

BIOSYNTHESE *IN VITRO* DES TRITERPÈNES DANS LE LATEX D'EUPHORBIA*

GÉRARD PONSINET et GUY OURISSON

Laboratoire associé au C.N.R.S., Institut de Chimie, Esplanade, Strasbourg, France

(Received 22 February 1967)

Résumé—L'activité enzymatique du latex d'Euphorbe est mise en évidence par la transformation *in vitro* d'acétate 1-¹⁴C en triterpènes (euphol, euphorbol, lanostérol, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, cycloartène-23 diol-3β, 25) dans des latex de différentes espèces. L'influence de différents facteurs est étudiée et discutée.

Abstract—The enzymatic activity of the latex of various *Euphorbia* species is demonstrated by the transformation *in vitro* of labelled acetate into triterpenes (euphol, euphorbol, lanosterol, cycloartenol, 24-methylene-cycloartanol, cycloart-23-ene-3β, 25-diol). Various conditions of incubation are studied and discussed.

INTRODUCTION

LE LATEX des espèces du genre *Euphorbia* est caractérisé par un certain nombre de triterpènes tétracycliques dont nous avons étudié systématiquement la répartition dans un but taxonomique.¹

D'autre part, les travaux effectués sur d'autres latex ont indiqué que ces milieux avaient une activité enzymatique propre qui les rendait capables de synthétiser des produits secondaires même *in vitro*: caoutchouc dans le latex de *Hevea brasiliensis* Muell., à partir d'acétate,² de mévalonate³ et de pyrophosphate d'isopentényle;⁴ et morphine dans le latex de *Papaver somniferum* L. à partir de tyrosine.^{5, 6}

La connaissance biochimique de ces milieux végétaux particuliers que sont les latex a d'ailleurs profité ces dernières années des nombreuses recherches entreprises par différents groupes en vue d'améliorer la productivité de l'arbre à caoutchouc. Ces études ont mis en particulier en évidence la complexité biochimique et cytologique de ce système qui avait été longtemps considéré comme un suc vacuolaire.

Tous les résultats relatifs à *Hevea* ne sont certes pas applicables *a priori* dans le détail aux autres latex. En fait les récents travaux de Meissner⁷ sur des latex d'espèces de différentes familles ne font apparaître que des variations faibles de certaines caractéristiques (valeur du pH,^{7a} teneur en protéines et ARN,^{7b} importance des échanges gazeux).^{7c}

Nos propres résultats, mentionnés ci-dessous, permettent de mettre en évidence la biosynthèse des triterpènes d'*Euphorbia* par incubation *in vitro* de latex en présence de pré-curseurs radioactifs (acétate 1-¹⁴C et mévalonate 2-¹⁴C).

* Ce travail fait partie de la thèse qui sera présentée par G. Ponsinet en 1967 devant la Faculté des Sciences de Strasbourg en vue du Doctorat ès-Sciences.

¹ G. PONSINET et G. OURISSON, Travaux en cours.

² H. J. TEAS et R. S. BANDURSKI, *Plant Physiol.* 32, 643 (1957).

³ R. G. O. KEKWICK et B. L. ARCHER, *Nature* 184, 268 (1959).

⁴ F. LYNEN et U. HENNING, *Angew. Chem.* 72, 820 (1960).

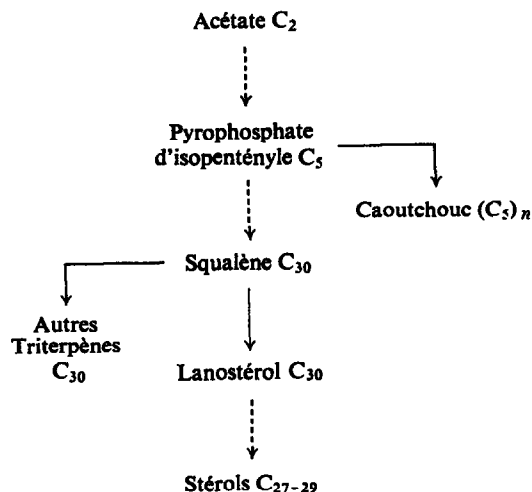
⁵ G. KLEINSCHMIDT et K. MOTHES, *Arch. Phyf.* 10, 293 (1960).

