

56. Biosynthèse de la farnésylacétone-(*E, E*) par les glandes androgènes du crabe *carcinus maenas*

par Jean-Pierre Férézou, Michel Barbier

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

et Josette Berreur-Bonnenfant

Laboratoire de Biologie et de Génétique Evolutives, CNRS, F-91190 Gif-sur-Yvette, France

Dédié au Professeur *Edgar Lederer*, en l'honneur de son 70^e anniversaire

(11.1.78)

Biosynthesis of *E, E*-farnesylacetone by the androgenic glands of the crab *Carcinus maenas*

Summary

Using sodium acetate-1,2-[¹⁴C] or mevalonic acid-2-[¹⁴C], the biosynthesis of (*E, E*)-farnesylacetone **1** by the androgenic glands of the crab *Carcinus maenas*, kept as organ subculture is demonstrated. Ozonolysis of the NaBH₄ reduction product **3** leads to three fragments the radioactivity of which has been measured after isolation by GC. It is thus established that the biosynthesis of **1** proceeds through geranylgeraniol. The hexahydroderivative **2** is not labelled in the two experiments.

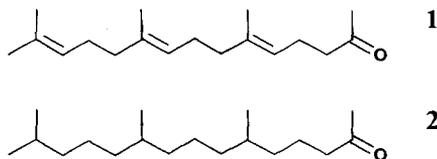
1. Introduction. - La recherche de substances biologiquement actives produites par les glandes androgènes du crabe *Carcinus maenas* a conduit à l'isolement d'une fraction lipidique [1] [2]. L'analyse de cette fraction par chromatographie gaz-liquide (CPG.) couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier deux cétones isoprénoïdes: la triméthyl-6, 10, 14-pentadécatriène-5, 9, 13-one-2-(*E, E*) (farnésylacétone) **1** et la triméthyl-6, 10, 14-pentadécane-2 (hexahydrofarnésylacétone) **2** [3]. La farnésylacétone **1** possède *in vitro* et *in vivo* une partie des activités biologiques de l'extrait total.

In vitro [1] la substance **1** inhibe l'incorporation de leucine-[³H] dans des ovaires d'*Orchestia gammarellus* pour des concentrations voisines de 2 ng/ml (10⁻⁸ M). Des injections (2 µl) de **1** (1 µg/ml) induisent chez des femelles de *Talitrus Saltator* la coloration antennaire [4], caractère sexuel secondaire mâle. Un autre effet biologique de l'extrait lipidique des glandes androgènes et de la farnésylacétone est l'inhibition des méthylations biologiques des tRNA [5] [6].

Le problème de l'origine biologique de ces cétones étroitement apparentées est intéressant. En effet, si la farnésylacétone **1** isolée pour la première fois en tant que produit naturel de la tomate [7] n'a pas été identifiée à notre connaissance dans le milieu marin, il n'en est pas de même pour la cétone saturée **2** présente dans les sédiments marins [8] ainsi que dans les vases [9]. De plus, *in vitro*, **2** est l'un des principaux produits de la dégradation oxydative de la chaîne phytyle de la chlorophylle

[10], transformation qui pourrait être d'ordre microbiologique et interviendrait durant les premières étapes de la diagenèse. Une autre hypothèse retenue est la formation de cette cétone à partir du norphytène provenant du phytol accumulé par le zooplancton [8] [11].

L'identification de la farnésylacétone et de l'hexahydrofarnésylacétone chez le crustacé *Carcinus maenas* a permis d'envisager l'existence d'une voie de biosynthèse *de novo* des deux cétones dans la glande androgène *via* le pyrophosphate de géranyl-géraniol. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons étudié l'incorporation d'acétate et de mévalonate marqués dans **1** et **2** par des glandes androgènes en culture.



