

SYNTHÈSE BIOLOGIQUE DES ACIDES FERULIQUE ET SINAPIQUE
MARQUÉS AU ^{14}C

G. MARIGO, D. RIVIERE et A.M. BOUDET

Centre de Physiologie Végétale, Laboratoire Associé
au C.N.R.S. N° 241, Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne, 31077 TOULOUSE Cédex, France

SUMMARY

$^{14}\text{CH}_3$ labelled ferulic and sinapic acids have been synthesized through an enzymic methylation of caffeic and 5-hydroxyferulic acids using labelled S-adenosyl methionine as $^{14}\text{CH}_3$ donor. The methyltransferases involved which were extracted from stems of Poplar catalyse these reactions with a good efficiency. A purification procedure of ^{14}C S-adenosyl methionine is described which allows the recycling of $^{14}\text{CH}_3$ donor. The yield of the overall process is therefore greatly improved. This method allows the synthesis of products with high specific radioactivity.

RESUME

Les acides férulique et sinapique marqués au ^{14}C sur le groupement méthyle ont été synthétisés par voie enzymatique à partir des acides caféique et 5-hydroxyférulique en utilisant la S-adénosyl méthionine radioactive comme donneur de $^{14}\text{CH}_3$. Le biocatalyseur utilisé, la O-méthyltransférase, est issu de tiges de Peuplier. Dans les conditions optimales de la réaction, cette enzyme est capable d'assurer la formation des deux acides phénoliques avec un rendement intéressant. La mise au point d'un protocole de purification du donneur de $^{14}\text{CH}_3$ permettant sa réutilisation, améliore la rentabilité de ce mode de synthèse dont l'intérêt consiste en l'obtention de produits d'activité spécifique élevée.

Key words : ^{14}C labelled ferulic and sinapic acids - S-adenosyl catechol O-methyltransferase (E.C. 2.1.1.6)

En raison de leur appartenance à un métabolisme spécifiquement végétal, les acides phénoliques entrent dans une catégorie de produits peu commercialisés sous forme radioactive. Pourtant ces composés jouent un rôle important chez les végétaux dans la biogénèse de molécules plus complexes comme les flavonoïdes et les tannins, ou l'élaboration de la lignine second constituant en abondance après la cellulose.

Dans le cadre d'une étude sur la lignification, nous avons cherché à obtenir à l'état radioactif deux acides cinnamiques principaux précurseurs des monomères des lignines : les acides férulique et sinapique. Jusqu'à présent, seules des préparations chimiques ont été signalées. Les auteurs utilisent soit des réactions d'échange entre l'hydrogène et le tritium (1) les acides se retrouvant marqués en position α de la chaîne latérale, soit des réactions de condensation de l'acide malonique ^{14}C avec les aldéhydes cinnamiques correspondants (2) ; l'isotope radioactif s'incorpore également dans ce cas au niveau de la chaîne latérale.

Dans ce travail, nous décrivons un procédé plus accessible aux biologistes ; il s'agit d'un mode de synthèse par voie enzymatique faisant appel aux propriétés catalytiques des O-méthyletransférases. L'isotope radioactif ^{14}C est intégré par l'intermédiaire d'un groupement méthyle en position 3 (acide férulique) ou 5 (acide sinapique) (Figure 1). Le donneur de groupement méthyle est la S-adénosyl méthionine ($^{14}\text{CH}_3$) et la réaction s'effectue à partir d'une préparation enzymatique partiellement purifiée obtenue à partir de jeunes tiges de Peuplier. Le principe consiste à opérer en présence de SAM* uniquement radioactive donc en conditions non saturantes, de manière à obtenir des produits d'activité spécifique identique à celle du précurseur.

Obtention de la S-adénosyl méthionine catechol O-méthyletransférase (E.C. 2.1.1.6) et mesure de l'activité

- Extraction et purification des protéines catalytiques

Toutes les opérations se font à des températures comprises entre 0 et 4° C. L'extraction des protéines porte sur des tiges de Populus euramericana (3) fraîchement prélevées ou congelées à -20° C. Le matériel est broyé dans un milieu constitué de tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5, PEG 6 000 à 0,5 % et mercaptoéthanol 15 mM en présence d'une quantité équivalente de Polyclar

Abréviations :

- * SAM = S-adénosyl L-méthionine
- SAH = S-adénosyl homocysteine
- PEG = Polyéthylène glycol