⁶ J. W. FAIRBAIRN et G. WASSEL, *Phytochem.* 3, 583 (1964).

^{7a} L. MEISSNER, *Flora, Abt. A.* 156, 404 (1966); ^b 156, 634 (1966); ^c 157, 1 (1966).

La grande variété des triterpènes tétra-et pentacycliques rencontrés dans le latex de différentes Euphorbes rend ce milieu particulièrement intéressant pour l'étude de la cyclisation du squalène: la connaissance du mécanisme de cette cyclisation pourra peut-être placer sur une base plus fondamentale les résultats chimiotaxonomiques mentionnés ci-dessus.¹

Sur l'ensemble des travaux réalisés sur la biosynthèse des stérols, peu se sont attachés à étudier la cyclisation du squalène en la dissociant des autres étapes conduisant de l'acétate aux stérols.



Le latex au contraire est caractérisé par sa forte teneur en triterpènes alors qu'il est très pauvre en stérols par comparaison avec d'autres systèmes (Tableau 1).

TABLEAU 1

Système	Rapport en poids	
	triterpènes stérols	Référence
Levure	0,02	9
Insaponifiable d'huiles de graines variées	0,01-0,1	10
Tissu de tabac cultivé <i>in vitro</i>	0,15	14a
Pois en germination (<i>Pisum sativum</i> L.)	0,22	11
Foie de rat	1	12
Euphorbe (plante entière)	5	
Euphorbe (latex isolé)	40	

Signalons également que l'accumulation de caoutchouc, réaction secondaire de la synthèse terpénique, est très faible chez les Euphorbes.⁸

⁸ D. E. BERNAL, *Rev. Gén. Caoutchouc*, **32**, 889 (1955).

⁹ G. PONSINET, Résultats non publiés.

¹⁰ E. FEDELI, A. LANZANI, P. CAPELLA et G. JACINI, *J. Am. Oil Chemists Ass.* **43**, 254 (1966).

¹¹ D. J. BAISTED, E. CAPSTACK et W. R. NES, *Biochemistry* **1**, 537 (1962).

¹² P. B. SCHNEIDER, R. B. CLAYTON et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.* **224**, 175 (1957).

¹³ G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* **4**, 799 (1965).

Enfin, le latex-milieu enzymatique acellulaire-devrait mieux qu'un tissu animal ou végétal permettre de contrôler la pénétration des précurseurs et l'homogénéité du milieu, l'homogénéisation des tissus ne préservant pas toujours toute leur activité enzymatique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention du Latex

La plus grande partie des opérations mentionnées ci-dessous a été effectuée sur des latex d'espèces herbacées récoltées au Jardin Botanique de Strasbourg ou en végétation spontanée dans la campagne environnante, de juillet à octobre.

Deux espèces herbacées contenant du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol ont été choisies pour leur abondance locale (*E. helioscopia* L. et *E. cyparissias* L.); une troisième espèce cactiforme (*E. erythrae* L.) a été utilisée pour mettre en évidence la biosynthèse de l'euphol et de l'euphorbol.

Le stockage des plantes n'a jamais dépassé 24 hr avant la collecte du latex. Celle-ci s'effectue pour les espèces herbacées en coupant les tiges une à une à quelques cm du sommet; le latex est collecté dans un tube maintenu à 0° par de la glace. Avec les plantes utilisées, la collecte de 1 ml de latex exige en moyenne 10 min de travail. Le latex d'*E. erythrae* L. est récolté par saignée avec une lame de rasoir, et pipetage.

Incubations

Pour chaque série d'incubations, le latex ainsi obtenu est réparti dans des tubes contenant précurseur, tampon et additifs éventuels. L'acétate de sodium est ajouté en solution dans l'eau (10 μ C dans 0,1 ml d'eau pour 1 ml de latex). Chaque incubation est faite à température ambiante à l'abri de la lumière et sur un volume de 0,5–1 ml de latex. La plupart des valeurs d'activité mentionnées sur les courbes et tableaux ci-dessous sont les moyennes de deux incubations identiques.

