

Stérols et triterpènes polyoxygénés : une famille de produits à large spectre d'activités biologiques

Le catabolisme normal des stérols et des triterpènes commence par des hydroxylations, conduisant à de nombreuses familles de dérivés dont les activités biologiques sont d'une extrême diversité. Les stérols et triterpènes polyhydroxylés inhibent la biosynthèse du cholestérol dans les cellules de mammifères, sont sélectivement cytotoxiques sur certaines souches tumorales, *ex vivo* et *in vivo*, et sont des immunomodulateurs (chacune de ces diverses actions étant plus ou moins marquée selon la structure précise).

Bang Luu
Guy Ourisson

RÉFÉRENCES

1. Kandutsch AA, Chen HW, Heininger HJ. Biological activity of some oxygenated sterols. *Science* 1978 ; 201 : 498-501.
2. Beck JP, Crastes de Paulet A. Activités biologiques des oxystérols. Paris : Éditions INSERM, 1988 : 23-40.
3. Ortiz de Montellano PR, Beck JP, Ourisson G. Regulation of sterol biosynthesis and lysis of cultured hepatoma cells : inhibition of lanosterol demethylation by hydroxysterols. *Biochem Biophys Res Commun* 1979 ; 90 : 897-903.

ADRESSE

B. Luu : directeur de recherche au Cnrs. G. Ourisson : professeur à l'université Louis-Pasteur de Strasbourg. Laboratoire de chimie organique des substances naturelles, associé au Cnrs, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg, France.

m/s n° 6 vol. 5, juin 89

Le cholestérol est, chez les eucaryotes, un constituant membranaire essentiel. Mais, en plus de son rôle structural, il joue un rôle fondamental, physiologique ou écologique, par certains produits de son métabolisme oxydatif : acides biliaires, hormones sexuelles ou corticoïdes, calciférols chez les vertébrés, hormones de mue (ecdystéroïdes) chez les arthropodes, phéromones sexuelles d'oomyètes, substances de défense de très nombreux végétaux ou d'insectes, hormones de croissance de végétaux (brassinoïdes), etc. Dans tous les cas, la biosynthèse de ces produits à partir de cholestérol commence par une hydroxylation, sélectivement sur l'une des positions du squelette indiquées sur la *figure 1*. Il est tout à fait remarquable que certains dérivés de première hydroxylation du cholestérol, précurseurs de produits à activité biologique importante, sont d'autre part directement actifs sur la biosynthèse du cholestérol lui-même, qu'ils inhibent par rétroaction (*figure 2*) [1]. Au cours des 15 dernières années, nous avons pu montrer que certains de ces poly-

hydroxystérols ont des activités biologiques variées, susceptibles d'applications biomédicales éventuelles, que nous allons résumer ici [2].

Inhibition de la biosynthèse du cholestérol

Certains dérivés hydroxylés du cholestérol inhibent très efficacement la biosynthèse du cholestérol dans des cellules en culture, en déprimant l'activité de l'HMGCoA-réductase, l'enzyme catalysant l'étape lente de la biosynthèse du cholestérol, la réduction de l'acide hydroxyméthylglutarique (HMG) en acide mévalonique (MVA). Nous avons montré que l'un au moins de ces dérivés, le 7 β -hydroxycholestérol, agit également sur une étape ultérieure, la déméthylation du lanostérol, lequel est alors accumulé [3]. Il serait tentant d'utiliser ces métabolites naturels du cholestérol comme hypocholestérolémiant : c'est, par exemple, sur la même étape HMGCoA \rightarrow MVA qu'agissent les grands médicaments récents comme la mévinoline [4] ; ceci n'est pas possible directement, par suite du méta-

4. Alberts AW, Chen J, Kuron G, *et al.* Mevinolin : a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 3957-61.

5. Schroeffer G Jr, Shevill BC, Wang KS, Wilson WK, Kistic A, Clarkson TB. 5 α -cholest-8 (14)-en-3 β ol-15-one lowers serum cholesterol and induces profound changes in the level of lipoprotein cholesterol and apoprotein in monkeys fed a diet of moderate cholesterol content. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6861-5.

6. Rong S, Bergmann C, Luu B, Beck JP, Ourisson G. Activité antitumorale *in vivo* de dérivés hydrosolubles de 7 β -hydroxycholestérol. *CR Acad Sci Paris* 1985 ; 300 (III) : 89-94.

