

Synthèse biologique d'acide quinique ^{14}C uniformément marqué

A. BOUDET

Centre de Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, Toulouse (31). France
Reçu le 20 novembre 1967.

SUMMARY

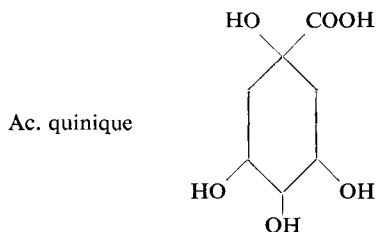
Uniformly ^{14}C -labelled quinic acid has been biosynthesized by exposing young Quercus pedunculata Ehrh leaves to a source of light in a $^{14}\text{CO}_2$ atmosphere. A preliminary study of the change in specific radioactivity of the labelled acid with time has led to a determination of the optimum metabolisation time. After extraction, separation over ion-exchange resins and purification by preparative chromatography have allowed to obtain from 10 mCi of $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ 0,26 mCi of quinic acid, the radiochemical purity of which was proved by autoradiography.

RÉSUMÉ

L'acide quinique ^{14}C uniformément marqué a été synthétisé en exposant à la lumière, en présence de $^{14}\text{CO}_2$, des jeunes feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. L'étude de l'évolution, en fonction du temps, de la radioactivité spécifique de l'acide marqué a conduit à déterminer un temps de métabolisation optimum. Après extraction, la séparation sur résines échangeuses d'ions et la chromatographie préparative ont permis d'obtenir à partir de 10 mCi de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, 0,26 mCi d'acide quinique radiochromatographiquement pur.

L'acide quinique (tétrahydroxy-1, 3, 4, 5-carboxy-1-cyclohexane) intermédiaire dans la synthèse du noyau aromatique chez certains microorganismes est bien répandu dans le règne végétal ⁽¹⁾. Dans le but de préciser son rôle métabolique chez les végétaux supérieurs nous avons cherché à obtenir ce composé sous forme radioactive. Jusqu'à présent seules des préparations

de type biologique ont été signalées. Les auteurs utilisent la photosynthèse : de jeunes plants de rosier ⁽²⁾, de *Gingko* ⁽³⁾ ou de Sapin ⁽⁴⁾ étant maintenus en atmosphère de ¹⁴CO₂.



Nous décrivons dans ce travail un mode d'obtention d'acide quinique ¹⁴C uniformément marqué, à partir de ¹⁴CO₂, qui fait appel à *Quercus pedunculata*, espèce chez laquelle nous avons relevé la présence de quantités importantes d'acide quinique ⁽⁵⁾. L'activité spécifique de l'acide isolé et le rendement en % de la radioactivité du carbone utilisé sont supérieurs à ceux mentionnés dans les méthodes déjà citées*.

PHOTOSYNTÈSE.

Dispositif expérimental.

La fixation du ¹⁴CO₂ est réalisée dans une enceinte en verre, étanche, de 22 l, placée sous une hotte bien ventilée. Un éclairage de 6 000 lux peut être apporté par 4 lampes à incandescence, l'échauffement étant compensé par la circulation de méthanol à -10 °C dans un tuyau transparent enroulé autour de l'enceinte; la température au niveau du végétal ne dépasse pas ainsi 25 °C.

La chambre de photosynthèse est en communication d'une part avec un générateur de CO₂, d'autre part avec un manomètre à mercure et 2 barboteurs à soude disposés en série pour fixer le CO₂ résiduel en fin d'expérience; l'ensemble du circuit (Fig. 1) peut être mis en dépression par l'intermédiaire d'une pompe à vide.

Avant d'introduire le ¹⁴CO₂ dans l'enceinte, on chasse le CO₂ de l'air qu'elle contient par passage d'un courant d'air décarbonaté. On établit un léger vide (4 cm de mercure) puis on libère le ¹⁴CO₂ par action d'acide lactique sur le Ba¹⁴CO₃ (C. E. A., 39,4 mci/mM). Le gaz radioactif est ensuite entraîné à l'intérieur de la chambre de photosynthèse par admission d'air décarbonaté

* En 1963 la firme " New England Nuclear Corporation " (575 Albany street Boston 18 Massachusset) a mis en vente un acide quinique U ¹⁴C obtenu par synthèse biologique sans précision d'origine.

jusqu'au rétablissement de la pression atmosphérique (l'addition de carbonate inerte au $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ est calculée de manière à ce que la teneur en CO_2 soit de 0,1 %).

