

CYCLISATION DE L'ÉPOXYDE-2,3 DE SQUALÈNE PAR DES MICROSOMES EXTRAITS DE TISSUS DE TABAC CULTIVÉS *IN VITRO*

R. HEINTZ et P. BENVENISTE

Groupe de Laboratoires de Strasbourg-Cronenbourg, Laboratoire des Applications Biologiques,
67 Strasbourg-Cronenbourg, France

(Received 3 November 1969)

Abstract—Squalene-2,3-epoxide (I) is converted into cycloartenol by washed microsomes obtained from tobacco tissues grown *in vitro*. The cyclization is independent of the following cofactors: ATP, NADH, Mg^{2+} . These results are considered in the light of hypothetical mechanisms for 2,3-oxidosqualene cyclization.

Résumé—L'époxyde-2,3 de squalène (I) est transformé en cycloarténol par des microsomes extraits de tissus de Tabac cultivés *in vitro*. La cyclisation est indépendante des cofacteurs suivants: ATP, NADH, Mg^{2+} .

LE MÉCANISME de la biosynthèse du lanostérol (II) à partir de l'époxyde-2,3 de squalène (I) dans le foie de Rat a été décrit^{1,2} comme étant une réaction de cyclisation non-oxydative de l'époxyde de squalène, induite par un proton. Il était raisonnable de supposer l'existence d'un processus analogue dans les tissus végétaux, mais dans ce cas, le triterpène tétracyclique formé devait être le cycloarténol (III). Ce fait a pu être mis en évidence par Rees *et al.*, qui ont cyclisé l'époxyde-2,3 de squalène avec un homogénat (S10) de feuille de haricot.³

Plusieurs auteurs ont suggéré que le cycloarténol pourrait jouer un rôle central en tant qu'intermédiaire triterpénique dans la biosynthèse des stérols de végétaux supérieurs.^{4,5} Cependant, cette hypothèse ne saurait exclure *a priori* la mise en jeu d'autres triterpènes tétracycliques à renouvellement rapide, tels que lanostérol (II) et parkéol (IV) dans le schéma biogénétique conduisant aux stérols (Fig. 1); mais jusqu'à présent, il n'a pas été possible de les isoler dans les expériences de biosynthèse.^{6a}

Nous avons entrepris de cycliser l'époxyde de squalène au moyen d'un système acellulaire extrait de tissus de Tabac afin de tenter de mettre en évidence, en plus du cycloarténol attendu, des produits à renouvellement très rapide tels le lanostérol ou le parkéol qui ne pouvaient pas être détectés *in vivo*.

Ces triterpènes, s'ils s'étaient formés, auraient éventuellement pu s'accumuler dans un système acellulaire incapable, comme nous l'avons montré précédemment,^{6b,7} d'assurer leur catabolisme oxydatif en 31-nor-triterpènes et en stérols.

¹ E. E. VAN TAMELEN, J. D. WILLETT, R. B. CLAYTON et K. E. LORD, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4752 (1966).

² E. J. COREY, W. E. RUSSEY et P. R. ORTIZ DE MONTELLANO, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4750 (1966).

³ H. H. REES, L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *Tetrahedron Letters* **723** (1968).

⁴ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* **5**, 31 (1966).

⁵ L. J. GOAD, B. L. WILLIAMS et T. W. GOODWIN, *European J. Biochem.* **3**, 232 (1967).

^{6a} P. BENVENISTE, M. J. E. HEWLINS et B. FRITIG, *European J. Biochem.* **9**, 526 (1969).

^{6b} R. HEINTZ, résultats non publiés.

⁷ P. BENVENISTE, G. OURISSON et L. HIRTH, *Phytochem.* **9**, 1073 (1970).