7. Iversen OH, Kolberg A, Smith-Kielland I, Stabursvik A. Inhibitory effect of an oxygenated cholesterol on the induction and progression of DMBA mammary carcinoma in the rat. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1986 ; 51 : 313-20.

8. Mersel M, Luu B, Ourisson G. Action différentielle du 7 β -hydroxycholestérol sur des cellules myocardiales et des fibroblastes. Obtention de cultures primaires de cellules myocardiales pures. *CR Acad Sci Paris* 1984 ; 229 (III) : 221-5.

9. Moog C, Dumont FJ, Luu B, Bischoff P. Activité immunosuppressive des oxystérols. Effets comparés du 7 β , 25-OHC et d'autres immunosuppresseurs sur l'activation des lymphocytes T. In : Beck JP, Crastes de Paulet A, eds. *Activités Biologiques des Oxystérols*. Paris : Editions INSERM, 1988 : 211-8.

10. Moog C, Luu B, Beck JP, Italiano L, Bischoff P. Studies on the immunosuppressive properties of 7 β , 25-dihydroxycholestérol. I. Reduction of interleukine production by treated lymphocytes. *Int J Immunopharmacol* 1988 ; 10 : 511-8.

11. Oth D, Mercier G, El Ayachi N. Modification de la sensibilité de cellules lymphomateuses vis-à-vis d'effecteurs de l'immunité par l'action d'agents pharmacologiques. In : Beck JP, Crastes de Paulet A, eds. *Activités Biologiques des Oxystérols*. Paris : Éditions INSERM, 1988 : 189-204.

12. Taylor FR, Kandutsch AA. Oxysterol binding protein. *Chem Phys Lipids* 1985 ; 38 : 187-94.

13. Beseme F, Astruc ME, Defay R, Crastes de Paulet A. Rat liver cytosol oxysterol binding protein. Characterization and comparison with the HTC cell protein. *FEBS Lett* 1987 ; 210 : 97-103.

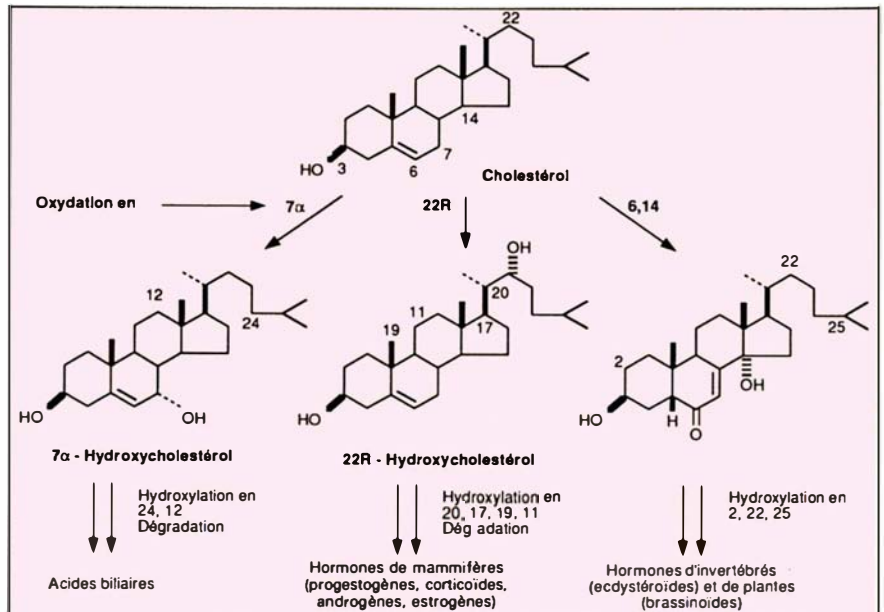


Figure 1. **Le cholestérol comprend 27 atomes de carbone liés en quatre cycles rigides et une chaîne latérale ramifiée.** Les traits renforcés correspondent à des liaisons disposées vers l'avant du plan moyen des cycles, liaisons dites β ; les traits pointillés, à des liaisons α , vers l'arrière de ce plan moyen. Une convention topologique universelle, étendant la notation D, L bien connue pour les sucres ou les acides aminés, définit la configuration des atomes de la chaîne : R (rectus), S (sinister). Les numéros sont destinés à identifier les atomes portant des modifications ; seuls sont numérotés, ici, les atomes mentionnés dans le texte ou sur la figure. Le métabolisme du cholestérol commence, chez tous les êtres vivants, par des hydroxylations en diverses positions spécifiques, qui conduisent ensuite à des produits physiologiquement très actifs comme des hormones, etc. Mais les premiers intermédiaires sont déjà biologiquement actifs ; ce sont les « hydroxystérols » considérés ici.

