

LE 24-MÉTHYLÈNE CHOLESTÉROL (ERGOSTA 5,24 (28) — DIÈNE 3 β — OL

M. BARBIER

Institut de Chimie des Substances naturelles, 91 - Gif-sur-Yvette

SOMMAIRE

Nous présentons une revue sur le 24-méthylène cholestérol, constituant habituel des pollens. Après un historique, la signification biologique de ce stérol chez les végétaux et chez l'Abeille est discutée.

HISTORIQUE

Il est connu depuis longtemps que les mollusques, en particulier l'huître, peuvent contenir d'autres stérols que le cholestérol (TSUJIMOTO et KOYANAGI, 1934). BERGMANN (1934) a décrit les propriétés d'un stérol isolé de l'huître *Ostrea virginica* : l'ostréastérol. En 1945, BERGMANN, SCHEDL et LOW, ont isolé un autre stérol, de l'éponge *Chalina arbuscula* : le chalinastérol. BERGMANN, FINEY et SWIFT, montraient ensuite (1951) que le chalinastérol était présent chez diverses anémones de mer. Les propriétés de l'ostréastérol et celles du chalinastérol sont assez semblables et il se pouvait que ces deux stérols soient identiques ; (BERGMANN et LOW, 1947 ; CAHNEMANN, 1956). BERGMANN et DUSZA (1957) reconnaissaient que leurs préparations d'ostréastérol et de chalinastérol n'étaient pas pures, et qu'en conséquence, les propositions de structures devaient être incorrectes.

Un échantillon pur fut isolé pour la première fois en 1955 par IDLER et FAGERLUND, à partir de l'huître *Ostrea gigas* (36 p. 100 de la fraction stérolique totale), puis du clam *Saxidomus giganteus* (53 p. 100 de la fraction stérolique totale). A cet effet, les stérols bruts ont été précipités sous forme de digitonides ; les *p*-phénylazo-benzoyl-stérols furent préparés et fractionnés par chromatographie sur colonne de silicagel. Cette chromatographie a conduit à quatre fractions ; la seconde fournit le stérol pur, après saponification, acétylation et traitement par l'anhydride maléique, dans le but d'éliminer les $\Delta - 5,7$ stérols (environ 9 p. 100). Les travaux de IDLER et FAGERLUND ont abouti pour ce stérol à la structure chimique d'un 24-méthylène

cholestérol (ergosta-5,24 (28)-diène 3- β -ol). L'hydrogénation catalytique a conduit au campestanol et l'ozonisation ménagée au 24-céto cholestérol avec libération de formaldéhyde. Le 24-méthylène cholestérol a été synthétisé en 1957 par FAGERLUND et IDLER, et par BERGMANN et DUSZA. Il est obtenu par réaction de Wittig sur le 24-céto cholestérol ; ce dernier est préparé par condensation du chlorure de l'acide 3- β hydroxy Δ -5- cholénique sur le cadmien du bromure d'isopropyle.

TABLEAU I
Analyse des stérols de divers pollens

Pollen	P.100 Pureté du pollen	P.100 d'insapo- nifiable	P.100 stérols bruts	Principaux stérols
Pommier (<i>Pirus malus</i>)	60	1	0,1	60 % de 24-méthylène cholestérol (1)
Saule (<i>Salix</i> sp.)	72	1,9	0,2	50 % de 24-méthylène cholestérol (1) 25 % de β -sitostérol
Bruyère (<i>Calluna vulgaris</i>)	87	1,8	0,15	80 % de stigmastérol (1) 10 % de 24-méthylène-cholestérol 10 % de β -sitostérol
Mixte :				
<i>Sinapis arvensis</i>	50			60 % de cholestérol
<i>Hypochoeris radicata</i>	50	2,8	0,7	présence du pollinastanol (1)
Porcelle (<i>Hypochoeris radicata</i>)	100	6	0,9	90 % de cholestérol (1)
Orchidée (<i>Cymbidium</i> sp.)	100	2,6	0,15	80 % de β -sitostérol (1)
Mixte (composition inconnue)	—	2,9	0,15	Stérols en C ₂₇ : 15 % (2) Stérols en C ₂₈ : 50 % Stérols en C ₂₉ : 35 %
Châtaigner (<i>Aesculus hippocastanum</i>)	85	2,8	0,1	Stérols en C ₂₇ : 3 % (2) Stérols en C ₂₈ : 23 % Stérols en C ₂₉ : 74 %
Noisetier (<i>Corylus avellana</i>)	100	—	—	Stérols en C ₂₇ : 0 % Stérols en C ₂₈ : 25 % Stérols en C ₂₉ : 75 %
Maïs (<i>Zea mays</i>)	100	2,6	0,15	59 % de 24-méthylène cholestérol 17 % de β -sitostérol 12 % de campestérol 12 % de stigmastérol
Pin (<i>Pinus montana</i>)	100	1,9	0,14	β -sitostérol 65 % campestérol 17 % Stigmastérol 9 % 24-méthylène cholestérol : trace cholestérol 8 %

(1) Résultats évalués d'après les analyses par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse.

