

## ASPECTS PARTICULIERS DE LA BIOSYNTHÈSE DES TRITERPÈNES DANS LE LATEX D'EUPHORBIA

G. PONSINET et G. OURISSON

Laboratoire associé au CNRS, Institut de Chimie, Esplanade, 67-Strasbourg, France

(Received 29 November 1967)

**Résumé**—L'utilisation du latex d'*Euphorbia* *in vitro* comme milieu d'étude de la biosynthèse des triterpènes a permis de mettre en évidence les faits suivants: 1. l'époxyde de squalène peut être considéré comme un intermédiaire de cette synthèse dans ce milieu; 2. la fraction particulière, sédimentable à basse vitesse, indispensable à la cyclisation du squalène, est effectivement responsable de l'orientation stérique donnée à cette réaction; 3. la biosynthèse des triterpènes se fait indépendamment dans le latex et dans les tissus de la plante; 4. le lanostérol présent dans le latex de certaines Euphorbes est, contrairement à celui des tissus animaux, un produit dérivé du cycloarténol. Une interprétation de la variabilité de la composition des latex d'Euphorbes en triterpènes peut être tirée de ces résultats.

**Abstract**—The use of *Euphorbia* latex *in vitro* as a source of enzymes for the biosynthesis of triterpenes has given the following results: 1. squalene oxide can be considered as an intermediate in this medium; 2. the particle fraction which is necessary to cyclize squalene is responsible for the steric control of the reaction; 3. the biosynthesis of triterpenes in the latex seems to be independent of that in the tissues of the same plant; and 4. cycloartenol is transformed into lanosterol in the latex of *E. lathyris*. An interpretation is given of previous results on the chemotaxonomy of the genus *Euphorbia*.

DANS une étude préliminaire<sup>1</sup> nous avons montré l'aptitude du latex d'*Euphorbia* à synthétiser *in vitro* les triterpènes à partir d'acétate  $\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{CO}_2\text{Na}$ . Nous avons mis à profit cette propriété pour obtenir quelques résultats complémentaires résumés ci-dessus.

### A. INTERMÉDIAIRES DE LA CYCLISATION DU SQUALÈNE EN TRITERPÈNES

Depuis que le rôle de l'époxyde de squalène comme intermédiaire de la cyclisation du squalène en lanostérol a été mis en évidence dans le foie de rat,<sup>2,3</sup> ce produit a été trouvé également dans deux systèmes végétaux: il a été cyclisé en  $\beta$ -amyrine par un homogénat de pois en germination<sup>4</sup> et il est présent dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*, où il doit être un précurseur du cycloarténol.<sup>5</sup> Par contre, dans ce dernier milieu, aucune radioactivité n'a été décelée au niveau du cycloartène. On sait pourtant que Barton et Moss<sup>6</sup> ont établi que le lanostadiène est un précurseur du lanostérol dans la levure.

Nous-mêmes avons cherché dans l'extrait de latex, après incubation avec de l'acétate  $1\text{-}^{14}\text{C}$ , la radioactivité au niveau de ces deux produits: époxyde de squalène et cycloartène. Nos résultats indiquent que le premier de ces deux intermédiaires postulés est effectivement synthétisé dans le latex alors que l'activité du second y est négligeable. Ceci fournit donc

<sup>1</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 1235 (1967).

<sup>2</sup> E. E. VAN TAMELEN, J. D. WILLETT, R. B. CLAYTON et K. E. LORD, *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4752 (1966).

<sup>3</sup> E. J. COREY, W. E. RUSSEY et P. R. O. DE MONTENALLO, *J. Am. Chem. Soc.* 88, 4750 (1966).

<sup>4</sup> E. J. COREY et P. R. O. DE MONTENALLO, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3362 (1967).

<sup>5</sup> P. BENVENISTE et R. A. MASSY-WESTROFF, *Tetrahedron Letters* 37, 3553 (1967).

<sup>6</sup> D. H. R. BARTON et G. P. MOSS, *Chem. Commun.* 261 (1966).

un élément supplémentaire pour généraliser la voie de l'époxyde de squalène chez les végétaux supérieurs.