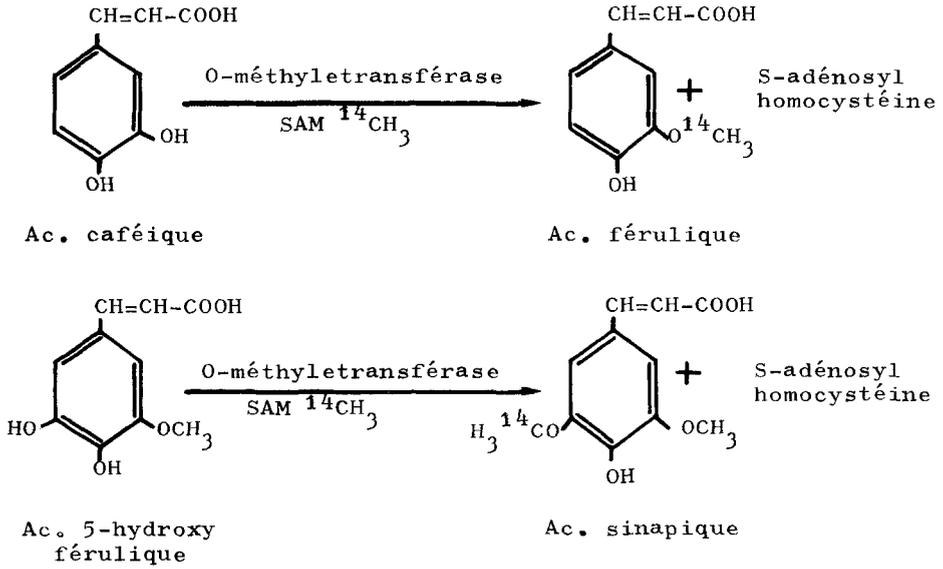


Figure 1 - Formation enzymatique des acides férulique et sinapique.

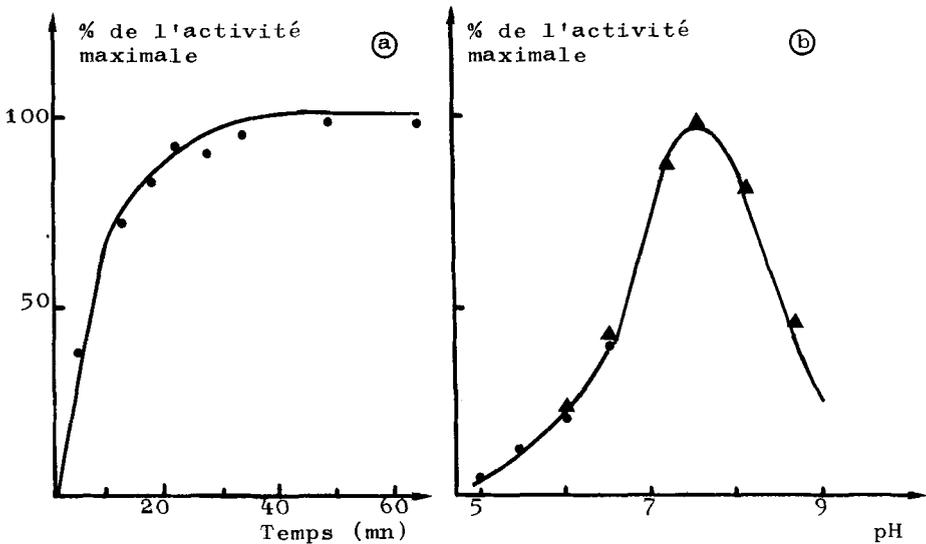


Figure 2 - (a) : Etude de la cinétique de la réaction enzymatique - (b) : Détermination du pH optimum (le pH du milieu est ajusté en présence de tampon acide citrique - K_2HPO_4 0,1 M ; \blacktriangle KH_2PO_4 - K_2HPO_4 0,1 M).

puis la suspension centrifugée 20 minutes à 40 000 g. On précipite ensuite les protéines solubles par le sulfate d'ammonium dans une zone de concentrations comprises entre 25 et 80 % de la saturation (pH maintenu entre 7 et 7,5 par addition d'ammoniaque concentré). On centrifuge enfin à 40 000 g pendant 20 minutes et on reprend le culot par 2 ml de tampon Tris 0,1 M de pH 7,5 contenant du mercaptoéthanol 2 mM. L'extrait protéique obtenu après dessalage par filtration moléculaire sur gel de Sephadex G 50 est retenu comme source d'enzyme.