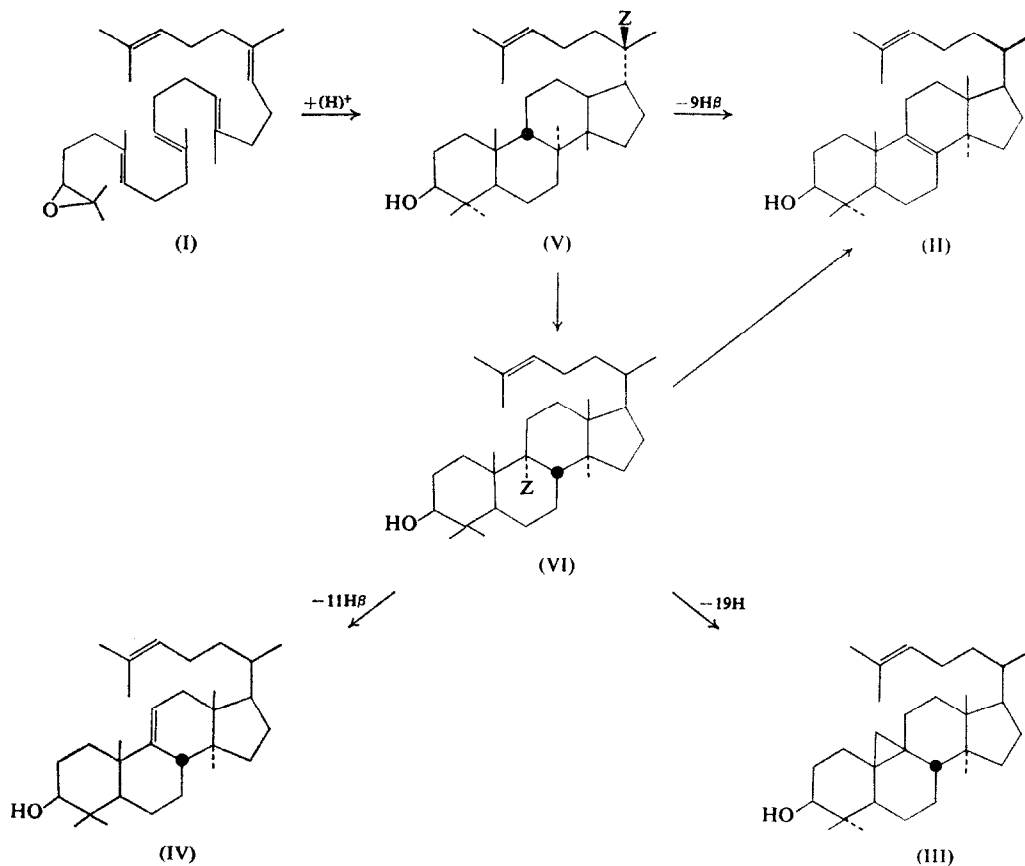


FIG. 1. SCHÉMA BIOGÉNÉTIQUE CONDUISANT RESPECTIVEMENT AU CYCLOARTÉNOL III, AU PARKÉOL IV ET AU LANOSTÉROL II.

Z pouvant être une charge positive, un radical enzymatique ou un radical non enzymatique.

Par ailleurs, et pour poursuivre une étude entreprise précédemment⁷ sur la localisation intracellulaire des enzymes de la stéroïdogénèse dans les tissus de Tabac cultivés *in vitro*, nous avons recherché la localisation de la cyclase de l'époxyde-2,3 de squalène.

RESULTATS ET DISCUSSION

La technique utilisée pour l'obtention des fractions subcellulaires a été décrite précédemment.⁷ Des fractions appelées C_1 , C_{20} , C_{200} et E_{40}^{80} et contenant respectivement des noyaux, des mitochondries, des microsomes et des enzymes solubles sont utilisées pour les incubations d'époxyde-2,3 de squalène ^{14}C . L'extrait chromatographié de l'incubat nous permet d'obtenir par lecture de la radioactivité un pic de radioactivité A. Ce pic correspond à une substance de mobilité identique à celle des triterpènes tétracycliques. Le produit est extrait de la silice après addition de lanostérol, de parkéol, de cycloarténol et de méthylène-24 cycloartanol non radioactifs témoins (0,5 mg), traité comme précédemment^{4,8} et transformé en acétate-

⁸ G. PONSINET et G. OURISSON, *Phytochem.* 4, 799 (1965).