2. Incorporation de l'acétate de sodium-1,2- ^{14}C . – Dans un premier essai nous avons incubé en milieu gélosé stérile deux lots de glandes androgènes en présence d'acétate de sodium-1,2- ^{14}C , respectivement pendant 24 h et 72 h. La fraction biologiquement active contenant **1** et **2** [2] est obtenue par extraction et purification chromatographique après addition d'entraîneurs. Cette fraction est ensuite analysée

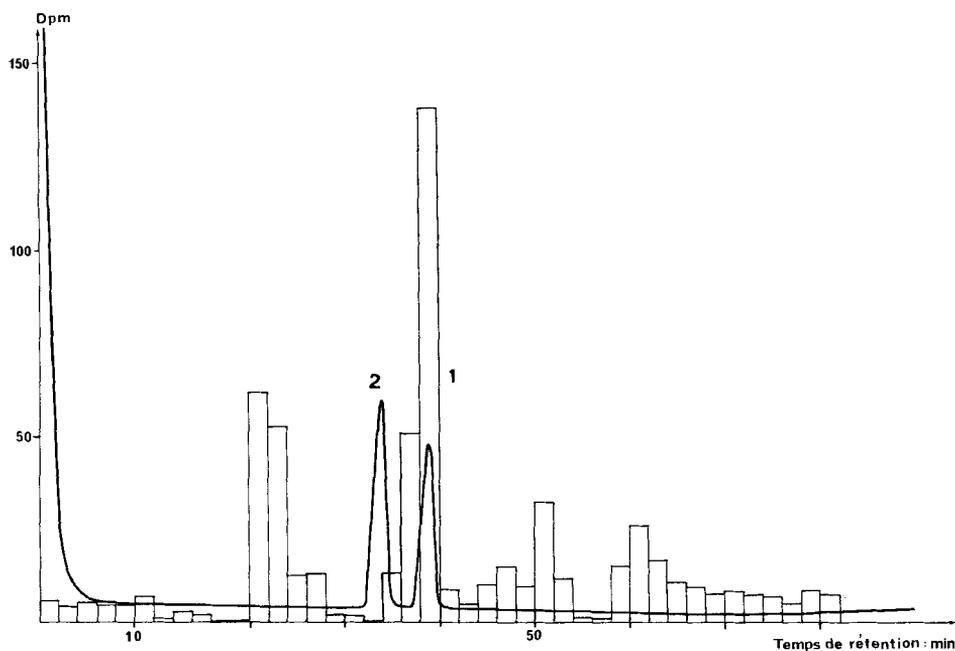


Fig. 1. Analyse par CPG. de l'incorporation d'acétate de sodium-1,2- ^{14}C dans les cétones **1** et **2** après 72 h de culture ($1,2 \cdot 10^3$ dpm injectés)