(2) Évaluation par spectrométrie de masse des acétates hydrogénéés.

BERGMANN et DUSZA (1957) ont montré que le 24-méthylène cholestérol préparé par synthèse, était identique à l'ostréastérol et au chalinastérol.

FAGERLUND et IDLER (1956) ont également isolé et identifié le 24-méthylène

cholestérol à partir de trois autres mollusques : la Coquille Saint-Jacques *Pecten caurinus*, la coque *Cardium corbis*, et la moule *Modiolus demissus*. Récemment, SALAQUE, BARBIER et LEDERER (1966 a et b) ont effectué l'analyse par spectrométrie de masse des stérols de quatre invertébrés marins ; l'anémone de mer *Calliactis effoeta* et l'oursin *Paracentrotus lividus* contiennent peu de 24-méthylène cholestérol, le cholestérol étant le principal stérol ; la Coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* et l'huître *Ostrea gryphea* par contre, contiennent le 24-méthylène cholestérol en quantités plus abondantes.

En 1959, BARBIER et SCHINDLER ont étudié la fraction stérolique des reines ainsi que des ouvrières d'abeilles *Apis mellifica* L. Ils ont montré que le principal stérol de ce mélange était le 24-méthylène cholestérol. L'identité ressort de la comparaison directe des propriétés physiques, des spectres infrarouges et des spectres de masse, ainsi que de l'étude des produits de l'ozonisation ménagée ; (BARBIER, REICHSTEIN, SCHINDLER, LEDERER 1959).

En 1960, BARBIER, HÜGEL et LEDERER isolaient le 24-méthylène cholestérol de divers pollens ; il n'y a donc pas de doute que la présence de ce stérol chez l'abeille soit d'origine alimentaire. L'analyse des stérols des pollens par spectrométrie de masse, (HÜGEL, VETTER, AUDIER, BARBIER, LEDERER, 1964 ; HÜGEL 1964, DEVYS et BARBIER, 1965) a permis de montrer la généralité de la présence du 24-méthylène cholestérol dans les pollens. Cependant, il n'est pas toujours le stérol le plus abondant (DEVYS et BARBIER, 1965). Le tableau 1 résume les résultats obtenus au cours de ces analyses.

La présence du cholestérol dans le pollen de la Porcelle est étonnant : c'est la première fois que ce stérol est trouvé avec une telle abondance dans les cellules d'un végétal supérieur.

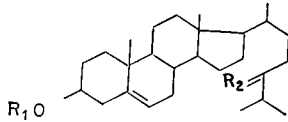
L'existence d'un groupe méthylène dans une position analogue se retrouve dans d'autres stérols. Citons pour mémoire certains stérols isolés des levures : épistérol, fécostérol, 24 (28)-déhydro-ergostérol, les acides éburicoïque, polyporénique, tumulosique, isolés de divers champignons (*Polyporus* sp.), ou bien le cycloecalérol (de l'eucalyptus) et l'euphorbol (isolé d'une euphorbe) ; pour une revue à ce sujet, voir par exemple FIESER et FIESER (1959).

Nous reportons dans le tableau 2 les constantes physiques du 24-méthylène cholestérol et de quelques dérivés.

SIGNIFICATION BIOLOGIQUE DU 24-MÉTHYLÈNE CHOLESTÉROL,

Les analyses des stérols des pollens par spectrométrie de masse (HÜGEL, VETTER, AUDIER, BARBIER, LEDERER, 1964) ont mis en évidence l'existence dans les pollens d'une série de stérols ne différant entre eux que par les substitutions de leur chaîne latérale en position 24. On trouve ainsi des stérols possédant des chaînes latérales identiques à celles du cholestérol, du desmostérol, du campestérol, du β -sitostérol et du stigmastérol. Une hypothèse a alors été émise selon laquelle le 24-méthylène cholestérol serait dans cette série un intermédiaire de biosynthèse. Il proviendrait d'une méthylation du desmostérol par la méthionine et pourrait par méthylation ultérieure et réduction, conduire au β -sitostérol (fig. 1). (Pour des revues à ce sujet, voir LEDERER (1964) et VILLANUEVA, BARBIER et LEDERER (1964).