Les incubations ne sont pas faites dans des conditions stériles, les plantes étant simplement lavées à l'eau avant traitement. Ce fait ne devrait pas présenter d'inconvénients étant données les faibles durées d'incubations.

Le latex des Euphorbes utilisées contient à peu près 10% de matière sèche. Le quart de cette matière sèche est constitué de triterpènes sous forme libre (3 β OH). Chaque ml de latex contient donc 25 mg de triterpènes environ.

MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ DU LATEX *IN VITRO*

Les premiers essais d'incorporation destinés à mettre au point les conditions d'incubation et la méthode d'extraction ont été effectués par simple mélange de latex et d'acétate de sodium en solution aqueuse. Chacune des trois espèces mentionnées ci-dessus a ainsi fourni des fractions triterpéniques radioactives, dont les constituants ont été séparés sous forme d'époxydes-acétates suivant une méthode déjà décrite.¹³ Des recristallisations répétées montrent que l'activité spécifique de ces produits est constante (Tableau 2).

La biosynthèse du lanostérol à partir d'acétate a été étudiée dans de nombreux systèmes, celle du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol a été mise en évidence dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*¹⁴ et les feuilles de *Pisum sativum* L.;¹⁵ celle de l'euphol et de l'euphorbol, caractéristiques des Euphorbiacées, n'avait pas été mentionnée jusqu'ici.

¹⁴ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 5, 31 (1966); ^b J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 815 (1967); ^c W. W. REID et M. J. BERNARD, *Biochem. J.* 100, 13P (1966).

¹⁵ L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *Biochem. J.* 99, 735 (1966).

TABLEAU 2. ACTIVITÉ EN CPM/MG DES ÉPOXYDES-ACÉTATES DE TRITERPÈNES

Nombre de recristal- lisations	<i>E. Cyparissias</i> L.*		<i>E. helioscopia</i> L.†			<i>E. erythraea</i> L.†	
	Méthylène-24 cycloartanol	Cyclo- arténol	Méthylène-24 cycloartanol	Cyclo- arténol	Lanostérol‡	Euphol	Euphorbol
1	47	20	1200	566	133	239	90
2	46	13	1143	493	130	195	65
3	44	15	1098	502	138	205	77
4	44	13	1095	503	140	195	75
5	45	14	1131	512			
6			1078				

* Activités mesurées au compteur à coupelles Nuclear Chicago.

† Activités mesurées au compteur à scintillations Packard.

‡ De tous les produits mentionnés ci-dessus, seul le lanostérol est présent en trop faible quantité et la recristallisation de son époxyde acétate nécessite l'addition préalable d'entraîneur non-radioactif.

Le cycloartène-23 diol-3 β , 25, dont la présence dans *E. cyparissias* L. a été indiquée récemment,¹⁶ a également été obtenu sous forme radioactive dans le latex de *E. helioscopia* L. Ce produit est présent sous forme estérifiée alors que les triterpènes 3 β -hydroxylés sont sous forme libre.

Les Figs. 1 et 2 qui représentent la variation dans le temps des produits de la synthèse terpénique dans le latex, confirment que les triterpènes y sont bien des produits d'accumulation et que la synthèse des stérols y est négligeable.

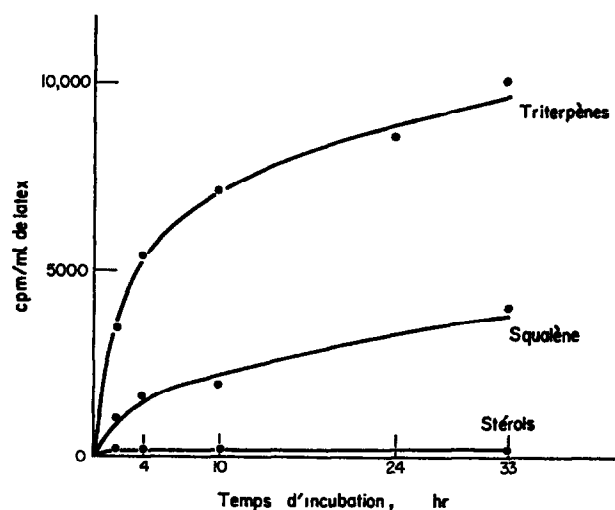


FIG. 1. ACCUMULATION DES TRITERPÈNES À PARTIR D'ACÉTATE.

