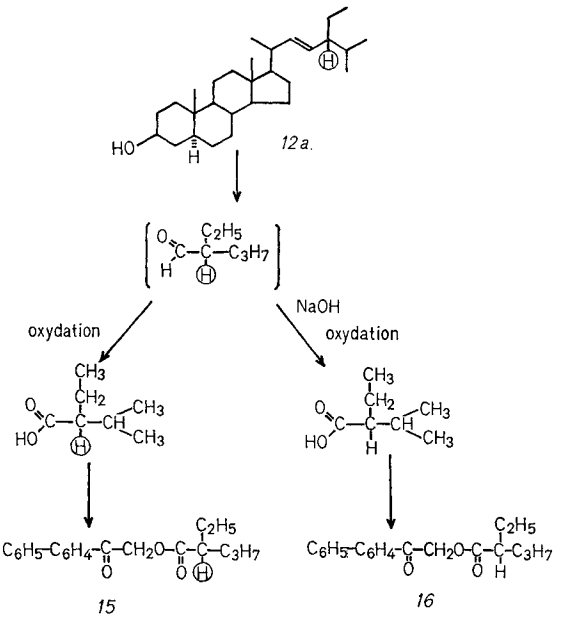
et *16* ont été cristallisés jusqu'à radioactivité spécifique constante.



Les résultats obtenus montrent que les rapports de radioactivité $^3H/^{14}C$ du lanostérol (*13*) introduit (5,6 ± 0,15), de l'ester *15* (5,54 ± 0,28) et de l'ester échangé *16* (5,55 ± 0,3) sont comparables. Ceci prouve donc que l'atome de tritium initialement sur le carbone 24 du précurseur n'a pas été éliminé, il ne se trouve plus sur le carbone 24 du stérol *12a* et est probablement sur le carbone 25 [19—21]. La biosynthèse du stérol *12a* ne peut donc procéder par les voies a et b et diffère donc de celle du 24-éthylcholesta-5,22,25-trièn-3β de *Clerodendrom campbellii* pour lequel la voie de biosynthèse b a été prouvée par Goodwin et coll. [22].

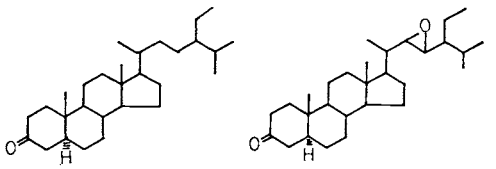
Les voies d, f, et g se distinguent par l'évolution des atomes d'hydrogène portés par le carbone 23 du précurseur *1*. Alors que la voie g implique l'élimination d'un des atomes d'hydrogène porté par le carbone 23, la voie d, f les conserve tous deux mais entraîne la migration de l'un d'eux du carbone 23 au carbone 24. Nous avons étudié ces possibilités par incorporation d'un mélange de [23-^{3}H]lanostérol et de [26,27-$^{14}C_2$]lanostérol ($^3H/^{14}C$ = 4,36 ± 0,1) préparé selon Akhtar et coll. [23]. Les cellules récoltées ont été saponifiées et la fraction correspondant aux phytostérols isolée.

Cette fraction a été acétylée et époxydée, l'acétate de stigmastanol (*11b*) (activité spécifique 34000 ± 860 dés./min) a un rapport $^3H/^{14}C$ (4,12 ± 0,21) comparable à celui du lanostérol introduit (4,36) et supérieur à celui de l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*) (3,32 ± 0,14) d'activité spécifique 19800 ± 340 dés. × min^{-1} × mg^{-1}. Les valeurs des activités spécifiques obtenues sont en accord avec une voie de biosynthèse où le composé saturé *11a* serait le précurseur du composé insaturé *12a*. Le rapport des radioactivités obtenu pour le composé *14b* (3,32) est compris entre les rapports 4,36 correspondant à la rétention des deux atomes de tritium et 2,18 correspondant à la perte d'un atome d'hydrogène en 23. Pour préciser si cette valeur est due à la manifestation d'un effet isotopique lors de la rupture des liaisons C-H et C-^{3}H, ou à l'existence de plusieurs voies de formation de la double liaison C-22, C-23, nous avons localisé les atomes de tritium dans le stérol *12a*. Les esters *p*-phenyl phenacyliques *15* ($^3H/^{14}C$ = 2,28 ± 0,31) et *16* ($^3H/^{14}C$ = 0,44 ± 0,15) ont été préparés à partir du composé *12a*. Les valeurs obtenues indiquent que la moitié de la radioactivité en tritium présente initialement en 23 sur le précurseur est localisée en 24; au cours de la double méthylation un des atomes d'hydrogène 23 du précurser a donc migré sur le carbone 24.