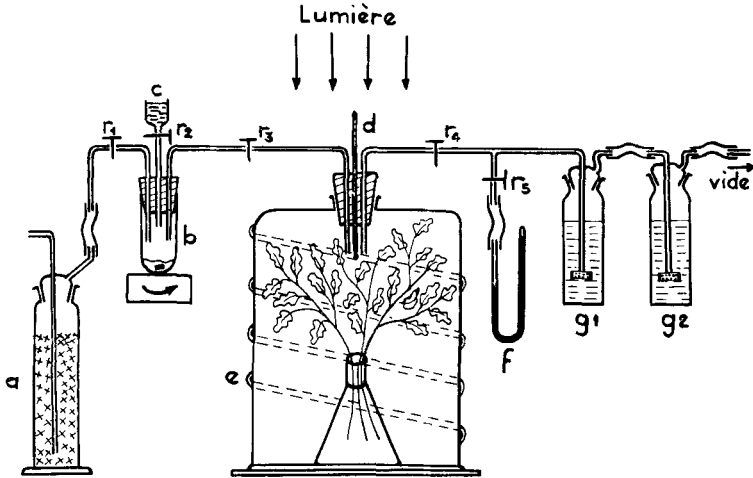


FIG. 1. Dispositif utilisé pour l'expérience de photosynthèse en présence de $^{14}\text{CO}_2$

- a — Piège à CO_2 contenant de la potasse solide
- b — Tube générateur de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$
- c — Acide lactique 4 N
- d — Thermomètre
- e — Circulation de méthanol à -10°C
- f — Manomètre à mercure
- g₁, g₂ — Barboteurs à soude
- r₁, r₂, r₃, r₄, r₅ — Robinets.

Déterminations préliminaires.

Après avoir observé le bon état de conservation, 150 h après prélèvement sur l'arbre, de rameaux de *Quercus pedunculata* maintenus dans l'eau distillée en atmosphère confinée et radioactive, nous avons essayé de déterminer la durée optimum de l'expérience de biosynthèse.

En effet, dans les préparations biologiques de produits radioactifs retenant l'assimilation chlorophyllienne, on relève pour un même composé des temps d'expérimentation extrêmement variables, allant pour l'acide quinique par exemple de 9 à 50 jours (3, 4).

Aussi, avons nous recherché, au bout de combien de temps, dans les conditions retenues, l'acide quinique présentait une activité spécifique maximum. Pour cela on sectionne, sur de petits arbustes développés en serres, un mois environ après l'ouverture des bourgeons, 5 rameaux sensiblement

identiques, portant de 8 à 10 feuilles. On les maintient dans l'eau distillée, à l'obscurité, pendant 24 heures pour réduire leur contenu en glucides, puis on les dispose à l'intérieur de l'enceinte dans laquelle on libère 1 mci de $^{14}\text{CO}_2$. Les jeunes plants sont alors soumis à une alternance de 14 heures de lumière (6 000 lux) et 10 heures d'obscurité, ce qui correspond aux conditions naturelles. Après les premières 14 heures on purge l'enceinte et on prélève un rameau dont les feuilles sont immédiatement fixées par immersion dans l'azote liquide. Pour les autres échantillons on opère de la même manière à des intervalles réguliers de 24 heures

soit prélèvement n° 1 après 15 h
 2 après 39 h
 3 après 63 h
 4 après 87 h
 5 après 111 h

Pour chaque essai on broie le matériel végétal dans l'alcool à 95° GL. à l'homogénéiseur "Bulher" puis on réalise une extraction par l'alcool à 80° GL. Après évaporation sous vide à 35 °C, on filtre, on défèque par l'acétate de plomb, on purifie la solution par passage sur résine cationique Dowex 50 (H^+) puis on fixe les substances anioniques sur résine Dowex 1 (CH_3COO^-). On élue globalement les anions par l'acide acétique 6 N, on évapore à sec, sous vide, on reprend par une quantité exacte d'eau distillée et on dose colorimétriquement l'acide quinique selon le protocole décrit dans un travail antérieur ⁽⁵⁾.