époxyde. Le comportement chromatographique du seul produit radioactif est identique à celui de l'acétate-époxyde-24,25 du cycloarténol. Après addition d'acétate-époxyde froid, on recristallise jusqu'à activité spécifique constante (Tableau 1).

TABLEAU 1. RECRISTALLISATION DE L'ACÉTATE-ÉPOXYDE-24(25)
DU CYCLOARTÉNOL

Cristallisation	1	2	3
dpm/mg d'acétate époxyde de cycloarténol	1530	1550	1460

Recristallisation dans le mélange $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ d'acétate-époxyde-24(25) de cycloarténol marqué (100 000 dpm) après addition d'acétate époxyde de cycloarténol (50 mg) non marqué.

Aucune radioactivité significative ne peut être décelée dans l'acétate-époxyde-24,25 du méthylène-24 cycloartenol, ni dans les acétates-diépoxydes du lanostérol et du parkéol.

L'époxyde-2,3 de squalène est donc cyclisé et le seul triterpène tétracyclique obtenu est le cycloarténol. Le fait que nous n'arrivons pas à déceler le lanostérol et le parkéol peut signifier que: — ces produits n'interviennent pas dans la biosynthèse des stérols du Tabac; ou que la taille de leurs réserves endogènes ne varie pas de manière suffisante au cours de l'incubation pour qu'ils soient détectés, compte tenu de l'activité spécifique du précurseur (époxyde-2,3 de squalène ^{14}C) utilisé.

L'efficacité de différentes fractions subcellulaires pour la cyclisation de l'époxyde-2,3 de squalène est comparée dans le Tableau 2: les microsomes sont plus actifs que les mitochondries et les noyaux. Quant aux enzymes solubles E_{40}^{80} , non seulement elles n'ont pas d'activité cyclasique, mais encore elles sont incapables de stimuler un système ne comprenant que des fractions particulières. Tout comme la squalène-synthétase précédemment étudiée, la cyclase est une enzyme liée très fortement à des structures membranaires (réticulum endoplasmique), donc difficile à solubiliser.

TABLEAU 2. ACTIVITÉ CYCLASIQUE DE DIFFÉRENTES FRACTIONS SUB-CELLULAIRES

	Acétate epoxyde* du cycloarténol	Epoxyde-2,3 de* squalène récupéré
Noyaux + enzymes solubles (E_{40}^{80})	6140	214 000
Mitochondries + enzymes solubles	12 450	236 000
Microsomes + enzymes solubles	20 500	200 000
Microsomes seuls	26 500	300 000
E_0^{80}	1400	110 000
E_{40}^{80}	4730	160 000

Fractions subcellulaires (2 mg de protéines), enzymes solubles (2 mg de protéines), milieu B (1 ml), époxyde-2,3 de squalène (radioactivité spécifique $1,43 \times 10^6$ dpm/ μM), volume total 6,5 ml.

* dpm/mg de protéines.

TABLEAU 3. EFFET DE L'OMISSION DE CERTAINS COFACTEURS DU MILIEU B

	Acétate epoxyde* du cycloarténol	Epoxyde-2,3 de* squalène récupéré
Exp. I		
(1) Milieu complet	67 650	128 540
(2) Milieu complet moins ATP et NADH	65 340	147 000
Exp. II		
(1) Milieu complet†	11 110	37 720
(2) Milieu complet moins Mg ⁺⁺	12 250	25 730

Microsomes (2 mg de protéines), milieu B (0,5 ml), époxyde-2,3 de squalène (radioactivité spécifique 10⁷ dpm/ μ M). Exp. I, 250 000 dpm/mg de protéines microsomaux. Exp. II, 60 000 dpm/mg de protéines microsomaux.

* dpm/mg de protéines microsomaux.

