

46

EXTRAIT DE LA / REPRINTED FROM  
REVUE EUROPÉENNE D'ÉTUDES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES 1971  
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH 1971

NUMÉRO / ISSUE 9 — VOLUME XVI — PAGES 897 à 908

*Mémoire / Original paper*

RÔLE DES TRITERPÈNES DANS L'ATTACHEMENT  
DES L-ACIDES AMINÉS PAR DES "ARN MATRICIELS"

par M. BELJANSKI et N. VAPAILLE

(Institut Pasteur, Paris)

*Flammarion Médecine-Sciences*  
20, rue de Vaugirard, Paris-6<sup>e</sup>, France

RÔLE DES TRITERPÈNES DANS L'ATTACHEMENT  
DES L-ACIDES AMINÉS PAR DES "ARN MATRICIELS"

par M. BELJANSKI et N. VAPAILLE

(Institut Pasteur\*, Paris)

RÉSUMÉ

*L'asiaticoside, l'acide asiatic et l'acide madécassique affectent de façon différente l'attachement de la L-proline-<sup>14</sup>C et de la L-alanine-<sup>14</sup>C par l'ARN-m, en présence de n'importe lequel des 4 nucléoside-5'-triphosphates et d'une préparation d'enzyme bactérienne partiellement purifiée dont les propriétés ont été précédemment décrites. L'attachement de la proline par l'ARN-m est ralenti par chacun des triterpènes utilisés, tandis que la fixation de l'alanine n'est considérablement accélérée que par l'acide asiatic libre. Ce dernier inhibe le turnover de l'alanine liée à l'ARN-m, déplaçant ainsi la réaction vers l'accumulation du complexe ARN-m-alanine, complexe qui est un intermédiaire obligatoire dans la synthèse des oligopeptides dans le système considéré. Aucun effet des triterpènes n'a été observé sur le turnover de la proline liée à l'ARN-m. La fixation des L acides aminés à l'ARN-t, en présence d'ATP, n'est pas affectée par les triterpènes non plus que l'activité des ribosomes isolés. Une hypothèse est proposée pour rendre compte de l'effet des triterpènes dans les cellules des mammifères en relation avec la biosynthèse du collagène, protéine riche en proline, hydroxyproline et alanine.*

SUMMARY

*Asiaticoside, asiatic and madecassic acids affect the binding of L-<sup>14</sup>V-proline and L-<sup>14</sup>C-alanine to m-RNA in the presence of any one of the four nucleoside triphosphates and a partially purified bacterial enzyme preparation whose properties have been previously described. The binding of proline to m-RNA, but not its turnover, is inhibited by any one of the triterpenes used, while that of alanine is highly increased only by free asiatic acid. This latter inhibits the turnover of alanine bound to m-RNA thus shifting the reaction towards an accumulation of the « m-RNA-alanine » complex which is an intermediate in the synthesis of oligopeptides in the present system. The binding of L-amino acids to t-RNA in the presence of ATP is not affected by triterpenes. A hypothesis is proposed to account for the effect of triterpenes in mammalian cells in connection with biosynthesis of collagen, a protein rich in proline, hydroxyproline and alanine.*

Le rôle de certains triterpènes présents dans l'« Extrait titré de Centella asiatica »\*\* a été étudié par divers auteurs (15, 24, 26) en vue de préciser le mode d'action de ces composés utilisés en thérapeutique.

Bien que des observations intéressantes et convaincantes aient été décrites pour démontrer en

particulier l'efficacité de ces triterpènes au cours de la réparation des plaies expérimentales, aucun résultat concernant les réactions biochimiques fondamentales impliquées dans la biosynthèse des protéines n'a été présenté. Pourtant les travaux de Ratsimamanga et coll. (24) indiquaient suffisamment que certaines de ces substances pourraient agir en accélérant la « biosynthèse des protéines ». En effet, ces auteurs avaient montré, d'une part que les triterpènes tels que l'asiaticoside (fig. 1) (7) et l'acide asiatic accélèrent la

\* 25 rue du D<sup>r</sup> Roux, Paris-15<sup>e</sup>.

\*\* « Extrait titré de Centella asiatica », Madécassol (R), Laboratoires Laroche Navarron.

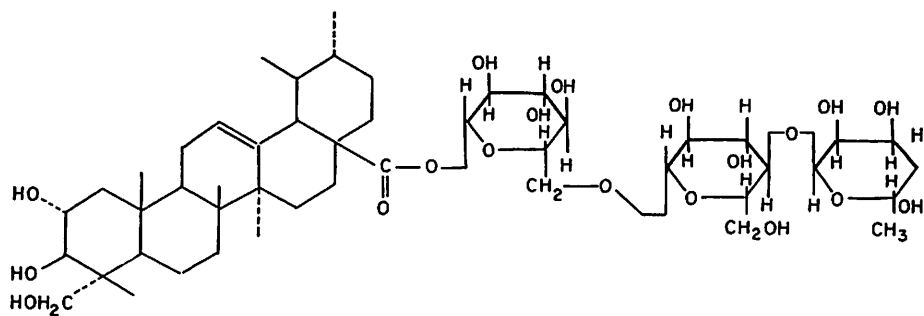


FIG. 1.

Formule chimique développée de l'asiaticoside. 2- $\alpha$ , 3  $\beta$ , 23-trihydroxy ursane-12-ène 28-oate de 1[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-6)]- $\beta$ -D-glucopyranose.

vitesse de multiplication des fibrocytes et des éléments vasculaires (24), et que, d'autre part, le tissu de granulation des animaux traités par les triterpènes possède un taux réduit d'hydroxyproline (24). Or, l'hydroxyproline semble jouer un rôle important dans la structure du collagène (17) dans lequel elle représente 14 % par rapport aux autres acides aminés (9). D'autre part, dans certaines lésions pathologiques de la peau, le derme contient un taux anormal de collagène (16) donc d'hydroxyproline. L'incorporation de la proline dans la peau du cobaye peut être inhibée par les triterpènes (15). Il était alors logique de se demander si l'asiaticoside (6, 20), l'acide asiatique (21) (22) et l'acide madécassique (19), constituants de l'extrait titré de *Centella asiatica*, agissent sur l'une des réactions biochimiques indispensables dans la biosynthèse des chaînes polypeptidiques.