TABIEAU 2



Constantes physiques du 24-méthylène cholestérol et de quelques dérivés

Substances	F	(α) _D (chloroforme)
24-méthylène cholestérol (R ₁ = H) (R ₂ = CH ₂)	143°	— 34,8°
Acétate de 24-méthylène cholestérol (R ₁ = CH ₃ CO) (R ₂ = CH ₂)	135°	— 44°
Benzoate de 24-méthylène cholestérol (R ₁ = C ₆ H ₅ CO) (R ₂ = CH ₂)	148°	— 14°
24-céto cholestérol (R ₁ = H) (R ₂ = O)	136°	— 35°
Acétate de 24-céto cholestérol (R ₁ = CH ₃ CO) (R ₂ = O)	128°	— 40°
Oxime du 24-céto cholestérol (R ₁ = H) (R ₂ = N-OH)	169°	—

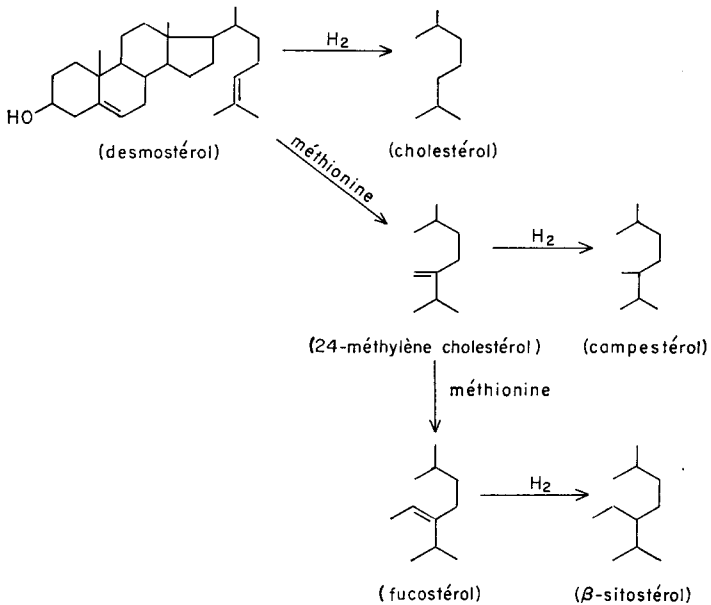


FIG. 1.

Il n'était pas exclu cependant que de telles méthylations de la chaîne latérale puissent se produire avant la déméthylation complète des produits de cyclisation du squalène. Dans ce cas, le 24-méthylène cholestérol serait un produit final et non un produit intermédiaire. L'existence de « séries biosynthétiques » de méthylstérol et de cyclopropylméthylstérols, ne différant entre eux que par leur chaîne latérale s'expli-