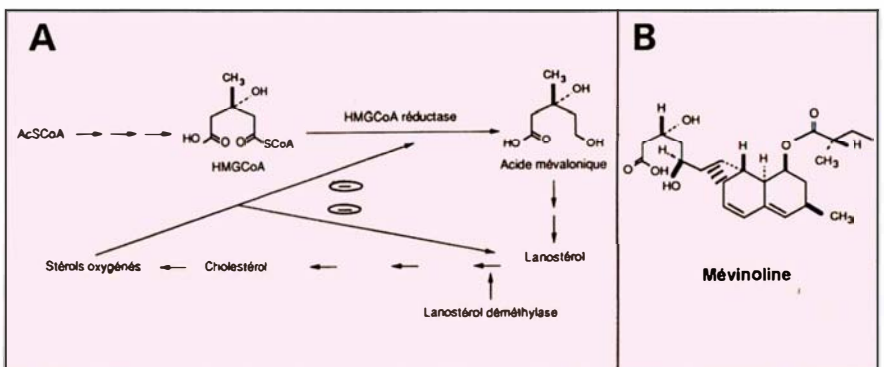
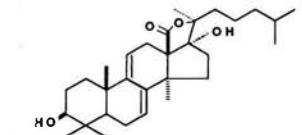
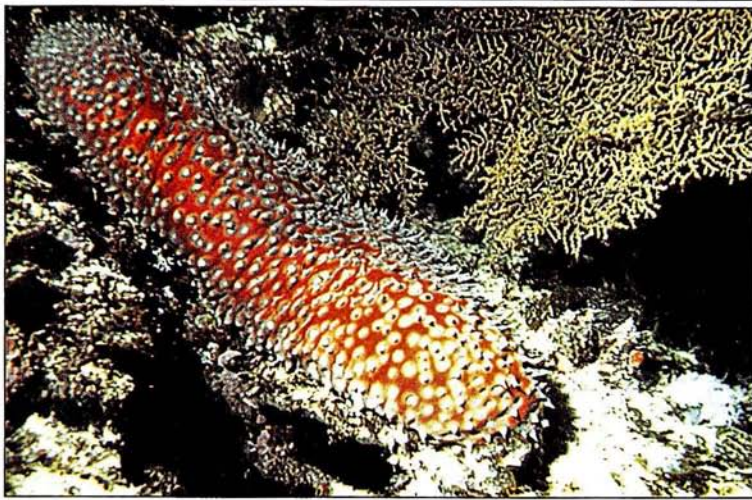
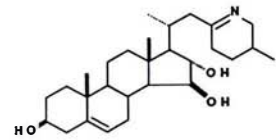
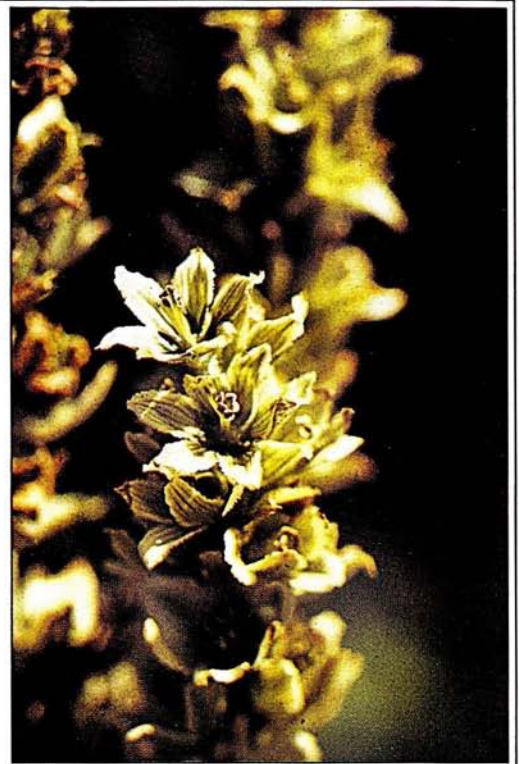