Pour étudier l'action des triterpènes nous avons choisi un système enzymatique purifié d'origine bactérienne possédant la capacité de synthétiser *in vitro* des peptides. Ce système utilise chacun des quatre ribonucleoside-5'-triphosphates (XTP) (UTP, CTP, GTP, ATP) permettant la formation d'un complexe entre les L-acides aminés et l'ARN matriciel (AA-ARN-m), étape précédant la formation des  $\alpha$ -peptides (1, 2, 3). Les L-acides aminés ( $^{14}\text{C}$ ) sont attachés à l'intérieur de la chaîne nucléotidique (4) d'un ARN matriciel qui a été caractérisé par divers critères (4, 5). Au cours de cette réaction qui a lieu en l'absence comme en présence d'organites cellulaires, chaque XTP est dégradé en ribonucleoside-5'-diphosphate (XDP) et en orthophosphate (4). La synthèse des peptides à partir du complexe « AA-ARN-m » s'effectue dans une deuxième étape (1).

L'utilisation de ce système bactérien était dans une certaine mesure justifiée du fait que des systèmes très proches furent mis en évidence chez les cellules du foie de rat (23, 28, 29, 30). En effet, les microsomes ou des fragments de ceux-ci, et même le surnageant 105.000  $\times$  g contiennent

des enzymes analogues à celles que nous avons utilisées. Ces systèmes incorporent activement les acides aminés dans les protéines ou même synthétisent des peptides de faible masse moléculaire.

#### MATÉRIELS ET MÉTHODES

**Souche bactérienne.** Les bactéries *Escherichia coli* HFr (Hayes) qui ont servi pour l'isolement des systèmes subcellulaires, pour la purification des polypeptide-synthétases (5, 8) et des acides ribonucléiques ont été cultivées en milieu synthétique dans les conditions décrites précédemment (8).

Les ribonucleoside-5'-di et triphosphates proviennent de Duchapt-Caron, Montrouge, France et de P.L. Biochemical Inc.; poly U, P.L. Biochemical Inc. U.S.A.

Les acides aminés ( $\text{L-}^{14}\text{C}$  (ac. spécifiques de 34-120  $\mu\text{C}/\text{mM}$ ) : Energie Atomique, France.

Phosphoenol-pyruvate-Na-K, Böhlinger, Allemagne; kinase pyruvique : Sigma Co; asiaticoside, acide asiatique, acide madécassique et « madécassol » : Laboratoires Laroche-Navarron, Levallois, France.

**Isolement des acides ribonucléiques « actifs ».** Les fractions d'ARN riches en ARN matriciels (3, 4) ont été obtenues par fractionnement à l'aide de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  des ARN totaux isolés (phénol) à partir d'*E. coli*. L'ARN-t a été isolé à partir de surnageant 105 000  $\times$  g. Les ARN ont été précipités par l'alcool à 95 % puis dialysés contre du tampon Tris 10 $^{-2}$ M, pH 7,5 contenant 0.1 M de KCl. Les ARN ont été dosés par absorption dans les U.V. à 260 m $\mu$ . 24 D.O. = 1 mg d'ARN. Le rapport 260/280 trouvé pour les ARN utilisés était toujours de 2,0 à 2,1 ce qui témoigne de l'absence de protéines en quantité notable dans les préparations d'ARN.

#### Formation et isolement du complexe $^{14}\text{C}$ -acide aminé-ARN-m

Les conditions de formation et d'isolement du complexe  $^{14}\text{C}$ -acide aminé-ARN-m ( $^{14}\text{C}$ -AA-ARN-m) sont décrites dans la légende du tableau I, les renseignements détaillés étant décrits ailleurs (1, 5). Les triterpènes utilisés, très peu solubles dans l'eau, ont été mis en suspension à l'aide d'un homogénéiseur à verre rodé. Les échantillons au temps 0 contiennent la quantité équivalente de triterpènes à celle utilisée dans la réaction. Le complexe AA-ARN-m précipité et lavé par  $\text{HClO}_4$  est filtré puis séché. La radioactivité est

TABLEAU I

Effet des triterpènes au cours de la formation du complexe  $^{14}\text{C}$ -acide aminé-ARN-m (*E. coli*)  
CPM / 20  $\mu\text{g}$  d'ARN-m.

$^{14}\text{C}$ acides aminés	sans	+ Mad	rappor <sup>t</sup> + Mad sans
1 Tyr	7 810	8 130	1,05
2 Leu	12 130	12 240	1,01
3 Iso	3 052	3 636	1,17
4 Glu	4 075	4 320	1,04
5 Lys	2 100	2 696	1,25
6 Arg	9 023	9 410	1,03
7 Asp	5 231	5 210	1,00
8 Met	3 430	3 630	1,06
9 Gly	2 330	2 410	1,04
10 Phe	9 130	10 730	1,17
11 His	2 130	1 996	0,94
12 Try	2 141	2 220	1,03
13 Ala	1 890	3 490	1,86
14 Pro	6 120	2 110	0,36

Le milieu d'incubation contient 1-3  $\mu$  moles de  $\text{MgCl}_2$ ; 25 à 50  $\mu$  moles de Tris-HCl (pH 7,60); 1,0  $\mu$  mole de XTP; 2-10  $\mu\text{moles}$  de  $^{14}\text{C}$ -L-acide aminé (100 000 à 250 000 coups/min); 20  $\mu\text{g}$  d'ARN-m; enzyme : fraction DEAE cellulose II (17) 100  $\mu\text{g}$ ; madécassol 300  $\mu\text{g}$ ; vol final 0,5 ml.  $T^\circ = 34^\circ$  incubation 30 mn. Le complexe est précipité puis lavé par  $\text{HClO}_4$  (ou TCA), séché et la radioactivité déterminée.

déterminée dans le « Packard TRI-CARB liquid scintillation spectrometer » (liquide PPO-POPOP). Les résultats sont exprimés soit en CPM soit en  $\mu\text{Moles}$  d'acide aminé  $^{14}\text{C}$  fixé par l'ARN-m.

**Isolément des ribosomes.** Les ribosomes ont été isolés et lavés d'après la méthode de Nirenberg (18) à partir d'extraits de bactéries d'*E. coli* prélevées en phase exponentielle de croissance. Le surnageant provenant de la centrifugation d'extraits 30 S (18) à 105 000  $\times$  g a été utilisé après dialyse, d'une part comme source d'enzymes d'activation des acides aminés pour la fixation de ceux-ci par le ARN-t et, d'autre part, pour l'extraction de l'ARN-t. Les ribosomes dialysés contre du tampon Tris-HCl 0,01 M pH 7,6, et contenant  $10^{-3}\text{M}$  d'acétate de Mg ont été utilisés pour l'incorporation des acides aminés (système ribosomique).