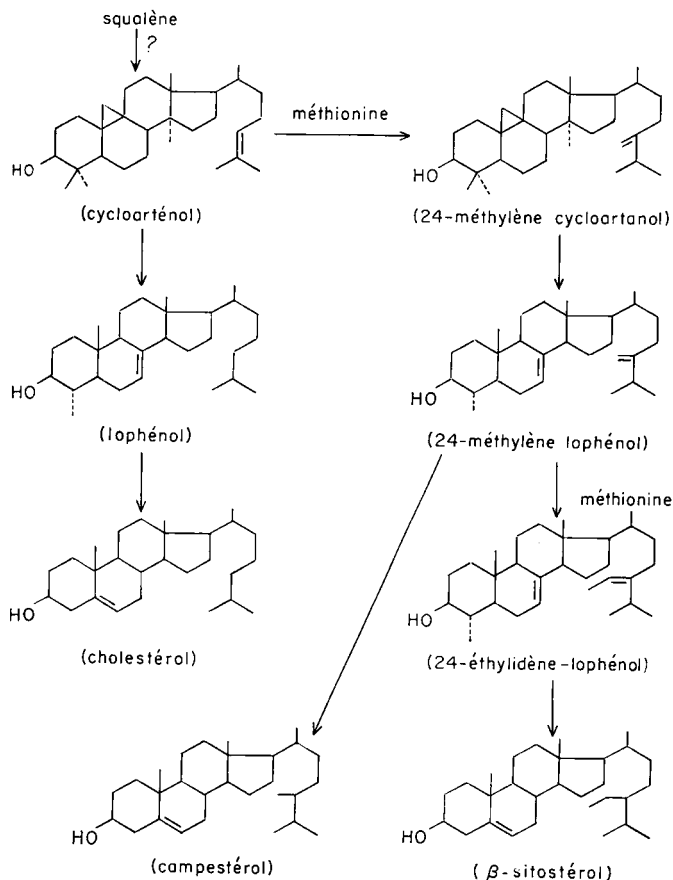


FIG. 2. — Hypothèse de biosynthèse des stérols chez la Pomme de terre, selon SCHREIBER et al. (1965).

querait par cette hypothèse. A la suite de l'isolement et de l'identification du pollinastanol, nouveau méthyl cyclopropylstanol d'un pollen (HÜGEL, BARBIER, LEDERER, 1964) on avait pu constater la présence dans ce même pollen d'une « série biosynthétique » de méthylcyclopropylstanols, ne différant entre eux que par leurs chaînes latérales (HÜGEL, BARBIER, 1962).

Les travaux récents de BENVENISTE, HIRTH et OURISSON (1966) sur le métabolisme des stérols chez le tabac cultivé *in-vitro*, et ceux de SHREIBER et al. (1965) sur les stérols de la pomme de terre, apportent des éléments en faveur d'une telle hypothèse. Le cycloarténol pourrait être l'intermédiaire sur lequel porterait la première méthylation par la méthionine (voir fig. 2). BENVENISTE, HIRTH et OURISSON (1966)

ont montré que dans le cas du tabac cultivé *in vitro*, le lanostérol n'était pas un intermédiaire entre le squalène et les phytostérols.

On peut s'interroger sur l'origine du 24-méthylène cholestérol chez certains invertébrés marins. En effet, ce stérol est un phytostérol; les travaux de TAMURA, TRUSCOTT et IDLER (1964) montrent l'existence d'une biosynthèse du cholestérol et du 24-méthylène cholestérol chez l'huître. Cependant les recherches de SALAQUE, BARBIER et LEDERER (1966) aboutissent à un résultat inverse. Il est vraisemblable (mais non encore démontré) que le 24-méthylène cholestérol des invertébrés marins phytophages provient de leur nourriture, c'est-à-dire du plancton.

Sélon DUPÉRON, HÜGEL, SIPAL et BARBIER (1964) l'abeille ne transforme pas de façon notable les phytostérols du pollen en cholestérol. Il est vrai que l'abeille peut trouver dans les pollens des quantités non négligeables de cholestérol. Les stérols des pollens se retrouvent dans la gelée royale (BOGDANOVSKY, BARBIER, 1961). BARBIER (1962) a trouvé que les extraits de reines d'abeille contenaient le 24-céto cholestérol et la 24-méthylène cholestène-4 one-3; ces substances sont présentes à l'état de traces et il n'a pas pu être démontré qu'il ne s'agissait pas d'artefacts.

Pour une revue plus générale sur les constituants des pollens, voir HÜGEL (1962).

Reçu pour publication en juin 1966.

SUMMARY

THE 24-METHYLENECHOLESTEROL (ERGOSTA 5,24 (28) DIENE-3 β -OL)

The author gives a review of 24-methylenecholesterol, a usual constituent of pollen. After a fairly long historical introduction, the biological significance of this sterol in plants is discussed. A bibliography is attached.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARDENNE M., OSSKE G., SCHREIBER K., STEINFELDER K., TÜMLER R., 1965. Über die Sterine von *Solanum tuberosum* Sterine und Triterpenoide VII. Mitteilung. *Die Kulturpflanze*, **13**, 101-113.
- BARBIER M., 1962. Résultats inédits.
- BARBIER M., BOGDANOVSKY D., 1961. Isolement et identification du 24-méthylène cholestérol à partir des larves de reines d'abeilles et de la gelée royale. *C. R. Acad. Sci.*, **252**, 3497-3498.
- BARBIER M., HÜGEL M. F., LEDERER E., 1960. Isolement du 24-méthylène cholestérol à partir du pollen de différentes plantes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 91-97.
- BARBIER M., REICHSTEIN T., SCHINDLER O., LEDERER F., 1959. Isolation of 24-methylen cholesterol from honey bees. *Nature*, **184**, 732-733.
- BARBIER M., SCHINDLER O., 1959. Isolierung von 24-methylen cholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica*) L. *Helv. Chim. Acta*, **42**, 1998-2005.
- BENVENISTE P., HIRTH L., OURISSON G., 1966. Biosynthèse des stérols dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*. I. Isolement de stérols et de triterpènes. *Phytochemistry*, **5**, 31-44. II. Particularités de la biosynthèse des phytostérols des tissus de tabac cultivés *in vitro*. *Phytochemistry*, **5**, 45-58.
- BERGMANN W., 1934. Marine products. II. The sterols of mollusks. *J. Biol. Chem.*, **104**, 317-328. Marine products. III. The chemistry of ostreasterol. *J. Biol. Chem.*, **104**, 553-557.
- BERGMANN W., DUSZA J. B., 1957. Beiträge zur Chemie der Meeresprodukte. XLII, 24-methylen Cholesterin. *Ann. Chem.*, **603**, 36-43.
- BERGMANN W., FEENEY R. J., SWIFT A. N., 1951. Marine products. XXXI. Palynasterol and other lipid compounds of sea anemones. *J. Org. Chem.*, **16**, 1337-1344.