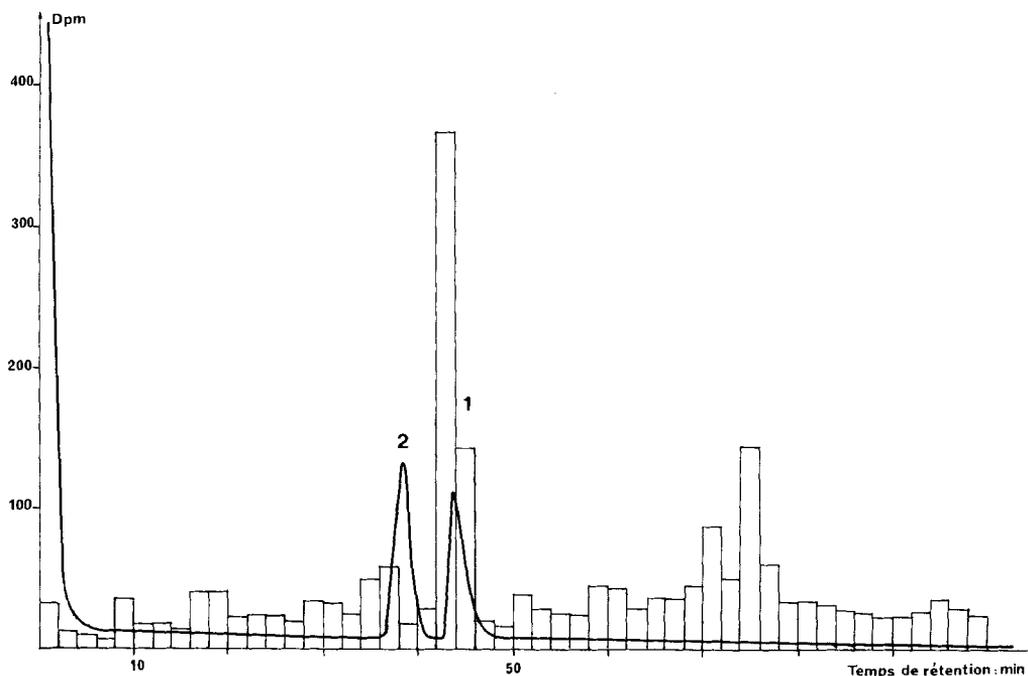


Fig. 2. Analyse par CPG. de l'incorporation d'acide mévalonique-2-[¹⁴C] dans les cétones **1** et **2** après 72 h de culture ($9 \cdot 10^3$ dpm injectés)

par CPG. préparative (fig. 1), par chromatographie sur couche mince (CCM.) d'alumine imprégnée de nitrate d'argent, et par CCM. d'acide silicique des dinitro-2,4-phénylhydrazones. Dans chaque cas la radioactivité des deux composés **1** et **2** ou de leurs dérivés est mesurée. Les résultats figurent dans le tableau. La radioactivité est seulement présente dans la farnésylacétone **1** aussi bien après 24 h qu'après 72 h d'incubation. Remarquons d'autre part une faible incorporation de l'acétate au niveau d'autres métabolites non identifiés.

3. Incorporation de l'acide mévalonique-2-[¹⁴C]-(R,S). - Nous avons complété l'expérience précédente en utilisant l'acide mévalonique-2-[¹⁴C], précurseur plus

Tableau. Incorporation de l'acétate de sodium-1,2-[¹⁴C] et de l'acide mévalonique-2-[¹⁴C] (R,S) dans des glandes androgènes maintenues en culture.

	Acétate-[¹⁴ C] 250 glandes		Mévalonate-[¹⁴ C] 2000 glandes
	24 h dpm	72 h dpm	72 h dpm
Précurseur	$5,5 \cdot 10^8$	$5,5 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9$
Extrait	$1,5 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^7$
CCM.	$8,4 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^6$
Sephadex LH 20	$2,2 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^5$
CPG. { 1	$4,5 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^2$	$1,7 \cdot 10^4$
{ 2	0	0	0