Latex *E. helioscopia* L. Incubation de 0,5 ml de latex avec 5 μ c d'acétate

¹⁶ A. N. STARRAT, *Phytochem.* **5**, 1341 (1966).

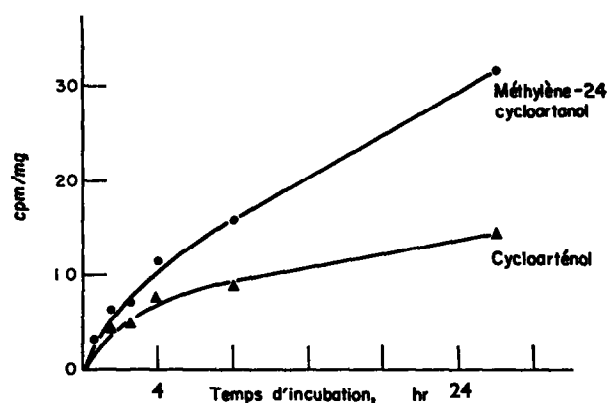


FIG. 2. ACCUMULATION DE MÉTHYLÈNE-24 CYCLOARTANOL ET DE CYCLOARTÉNOL.
Latex d'*E. cyparissias* L. Incubation de 1 ml de latex avec 10 μ c d'acétate. Compteur Nuclear Chicago.

ÉTUDE DES CONDITIONS D'INCUBATION

J. d'Auzac *et al.*¹⁷ ont montré que le rendement de l'incorporation de l'acétate en caoutchouc dans le latex d'*Hevea* était très sensible aux modifications physiques (pH, température, pression osmotique, dilution, etc. ...). Il semble en fait, d'après les résultats ci-dessous, que les variations d'activité en fonction de différents facteurs soient comparables à celles observées dans d'autres systèmes (homogénat de foie en particulier).

Pour étudier l'influence de différents facteurs sur le rendement de la synthèse des triterpènes, il n'est pas nécessaire de séparer le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol qui en sont les constituants majeurs: l'activité spécifique de leur mélange en cpm/mg donne une bonne mesure de l'activité enzymatique par unité de volume de latex, mesure indépendante des pertes possibles à l'extraction et ne nécessitant pas l'introduction préalable d'entraîneur.

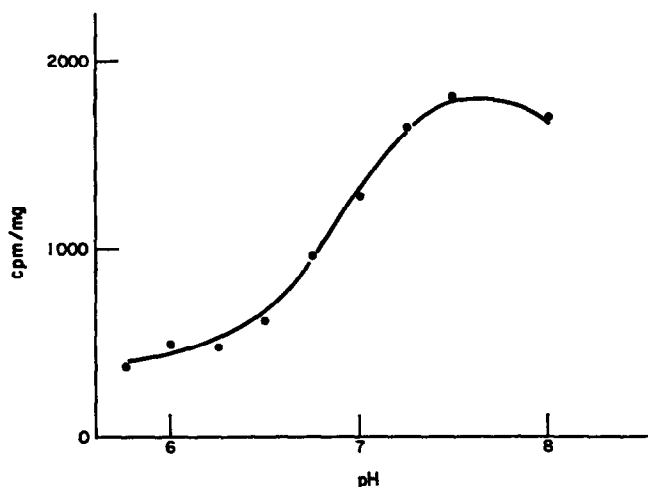


FIG. 3. INFLUENCE DU pH SUR LA SYNTHÈSE DES TRITERPÈNES.
Latex de *E. helioscopia* L. Incubation (24 hr) de 0,5 ml de latex; 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M; 5 μ c acétate.