- BERGMANN W., LOW E. M., 1947. Marine products. XX. Structure of sterols from marine invertebrates. *J. Org. Chem.*, **12**, 67-75.
- BERGMANN W., SCHEDL H. P., LOW E. M., 1945. Marine products. XIX. Chalinasterol. *J. Org. Chem.*, **10**, 587-593.
- CAHNEMANN H. J., 1956. The infra-red spectrum of ostreasterol (chalinasterol). *J. Org. Chem.*, **21**, 1412-1414.
- DEVYS M., BARBIER M., 1965. Le cholestérol, principal stérol du pollen d'une composée, la Porcelle, *Hypochoeris radicata*. *C. R. Acad. Sci.*, **261**, 4901-4903.
- DUPÉRON P., HÜGEL M. F., SIPAL Z., BARBIER M., 1964. Analyse des stérols d'insectes phytophages par spectrométrie de masse. *Comp. Biochem. Physiol.*, **11**, 257-262.
- FAGERLUND U. H. M., IDLER D. R., 1956. Marine sterols. II. 24-methylen cholesterol in mollusks. *J. Org. Chem.*, **21**, 372-373.
- FIESER M. F., FIESER M., 1959. *Steroids*, Reinhold, New York.
- HÜGEL M. F., 1962. Étude de quelques constituants du pollen. *Ann. Abeille*, **5**, 97-133.
- HÜGEL M. F., 1964. Sur les stérols du pollen. Thèse de Docteur-Ingénieur, Paris.
- HÜGEL M. F., BARBIER M., 1962. Résultats inédits.
- HÜGEL M. F., BARBIER M., LEDERER E., 1964. Sur le pollinastanol, nouveau stérol du pollen. *Bull. Soc. Chim.*, 2012-2013.
- HÜGEL M. F., VETTER W., AUDIER H., BARBIER M., LEDERER E., 1964. Analyse des stérols du pollen par spectrométrie de masse. *Phytochemistry*, **3**, 7-16.
- IDLER D. R., FAGERLUND U. H. M., 1955. Marine sterols. I. Isolation of 24-methylen cholesterol from mollusks. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4142-4144.
- IDLER D. R., FAGERLUND U. H. M., 1957. Marine sterols. II The synthesis of 24-methylen cholesterol. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1988-1991.
- LEDERER E., 1964. The origin and function of some methyl groups in branched chain fatty acids, plant sterols, and quinones. 2nd jubilee lecture of the Biochem. Soc. Lond. *Biochem. J.*, **93**, 449-468.
- SALAQUE A., BARBIER M., LEDERER E., 1966 a). Sur la biosynthèse des stérols de l'huître *Ostrea gryphea* et de l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Comp. Biochem. Physiol.* (sous presse).
- SALAQUE A., BARBIER M., LEDERER E., 1966 b). Résultats inédits.
- TAMURA T., TRUSCOTT B., IDLER D. R., 1964. Sterol metabolism in the oyster. *J. Fisheries Res. Board of Canada*, **21**, 1519-1522.
- TSUJIMOTO M., KOYANAGI H., 1934. The fatty substances of oysters and four other shellfish. *J. Soc. Chem. Ind. Japan*, **37**, 436-439.
- VILLANUEVA V. R., BARBIER M., LEDERER E., 1964. Sur la biosynthèse de la chaîne latérale éthyli-dène du fucostérol par double méthylation par la méthionine. *Bull. Soc. Chim.*, 1414-1423.
-