- Mesure de l'activité O-méthyletransférase

Après 10 minutes d'équilibration à 30° C des différents constituants du milieu réactionnel -0,1 ml $MgCl_2$ 1 mM ; 0,01 ml de mercaptoéthanol 1 mM ; 0,2 ml d'une solution 2 mM d'acide caféique* ou 5-hydroxyférulique* ; 1 ml d'extrait protéique contenant 0,9 mg d'azote- en solution dans le tampon Tris-HCl 0,1 M de pH 7,3, on ajoute 0,2 ml de S- adénosyl méthionine** marquée. On laisse la réaction se poursuivre à 30°C et on l'arrête par addition d'HCl 3 N. L'acide phénolique éventuellement formé est extrait sélectivement par l'acétate d'éthyle et la radioactivité du produit mesurée au spectromètre Packard (modèle 22-11). Un essai réalisé avec l'extrait protéique dénaturé permet d'estimer la radioactivité qui n'est pas liée au produit de la réaction.

Déterminations préliminaires

- Recherche des conditions optimales de la réaction enzymatique

Afin d'obtenir des rendements élevés, nous avons étudié l'influence des différents facteurs contrôlant le processus enzymatique étant donné que nous nous trouvions dans une situation particulière où l'un des cosubstrats, la SAM, était présent en quantités non saturantes. De plus, dans un souci de simplification du protocole définitif, nous avons déterminé la stabilité de l'enzyme en fonction de la durée de conservation de l'extrait protéique.

Cette étude, réalisée dans le cas de la transformation de l'acide caféique en acide férulique, montre qu'en présence d'un excès d'enzyme dans le milieu (1 ml d'extrait soit 0,9 mg d'azote) la réaction se poursuit de manière linéaire durant les 10 premières minutes d'incubation (Figure 2 a) ; elle se stabilise

* L'acide caféique est d'origine Merck. L'acide 5-hydroxyférulique nous a été fourni gracieusement par le Pr. SHIMADA, Laboratoire du Pr. HIGUCHI.

** La S- adénosyl L- méthionine méthyle ^{14}C d'activité spécifique 45 mCi/mMole provient du C.E.A.

ensuite au-delà d'une période de 45 minutes, durée retenue pour la suite de l'expérimentation.

L'examen des diverses données de la littérature permet de situer entre 6,5 et 9,7 le pH optimum des O-méthyletransférases (4, 5). L'étude des variations de l'activité de l'enzyme en fonction de ce paramètre fait apparaître l'existence d'une valeur optimale voisine de 7,3 (Figure 2 b) chez le Peuplier.

L'étude de la stabilité du biocatalyseur en fonction de la durée de conservation à 5°C (Tableau I) montre que celui-ci est capable d'assurer la transformation de l'acide caféique avec un rendement sensiblement identique durant une période de 28 jours. Cette observation est à rapprocher des travaux de POULTON et BUTT (5) chez *Beta vulgaris* qui constatent que l'OMT de ce végétal se conserve 1 mois à -20°C .

TABLEAU I

Etude de la stabilité de l'enzyme à 5°C . Les activités enzymatiques sont exprimées en % de la valeur maximale

Activité enzymatique				
1er jour	4e jour	9e jour	17e jour	28e jour
96	100	83	82	83

- Etude d'un protocole de purification de la S-adénosyl méthionine

Afin d'augmenter la rentabilité de ce mode de synthèse nous avons tenté de purifier la SAM ^{14}C non transformée enzymatiquement, sur colonne de résine Dowex 50 (6). Ce type de purification présente l'avantage de séparer la SAM d'un de ses produits de transformation, la S-adénosyl homocystéine, qui s'avère inhiber l'activité catalytique des O-méthyletransférases (5). Cependant, le protocole initial reposant sur la séparation des deux constituants après élution sélective par NaCl 0,1 M (SAH) puis par HCl 6 N (SAM) s'est avéré inadéquat dans l'optique d'une réutilisation ultérieure de la SAM.

Nous avons amélioré le degré de purification du produit en traitant la colonne de résine Dowex* après élution du SAH (NaCl 0,1 M, 200 ml) par des solutions d'HCl 0,1 N (150 ml) puis HCl N (100 ml). Dans ces conditions la SAM ^{14}C éluee ensuite par HCl 6 N

* Il s'agit d'une colonne de résine Dowex 50, 100-200 mesh X 8, forme Na^+ (5 x 1 cm).

(100 ml) s'avère alors suffisamment purifiée pour être utilisée dans de nouvelles réactions de méthylation.

Protocole de synthèse définitif des acides férulique et sinapique

- Formation enzymatique des produits

On prépare un extrait protéique à partir d'une quantité de tiges de Peuplier (30 g) telle qu'après purification on dispose d'une source enzymatique suffisante (15 ml) pour réaliser différents essais.

On fait agir le substrat approprié dans les conditions définies précédemment (1 ml d'extrait protéique, pH du milieu réactionnel 7,3, durée 45 minutes à 30° C) en présence des différents éléments de la réaction. Le donneur de CH_3 est la SAM ^{14}C et l'expérience se déroule sans apport de SAM inerte.