## B. LOCALISATION DU SITE DE CYCLISATION DU SQUALÈNE

### *Activité du Latex Centrifugé*

Nous avons montré que le latex centrifugé à basse vitesse (5000 g)<sup>1</sup> perd toute aptitude à synthétiser les triterpènes. Nous complétons ce résultat en indiquant (Tableau 1) que le surnageant est également incapable de synthétiser le farnésol libre et le squalène.

TABLEAU 1. RADIOACTIVITÉ DES PRODUITS DE LA SYNTHÈSE TERPÉNIQUE DANS LE LATEX DE *E. cyparissias*

Produits synthétisés	Latex entier (2 ml) (cpm)	S <sub>5000 g</sub> de 2 ml de latex (cpm)
Farnésol libre	1 400	100
Squalène	400	20
Triterpènes	19 000	300

On sait que le pyrophosphate de farnésyle est synthétisé par les enzymes solubles et que sa dimérisation se fait au niveau d'une surface particulière (microsomes de l'homogénat de foie de rat, par exemple). Ainsi la centrifugation du latex élimine des particules qui sont nécessaires à la synthèse du squalène.

Quant au farnésol libre, il est libéré du pyrophosphate par des phosphatases qui, elles aussi, sont microsomales, ce qui explique son absence du surnageant.

### *Localisation des Produits de la Synthèse Terpénique*

La centrifugation du latex après incubation avec de l'acétate 1-<sup>14</sup>C permet d'extraire séparément le culot et le surnageant et de déterminer la radioactivité des produits qui s'y trouvent.

TABLEAU 2. RADIOACTIVITÉ DES PRODUITS LOCALISÉS DANS LE CULOT ET LE SURNAGEANT DE CENTRIFUGATION APRÈS INCUBATION AVEC ACÉTATE (LATEX D'*E. cyparissias*, 2 ml)

Produits synthétisés	Cpm après temps d'incubation			
	12 hr		24 hr	
	Culot	Surnageant	Culot	Surnageant
Farnésol libre	2700	1500	1700	1500
Squalène	80	400	50	700
Triterpènes	6000	500	1200	700

Nous constatons avec le Tableau 2 que la presque totalité des triterpènes synthétisés est localisée dans le culot. Puisque, pondéralement, les triterpènes sont présents dans le

surageant, il faut admettre qu'ils restent associés à la surface particulaire où ils sont synthétisés, plus de 24 hr avant d'être dispersés dans le surageant. Cette forme de dispersion reste d'ailleurs à déterminer.

La faible activité du squalène présent dans le culot indique que ce produit y a un renouvellement rapide. Par contre, tout se passe comme si le squalène "dissocié" de ces membranes et présent dans le surageant s'y accumule sans pouvoir être cyclisé.

### Systemes Mixtes

Nous avons voulu ensuite vérifier que les particules qui constituent notre culot de centrifugation et qui sont le site de la cyclisation du squalène sont bien responsables de l'orientation stérique donnée à cette réaction. La cyclisation du squalène dans le latex conduit à une grande variété de produits dont nous avons montré la signification phylétique.<sup>7</sup>

Le culot du latex de *E. cyparissias* (espèce produisant du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol) a été dispersé dans le surageant du latex de *E. erythrae* (espèce produisant de l'euphol et de l'euphorbol) et *vice-versa* le culot de *E. erythrae* dans le surageant de *E. cyparissias*. Le Tableau 3 montre que le premier mélange, riche en euphol et euphorbol endogènes, incubé avec de l'acétate 1-<sup>14</sup>C, a synthétisé du cycloarténol radioactif et que le deuxième a synthétisé de l'euphol.

TABLEAU 3. NATURE DES TRITERPÈNES SYNTHÉTISÉS PAR DES SYSTÈMES MIXTES DE LATEX

Milieu d'incubation	Activité des triterpènes (cpm)	
	Produits synthétisés	
	Méthylène-24	
	cycloartanol+cycloarténol	Euphol+euphorbol
Surnageant <i>E. erythrae</i> + culot <i>E. cyparissias</i>	5720	1000
Surnageant <i>E. cyparissias</i> + culot <i>E. erythrae</i>	480	3120

Ce résultat permet de confirmer le rôle des surfaces particulières dans la cyclisation du squalène. Il faut également noter que, en poids de matière sèche, le culot ne représente qu'environ 2 pour cent du poids total du latex. Nous n'avons pas pu trouver dans la littérature de données de cytologie définissant la nature des particules du culot.