¹⁷ J. D'AUZAC, S. PUJARNISLE, P. L. E. FOURNIER et T. C. CUONG, *Ann. Fac. Sci. Univ. Saigon* 97 (1962).

Influence du pH

Le pH du latex de différentes espèces d'Euphorbes a été déterminé récemment ^{7a} et varie de 5,4–6,3 suivant les espèces. Néanmoins, la dilution du latex par un volume égal de tampon phosphate 0,1 M de pH déterminé montre que le pH naturel ne correspond pas au maximum d'activité (Fig. 3).

Influence de la Pression Osmotique

La Fig. 4 montre l'influence de la pression osmotique du tampon de dilution, faisant apparaître un maximum pour une concentration de saccharose d'environ 0,5 M.

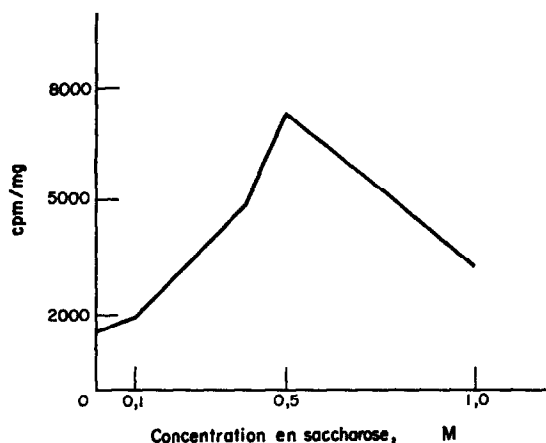


FIG. 4. INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR LA SYNTHÈSE DES TRITERPÈNES.

Latex de *E. helioscopia* L. Incubations (24 hr) de: 0,5 ml de latex; 0,5 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4; 5 μ c acétate.

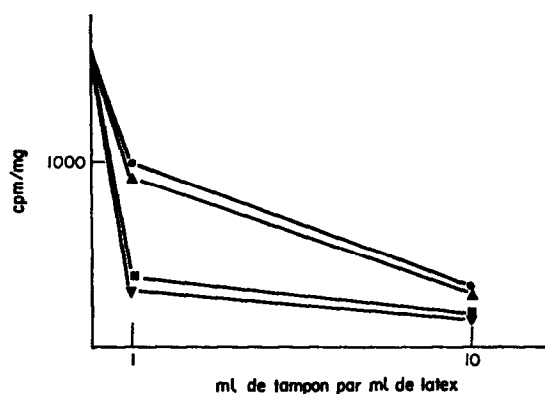


FIG. 5. INFLUENCE DE LA DILUTION ET DES COFACTEURS.

Latex de *E. helioscopia* L. Incubations (24 hr) de 0,5 ml de latex; 0,5 à 5 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4; 5 μ c acétate.

● tampon seul; ▲ tampon + $MgCl_2$; ■ tampon + cofacteurs* + saccharose 0,4 M; ▼ tampon + cofacteurs.

* NADH 0,5 μ M/ml; ATP 0,6 μ M/ml; $MgCl_2$ 0,004 M; EDTA 10 μ M/ml; GSH 0,01 M; Nicotinamide 0,03 M.

Influence des Cofacteurs

D'après les courbes de la Fig. 5, il apparaît que le latex doit contenir les quantités optimales des cofacteurs et additifs utilisés habituellement pour renforcer l'activité des enzymes extraits dans les homogénats de tissus puisque, globalement, leur addition abaisse le rendement de l'incorporation d'acétate.

La détermination de la concentration optimale de chacun de ces additifs nécessiterait de très nombreuses mesures. Il a été montré récemment¹⁸ que la concentration optimale d'ATP pour l'incorporation d'acétate en caoutchouc et lipides dans le latex d'*Hevea* est de 0,1 μ M/ml, des concentrations plus élevées étant inhibitrices.

La Fig. 5 montre par ailleurs la forte diminution d'activité due à la dilution par le tampon utilisé.