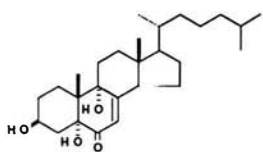
Figure 2. **A. Biosynthèse du cholestérol.** A partir d'acide acétique en C₂, sous forme d'ester de coenzyme A (CoA), une série d'étapes conduit à l'acide hydroxyméthylglutarique (HMG en C₆), toujours lié au coenzyme A. L'HMGCoA est réduit par l'HMGCoA-réductase en acide mévalonique. Cette étape est la plus lente, et définit par conséquent la vitesse de biosynthèse. L'acide mévalonique (en C₆) perd un atome de carbone, et le fragment en C₅ est ensuite transformé par une série d'étapes très bien connues en un produit en C₃₀ (6 x C₅), le lanostérol (voir structure sur la figure 3), ensuite oxydé en cholestérol avec perte de trois atomes de carbone. Les stérols oxygénés résultant du catabolisme du cholestérol inhibent l'HMGCoA-réductase et également les enzymes d'oxydation du lanostérol (avec accumulation de cet intermédiaire). **B. La mévinoline est un inhibiteur de l'HMGCoA-réductase, isolé de micro-organismes et largement utilisé comme hypocholestérolémiant.** On remarquera que cette molécule comprend des éléments structuraux ressemblant à l'acide mévalonique (coin « nord-ouest ») et aux cycles du cholestérol (moitié « sud »).



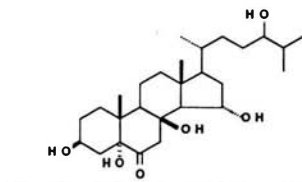
Constituant de toxines d'holothuries



Alcaloïde du Vêrâtre



stérol cytotoxique de *Polyporus versicolor*



Constituant de toxines d'étoiles de mer

bolisme trop rapide de ces hydroxystérols dans l'organisme, mais d'autres stérols oxygénés moins facilement dégradables ont effectivement une action puissante *per os* chez le singe (réduction de 50 % de la cholestérolémie) [5].

Cytotoxicité sélective et propriétés antitumorales

Au cours d'une étude de drogues traditionnelles, nous avons fait l'observation inattendue que certains dérivés hydroxylés (mono- ou di-) du cholestérol avaient une action cytotoxique sélective *in vitro* sur diverses souches tumorales, qu'ils lysent à des concentrations micromolaires auxquelles résistent des cellules non tumorales [2]. Nous avons montré que cette activité, sélective du point de vue structural puisque des produits très voisins peuvent présenter des toxicités très différentes, est également sélective par rapport aux souches tumorales étudiées. Par exemple, le 25-hydroxycholestérol, peu cytotoxique vis-à-vis de cellules d'hépatomes, l'est bien davantage envers des cellules de lymphomes, alors que le 7 β -hydroxycholestérol présente la sélectivité inverse, et que le 7 β , 25-dihydroxycholestérol, qui combine ces deux sites d'hydroxylation, est, lui, toxique envers toutes les lignées cellulaires testées.

Dans tous les cas, cette toxicité est caractérisée par une lyse rapide des cellules, qui disparaissent rapidement du champ du microscope. La quasi-absence de cellules mortes suggère évidemment une action membranaire. *In vivo*, avec des dérivés hydrosolubles (sels de sodium d'hémisuccinates ou de phosphates, ou dérivés polyhydroxylés), la régression et même la disparition de diverses tumeurs transplantables ont été obtenues avec des souris et des rats [6, 7]. Dans ces cas, la guérison peut être totale, et elle est parfois obtenue en une seule injection, pour une proportion importante des animaux traités.

Une autre forme remarquable de cytotoxicité différentielle a été observée *in vitro* dans des cultures contenant simultanément des myocytes cardiaques et, ce qui est la règle, des fibroblastes normalement envahissants. Les fibroblastes, plus sensibles

au 7 β -hydroxycholestérol, sont lysés à des concentrations qui ne tuent pas les myocytes. Les contractions synchrones de ces derniers sont rendues asynchrones, mais reprennent dans un milieu de culture neuf, sans hydroxystérol [8].