**Incorporation des L-acides aminés- $^{14}\text{C}$  par le système ribosomique.** Pour l'incorporation des L-acides aminés- $^{14}\text{C}$  le milieu d'incubation (0,3 ml) contient : Tris-HL, 0,05 M, pH 7,65;  $\text{MgCl}_2$ , 0,015 M; ATP 0,002 M; GTP, CTP, UTP chacun 0,001 M; phosphoénol-pyruvate-Na-K 0,01 M; kinase pyruvique 5  $\mu\text{g}$ ; mercaptoéthanol 0,001 M; ARN-t, 0,2 mg; polyU 20  $\mu\text{g}$ ;  $^{14}\text{C}$ -L-phénylalanine ou d'autres acides aminés- $^{14}\text{C}$  (10<sup>6</sup>CPM); ribosomes 70 S (protéines) 0,1 mg; surnageant 105 000  $\times$  g 0,3 mg. Incubation à 34<sup>o</sup> 10 mn. La réaction est arrêtée par 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10% et le mélange chauffé pendant 15 mn. à 100<sup>o</sup>. Le précipité, après refroidissement, est filtré sur millipore, lavé avec le TCA 5%, séché, puis la radioactivité déterminée dans le « Packard TRI-CARB liquid scintillation spectrometer ».

## RÉSULTATS

Nous savons qu'«in vitro» la synthèse des oligopeptides par les polypeptide-synthétases est obligatoirement précédée de la formation d'un complexe intermédiaire entre l'acide aminé et l'ARN-m (1). Chacun des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates (ATP, GTP, CTP, UTP) peut servir de source d'énergie permettant l'activation des acides aminés par les polypeptide-synthétases et leur attachement à l'ARN-m (5).

Pour étudier l'effet des triterpènes dans la fixation des L-acides aminés- $^{14}\text{C}$  par des ARN-m, quatorze acides aminés- $^{14}\text{C}$ , (chacun individuellement) ont été utilisés. Le comportement de la proline et celui de l'alanine a particulièrement attiré notre attention, car les résultats obtenus avec ces deux acides aminés diffèrent nettement de ceux observés avec tous les autres acides aminés utilisés (tableau I).

*Les triterpènes inhibent la formation du complexe  $^{14}\text{C}$ -pro-ARNm*

L'incorporation de la proline- $^{14}\text{C}$  par l'ARNm a été suivie en présence soit d'UTP soit d'ATP, principalement et de polypeptide-synthétases purifiées à partir d'*E. coli*. On constate (fig. 2) que le plateau indiquant l'état «stable» apparent du complexe se maintient au moins pendant 1 heure à 32<sup>o</sup> indépendamment de la nature de la source

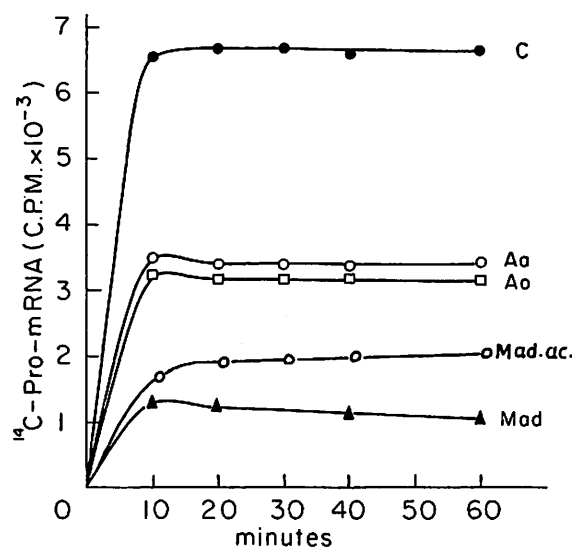


FIG. 2.

Fixation de la  $^{14}\text{C}$ -proline par l'ARN-m en l'absence et en présence de triterpènes. Conditions expérimentales décrites dans la légende du tableau I, chaque triterpène (300  $\mu\text{g}$ /0,5 ml) a été ajouté au milieu d'incubation au temps 0. Source d'énergie UTP (ATP). C = Contrôle.

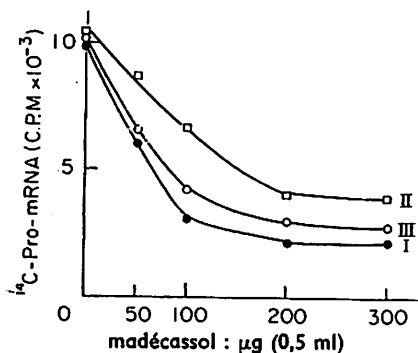


FIG. 3.

Effet de différentes préparations de madécassol au cours de la formation du complexe « $^{14}\text{C}$ -Pro-ARN-m». Conditions expérimentales décrites dans la légende du tableau I. Madécassol a été ajouté au milieu d'incubation au temps 0. Source d'énergie UTP. C = contrôle. I, II, III = différentes préparations de madécassol.

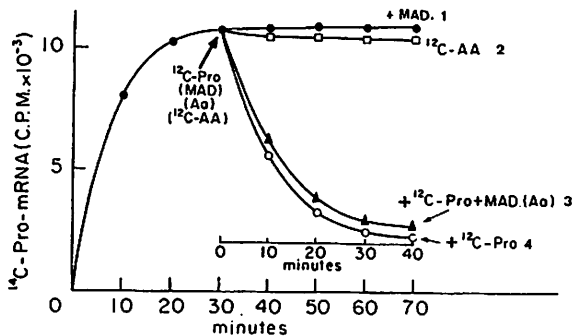


FIG. 4.

Turnover de la Proline dans le complexe Pro-ARN-m en l'absence et en présence de triterpènes. Conditions (voir légende du tableau I). La flèche indique le moment d'addition de diverses substances, soit chacune séparément, soit deux à la fois. Source d'énergie ATP ; 300  $\mu\text{g}$  de madécassol (MAD) ou 300  $\mu\text{g}$  d'acide asiatic (Aa) ;  $^{14}\text{C}$ -Pro 0,2  $\mu\text{mole}$  ;  $^{14}\text{C}$ -AA, mélange de 20 L-acides aminés (0,01  $\mu\text{mole}$  de chaque) ; 1 = Contrôle + MAD, sans addition de  $^{14}\text{C}$  Pro ; 2 = Contrôle + mélange de 18  $^{14}\text{C}$ -AA ; 3 = Contrôle +  $^{14}\text{C}$  Pro + MAD (ou Aa) ; 4 = Contrôle +  $^{14}\text{C}$  Pro.