ESSAI DE FRACTIONNEMENT DU LATEX

Plusieurs études de la biosynthèse des stérols dans les homogénats de tissu ont montré que cette synthèse à partir d'acétate se fait jusqu'au pyrophosphate de farnésyle par des enzymes solubles, et de ce produit aux triterpènes au niveau des microsomes.¹⁹ Ces microsomes sont une fraction de centrifugation à haute vitesse contenant les débris du réticulum endoplasmique, fragmenté lors de l'homogénéisation. Ils contiennent des fragments lipoprotéiques et les ribosomes.

Le Tableau 3 montre, par comparaison des rendements d'incorporation d'acétate et de mévalonate, que l'étape lente de la synthèse des triterpènes dans le latex se situe après le mévalonate. D'autre part, la centrifugation à basse vitesse provoque l'élimination d'enzymes nécessaires à la transformation du mévalonate en triterpènes. La collecte du latex se faisant sans homogénéisation, il faut admettre que cette centrifugation élimine le réticulum endoplasmique et l'activité enzymatique qui lui est associée. La présence de ribosomes a été mise en évidence dans le latex de *Hevea brasiliensis* Muell. par McMullen²⁰ et dans celui de *Papaver somniferum* L. par Meissner^{7a} mais on a également montré que ces particules sont associées en un réseau²¹ qui provoque leur sédimentation à basse vitesse.^{7a}

TABLEAU 3. LATEX *E. helioscopia* L.

Précurseur	Centrifugation avant incorporation de précurseur	Activité spécifique des triterpènes cpm/mg
5 μ c acétate	—	680
5 μ c acétate	15 min 2000 g	2
2 μ c MVA	—	774
2 μ c MVA	15 min 2000 g	3

Fractions de 0,5 ml de latex dilué par 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4.

Ainsi le latex ne se comporte pas comme un homogénat, qui conserve son activité après centrifugation à 10.000 g. Il faut noter de plus que la centrifugation du latex à 2000 g n'élimine

¹⁸ G. WEEKS et R. G. O. KEKWICK, *Biochem. J.* **96**, 52P (1965).

¹⁹ L. GOSSELIN et J. DUVIVIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 359 (1965).

²⁰ A. I. McMULLEN, *Biochem. J.* **85**, 491 (1962).

²¹ W. A. SOUTHOORN, *Nature* **189**, 1000 (1961).

pratiquement pas de triterpènes: ceux-ci ne se séparent que partiellement à 40.000 g, en se collant à la paroi du tube au niveau supérieur du liquide.

ESSAI D'INCORPORATION DU SQUALÈNE

La transformation du squalène en triterpènes comprend une cyclisation et une hydroxylation. Un travail récent de Barton et Moss²² semble montrer que les deux réactions ne sont pas concertées puisque ces auteurs ont montré que le lanostadiène est un précurseur du lanostérol dans la levure. Deux autres groupes ont par ailleurs montré que l'oxydation peut précéder la cyclisation, en réalisant la transformation de l'époxy-2,3 squalène en lanostérol²³ par les enzymes du foie de rat.

Les microsomes sont connus comme étant le support des hydroxylases, ce qui expliquerait leur rôle dans l'hydroxylation. Ils pourraient avoir également pour rôle de fournir une surface stéréospécifiquement active qui imposerait au squalène—hydrocarbure acyclique et insoluble dans l'eau—une conformation permettant la cyclisation par réaction de diènes 1-5. Suivant les espèces, cette surface active imposerait une conformation conduisant au cycloarténol ou à l'euphol. Nos résultats relatifs à la centrifugation du latex confirment que les microsomes, ou du moins la structure qui les produit, sont nécessaires à cette synthèse.

Dans le but de localiser plus précisément le site de cyclisation du squalène nous avons tenté d'incorporer du squalène radioactif au latex. Cet hydrocarbure étant insoluble dans l'eau nous avons dû le disperser dans un tampon à l'aide de Tween 20 ou d'acétone, les concentrations en ces produits étant déterminées pour produire une dispersion efficace sans pour cela inhiber l'activité enzymatique.

Malgré ces précautions, aucune radioactivité n'a pu être décelée dans les triterpènes après incubation de latex en présence de squalène, dans des conditions où l'acétate se transforme en triterpènes.