### C. COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ DU LATEX ISOLÉ ET DES TISSUS DE LA PLANTE

Pour montrer que le latex constitue dans la plante un système particulier nous avons fait des incorporations d'acétate séparément dans le latex *in vitro* et dans les tissus de la plante où le latex a été prélevé.

Cette expérience a été réalisée avec *E. erythrae* (latex à euphol et euphorbol) et *E. lathyris* (latex à lanostérol, cycloarténol et méthylène-24 cycloartanol). Pour cette dernière espèce les feuilles ont simplement été immergées dans une solution d'acétate radioactif; pour la première, qui est une espèce cactiforme sans feuilles, des sections de tige ont été utilisées de la même façon.

<sup>7</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 7, 89 (1968).

Après l'incubation le latex et les tissus ont été extraits séparément. L'activité des stérols et celle de chacun des constituants triterpéniques a été mesurée.

Les Tableaux 4 et 5 rapportent les résultats obtenus. Ceux-ci confirment la très faible synthèse de stérols dans le latex isolé. Par contre, dans les deux cas, des stérols sont synthétisés par les tissus. Dans les deux cas également, les tissus synthétisent du cycloarténol en plus des triterpènes spécifiques du latex qu'ils contiennent encore: dans *E. lathyris* (Tableau 4) le rapport cycloarténol/lanostérol est plus élevé dans les tissus que dans le latex; de même pour *E. erythrae* le rapport cycloarténol/euphol (Tableau 5).

Donc, quels que soient les triterpènes (sans stérols) synthétisés par le latex (cycloarténol, lanostérol ou euphol), ce couple cycloarténol-stérols est synthétisé par les tissus.

TABLEAU 4. BILAN DE LA SYNTHÈSE TERPÉNIQUE DANS *E. lathyris*

Produits synthétisés	Activité en cpm synthétisée par	
	Les feuilles entières (1 g de poids sec)	Le latex (1 ml)
Cycloarténol + méthylène-24 cycloartanol	64 000	35 000
Lanostérol	19 050	19 000
Stérols	6 800	0

TABLEAU 5. BILAN DE LA SYNTHÈSE TERPÉNIQUE DANS *E. erythrae*

Produit synthétisé	Activité en cpm synthétisée par	
	Des sections de tiges (0,5 g de poids sec)	Le latex (2 ml)
Cycloarténol	10 400	1 100
Euphol + euphorbol	32 000	32 000
Stérols	3 300	500

Ainsi les Euphorbes possèderaient deux systèmes distincts:

- 1—le latex sans stérols mais contenant des triterpènes variés;
- 2—les tissus "normaux" qui, comme tous les tissus des autres végétaux supérieurs étudiés contiennent du cycloarténol et des phytostérols.<sup>8</sup>

Les Euphorbes à lanostérol et à euphol ne seraient donc des cas particuliers, parmi les plantes supérieures, qu'au niveau de leur latex.

#### D. BIOSYNTHESE DU LANOSTÉROL DANS LE LATEX

Un certain nombre d'espèces d'*Euphorbia* sont connues pour contenir du lanostérol.<sup>7</sup> Si l'expérience rapportée ci-dessus avec *E. lathyris* est généralisable aux autres Euphorbes

<sup>8</sup> L. J. GOAD dans *Terpenoids in Plants* (éditeur J. B. PRIDHAM), Academic Press, Londres (1967); J. D. EHRHARDT, Thèse Docteur-Ingénieur, Strasbourg (1967).

à lanostérol, on peut affirmer que le lanostérol de ces plantes n'est synthétisé que par leur latex. Ces latex ont donc en commun avec les tissus animaux et ceux des levures la faculté de synthétiser le lanostérol. Or on sait déjà que dans les tissus animaux et ceux des levures, le lanostérol est le précurseur des stérols alors que les latex sont dépourvus de stérols (Tableaux 4 et 5). Ceci constitue une première distinction.