TABLEAU II

Acide asiatic et incorporation de  $^{14}\text{C}$ -Proline,  $^{14}\text{C}$ -Alanine, et de  $^{14}\text{C}$ -Valine par l'ARN-m d'*E. coli* en présence de divers XTP.  
 $\mu\text{m}$  Moles de  $^{14}\text{C}$ -AA incorporées par 200  $\mu\text{g}$  d'ARN-m

$^{14}\text{C}$ acides aminés	ATP		UTP		CTP		GTP		Inhibition %	Stimulation %
	sans	+ Aa	sans	+ Aa	sans	+ Aa	sans	+ Aa		
$^{14}\text{C}$ -Pro	0.71	0.41	0.52	0.20	0.51	0.17	0.53	0.20	42-65	0
$^{14}\text{C}$ -Ala	1.45	3.18	1.43	3.43	—	—	—	—	0	120-140
$^{14}\text{C}$ -Val	0.96	1.01	0.95	0.94	0.92	0.93	0.97	0.93	0	0

Les conditions pour la formation et l'isolement du complexe  $^{14}\text{C}$ -AA-ARN-m sont décrites dans la légende du tableau I. 300  $\mu\text{g}$  d'acide asiatic furent utilisés. Le complexe précipité par le TCA doit être efficacement et soigneusement lavé avec le TCA.

d'énergie (UTP ou ATP). Les triterpènes ont été ajoutés au milieu d'incubation soit au temps 0 (fig. 3) soit au moment où le plateau représentant la « saturation » de l'ARNm par l'acide aminé a été atteint (fig. 4). On voit que différents lots de Madécassol ajoutés au milieu d'incubation (temps 0) (fig. 3) possèdent pratiquement le même pouvoir d'inhibition pour la fixation de  $^{14}\text{C}$ -Pro par l'ARNm. Remarquons que le taux d'inhibition peut varier selon les préparations enzymatiques mais reste toujours supérieur à 25 %.

Comme le « Madécassol » est constitué essentiellement d'asiaticoside (fig. 1) ( $\approx 40\%$ ), d'acide asiatic et d'acide madécassique ( $\approx 60\%$ ), il était important de déterminer le rôle respectif de chacun de ces composés lors de la formation du complexe « acide aminé-ARNm », proline et alanine en particulier.

Les résultats résumés (fig. 2) montrent que l'acide asiatic, l'acide madécassique ainsi que l'asiaticoside agissent en inhibant la réaction permettant l'attachement de la proline- $^{14}\text{C}$  par l'ARNm aussi bien en présence d'ATP que d'UTP. L'acide asiatic soit à l'état libre, soit associé aux sucres inhibe efficacement la formation du complexe « Pro-ARN-m ». L'inhibition qui varie entre 50 à 80 % est généralement plus importante en présence d'UTP (GTP, CTP) qu'en présence d'ATP (tableau II et fig. 2). On voit déjà l'intérêt que pourrait présenter l'utilisation de ces triterpènes pour l'incorporation de la proline dans les chaînes polypeptidiques et en particulier là où cet acide aminé se transforme en hydroxyproline par la réaction d'hydroxylation (10, 25).

#### Triterpènes et turnover de la proline- $^{14}\text{C}$ dans le complexe Pro-ARN-m

On peut mettre en évidence, en présence de polypeptide-synthétases, d'un nucléoside-5'-triphosphate et d'ARN-m un phénomène que nous appelons « turnover » des acides aminés : un acide aminé- $^{14}\text{C}$  fixé par l'ARN-m («  $^{14}\text{C}$ -AA-ARN-m ») peut quitter ses sites d'attachement dans l'ARN-m et être remplacé rapidement par son homologue- $^{12}\text{C}$  uniquement.

La figure 5 illustre le cas de la proline- $^{14}\text{C}$  : lorsque  $^{14}\text{C}$ -Pro a saturé l'ARN-m, le milieu d'incubation est additionné de  $^{12}\text{C}$ -Pro en quantité 100 fois supérieure à celle de  $^{14}\text{C}$ -Pro. Après des

temps différents le complexe  $^{14}\text{C}$ -Pro-ARN-m est isolé, lavé et la radioactivité déterminée. On constate après addition de  $^{12}\text{C}$ -Pro que la  $^{14}\text{C}$ -Pro se détache de l'ARN-m et la quantité détachée après 30 min. est environ 80 %. Ce phénomène s'observe en présence soit d'UTP soit d'ATP. Dans ces mêmes conditions un mélange de  $^{12}\text{C}$ -acides aminés hétérologues ne provoque qu'un faible départ de  $^{14}\text{C}$ -Pro (fig. 4).

Le résultat symétrique (fig. 5) est obtenu si l'on inverse l'ordre des fixations de  $^{12}\text{C}$ -Pro et  $^{14}\text{C}$ -Pro, car la proline s'échange aisément sur son site (ses sites) spécifique avec son homologue uniquement. Il s'agit là d'un turnover dynamique et sélectif d'un acide aminé donné. Aucun des triterpènes essayés n'agit sur le turnover de la proline ni ne compromet la stabilité du complexe une fois celui-ci formé (fig. 4). Elles n'agissent pas sur le mécanisme provoquant le détachement des acides aminés de l'ARN-m. L'action de ces substances s'exerce sur l'activité de l'enzyme permettant d'attacher la  $^{14}\text{C}$ -Pro à l'ARN-m, c'est-à-dire sur la formation même du complexe Pro-ARN-m. Les triterpènes agissent en modifiant le taux de synthèse du complexe «  $^{14}\text{C}$ -Pro-ARN-m », intermédiaire dans la synthèse des liaisons peptidiques et par conséquent régulent la quantité d'hydroxyproline là où elle est indispensable (par exemple collagène des tissus animaux).

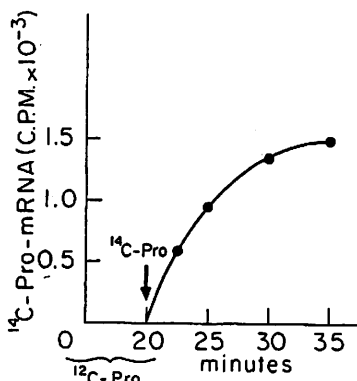


FIG. 5.

Échange de  $^{14}\text{C}$ -Proline avec  $^{12}\text{C}$ -Proline dans le complexe « Proline-ARN-m ». Conditions expérimentales (voir légende du tableau I).  $^{12}\text{C}$ -Proline (3  $\mu\text{moles}$ ) a été ajoutée au temps 0. La flèche indique le moment d'addition de  $^{14}\text{C}$  proline (10  $\mu\text{moles}$ ;  $1,3 \times 10^6$  CPM). Source d'énergie ATP.