On dépose alors sur une feuille de papier Whatman n° 1 un volume de chaque extrait contenant une même quantité d'acide quinique (0,3 μM). Après migration dans la phase supérieure du mélange solvant (Butanol 1 — Acide formique — H_2O , 40-10-50 en volume : solvant A) pendant 16 heures, on apprécie la radioactivité de l'acide quinique par passage du chromatogramme au détecteur à scintillation en milieu semi-liquide (SAIP Modèle DMSL I), associé à un dispositif d'intégration et à un enregistreur.

Ces enregistrements sont reproduits sur la figure 2. On constate que l'acide quinique présente une activité spécifique maximum après 87 h, durée d'expérience qui sera donc retenue. Il semble d'après ces résultats que l'acide quinique présente une vitesse de renouvellement assez rapide.

Expérience définitive.

On prélève sur un arbre en plein champ plusieurs rameaux feuillés un mois environ après l'ouverture des bourgeons, période à laquelle nous avons constaté une teneur maximale des feuilles en acide quinique ⁽⁵⁾ (4 % du poids de la matière sèche).

L'expérience est conduite comme précédemment mais on utilise cette fois 10 mCi de $^{14}\text{CO}_2$. Après 86 h on balaie l'atmosphère de l'enceinte pendant 1 h par un courant d'air décarbonaté. On recueille les rameaux, on détache les feuilles, on les pèse (poids de matériel frais : 60 g) puis on les fixe par l'azote liquide.

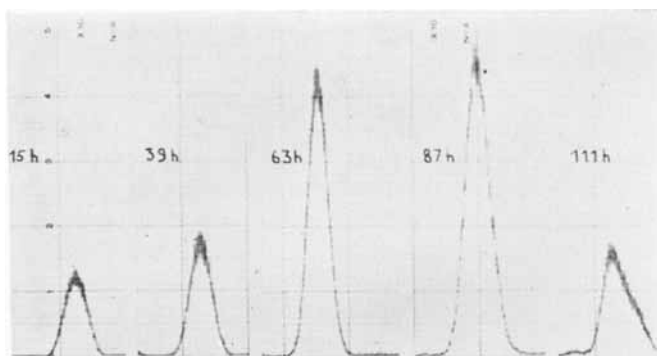


FIG. 2.

Le CO_2 retenu dans deux barboteurs à soude est précipité quantitativement sous forme de BaCO_3 par BaCl_2 en solution dans NH_4Cl . Le sel de Baryum est recueilli par filtration, lavé à l'eau chaude et à l'éthanol à 95° puis séché à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant.

La radioactivité du sel, réduit en poudre fine au mortier, est mesurée, en couche infiniment mince, sur un compteur GEIGER 2π à circulation gazeuse (SAIP type FCP 101), dont le rendement déterminé expérimentalement avec une source étalon de référence est d'environ 45 %. L'activité totale du BaCO_3 est de 0,8 mCi, le rendement de fixation est donc de 92 %.

ISOLEMENT DE L'ACIDE QUINIQUE ^{14}C .

Le broyage, l'extraction et la purification de l'extrait jusqu'au passage sur Dowex 50 ont déjà été décrits dans l'expérience préliminaire. A la sortie de la résine cationique la fraction acide est fixée sur résine Dowex 2 (CO_3^{--}), éluee par le carbonate d'ammonium puis les différents acides sont séparés sur une colonne de résine Dowex 1×8 , 200-400 mesh (CH_3COO^-) selon la méthode de Hulme et Woollorton ⁽⁶⁾, l'élution étant réalisée par un gradient d'acide acétique.