Cependant la valeur du rapport de radioactivité $^3H/^{14}C$ = 3,32 obtenue pour le composé *14b* indique que seul un quart de la radioactivité en tritium du précurseur est localisé en position 23; 25% des hydrogènes 23 ont donc été éliminés. Pour expliquer ces résultats nous avons envisagé l'existence pour le composé *12a* d'une deuxième voie de biosynthèse concurrente à d, f impliquant la migration d'un des hydrogènes initialement en 23 notamment par introduction de la double liaison C-22, C-23 sur la chaîne latérale saturée du stigmastanol (*11a*) biosynthétisé selon la voie d, e. Cette hypothèse nous a conduit à étudier la conversion du stigmastanol (*11a*) en stigmastèn-22,ol-3β (*12a*) et nous avons préparé le composé *11c* tritié en position 3α. Le stigmastanol a été oxydé par le réactif de Jones [18]

en stigmastanone (*17*), la réduction de ce composé par le borohydrure de sodium tritié conduit au [3α-^{3}H]stigmastanol (*11c*). Les cellules de *Dictyostelium discoïdeum* en croissance ont été incubées en présence de *11c*. Les cellules récoltées ont été saponifiées, la fraction neutre isolée (taux d'incorporation calculé par rapport à la radioactivité introduite 18,5 %).



17 *18*

La fraction correspondant aux phytostérols a été acétylée et époxydée. L'acétate de stigmastanol (*11b*) a été séparé de l'acétate d'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*) qui a une activité spécifique de 430 dés. $\times$ min^{-1} $\times$ mg^{-1}. Par saponification du composé *14b*, nous avons obtenu l'époxy-22,23 stigmastanol (*14a*) dont l'activité spécifique est identique à celle de l'acétate *14b*. L'oxydation de cet alcool conduit à l'époxy-22,23 stigmastanone (*18*) dépourvue de radioactivité. Ce résultat montre que la désaturation du composé saturé est possible et a lieu sans randomisation, et que la double liaison C-22, C-23 peut être introduite sur la chaîne latérale des stérols après l'alkylation en C-24.

Les résultats obtenus dans les différentes incorporations impliquent que la transformation du stérol insaturé en stérol saturé n'ait pas lieu. Pour vérifier ce point, nous avons incubé les cellules de *Dictyostelium discoïdeum* en présence de [3α-^{3}H]stigmastèn-22,ol-3β, (*12c*) préparé à partir de la stigmasténone par une méthode semblable à celle d'obtention du composé *11c*. Les cellules récoltées ont été saponifiées, la fraction neutre isolée a été chromatographiée dans les conditions habituelles. La fraction correspondant aux phytostérols a été acétylée et époxydée, l'acétate de l'époxy-22,23 stigmastanol (*14b*) a été séparé de l'acétate de stigmastanol (*11b*); le taux de transformation de *12c* en *11a* est de 0,61 %. Par saponification du composé *11b*, nous avons obtenu le stigmastanol (*11a*) dont l'activité spécifique est identique à celle de *11b*. L'oxydation de cet alcool par le réactif de Jones [17] conduit à la stigmastanone correspondante dépourvue de radioactivité.

Cette expérience montre que la transformation du composé 22,23 insaturé *12a* en stigmastanol (*11a*) est possible *in vivo* dans les conditions utilisées; cependant le taux de cette conversion (0,61 %), beaucoup plus faible que celui de la transformation inverse (4,7 %) indique que la transformation *11a* $\rightarrow$ *12a* est prépondérante *in vivo* par rapport à la réaction inverse.

En conclusion, les différentes incorporations que nous avons effectuées montrent que dans le Myxomycète *Dictyostelium discoïdeum* le lanostérol (*13*) peut être converti *in vivo* en stigmastanol (*11a*) et en stigmastèn-22,ol-3β (*12a*) sans perte de l'atome d'hydrogène porté par le carbone 24. La conversion de *13* en *12a* peut avoir lieu selon la voie de biosynthèse d, f qui implique la migration d'un atome d'hydrogène de 23 en position 24 ou par passage par le stigmastanol (*11a*), la double liaison C-22,C-23 étant introduite sur la chaîne latérale saturée après l'alkylation en C-24. Les résultats obtenus lors de l'incorporation du [23-^{3}H]lanostérol sont en faveur de la voie de biosynthèse d, e pour le stérol *11a*; en effet la conversion de *13* en *11a* a lieu sans perte des atomes d'hydrogène H-23 du lanostérol, d'autre part l'ester *p*-phenyl phénacylique *16* présente un rapport de radioactivité ^{3}H/^{14}C moitié de celui du lanostérol de départ ce qui indique qu'un atome d'hydrogène a migré de la position C-23 en C-24 lors de la biosynthèse du stérol *12a*. Compte tenu de la transformation *11a* $\rightarrow$ *12a* que nous avons mise en évidence, ce résultat signifie que la biosynthèse de *11a* a lieu avec migration d'un atome d'hydrogène de C-23 en C-24 compatible avec la voie de biosynthèse d, e. Cette interprétation des résultats sous-entend une élimination stéréosélective de l'un des hydrogènes du C-23 du lanostérol lors de la transformation *11a* $\rightarrow$ *12a*. Ce point est actuellement à l'étude.