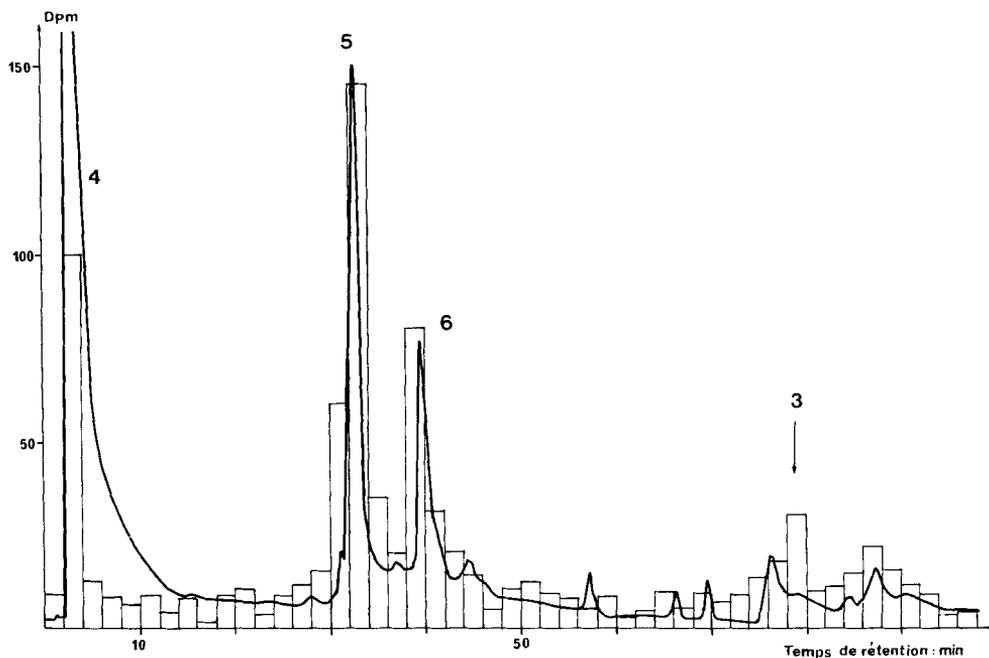
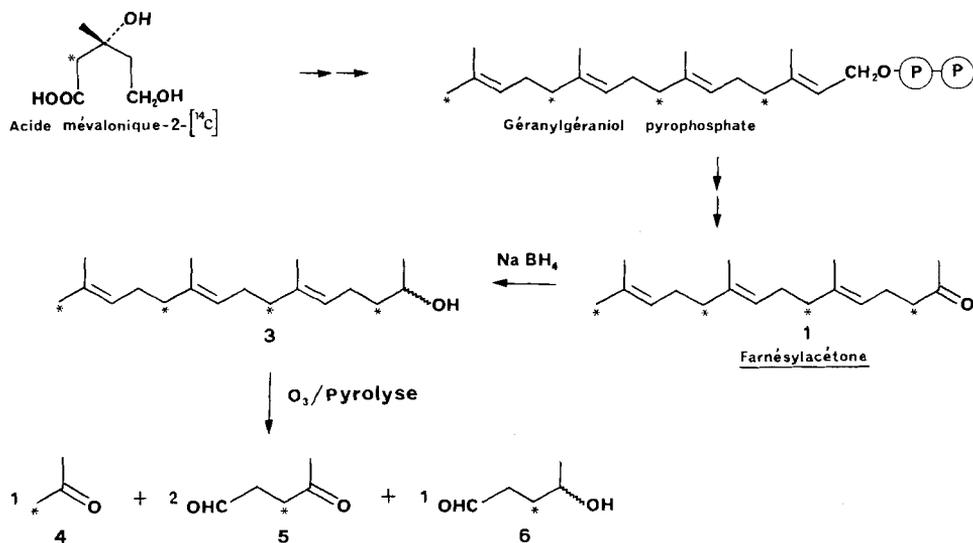


Fig. 3. Analyse par CPG. de la radioactivité présente dans les fragments d'ozonisation de l'alcool 3 ($5 \cdot 10^3$ dpm injectés)

spécifique des terpènes qui permettait en outre d'envisager une dégradation ultérieure de la molécule de farnésylacétone **1** afin de vérifier son origine diterpénique. Une quantité plus importante de glandes androgènes a été incubée lors de cette expérience pour augmenter les incorporations. Après 3 jours, les glandes androgènes ont été traitées comme précédemment. Les résultats de CPG. représentés Fig. 2 confirment l'incorporation du précurseur seulement au niveau de la farnésylacétone.

Une partie aliquote de la fraction isolée sur Sephadex LH 20 est réduite par NaBH_4 . Après purification, l'alcool **3** correspondant à la farnésylacétone **1** est ozonisé selon la technique de Blumer [11]. Les ozonides obtenus sont directement pyrolysés dans l'injecteur du chromatographe. La réduction permet de différencier l'hydroxyaldéhyde **6** provenant du reste carbonyle de la farnésylacétone, du fragment cétoaldéhyde **5** (Schéma). Après l'analyse en CPG., les fragments obtenus sont recueillis et leur radioactivité mesurée (Fig. 3). Les rapports des radioactivités pour les fragments **4** (acétone), **5** (oxo-2-pentanal), **6** (hydroxy-2-pentanal) sont voisins de 1:2:1 (Fig. 3), ce qui indique bien l'incorporation de 4 unités mévaloniques dans la molécule de farnésylacétone **1** (Schéma).

4. Conclusion. - La glande androgène du crabe *Carcinus maenas* incorpore donc en culture le mévalonate dans la farnésylacétone **1**. L'étape importante de cette biosynthèse est l'oxydation du géranylgeraniol intermédiaire (vraisemblablement sous forme de pyrophosphate). Il n'a pas été possible d'observer l'incorporation des



précurseurs utilisés dans l'hexahydrofarnésylacétone **2**. La question reste donc posée de savoir s'il existe une possibilité de réduction de la farnésylacétone en hexahydrofarnésylacétone chez les crustacés *in vivo*, selon un processus plus lent ou dans un autre organe par exemple. Il n'est pas exclu que l'hexahydrofarnésylacétone **2**, déjà identifiée dans les sédiments marins, provienne de la dégradation de la chaîne phytyle de la chlorophylle, hypothèse déjà retenue par différents auteurs [8] [9]. Cette cétone pourrait alors avoir une origine exogène ou être formée par dégradation oxydative *in vivo*.