CONCLUSION

La mise en évidence de l'activité enzymatique du latex *in vitro* confirme que celui-ci a bien le caractère d'un cytoplasme physiologiquement actif. Ce latex constitue un système à la fois facilement accessible et plus proche du milieu cellulaire que les homogénats de tissus, puisque la méthode de récolte permet d'en préserver les structures.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction des Triterpènes

Après incubation pendant 24-48 hr, le latex est lyophilisé et extrait à éther de pétrole. La solution obtenue est filtrée sur coton, Na₂SO₄ anhydre et Al₂O₃. La colonne d'alumine est éluée au mélange EP-éther 50/50 et le produit obtenu fractionné sur chromatoplaque préparative de SiO₂. Les triterpènes libres sont récupérés et acétylés (12 hr à température ordinaire dans la pyridine anhydre en présence de Ac₂O).

Les acétates de triterpènes ainsi obtenus sont filtrés sur une colonne de SiO₂-AgNO₃ 90/10 éluée au mélange éther de pétrole-éther 80/20 ou mieux sur une plaque préparative de SiO₂-AgNO₃. L'acétylation suivie de chromatographie sur AgNO₃ assure une purification supplémentaire des produits radioactifs.

Le produit obtenu est éventuellement époxydé pour en séparer les constituants par chromatoplaques préparatives de SiO₂. Dans la plupart des cas, ces acétates de triterpènes ont été comptés directement dans un compteur à scintillations Packard sur des quantités allant de 0 à 5 mg.

²² D. H. R. BARTON et G. P. MOSS, *Chem. Commun.* 261 (1966).

²³ E. J. COREY, W. E. RUSSEY et P. R. O. DE MONTENALLO, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4750 (1966); E. E. VAN TAMELEN, J. D. WILLETT, R. B. CLAYTON et K. E. LORD, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4752 (1966).

La quantité de triterpènes présents préalablement dans le latex (20–40 mg par ml de latex suivant les espèces) rend inutile l'addition d'entraîneur. Par contre, pour tracer les courbes de la Fig. 1, il est nécessaire d'ajouter du squalène non radioactif, celui-ci n'étant pas pondéralement présent, et du β -sitostérol non radioactif, dont le latex contient environ 1 mg par ml.

Préparation du Squalène Radioactif

Du squalène à haute activité spécifique a été préparé par germination de pois (*Pisum sativum* L.) en présence d'acétate de sodium $1\text{-}^{14}\text{C}$ selon la méthode décrite par Capstack *et al.*²⁴ Le marquage du squalène obtenu a été vérifié sur une fraction aliquote par recristallisation de son hexachlorure après addition d'hexachlorure de squalène non radioactif (Tableau 4).

TABLEAU 4. RECRISTALLISATION DE L'HEXACHLORURE DE SQUALÈNE RADIOACTIF PRODUIT PAR LE POIS

Recristallisation	F°	Activité spécifique cpm/mg
1		540
2		538
3		536
4		550
5		580
6	128–134	580
7	129–135	560

Analyse des Stérols

L'analyse de la fraction stérolique du latex en chromatographie en phase gazeuse montre qu'elle est essentiellement constituée de β -sitostérol accompagné de cholestérol (8%) et de campestérol (5%) (Tableau 5).

TABLEAU 5. TEMPS DE RÉTENTION DES STÉROLS PAR RAPPORT AU CHOLESTANE (8,9 MIN)

	3 β OH	3 β OAc
Cholestérol	2,2	3,0
Campestérol	2,7	3,9
β -Sitostérol	3,4	4,8

Appareil Pan Chromatograph PYE; Colonne 0,75% SE 52; Température 240°.

Remerciements—Nous remercions les Drs. P. Benveniste et J. D. Ehrhardt pour leur aide et leurs conseils et le Professeur L. Hirth (Centre de Recherches Nucléaires, Strasbourg) chez qui ont été faits les comptages de radioactivité.

²⁴ E. CAPSTACK, D. J. BAISTED, W. W. NEWSCHWANDER, G. BLONDIN, N. L. ROSIN et W. R. NES, *Biochemistry* 1, 1179 (1962).