#### Effet stimulateur des triterpènes lors de la formation du complexe $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m

Le comportement de l'alanine ( $^{14}\text{C}$ ) dans la formation « in vitro » du complexe avec l'ARN-m en présence de triterpènes présente un intérêt tout à fait particulier. En effet, contrairement à la proline dont l'incorporation par l'ARN-m est inhi-

bée par les triterpènes, celle de l'alanine ( $^{14}\text{C}$ ) est fortement stimulée. La fig. 6 montre que l'acide asiatique ajouté séparément au milieu d'incubation au temps 0 stimule la formation du complexe  $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m aussi bien en présence d'UTP, que d'ATP. La vitesse initiale de la formation du complexe  $^{14}\text{C}$  Ala-ARN-m semble plus grande en présence d'acide asiatique qu'en son absence. Mais ce qui est surtout frappant c'est que le « plateau de saturation » ( $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m) augmente de 2 à 4 fois en présence de différentes concentrations d'acide asiatique (fig. 6). Ce phénomène s'observe également en présence de Madécassol au cours de la formation du complexe Ala-ARN-m; mais il est beaucoup moins prononcé. Par contre, l'asiaticoside, acide asiatique lié par son carboxyle au sucre, ainsi que l'acide madécassique sont sans effet. Rappelons que la structure chimique de l'acide asiatique et de l'acide madécassique ne diffèrent que par un hydroxyle (6, 19).

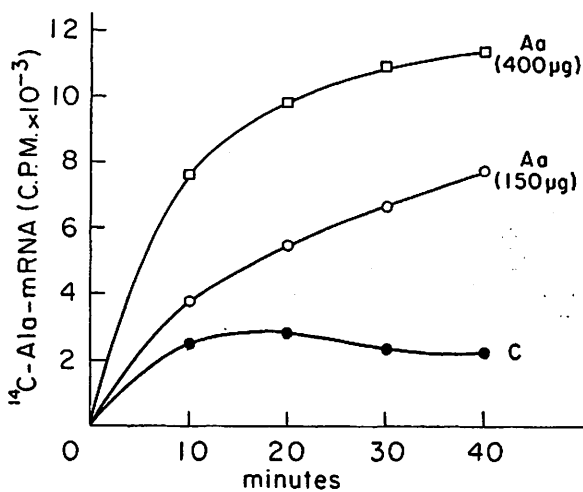


FIG. 6.

Formation du complexe «  $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m » en présence d'acide asiatique (Aa). Conditions expérimentales (voir légende du tableau I). L'acide asiatique (concentrations indiquées) a été ajouté au temps 0. Source d'énergie UTP. C = contrôle.

#### Triterpènes et turnover de l'alanine dans le complexe « Ala-ARN-m »

L'effet fortement stimulateur de l'acide asiatique sur la formation du complexe, c'est-à-dire la fixation de l'alanine- $^{14}\text{C}$  à l'ARN-m, était à première vue surprenant mais suggérait immédiatement que l'effet de cet acide devrait s'expliquer aussi par la stabilité du complexe  $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m. Afin de vérifier cette hypothèse l'acide asiatique a été ajouté au milieu d'incubation au moment où le plateau représentant la saturation de l'ARN-m

par l'alanine  $^{14}\text{C}$  a été atteint (fig. 7). On constate rapidement un phénomène remarquable : l'acide asiatique provoque apparemment une nouvelle réaction qui se traduit par un attachement supplémentaire de quantités importantes d'alanine  $^{14}\text{C}$ . En effet un deuxième plateau peut-être obser-

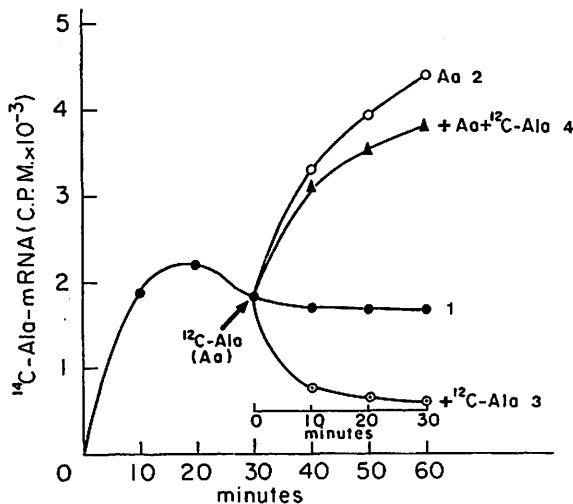


FIG. 7.

Turnover d'Alanine dans le complexe « Ala-ARN-m » en l'absence et en présence d'acide asiatique (Aa). Conditions expérimentales (voir légende du tableau I). La flèche indique le moment d'addition soit de  $^{12}\text{C}$ -Ala (0,2  $\mu\text{M}$ ) soit d'Aa (300  $\mu\text{g}/0,5$  ml) soit de deux à la fois. Source d'énergie UTP. 1 = contrôle; 2 = contrôle + acide asiatique (Aa); 3 = contrôle +  $^{12}\text{C}$ -Ala; 4 = contrôle + acide asiatique (Aa) +  $^{12}\text{C}$ -Ala.

vé en présence d'acide asiatique. Ces résultats montrent clairement que le phénomène de dilution isotopique est à exclure dans le turnover des acides aminés. Il est important de préciser que le « madécassol » agit dans le même sens que l'acide asiatique bien que son effet soit moindre. Par contre l'asiaticoside et l'acide madécassique sont sans effet (fig. 8). Rappelons que le madécassol renferme de l'acide asiatique libre (environ 40 %). L'acide asiatique semble jouer un rôle important non seulement dans la formation de l'Ala-ARN-m, mais également dans la stabilité de ce dernier. On peut effectivement démontrer que l'acide asiatique règle puissamment le turnover de l'alanine- $^{14}\text{C}$  fixé par l'ARN-m (fig. 7). En effet lorsque l'alanine- $^{12}\text{C}$  est ajoutée au milieu d'incubation au moment où  $^{14}\text{C}$ -Ala a saturé l'ARN-m on constate qu'en présence d'acide asiatique il n'y a plus d'échange entre l'Ala- $^{14}\text{C}$  et son homologue  $^{12}\text{C}$  : l'équilibre est déplacé en faveur de la synthèse du complexe « Ala-ARN-m », et non en faveur de sa dégradation, d'où l'impression que l'acide asiatique favorise la fixation de l'Ala- $^{14}\text{C}$  par l'ARN-m. L'acide, selon la concentration utilisée, permet donc d'ac-

cumuler le complexe « Ala-ARN-m » (fig. 7). Cet intermédiaire pourrait alors permettre la synthèse des polypeptides particulièrement riches en alanine de certaines protéines de structure, par exemple. Ce phénomène ne s'observe pas avec d'autres acides aminés (tableau I), il est spécifique de l'alanine. La fig. 9 illustre le cas de la leucine. Aucune action des triterpènes ne peut être décelée ni sur la formation du complexe «  $^{14}\text{C}$ -Leu-ARN-m », ni sur sa stabilité.