Nous remercions le Professeur *E. Lederer* pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et le *Dr M. Suchý*, Dübendorf, Suisse, pour des échantillons de farnésylacétone et d'hexahydrofarnésylacétone. Nous remercions Mmes *M. C. Carré*, *D. Duchêne* et *M. C. Fried-Montaufier* pour leur collaboration technique.

Partie expérimentale

Culture d'organes. Le milieu stérile solide est composé de gélose à 0,5% dans de l'eau de mer filtrée, glucosée à 1% et additionnée de Pénicilline (100 UI/ml).

Les organes sont prélevés sur des crabes mâles *Carcinus maenas* provenant de Roscoff (Bretagne). Ils sont déposés sur le milieu à raison de 10 glandes androgènes pour 1 ml de milieu; 10 glandes androgènes (sans le canal déférent) pèsent environ 200 μg (poids humide).

Incorporation de l'acétate de sodium. 2 lots de 250 glandes sont cultivés en présence de 0,5 mCi d'acétate de sodium-1,2- $[^{14}\text{C}]$ (activité spécifique 96,8 mCi/mM) en solution aqueuse stérile.

La culture est arrêtée après 24 h d'incubation pour le 1er lot et après 72 h pour le 2e lot. Les glandes sont congelées et conservées à -30° . En fin de culture les organes sont bien vivants et ne présentent pas de traces d'infection bactérienne ou fongique.

Incorporation de l'acide mévalonique. 2000 glandes androgènes sont cultivées durant 72 h en présence de 0,5 mCi d'acide mévalonique-2- $[^{14}\text{C}]$ (*R,S*) (activité spécifique 36,5 mCi/mM) et sont ensuite traitées de la même façon que pour l'expérience précédente.

Purification de la farnésylacétone 1 et de l'hexahydrofarnésylacétone 2. Les glandes sont broyées au mortier puis extraites successivement par 10 ml d'éthanol, éthanol/éther 1:1 et éther. Après concentration sous pression réduite, l'extrait total additionné d'eau est repris par l'éther. Après extraction, séchage

sur Na_2SO_4 et addition de 1 mg de farnésylacétone et 1 mg d'hexahydrofarnésylacétone, la fraction lipidique obtenue est chromatographiée sur couche mince de SiO_2 F 254 *Schleicher-Schüll* (0,25 mm) avec le mélange benzène/éther 9:1 (Rf 0,73 pour **1** et 0,75 pour **2**). La zone biologiquement active de Rf 0,6-0,8 est recueillie et fractionnée sur colonne de Sephadex LH 20 (CHCl_3). Les analyses ultérieures ont toujours été effectuées sur des parties aliquotes de la fraction ainsi purifiée contenant l'hexahydrofarnésylacétone **2** et la farnésylacétone **1**.

Chromatographie gaz-liquide (CPG). La séparation de **1** et **2** est effectuée en CPG. préparative (*Varian 1400*) (colonne de Pyrex, 2 m, \varnothing intérieur 3 mm, OV1 2% sur Chromosorb WHP 100-200; 1°/min de 110 à 250°, N_2 : 10 ml/min), en recueillant à -60° les fractions toutes les 2 min.

Chromatographie sur couche mince (CCM). Une partie (10%) de la fraction purifiée ayant incorporé l'acétate- ^{14}C est chromatographiée sur couche mince d' $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AgNO}_3$ (30 g Al_2O_3 , 10 g AgNO_3 , 5 g plâtre). Le développement est effectué par le mélange hexane/chloroforme 9:1 (Rf **1**: 0; Rf **2**: 0,2) puis hexane/ CHCl_3 /acétate d'éthyle 5:4:1 (Rf **1**: 0,37; Rf **2**: 0,94) (révélation latérale par la dinitro-2,4-phénylhydrazine à 0,1% dans l'acide chlorhydrique conc./EtOH 1:9 ou par l'acide sulfurique à 50% à 100°). Une autre partie (10%) de la même fraction est traitée par la dinitro-2,4-phénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique dilué. Après extraction et séchage, les dinitro-2,4-phénylhydrazones obtenues sont chromatographiées sur couche mince de gel de silice avec le mélange hexane/benzène 1:3 (Rf **1**: 0,44; Rf **2**: 0,57).