† Dans cette expérience, nous dialysons avec précaution les microsomes contre du tampon (2×10^{-2} M Tris, $2,5 \times 10^{-3}$ M mercaptoéthanol, pH 7,6).

Nous avons étudié l'effet de certains cofacteurs. Les résultats figurent dans le Tableau 3. Nous avons ainsi pu prouver que la cyclisation est indépendante d'un apport de NADH et d'ATP. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Dean *et al.* qui incubent l'époxyde-2,3 de squalène en présence d'un système enzymatique extrait de foie de Porc.⁹ Selon ces auteurs, la cyclisation de l'époxyde-2,3 de squalène en lanostérol peut être interprétée comme étant un mécanisme d'addition intramoléculaire initié par la capture d'un proton par le substrat et qui s'achève par la neutralisation d'une charge positive.

Ces réactions seraient catalysées par des groupements fonctionnels appropriés de la protéine enzymatique, ce qui permet d'expliquer le fait que des cofacteurs organiques ne soient pas indispensables à la réaction. Nous pouvons appliquer le même raisonnement pour la formation du cycloarténol (III) à partir de l'époxyde de squalène. L'unique différence consiste dans le fait que la neutralisation de la charge positive s'effectue par élimination d'un proton en C-9 dans le cas de la synthèse du lanostérol et par l'enlèvement d'un proton en C-19 de l'intermédiaire postulé (VI)⁵ et la fermeture du cycle propanique 9:19 dans le cas de la formation du cycloarténol (Fig. 1).

L'indépendance du système enzymatique vis-à-vis de Mg²⁺ est plus surprenante. Nous avons pensé que les vésicules ergastoplasmiques retiennent, en dépit des dialyses effectuées, des quantités suffisantes de cations divalents (Mg²⁺, Mn²⁺, etc.). Nous avons cependant constaté que, dans des conditions expérimentales identiques, la squalène-synthétase (enzyme dépendant, elle, d'un cation divalent) était inactive.⁷ Nous avons l'intention d'approfondir ce dernier point et dans ce but, nous avons entrepris de solubiliser la cyclase de l'époxyde-2,3 de squalène.

⁹ P. D. G. DEAN, P. R. ORTIZ DE MONTELLANO, K. BLOCH et E. J. COREY, *J. Biol. Chem.* **242**, 3014 (1967).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'article précédent⁷ sauf pour le points suivants.

Éléments marqués. L'époxyde-2,3 de squalène a été préparé biosynthétiquement par la méthode de Reid,¹⁰ appliquée aux cultures de tissus de Tabac,¹¹ selon le mode opératoire précisé ci-dessous. 12 cultures (36 g, poids frais) de tissus de Tabac cultivés *in vitro* sont introduites stérilement dans un erlenmeyer contenant 40 ml d'un milieu de Knop¹² auquel on ajoute 10 mg de phosphate de triéthanolamine, 3HCl. L'incubation avec agitation s'effectue pendant 5 hr à température constante. Les tissus sont alors filtrés sur gaze et transvasés dans une solution fraîche de Knop contenant, en plus des 10 mg d'inhibiteur, 150 μ C d'acétate de sodium ¹⁴C (95 mc/mM). On incube 90 min, puis les tissus sont prélevés et l'incorporation d'acétate ¹⁴C est bloquée par refroidissement brusque des cultures à -20° pendant une minute, les tissus sont alors filtrés sur gaze, lavés à l'eau pour éliminer l'acétate ¹⁴C non incorporé et conservés pendant 20 min à -20° dans des fioles de Fourneau et enfin lyophilisés pendant 18 hr.

L'époxyde-2,3 de squalène ¹⁴C formé est extrait à l'éther de pétrole pendant 17 hr dans un appareil Soxhlet; le solvant est évaporé sous vide et le résidu est chromatographié sur couche mince de silice, en présence d'époxyde-2,3 de squalène non radioactif témoin.