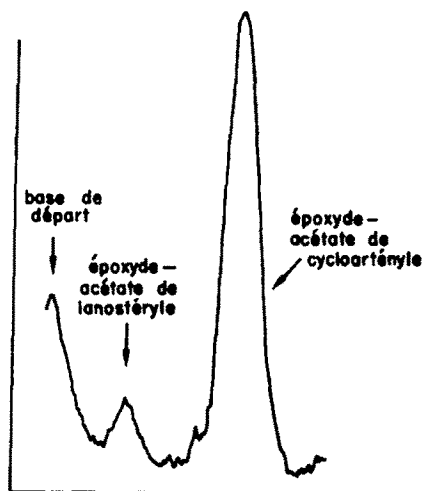


FIG. 1. DIAGRAMME DE RADIOACTIVITÉ DES ÉPOXYDES-ACÉTATES DE TRITERPÈNES DE *E. lathyris* APRÈS INCORPORATION DE CYCLOARTÉNOL-25- $^{14}\text{C}$ .

TABLEAU 6. RECRISTALLISATION DE L'ÉPOXYDE-ACÉTATE DE LANOSTÉROL BIOSYNTHÉTISÉ À PARTIR DE CYCLOARTÉNOL 25- $^{14}\text{C}$

Recristallisation	Activité spécifique (cpm/mg)
1	130
2	115
3	120
4	132

L'expérience suivante va nous apporter une deuxième distinction relative à la biosynthèse de ce lanostérol. Le cycloarténol n'a jamais été mis en évidence dans un tissu animal ou dans une levure (où nous-mêmes l'avons d'ailleurs cherché<sup>9</sup>) alors qu'il coexiste dans les latex avec le lanostérol.

Nous avons profité de la synthèse de cycloarténol- $^{14}\text{C}$ -25, réalisée par Murphy,<sup>10</sup> pour incorporer ce produit au latex de *E. lathyris*. Nous avons pu mettre ainsi en évidence sa transformation en lanostérol radioactif. Ce résultat a été obtenu par analyse au lecteur de chromatoplaques Berthold du mélange des époxydes-acétates de triterpènes<sup>11</sup> (Fig. 1) et par

<sup>9</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 3682 (1965).

<sup>10</sup> C. MURPHY et G. OURISSON. Travaux non publiés.

<sup>11</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 4, 799 (1965).

recristallisation de l'époxyde-acétate de lanostéryle ainsi isolé (Tableau 6). Nous avons évidemment vérifié que la transformation observée est due à une réaction enzymatique: le cycloarténol, soumis au même traitement mais sans latex est récupéré intact. De plus, nous avons vérifié la localisation de l'isotope  $^{14}\text{C}$  sur l'atome C-25 du lanostérol biosynthétisé, pour exclure la possibilité d'une dégradation de la chaîne latérale du cycloarténol- $^{14}\text{C}$ -25 conduisant à un produit radioactif à bas poids moléculaire qui aurait pu se métaboliser en lanostérol. D'ailleurs:

- 1—le rendement de la réaction (environ 2 pour cent) est suffisamment bon et reproductible pour éliminer cette possibilité;
- 2—la transformation de lanostérol- $^{14}\text{C}$ -25 en cycloarténol n'a pas été observée dans les mêmes conditions;
- 3—le cycloarténol- $^{14}\text{C}$ -25 n'a pas pu être transformé en un autre triterpène dans les latex de *E. cyparissias* et *E. erythraea*.

Il semble donc que les latex à lanostérol présentent un cas de convergence avec les tissus animaux: un même produit, le lanostérol, y est présent mais sa biosynthèse et son catabolisme y semblent différents.

### CONCLUSION

Nous proposons l'interprétation suivante des résultats décrits ci-dessus et de ceux que nous avons décrits antérieurement dans une première étude chimiotaxonomique des latex du genre *Euphorbia*.<sup>7</sup>

Les latex sont des systèmes particuliers, dont le rôle physiologique, quel qu'il soit, est assuré par la présence de grandes quantités de triterpènes en suspension. Ces triterpènes, intervenant en nature et non en tant qu'intermédiaires de la biosynthèse des phytostérols, des variations structurales sont compatibles avec la survie, et peuvent, si elles présentent un avantage même mineur, être sélectivement préservées dans des groupes plus ou moins étendus d'espèces.