Nous remercions très vivement Monsieur le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et les nombreuses suggestions qu'il nous a faites. MM. H. Felkin, J. F. Biellmann et P. Hunt pour de nombreuses discussions, le Professeur M. Akhtar pour l'envoi d'échantillons de lanostérol radioactif, Mlle E. Zissmann pour la préparation des cultures du myxomycète et le Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay) pour une subvention ayant facilité l'achat de molécules marquées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Castle, M., Blondin, G., et Nes, W. R., *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 3306.
2. Bader, S., Guglielmetti, L., et Arigoni, D., *Proc. Chem. Soc.* (1964) 16.
3. Villanueva, V. R., Barbier, M., et Lederer, E., *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1964) 1423.
3a. Villanueva, V. R., Barbier, M., et Lederer, E., dans *Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1965, p. 509.
4. Hügel, M. F., Vetter, W., Audier, H., Barbier, M., et Lederer, E., *Phytochemistry*, 3 (1964) 7.
5. Lederer, E., *Biochem. J.* 93 (1964) 449.
5a. Lederer, E., *Experimentia*, 20 (1963) 473.
5b. Lederer, E., *Israel J. Med. Sci.* 1 (1965) 1120.
5c. Lederer, E., *Quart. Rev.* 23 (1969) 453.
6. Mercer, E. J., *Biochem. J.* 96 (1965) 17 P.

7. Goad, L. J., Hamman, A. S. A., Dennis, A., et Goodwin, T. W., *Nature*, 210 (1966) 1322.
8. Smith, A. R. H., Goad, L. J., Goodwin, T. W., et Lederer, E., *Biochem. J.* 104 (1967) 56 C.
9. Lecompte, M. F., Thèse de 3e cycle, Faculté des Sciences d'Orsay, 1969.
10. Lenfant, M., Zissmann, E., et Lederer, E., *Tetrahedron Lett.* (1967) 1049.
11. Lenfant, M., Ellouz, R., Das, B. C., Zissman, E., et Lederer, E., *Eur. J. Biochem.* 7 (1968) 159.
12. Tomita, Y., Umori, A., et Minato, H., *Phytochemistry*, 9 (1970) 555.
13. Ellouz, R., et Lenfant, M., *Tetrahedron Lett.* (1969) 609.
14. Ellouz, R., et Lenfant, M., *Tetrahedron Lett.* (1969) 2655.
15. Ellouz, R., et Lenfant, M., *Tetrahedron Lett.* (1970) 3967.
16. Bonner, J. T., *The Cellular Slime Molds*, University Press Princeton, N.J. 1959.
17. Narula, S. A., et Dev, S., *Tetrahedron Lett.* (1969) 1733.
18. Pappas, J. J., et Keavency, W. P., *Tetrahedron Lett.* (1966) 4273.
19. Akhtar, M., Hunt, P. F., et Parvez, M. A., *Chem. Commun.* (1966) 565 et *Biochem. J.* 103 (1967) 616.
20. Raab, K. H., de Souza, N. J., et Nes, W. R., *Biochim. Biophys. Acta*, 152 (1968) 742.
21. Goad, L. J., et Goodwin, T. W., *Eur. J. Biochem.* 7 (1969) 502.
22. Bolger, L. M., Rees, H. H., Ghisalberti, E. L., Goad, L. J., et Goodwin, T. W., *Biochem. J.* 108 (1970) 197.
23. Akhtar, M., Parvez, M. A., et Hunt, P. F., *Biochem. J.* 106 (1968) 623.
24. Akhtar, M., Parvez, M. A., et Hunt, P. F., *Biochem. J.* 113 (1969) 727.
25. Bennet, R. D., et Heftmann, E., *Steroids*, 14 (1969) 403.

R. Ellouz
Institut de Chimie des Substances Naturelles, C. N. R. S.
F-78 Gif-sur-Yvette, France

Adresse actuelle de M. Lenfant:
Département de Biochimie, Faculté de Médecine
Université de Montréal, Boîte postale 6128, Montréal, Canada