#### Triterpènes et fixation d'acides aminés- $^{14}\text{C}$ par l'ARN-t

Il est bien établi que l'ARN-t possède la propriété d'attacher les L-acides aminés en présence d'ATP — comme unique source d'énergie — et des enzymes d'activation présentes dans le cytoplasme cellulaire (12, 13). L'acide aminé est attaché par son carboxyle spécifiquement à l'adénosine terminale de la chaîne de cet ARN-t (14). Par cette caractéristique l'ARN-t diffère des ARN matriciels qui acceptent les acides aminés à l'intérieur (5) de leurs chaînes en présence de chacun de quatre ribonucléoside 5'-triphosphates (1, 8). L'ARN-t a été incubé en présence d'ATP, d'enzymes d'activation en l'absence et en présence soit d'asiaticoside, soit de « Madécassol », soit d'acide asiatique. Le complexe « AA- $^{14}\text{C}$ -ARN-m » a été isolé comme décrit pour le complexe AA- $^{14}\text{C}$ -ARN-m. Les résultats sont consignés dans le tableau III. Les triterpènes n'influencent pas la fixation des acides aminés par l'ARN-t.

TABLEAU III

#### Triterpènes et incorporation de $^{14}\text{C}$ -acides aminés par l'ARN-t d'*E. coli*

$^{14}\text{C}$ -acides-aminés	Radioactivité : CPM par 50 $\mu\text{g}$ d'ARN-t		
	sans	+ Mad	+ Aa
$^{14}\text{C}$ -Ala	3 030	2 740	3 130
$^{14}\text{C}$ -Pro	3 541	3 352	3 420
$^{14}\text{C}$ -Val	4 120	4 231	4 162
$^{14}\text{C}$ -Leu	9 760	9 930	9 676

Le milieu d'incubation contient : 5  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MgCl}_2$ , Tris-HCl (pH 7,7) ; 1  $\mu\text{M}$  d'ATP ; 2-10  $\mu\text{moles}$  de  $^{14}\text{C}$ -acide aminé (100 000-250 000 cpm) ; 50  $\mu\text{g}$  de ARN-t (total RNA 4 S) ; 100  $\mu\text{g}$  de surnageant 105 000 g volume final 0,5 ml ;  $T^\circ = 34^\circ$  ; temps 20 mn. Le complexe AA-ARN-t est précipité et lavé par le TCA, séché et la radioactivité déterminée.

#### Triterpènes et système ribosomique pour l'incorporation des acides aminés

Afin de vérifier si l'incorporation des acides aminés par un système ribosomique en présence d'un « messenger » pourrait être influencée par les triter-

pènes, les ribosomes ont été isolés à partir de bactéries d'*E. coli* (18). En présence d'un messenger artificiel tel que le Poly U, l'incorporation de la phénylalanine dépend essentiellement de ce polynucléotide (tableau IV). Le « Madécassol » et l'acide asiatique, séparément utilisés, à des concentrations indiquées, ont une faible action inhibitrice sur la polymérisation de la phénylalanine  $^{14}\text{C}$  en l'absence et en présence de Poly U ainsi que sur celle de la phénylalanine- $^{14}\text{C}$  en présence de Poly U (tableau IV). Il est particulièrement intéressant d'observer l'effet stimulateur de l'acide asiatique sur l'incorporation de l'alanine- $^{14}\text{C}$  dans les protéines acido-précipitables en l'absence de polynucléotide synthétique. Ceci peut s'expliquer du fait que le surnageant 105 000 x g utilisé contient des polypeptide-synthétases. L'ensemble de ces résultats suggère que l'action des triterpènes pourrait « in vivo » être située au niveau d'un système responsable de la synthèse des protéines de structure et non au niveau du système ribosomique.

TABLEAU IV

Triterpènes et incorporation de  $^{14}\text{C}$ -acides aminés par le système ribosomique (*E. coli*).

CPM  $\times 10^{-3}$  par 100  $\mu\text{g}$  de prot. ribosomiques

$^{14}\text{C}$ -acides aminés	sans	+ Poly U	+ Poly C
Phe	1,9	24,0	1,8
Phe + Mad	2,0	23,6	1,9
Phe + Aa	2,2	20,8	2,1
Pro	0,56	—	0,77
Pro + Mad	0,38	—	0,58
Pro + Aa	0,40	—	0,60
Ala	2,07	—	—
Ala + Mad	2,97	—	—
Ala + Aa	4,03	—	—

Les conditions expérimentales sont décrites au chapitre « Matériel et Méthodes ».

#### CONCLUSION ET DISCUSSION

Les faits que nous venons de présenter montrent que les triterpènes, constituants du Madécassol, agissent « in vitro » en contrôlant de manière spécifique la formation du complexe « AA-ARN-matriciels », intermédiaire indispensable et précédant la synthèse des chaînes peptidiques (1) (3) par les polypeptide-synthétases, alors qu'ils sont inertes dans le système exigeant la présence d'ARN de transfert. La fixation de la proline et de l'alanine par les ARN-m semble spécifiquement per-

turbée par les triterpènes. L'inhibition importante mais jamais totale de l'attachement de la proline par l'ARN-m (in vitro) en présence de chacun des triterpènes montre que ces composés

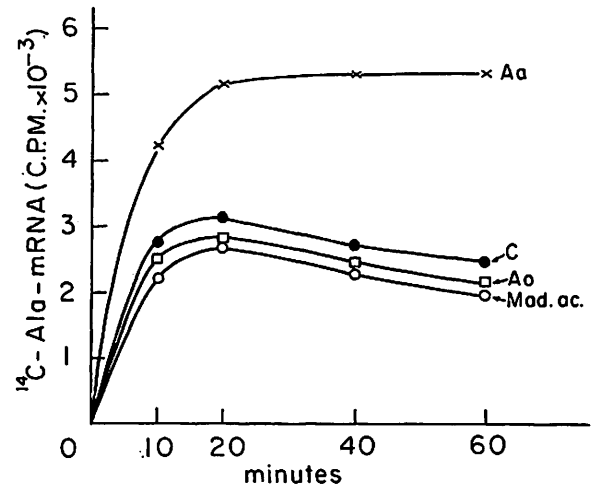


FIG. 8.