En dehors du latex d'*Euphorbia* la littérature n'offre que deux cas de présence de lanostérol dans un végétal supérieur: l'huile de café<sup>12</sup> et le tissu de rose.<sup>13</sup> Or une étude complémentaire et critique de ces deux cas a permis d'infirmer ces résultats.<sup>14</sup> Le cycloarténol semble donc bien être le triterpène universellement répandu chez les végétaux chlorophylliens et le lanostérol celui des animaux et des champignons.

Etant donné l'absence de lanostérol dans les tissus végétaux, la biosynthèse des phytostérols peut s'expliquer:

- soit par passage par le lanostérol, à condition que ce produit ait un renouvellement trop rapide pour être décelé;
- soit par passage par le cycloarténol.

Goad et Goodwin d'une part,<sup>15</sup> Benveniste *et al.*,<sup>16</sup> Ehrhardt *et al.*<sup>17</sup> d'autre part, ont explicité cette hypothèse en présentant une voie métabolique vraisemblable reliant les produits effectivement trouvés dans leurs milieux d'étude respectifs.

<sup>12</sup> H. P. KAUFMANN et A. K. SEN GUPTA, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 66, 461 (1964).

<sup>13</sup> B. L. WILLIAMS et T. W. GOODWIN, *Phytochem.* 4, 81 (1965).

<sup>14</sup> L. J. GOAD. Communication particulière.

<sup>15</sup> L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *European J. Biochem.* 1, 357 (1967).

<sup>16</sup> P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 5, 31 (1966).

<sup>17</sup> J. D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 6, 815 (1967).

Dans les latex également, le cycloarténol est le produit le plus généralement répandu puisqu'il est trouvé dans tous les groupes d'espèces d'*Euphorbia*. La présence de ce triterpène serait donc un caractère "primitif" que diverses mutations auraient pu modifier:

- apparition d'enzymes permettant des transformations du cycloarténol (cas des latex à lanostérol);
- modification de la stéréospécificité de la squalène-oxydocyclase conduisant aux triterpènes de la famille de l'euphol ou du tirucallol (cas de quelques groupes d'espèces cactiformes et de *Hura crepitans*<sup>18</sup>);
- modification de la spécificité de la même enzyme, conduisant à des triterpènes pentacycliques partiellement estérifiés (cas du groupe *Poinsettia*);
- modification du système enzymatique avec polymérisation de la presque totalité du pyrophosphate d'isopentényle intermédiaire en caoutchouc (cas d'*Hevea*). Il est d'ailleurs intéressant de noter que nous avons également mis en évidence la présence de traces de cycloarténol dans le latex d'*Hevea*.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les indications générales concernant la collecte du latex, le mode d'incubation, l'extraction, la purification et le comptage des triterpènes sont données dans la publication précédente.<sup>1</sup>

Les valeurs chiffrées d'activité en cpm sont calculées en tenant compte de la quantité totale (endogène ou entraîneur) des différents produits cherchés et sont donc indépendantes des pertes lors des extractions et purifications.

### Mise en Évidence de l'Époxyde de Squalène

Du latex de *E. cyparissias* (20 ml) est incubé 24 hr *in vitro* avec 200  $\mu$ C d'acétate 1-<sup>14</sup>C. Après lyophilisation et extraction, on ajoute 30 mg d'époxyde de squalène et 30 mg de lanostène-8. L'insaponifiable est chromatographié sur plaque préparative de silice. La fraction correspondant au lanostène (et pouvant contenir également lanostadiène-8,24 et cycloartène-24) comptée sans autre purification, a une activité négligeable.

La fraction époxyde de squalène est rechromatographiée et traitée comme l'ont indiqué Benveniste et Massy-Westropp:<sup>5</sup> une partie est transformée en diol 2,3 et chromatographiée, et une partie de ce diol est transformée en monoacétate et chromatographiée.

Le comptage des trois produits indique une bonne constance de l'activité spécifique: époxyde 158 cpm/mg; diol 162 cpm/mg; monoacétate 140 cpm/mg; ce qui est un critère suffisant de la pureté de la pureté de l'époxyde.