Ozonisation. Après incorporation du mévalonate- ^{14}C , 25% de la fraction purifiée sur Sephadex LH 20 est réduite par NaBH_4 (15 mg dans 500 μl éthanol, 1 h). Après acidification et extraction par l'éther, les alcools obtenus sont purifiés sur couche mince de SiO_2 *Merck* 0,25 mm avec le mélange hexane/acétate d'éthyle 17:3; Rf 0,26 pour le produit **3** de la réduction de **1** [(\pm)-triméthyl-6,10,14-pentadécatriène-5,9,13-ol-2-(*E,E*)] et Rf 0,32 pour le produit de réduction de **2** (triméthyl-6,10,14-pentadécanol-2). L'alcool **3** est soumis à une ozonisation selon une technique sans solvant [11]: il est traité par un courant d'ozone (7 min à -60° puis 7 min à la température ambiante) après avoir été adsorbé à la surface externe d'un tube de Pyrex, longueur: 25 mm, \varnothing 2 mm. Afin de permettre la pyrolyse des ozonides, le tube introduit rapidement dans l'injecteur du chromatographe gaz-liquide est maintenu à 100° durant 3 min avant d'établir le courant d'azote (10 ml/min); 2 μl d'acétone froide sont introduits simultanément dans l'injecteur comme entraîneur. Après chromatographie (colonne d'acier inoxydable 2 m, \varnothing intérieur 3 mm, 5% FFAP sur Aeropack: 2°/min de 40 à 225°; N_2 12 ml/min) les fractions sont recueillies à la sortie toutes les 2 min à -60° . L'identification du fragment **5** repose sur la comparaison du temps de rétention avec celui du même fragment, formé par ozonisation de **1**.

Les radioactivités ont été analysées sur couches minces au moyen d'un scanner *Berthold LB 2720* et en solution dans le toluène par un scintillateur *Nuclear Chicago*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *J. Berreur-Bonnenfant & J.J. Meusy*, C. r. hebd. séances Acad. Sci. 275, 1641 (1972).
- [2] *J. Berreur-Bonnenfant, J.J. Meusy, J.P. Férézou, M. Devys, A. Quesneau-Thierry & M. Barbier*, C. r. hebd. séances Acad. Sci. 277, 971 (1973).
- [3] *J.P. Férézou, J. Berreur-Bonnenfant, J.J. Meusy, M. Barbier, M. Suchý & H.K. Wipf*, *Experientia* 33, 290 (1977).
- [4] *M. Barbier, H. Charniaux-Cotton & M.C. Fried-Montaufier*, C. r. hebd. séances Acad. Sci. 263, 1508 (1966).
- [5] *A. Tekitek, J. Berreur-Bonnenfant, J.P. Férézou, J.J. Meusy, M. Barbier & E. Lederer*, *Biochimie* 58, 1355 (1976).
- [6] *A. Tekitek, M. Rojas, J. Berreur-Bonnenfant, G. Pham, F. Nau, J.P. Férézou, M. Barbier & E. Lederer*, C. r. hebd. séances Acad. Sci. 285, 825 (1977).
- [7] *R.G. Buttery, R.M. Seifert & L.C. Ling*, *Chemistry Ind.* 1969, 238.
- [8] *R. Ikan, M.J. Baedecker & I.R. Kaplan*, *Nature* 244, 154 (1973).
- [9] *M. Dastillung*, Thèse de Doctorat d'Etat, Strasbourg 1976.
- [10] *R. Ikan, M.J. Baedecker & I.R. Kaplan*, *Geochim. cosmochim. Acta* 39, 187 (1975).
- [11] *M. Blumer, J.C. Robertson, J.E. Gordon & J. Sass*, *Biochemistry* 8, 4067 (1969).