Les courbes de la figure 3 représentent le passage de l'acide quinique apprécié par dosage de l'acidité et mesure de la radioactivité (compteur à scintillation) sur une partie aliquote de chaque fraction.

A la fin de l'élution de l'acide quinique on constate une interférence avec l'acide galacturonique en raison de la disproportion existant entre les quantités des deux acides. Pour éviter une contamination de l'acide quinique on a donc seulement retenu le contenu des tubes 71 à 81. On évapore à sec sous pression réduite, on transvase dans une boîte à tare en reprenant par le minimum d'eau distillée, et par évaporation lente dans un dessiccateur on obtient 589,9 mg d'acide quinique à l'état cristallisé.

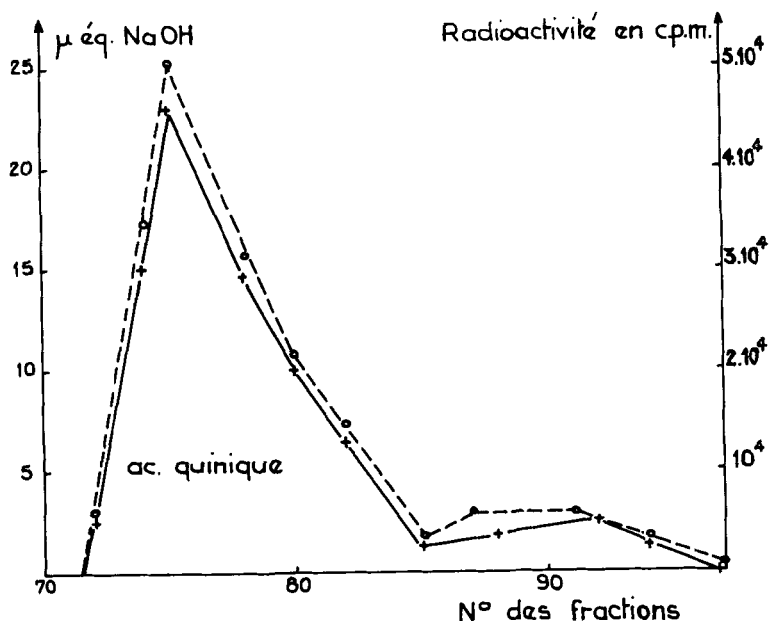


FIG. 3. Elution de l'acide quinique sur colonne acétate
La courbe en trait plein indique l'acidité des fractions recueillies (déterminées sur 250 μ l) celle en tirets indique leur radioactivité (déterminée sur 5 μ l).

CARACTÉRISTIQUES DE L'ACIDE ISOLÉ.

La pureté chimique du produit obtenu a été vérifiée par mesure du point de fusion : 162-163 (théorique 162), en mélange avec de l'acide quinique inerte : 162, et chromatographie sur papier dans 3 systèmes solvants.

La pureté radiochimique a été contrôlée par autoradiographie après migration chromatographique dans le solvant A et la phase supérieure du mélange : Propanol I — Benzoate de méthyle — Ac. formique (7-3-2 en volume) auquel on ajoute, après 72 h, 1 volume d' H_2O . On constate après révélation la présence d'impuretés radiochimiques en faibles quantités à différents niveaux (fig. 4a), la plus importante correspond à la position de l'acide galacturonique. La radioactivité de l'ensemble de ces impuretés n'atteint pas 2 % de la radioactivité totale.

Nous avons ainsi été conduit à envisager une purification supplémentaire par chromatographie préparative. L'acide radioactif mis en solution dans le minimum d'eau distillée est déposé en bande sur 3 feuilles de papier Macherey Nagel 2827 ff (carton mou lavé aux solvants et aux acides). La migration s'effectue pendant 4 h dans le solvant A après une période d'équilibration

de 14 h avec les vapeurs de la phase inférieure. Les zones correspondant à l'acide quinique sont éluées par l'eau et la solution concentrée sous vide. Un contrôle de la pureté radiochimique est à nouveau effectué par autoradiographie, après :

- chromatographie dans les solvants : Ethanol — H_2O (3-1 en volume) — Alcool benzylique — Butanol III — Propanol II — H_2O (3-1-1-1 en volume) mélange à 2 % d'acide formique.
- électrophorèse à haute tension (2 900 v) dans le tampon acétate d'ammonium N/10, $\text{pH} = 2,8$ (dans tous les cas on dépose 50 μg d'acide quinique inerte au niveau du spot de départ avant d'ajouter la substance radioactive; on élimine ainsi certains artefacts dans l'autoradiographie ⁽⁷⁾).