### Caractérisation du Farnésol Libre

Pour déterminer l'activité du farnésol synthétisé dans le latex, du farnésol entraîneur est ajouté au moment de l'extraction. Par chromatographie sur plaque de silice, celui-ci est isolé puis acétylé. L'acétate obtenu est chromatographié sur plaque de silice, puis de silice imprégnée de nitrate d'argent. On obtient ainsi un produit débarrassé d'éventuels acétates de stérols.

### Centrifugation

Le latex est dilué par un égal volume de tampon phosphate 0,1 M pH 7,4, saccharose 0,5 M. La centrifugation est faite dans une centrifugeuse Serval à 5000 g pendant 10 mn à température ordinaire. Pour redisperser un culot de centrifugation dans le surnageant le tube de centrifugeuse est agité par un Vibromixer pendant 1 mn.

### Incorporation d'Acétate aux Tissus d'Euphorbes

Pour *E. lathyris* les feuilles sont immergées dans une solution aqueuse d'acétate CH<sub>3</sub>-<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>Na (10  $\mu$ C pour 5 g de feuilles). Après 24 hr les feuilles sont lyophilisées, broyées et extraites à l'éther de pétrole. L'insaponifiable est chromatographié et les triterpènes et stérols sont séparés de la manière habituelle. Pour *E. erythraea* des sections de tige d'environ 0,5 mm d'épaisseur sont immergées et traitées comme pour les feuilles ci-dessus.

<sup>18</sup> G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 4, 813 (1965).

*Incorporation de Cycloarténol 25-<sup>14</sup>C au Latex de E. lathyris*

On ajoute 0,2 mg de Tween-20 à une solution étherée de  $5 \times 10^5$  cpm de cycloarténol 25-<sup>14</sup>C fraîchement rechromatographié. L'éther est évaporé sous vide sans chauffer. Puis on ajoute 0,2 ml de tampon phosphate 0,1 M; pH 7,4, 0,5 M sucrose et on agite le tube. A ce mélange on ajoute 1 ml de latex de *E. lathyris* aussitôt après sa collecte de la plante. Après 24 hr d'incorporation le latex est lyophilisé et les triterpènes sont extraits, acétylés et époxydés de la manière habituelle.

On obtient un mélange (36 mg) d'époxydes-acétates de lanostérol, cycloarténol et méthylène-24 cycloartanol en quantités sensiblement égales. Ce mélange est fractionné sur une plaque préparative éluee trois fois avec un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle 95/5.

La répartition de la radioactivité sur la plaque est analysée par un lecteur de chromatogramme Berthold qui fournit le diagramme de la Fig. 1.

L'époxyde-acétate de lanostéryle est récupéré (10 mg, 8000 cpm) et rechromatographié deux fois sur plaque préparative avec un système d'élution très sélectif (plusieurs éluions successives). On y ajoute 40 mg du même produit non radioactif et on recristallise quatre fois dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (F=196-197°, litt. F=194-198°<sup>14</sup>). Les cristaux obtenus à chaque cristallisation sont comptés au compteur à scintillation Packard (1 mg de cristaux, mouvement propre 18 cpm, rendement de comptage 62 pour cent). Le Tableau 6 indique que l'activité spécifique est constante. Le rendement de la transformation de cycloarténol en lanostérol est de 1,6 pour cent.

Une partie du mélange d'acétates de triterpènes non époxydés (20 mg) obtenus dans une autre expérience a été ozonisée (20 mn à -70° en solution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Pyridine 99/1) puis l'ozonide obtenu a été réduit (1 hr avec une solution de NaBH<sub>4</sub> dans l'éthanol absolu). Par extraction et chromatographie on isole un produit qui a même *R<sub>f</sub>* que l'acétoxy-3β trinorlanostène-8-ol-24<sup>10</sup> et dont la radioactivité est négligeable.

Une incorporation de lanostérol 25-<sup>14</sup>C<sup>10</sup> dans les mêmes conditions n'a pas pu mettre en évidence de transformation de ce produit en un autre triterpène. Les deux incorporations (cycloarténol et lanostérol) ont été également faites dans le latex de *E. cyparissias*, dont la teneur en lanostérol est très faible, en donnant également des résultats négatifs.

**Remerciements**—Nous remercions les Drs. Benveniste et Fritig pour leurs conseils et leur aide pour les comptages de radioactivité.