Formation du complexe «  $^{14}\text{C}$ -Ala-ARN-m » en l'absence et en présence de triterpènes. Conditions expérimentales (voir légende du Tableau I). Chaque triterpène (300  $\mu\text{g}/0,5$  ml) a été ajouté au temps 0. Source d'énergie UTP. Aa = contrôle, sans addition de  $^{14}\text{C}$  Ala; C = contrôle + Acide asiatique (Aa); Ao = contrôle +  $^{14}\text{C}$ -Ala + Aa; Mad. ac. = contrôle +  $^{14}\text{C}$ -Ala.

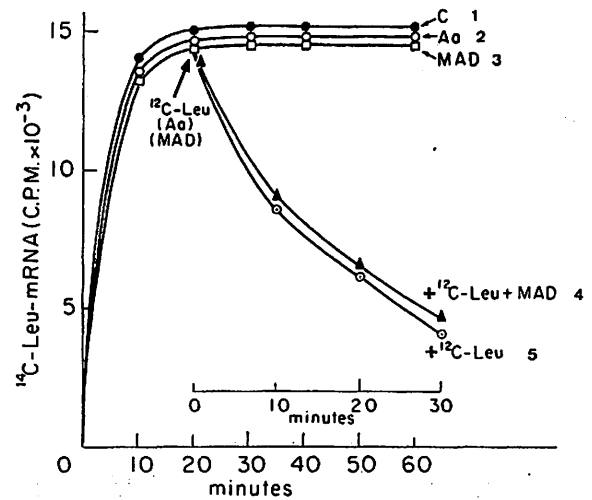


FIG. 9.

Formation du complexe «  $^{14}\text{C}$ -Leu-ARN-m » et turnover de Leucine en présence de triterpènes. Conditions expérimentales (voir légendes du tableau I). La flèche indique le moment d'addition de substances utilisées (un à la fois ou deux à la fois).  $^{14}\text{C}$ -L-leucine (0,2  $\mu\text{moles}$ ) Aa (300  $\mu\text{g}/0,5$  ml). MAD (300  $\mu\text{g}/0,5$  ml). 1 = Contrôle; 2 = Contrôle + acide asiatique; 3 = Contrôle + madécassol; 4 = Contrôle +  $^{14}\text{C}$ -Leucine + madécassol; 5 = Contrôle +  $^{14}\text{C}$ -Leucine.



pourraient moduler l'entrée de la proline dans les chaînes polypeptidiques et par conséquent ralentir la formation de l'hydroxyproline à partir de la proline, ce qui pourrait se traduire dans les cellules animales par une modification de la synthèse du collagène. L'asiaticoside, l'acide asiatic et l'acide madécassique, chacun séparément utilisé, inhibent fortement l'activité de la préparation enzymatique catalysant l'attachement de la proline par l'ARNm. Ce phénomène s'observe aussi bien en présence d'ATP que d'UTP, CTP et de GTP utilisés comme source d'énergie (tableau II). La stabilité du complexe «Pro-ARN-m» une fois formé en l'absence de triterpènes n'est pas compromise par leur présence.

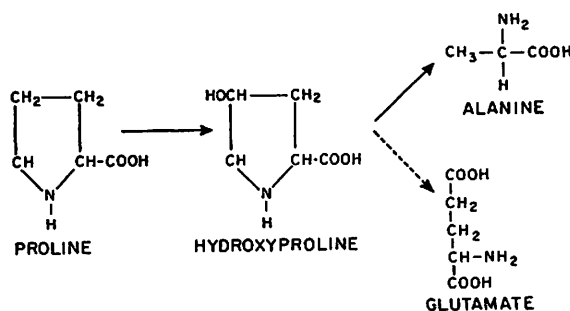


FIG. 10.

Relation métabolique entre proline, Hydroxyproline et alanine (27).

Il est remarquable de constater que l'acide asiatic libre agit d'une manière spécifique et inattendue en ce qui concerne la formation du complexe «alanine-ARN-m». En effet, contrairement à ce que l'on observe avec la proline, l'acide asiatic libre inhibe «in vitro» le turnover de l'alanine liée à l'ARN-m ce qui se traduit par une augmentation considérable du taux d'alanine incorporée. Dans cette réaction particulière, ni l'asiaticoside (acide asiatic lié par son COOH aux sucres), ni l'acide madécassique ne peuvent remplacer l'acide asiatic

libre. Mais l'hydrolyse enzymatique de l'asiaticoside en acide asiatic et sucres pourrait fournir l'acide asiatic qui alors interviendrait dans la formation et la disponibilité du complexe «alanine-ARN-m», intermédiaire dans la synthèse des chaînes peptidiques.

Le phénomène que nous avons mis en évidence à l'aide d'un système d'origine bactérienne pourrait selon toute vraisemblance (\*) s'observer dans les cellules animales et constituer une étape déterminante au cours de la synthèse de certaines protéines de structure et du collagène, en particulier. En effet, dans le collagène, la proline, l'hydroxyproline et l'alanine représentent ensemble 40 % des acides aminés constituant cette protéine particulière et sont liés par une relation métabolique (fig. 10) (25). Il est établi que l'hydroxyproline peut se former uniquement par hydroxylation de la proline lorsque celle-ci est déjà engagée en liaisons peptidiques. Les triterpènes en abaissant le taux de proline disponible pour les chaînes peptidiques (Pro-ARN-m) pourraient ainsi régler le taux d'hydroxyproline donc de collagène. On sait d'autre part (25, 27) que dans les cellules animales, l'hydroxyproline est métabolisée de manière à donner essentiellement de l'alanine qui peut être soit utilisée pour la synthèse des chaînes polypeptidiques soit transformée en pyruvate et conduire vers la formation du glycogène (11). Comme l'hydroxyproline se forme obligatoirement à partir de proline il s'agirait de la conversion de proline en alanine, via l'hydroxyproline.

Soulignons que le collagène, seule protéine qui contient un taux élevé d'hydroxyproline (14 %), est synthétisé en excès dans certaines maladies du derme et dans les tissus brûlés. Les triterpènes qui accélèrent la réparation des plaies expérimentales, doivent, par leur action spécifique vis-à-vis de la proline et de l'alanine jouer un rôle essentiel dans les mécanismes de synthèse du collagène et probablement de certaines classes de protéines de structure.