Sur les autoradiogrammes révélés on n'observe qu'une seule tache sombre correspondant à l'acide quinique (Fig. 4b) le composé isolé est donc radiochromatographiquement pur.

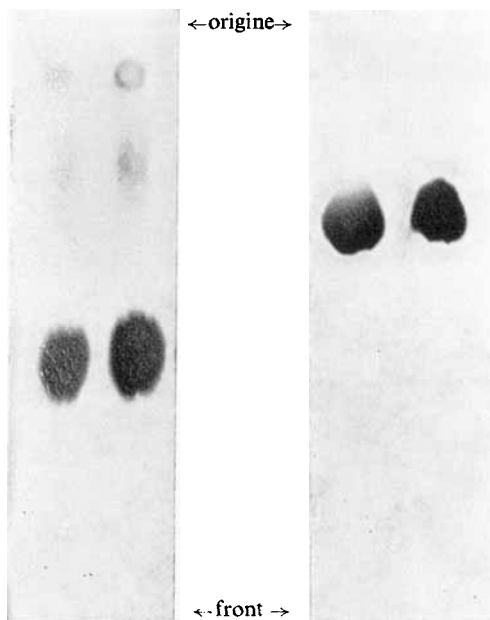


FIG. 4 a.

FIG. 4 b.

On reprend l'acide par le minimum d'eau distillée, on ajoute de l'acétone jusqu'à apparition d'un louche et l'on obtient au réfrigérateur 543 mg de cristaux très légèrement jaunes. L'acide quinique est conservé à $-25\text{ }^\circ\text{C}$, en ampoule scellée sous vide; son activité spécifique est de 95 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, l'activité totale de 260 μCi soit un rendement de 2,8 % du $^{14}\text{CO}_2$ utilisé.

BIBLIOGRAPHIE

1. CROMBIE, W. M. — Metabolism of "extracyclic" organic acids in : *Encyclopedia of plant physiology*. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg XII/2, 810-933, (1960).
2. WEINSTEIN, L. H., PORTER, C. A. and LAURENCOT, H. J., Jr. — Quinic acid as a precursor in aromatic biosynthesis in the rose. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **20** (2) : 121-134 (1959).
3. WEINSTEIN, L. H., PORTER, C. A. and LAURENCOT, H. J., Jr. — Biosynthesis of uniformly labeled shikimic and quinic acids in leaves of *Gingko biloba*. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **21** (7) : 439-446 (1962).
4. GOLDSCHMID, O., and QUIMBY, G. R. — Lignin precursors : the role of quinic acid. *TAPPI*, **47**, N° 9, 528-533 (1964).
5. BOUDET, A., MARIGO, G., et ALIBERT, G. — Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations des teneurs en acides quinique et shikimique dans les feuilles de *Quercus pedunculata* Ehrh. au cours d'une année de végétation. *C. R. Acad. Sci. Paris, t.* **265** : 209-212 (1967).
6. HULME, A. C. and WOOLTORTON, L. S. C. — Détermination and isolation of the non volatils acids of pome fruits and a study of acid changes in apple during storage. *J. Sci. Food, Agr.*, **9** : 150-8 (1958).
7. GRENNEN TSUK, R., CASTRO, Th., LAUFER, L. and SCHWARZ, D. R. — Determination of radiochemical purity by means of autoradiography in : *Actes de la conférence sur les méthodes de préparation et de conservation des molécules marquées*. Euratom 1625 e, 497-509, (1963).