Propriétés immunomodulatrices

A des concentrations non toxiques — par exemple, environ 0,1 μ M —, certains de ces stérols hydroxylés sont capables de déprimer la stimulation des lymphocytes par certains mitogènes non spécifiques. C'est ainsi que le 7 β -hydroxycholestérol, tout comme la dexaméthasone et la ciclosporine A, exerce cette action sur des lymphocytes activés par la concanavale A. Cependant, son mécanisme d'action doit différer de ceux de ces deux immunomodulateurs classiques [9]. En effet, comme la dexaméthasone (mais pas la ciclosporine A), l'hydroxystérol inhibe la stimulation des lymphocytes activés par l'acétate myristate de phorbol (PMA)* (*note p. 407*) en présence d'interleukine-2, et, comme la ciclosporine A (mais pas la dexaméthasone), il inhibe la stimulation des mêmes lymphocytes par l'acétate

myristate de phorbol en présence cette fois de ionomycine** (*note p. 407*). Cette inhibition se traduit par une dépression de la synthèse de l'interleukine-2 (IL-2) et une diminution de l'expression de récepteurs à IL-2 à la surface des lymphocytes T [10]. Des études préliminaires semblent montrer que la cause principale de cette activité pourrait être une inhibition de la protéine kinase C.

Dans ce cas également, des substances très voisines montrent des effets très différents : le 7 β , 25-dihydroxycholestérol est beaucoup plus immunosuppresseur que son isomère le 7 α , 25-dihydroxycholestérol ; une différence comparable est observée entre les deux cholestérols dihydroxylés en 7 α et en 22R ou 22S (R : *rectus* ; S : *sinister*).

Cette activité immunomodulatrice ne se limite pas aux effets sur des lymphocytes activés par des mitogènes non spécifiques. Par exemple, l'activité des lymphocytes T cytotoxiques et leur génération en culture mixte sont également affectées ; le 7 β , 25-dihydroxycholestérol est un excellent outil pour l'étude des LAK (*lymphokine-activated killers*) (*voir Lexique Immunologie, suppl. au n° 1, vol. 5, p. 18*), intervenant dans la défense immunitaire contre le

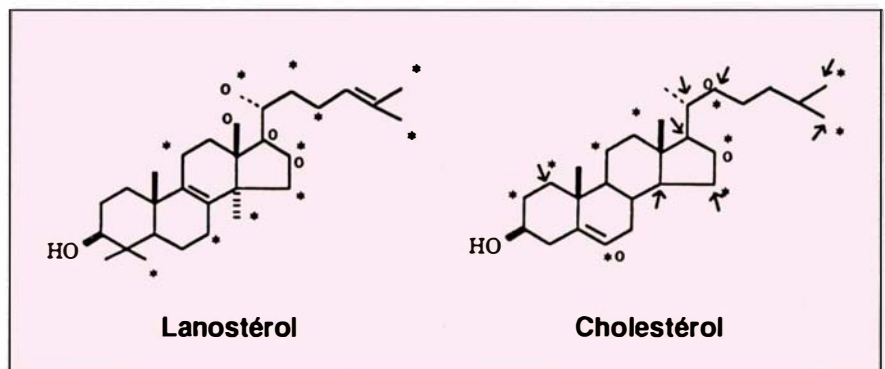


Figure 3. Le lanostérol est le triterpène (C₃₀) dont la biodégradation conduit au cholestérol (C₂₇) chez des animaux et des champignons. Cette biodégradation commence par des réactions d'oxydation sur certains sites spécifiques. L'oxydation sur d'autres sites, indiqués ici par des sigles typographiques, donne naissance à une multitude de produits biologiquement inactifs, caractéristiques d'une famille précise d'êtres vivants. De même, le cholestérol peut, dans certains groupes taxonomiques, donner naissance par oxydation à des produits dont la structure révèle immédiatement, pour un œil averti, la famille d'organismes vivants d'origine. Sites d'oxydation (lanostérol) : * : constituants cytotoxiques de polyporacées (champignons) ; o : saponines hémolytiques d'holothuries (échinodermes). Sites d'oxydation (cholestérol) : * : saponines hémolytiques de lilacées ; o : saponines hémolytiques d'étoiles de mer (échinodermes) ; - : neurotoxines de solanacées.

cancer [11]. Nous avons aussi montré que le même dihydroxycholestérol mobilise efficacement des macrophages et des neutrophiles.