On laisse la réaction se poursuivre, et, après acidification on sépare le produit formé de la SAM radioactive par extraction sélective à l'acétate d'éthyle.

Dans ces conditions, le rendement de la transformation s'avère élevé puisqu'il avoisine une valeur moyenne de 40 %.

Après action enzymatique, la SAM ^{14}C non transformée est réutilisée dans de nouveaux essais après purification sur Dowex 50 et évaporation du solvant d'éluion (HCl 6 N). Dans ce cas, pour éviter d'éventuelles modifications du pH (HCl résiduel) on augmente la concentration du tampon Tris-HCl dans le milieu d'incubation (400 mM).

- Caractéristiques des acides synthétisés

La nature* et la pureté* chimique des acides phénoliques synthétisés sont vérifiées d'après leur comportement chromatographique dans différents solvants ainsi que par spectrophotométrie dans l'ultraviolet après chromatographie préparative sur papier Whatman N° 3 dans le mélange toluène - acide acétique - eau (4-1-5 en volume ; phase supérieure) qui les sépare de leurs substrats correspondants.

La pureté radiochimique des produits formés est contrôlée par autoradiographie après migration chromatographique sur papier dans les mélanges :

A - chloroforme - acide acétique - eau (2-1-1 en volume)

B - toluène - acide acétique - eau (4-1-5 en volume)

Pour chacun des acides synthétisés, on constate essentiellement, après révélation, la présence d'une impureté radioactive

* Ces déterminations sont effectuées lors d'essais réalisés en présence de SAM inerte 1 mM.

correspondant vraisemblablement aux acides isoférulique et 5-hydroxy 3-4 méthoxy-cinnamique qui se forment parallèlement (7). Ce mode de méthylation ne représente cependant qu'une faible part de l'activité enzymatique (5 % de la quantité de produit radioactif formé).

Nous avons été conduits alors à envisager une purification supplémentaire par chromatographie préparative ; la migration s'effectue sur papier Whatman N° 3 en chromatographie ascendante dans le solvant A. Les zones correspondant aux acides férulique et sinapique sont éluées par l'alcool à 80° GL et la solution concentrée sous vide.

Un contrôle effectué par autoradiographie après chromatographie dans le solvant butanol - acide acétique - eau (6-1-2 en volume) montre que les composés isolés sont chromatographiquement purs (Figure 3). Leur activité spécifique est de 45 mCi/mMole.

Dans les conditions retenues, il nous a été possible de synthétiser 22 μCi d'acide sinapique à partir de 35 μCi de SAM ^{14}C moyennant 4 recyclages successifs, soit un rendement de 62 % du précurseur radioactif utilisé. Les valeurs obtenues peuvent être du même ordre de grandeur en ce qui concerne l'acide férulique. Les deux composés sont conservés à -20°C ; cependant, en raison d'un phénomène d'autodécomposition non négligeable en fonction du temps, il est nécessaire de les purifier avant chaque utilisation.



Figure 3

La disponibilité en ces molécules radioactives devrait nous permettre actuellement de poursuivre non seulement certaines études engagées au laboratoire sur la régulation de la lignification (3) mais également d'envisager l'obtention de lignines radioactives à composition monomérique contrôlée afin d'aborder

plus spécifiquement des problèmes concernant la biodégradation de ces polymères.

Enfin, au-delà de la préparation des deux acides phénoliques précédents, le procédé paraît applicable à la synthèse de composés méthoxylés plus diversifiés. En effet, si dans le cas du Peuplier, l'enzyme est spécifique des substrats cinnamiques (7) celle-ci intervient chez certaines espèces (4) dans les réactions de méthoxylations d'autres catégories de polyphénols.

BIBLIOGRAPHIE

1. Manitto P., Monti D. and Gramatica P. - J.C.S. Chem. Comm. 719 : 21 (1973).
2. Stöckigt J. and Klischies M. - *Holzforschung* 31 : 41 (1977).
3. Grand C. - Régulation de la lignification chez Populus euramericana. Approches tissulaire et moléculaire, Thèse Doct. Spécialité, Toulouse (1979).
4. Ebel J., Hahlbrock K. and Grisebach H. - *Biochim. Biophys. Acta* 268 : 313 (1972).
5. Poulton J.E. and Butt V.S. - *Biochim. Biophys. Acta* 403 : 301 (1975).
6. Shapiro S.K. and Ehniger D.J. - *Analytical Biochem.* 15 : 323 (1966).
7. Charrière Ladreix Y. - *Phytochemistry* 18 : 43 (1979).