(\*) La synthèse de peptides par les polypeptide-synthétases isolées à partir du foie de rat a été décrite (28).

#### BIBLIOGRAPHIE

- BELJANSKI M. et BELJANSKI M. «Acide aminé-acide ribonucléique», intermédiaire dans la synthèse des liaisons peptidiques. VI. *Biochim. biophys. Acta*, 1963, 72, 587.
- BELJANSKI M., BELJANSKI M. et LOVINY T. S. Rôle des polypeptide-synthétases dans la formation de peptides spécifiques en présence de ribonucléoside-tri-phosphates. *Biochim. biophys. Acta*, 1962, 56, 559.
- BELJANSKI M. et BOURGAREL P. Isolement et caractérisation d'un RNA matriciel d'*Alcaligenes faecalis*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1968, 266, 845.
- BELJANSKI M., FISCHER C. et BELJANSKI M. Le RNA messenger, accepteur spécifique des L-acides aminés en présence d'enzymes bactériennes. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1963, 257, 547.
- BELJANSKI M., FISCHER-FERRARO C. et BOURGAREL P. Identification des sites d'attachement spécifiques d'arginine et de valine dans des RNA d'origines différentes. VIII. *Europ. J. Biochem.*, 1967, 4, 188.
- BOITEAU P., BUZAS A., LEDERER E. et POLONSKY J. Sur la constitution chimique de l'asiaticoside «hétéroside» naturel utilisé contre la lèpre. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, 31, 46.

7. BONTEMS J. Sur un hétéroside nouveau, l'asiaticoside, isolé à partir de l'hydrocotyle asiatica L. (Ombellifères). Bull. Sci. Pharmacol., 1941, 49, 186.
8. FISCHER-FERRARO C. et BELJANSKI M. Nouvelle méthode de purification des polypeptide-synthétases. VII. Europ. J. Biochem., 1968, 4, 118.
9. FRUTON J. et SIMMONDS S.P. 125 in General Biochemistry, New York, 1958, J. Wiley Sons Inc.
10. GOLDBERG B. et GREEN H. Relation between collagen synthesis and collagen proline hydroxylase activity in mammalian cell. Nature, 1969, 221, 267.
11. HESS W. C. et SHAFFRAN I. P. The rates of absorption and of the formation of liver glycogen by L-proline and L-hydroxyproline. J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 474.
12. HOAGLAND M. B., KELLER E. B. et ZAMECNICK P. C. Enzymatic carboxyl activation of amino acids, J. Biol. Chem., 1956, 218, 345.
13. HOAGLAND M. B., ZAMECNICK P. C. et STEPHENSON M. L. Intermediate reactions in protein biosynthesis. Biochem. biophys. Acta, 1957, 24, 215.
14. HECHT I. T., STEPHENSON M. L. et ZAMECNICK P. C. Dependence of amino acid binding to soluble ribonucleic acid on cytidine triphosphate. Biochem. biophys. Acta, 1958, 29, 460.
15. LAWRENCE J. C. The morphological and pharmacological effects of asiaticoside upon skin « in vitro » and « in vivo ». Europ. J. Pharmacol., 1967, 1, 414.
16. MAC CONKEY B., WALTON K. W., CARNEY S. A., LAWRENCE J. C. et RICKETTS C. R. Significance of the occurrence of transparent skin, study of histological characteristics and biosynthesis of dermal collagen. Ann. rheum. Dis., 1967, 26, 219.
17. NEUBERGER A., PERRONE J. C. et SLACK H. G. B. The relative metabolic inertia of tendon collagen in the rat. Biochem. J. 1951, 49, 199.
18. NIRENBERG M. W. Cell-free protein synthesis directed by messenger RNA. P. 17. In methods of enzymology, Colowick S. P. and N. O. Kaplan Eds., New York, 1963, VI, Academic Press.
19. PINHAS H., BILLET D., HEITZ S. et CHAIGNEAU M. Structure de l'acide madécassique, nouveau triterpène de Centella asiatica de Madagascar. Bull. Soc. chim. franç., 1967, 6, 1890.
20. POLONSKY J., SACH E. et LEDERER E. Sur la constitution chimique de la partie glucidique de l'asiaticoside. Bull. Soc. chim. franç., 1959, 6, 880.
21. POLONSKY J. Sur la constitution chimique de l'acide asiatique, aglycone de l'asiaticoside. Bull. Soc. chim. franç., 1952, 649, 1015 ; 1953, 173.
22. POLONSKY J. et ZYLBER J. Détermination de la configuration de l'hydroxyle primaire de l'acide asiatique. Bull. Soc. chim. franç., 1961, n° 247, 1586.
23. PROSSER E. J. T., HIRD H. J. et MUNRO H. N. A particulate fraction of liver containing a ribonuclease resistant system for amino acid incorporation into protein. Biochem. biophys. Res. Commun., 1961, 4, 243.
24. RATSIMAMANGA A. R., BOITEAU P., NIGEON-DUREUIL M. et COSTES G. Le rôle physiologique des triterpénoides cicatrizants majeurs. Ann. Univ. Madagascar, 1964, 2, 4.
25. STETTEN M. R. Metabolic relationship between glutamic acid, hydroxyproline and ornithine. P. 277. In Amino acid metabolism. W. D. Mac Elroy et B. Glass, Eds., Baltimore, 1955, William Wilkins.
26. TINCANI G. P., RIVA P. C. et BALDINI E. Le attività enzimatiche cutanee nei processi di rigenerazione. G. ital. Derm., 1963, 5, 429.
27. WOLF G., HECK W. W. et LEAK J. C. The metabolism of hydroxyproline-alpha <sup>14</sup>C in the intact rat. Radioactivity in amino acid from proteins. J. Biol. Chem., 1956, 223, 95.
28. ZALTA J. P. et BELJANSKI M. Synthèse de peptides par des fractions subcellulaires préparées à partir du foie de rat. C. R. Acad. Sci. Paris, 1961, 253, 567.
29. ZALTA J. P. Nouveau système d'incorporation des acides aminés isolés des microsomes du foie de rat. C. R. Acad. Sci. Paris, 1960, 250, 4058.
30. ZALTA J. P., LACHURIE F. et OSORNO S. Existence de deux systèmes permettant l'incorporation des acides aminés dans les microsomes du foie de rat, C. R. Acad. Sci. Paris, 1960, 251, 814.

*Extrait de la Revue Européenne n° 9-1971*

---

6469. — IMPRIMERIE NOUVELLE, ORLÉANS. — 12-1971