Nous avons obtenu deux préparations d'époxyde-2,3 de squalène ¹⁴C dont les activités spécifiques étaient d'environ respectivement 10⁶ dpm et 10⁷ dpm/ μ mole. Le produit radioactif est introduit en solution acétonique à 0,5 pour cent de Tween 80 dans le ballon d'incubation. L'acétone est évaporée sous vide et le résidu est repris par du tampon Tris pH 7 et homogénéisé sous azote au Vortex.

Incubations. Aux fractions particulières obtenues comme il a été décrit dans l'article précédent, nous ajoutons (ou non) les enzymes E_{40}^{80} , le milieu C (4×10^{-1} M Tris, 2×10^{-2} M mercaptoéthanol, 2×10^{-3} M nicotinamide, $3,2 \times 10^{-2}$ Mg²⁺; $1,6 \cdot 10^{-2}$ M ATP, 5×10^{-3} NADH ou NADPH, $3,2 \cdot 10^{-2}$ M K⁺, pH = 7,6). Nous incubons 5 hr à 31° sous azote. La réaction est bloquée par addition d'un volume de potasse éthanolique à 10 pour cent.

Traitement analytique des incubats. Les incubats sont extraits 3 fois par un volume d'éther de pétrole. Les phases organiques sont réunies et séchées sur Na₂SO₄. L'éther de pétrole est évaporé sous vide et le résidu est chromatographié sur couche mince de silice G (Merck, Darmstadt) (éluant: cyclohexane, acétate d'éthyle 90:10). L'isolement et l'identification des diméthyl-4,4 stérols sont effectués comme précédemment décrit par préparation des acétates, puis des acétates-époxydes^{5,8} après addition de témoins non radioactifs (0,5 mg). L'identification du méthylène-24 cycloartanol, du parkéol, du lanostérol et du cycloarténol se fait au niveau des acétates par chromatographie sur silice imprégnée de nitrate d'argent. Des plaques analytiques Merck sont immergées pendant 1 min dans une solution à 20 pour cent de AgNO₃ dans 75 pour cent EtOH. Ces plaques sont séchées à l'air libre pendant 1 hr et activées à 110° pendant 30 min. Une feuille de papier filtre est adaptée au sommet de la plaque pour assurer une évaporation constante. La migration s'effectue à 24° pendant 41 hr (éluant: cyclohexane/benzène 80-20, v/v). La mise en évidence de la radioactivité et la visualisation des bandes se fait de la manière habituelle. Dans ces conditions, nous séparons par ordre de polarité décroissante les acétates de méthylène-24 cycloartanol, de parkéol, puis le mélange lanostérol-cycloarténol qui sera séparé au niveau des acétates-époxydes.

Cristallisation à activité spécifique constante de l'acétate-époxyde-24,25 du cycloarténol. L'acétate-époxyde du cycloarténol non radioactif (50 mg) est ajouté à l'acétate-époxyde du cycloarténol radioactif ($\approx 100\,000$ dpm) obtenu lors d'une incubation. L'ensemble est cristallisé dans un mélange MeOH-CH₂Cl₂. Des fractions aliquotes de poids déterminé sont prélevées et la radioactivité est comptée au Packard. On a vérifié la constance de l'activité spécifique au cours des différentes recristallisations (Tableau 1).

Remerciements—Ce travail a été réalisé dans le cadre de la Recherche coopérative sur Programme No. 34 du Centre National de la Recherche Scientifique et aidé par une subvention du Commissariat à l'Energie Atomique (Division Biologique). Nous remercions Messieurs les Professeurs L. Hirth et G. Ourisson ainsi que Monsieur le Dr. P. Schaefer pour leurs encouragements et les nombreuses discussions que nous avons eues avec eux sur ces problèmes. Nous remercions également Madame P. Schmitt et Mademoiselle P. Fund pour leur excellente assistance technique.

¹⁰ W. W. REID, *Phytochem.* **7**, 451 (1968).

¹¹ U. EPPENBERGER, G. OURISSON et L. HIRTH, *European J. Biochem.* **8**, 120 (1969).

¹² L. HIRTH, Thèse, Paris (1958).