Mécanisme d'action

Il semble établi que la membrane périplasmique est une cible pour les hydroxystérols, mais les effets variés que nous avons résumés peuvent mettre en jeu divers mécanismes précis. La cytotoxicité, accompagnée de lyse cellulaire, est certainement en partie liée à l'inhibition, bien démontrée, de la biosynthèse du cholestérol, constituant nécessaire des membranes des eucaryotes, qu'il renforce. Mais la cytotoxicité d'un hydroxystérol n'est pas strictement corrélée avec son aptitude à inhiber la biosynthèse du cholestérol, et il faut chercher plus loin. Un effet direct des hydroxystérols sur la membrane est également avéré, simplement par l'observation microscopique d'érythrocytes dont la surface se hérissé très rapidement de spicules, formant des échinocytes, à des concentrations d'hydroxystérols insuffisantes pour les lyser. Il s'agit probablement d'un effet physique provenant d'une interaction déstabilisant les assemblages de phospholipides que sont les membranes. Cela pourrait conduire à des modifications superficielles provoquant les effets immunomodulateurs observés. Enfin, il est possible que les hydroxystérols agissent comme des hormones, c'est-à-dire qu'ils pénètrent dans le cytosol où ils seraient pris en charge par des protéines réceptrices spécifiques, avant d'atteindre le noyau. La découverte de la protéine liant des stérols oxygénés (*oxysterol-binding protein*) est compatible avec cette hypothèse [12].

Autres hydroxystérols biologiquement actifs

Les lecteurs du *Pavillon des cancéreux* de Soljenitsine se rappellent sans doute le chapitre intitulé « Le Cancer du bouleau », décrivant l'attente fébrile des malades espérant

que la guérison leur sera apportée par le « tchaga », champignon ressemblant à une tumeur du tronc de ces arbres. Ce champignon contient effectivement une substance, l'inotodiol, qui présente beaucoup des caractéristiques structurales et biologiques des hydroxystérols. Il s'agit en fait d'un dérivé hydroxylé du lanostérol, un précurseur clé du cholestérol dans sa biosynthèse.

Il est d'ailleurs remarquable que, d'une façon générale, les champignons de la même famille, celle des polyporacées, soient caractérisés par la présence de dérivés oxydés du lanostérol ou du cholestérol différant par le site et la nature des oxydations selon l'espèce considérée, mais donnant une « allure chimique » commune à la famille. De telles régularités chimio-taxonomiques sont en fait fréquentes chez les organismes vivants, et sont souvent associées à la production de substances toxiques, probablement utiles comme substances de défense écologique. On peut ainsi reconnaître, simplement par la structure de dérivés oxygénés de triterpènes ou de stérols, si ces derniers ont été extraits d'une plante comme une solanée, ou d'un organisme marin comme une holothurie, ou encore d'une étoile de mer.

Conclusions

Comme on le voit, des dérivés simples de produits essentiels comme le cholestérol, normalement présents dans les organismes vivants comme dérivant de son métabolisme normal, peuvent avoir une importance biologique multiple. Ils peuvent participer, par un effet d'inhibition de la biosynthèse de leur précurseur, à la régulation de la teneur de ce dernier. Ils peuvent aussi simplement constituer les premières étapes de transformation du cholestérol en hormones^{***}, phéromones^{****} ou allomones^{*****}. Mais, en outre, ils révèlent des activités potentiellement intéressantes soit comme cytotoxiques sélectifs, soit comme immunomodulateurs. Cette famille mérite qu'on lui prête davantage d'attention ■

Summary

Polyoxygenated sterols and triterpenes: a family of natural products with manifold bioactivity

Cholesterol and the other sterols are precursors of many hormones of vertebrates (pregnane, androstane, estrane derivatives) or invertebrates (ecdysteroids) or even plants (brassinoids). The intermediates between sterols and these essential bioactive metabolites can display themselves two types of important biological activities: they may regulate the biosynthesis of sterols by interacting with some of the enzymatic steps of the biosynthesis, or they may exert some action on other individuals, either of the same species (pheromonal activity), or of other species (ecological activities). Examples are given of cytotoxic and immunomodulating substances, which are simple hydroxylated derivatives of cholesterol normally present in animal cells, and may be useful therapeutically.

* Les esters de phorbol sont des activateurs de la protéine kinase C.

** La ionomycine est un ionophore calcique.

*** Hormone: substance agissant, à distance de son site de sécrétion, sur des cellules du même organisme.

**** Phéromones: substance sécrétée par un organisme et spécifique d'organismes de la même espèce.

***** Allomone: substance sécrétée par un organisme et spécifique d'organismes d'espèces différentes. Il s'agit souvent de substances de défense.

TIRÉS A PART

G. Ourisson.