

ROLE DE LA PHENYLALANINE DANS LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES ET ACIDES "CINNAMIQUE" DANS LES TIGES VOLUBILES DE *PERIPLOCA GRAECA*

DANIEL MELIN

Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, 25030 Besançon Cedex, France

(Reçu le 27 Mars 1975)

Key Word Index—*Periploca graeca*; Asclepiadaceae; flavonols; coumarins, cinnamic acids; phenylalanine ammonia lyase; twining stems; circumnutiation.

Abstract—Phenylalanine is the precursor of the cinnamic acids and coumarins in the stems and leaves of *P. graeca* L. Esterification of *p*-coumaric acid by quinic acid is required before oxidation to chlorogenic acid. In our experiments, we did not obtain radioactive flavonols from ^{14}C phenylalanine. PAL activity varies as a result of light and temperature in the same manner as the level of flavonoids (especially the phenolic acids). This enzyme, therefore, plays a regulatory role in the synthesis of these phenolic substances. The variation in PAL activity during illumination does not follow the same course as described for other plants.

INTRODUCTION

Les tiges principales de *Periploca graeca* L. développées en conditions expérimentales contrôlées et constantes s'animent, après un temps de port érigé, d'amples mouvements révolutifs: ce sont des tiges volubiles. Ces tiges volubiles se caractérisent entre autres par une vitesse de croissance longitudinale très rapide. Le contenu flavonoïdique de ces pousses feuillées comprend acides-phénols, coumarines, flavonols et anthocyanidols [1]. Au cours du développement de la tige l'équipement flavonoïdique est stable, seules les teneurs des diverses substances changent. L'étude qualitative et quantitative des flavonoïdes conduite en fonction du port des tiges [1] ne révèle pas une relation nette entre les deux phénomènes mais ne l'exclut pas. En suivant les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes dans notre matériel nous espérons, ensuite, pouvoir la perturber et observer les conséquences de la perturbation sur le taux de croissance et le déroulement des mouvements révolutifs. Classiquement la synthèse de ces molécules admet comme précurseurs la phénylalanine et l'acétate issu du glucose [2]. Mais le

schéma classique ne s'applique peut être pas dans tous les matériaux [3, 4]. L'enzyme-clé de l'anabolisme des substances phénoliques est la phénylalanine ammoniac lyase (PAL) [5]. Nous mesurerons donc l'activité de cette enzyme dans *P. graeca* L. avant d'examiner les résultats d'incorporation de phénylalanine ($\text{U}-^{14}\text{C}$).

RESULTATS

Mesure de l'activité PAL

Activité PAL et âge des tissus. Pour des tiges principales volubiles nous avons mesuré l'activité enzymatique des feuilles insérées aux différents noeuds et celle des entre-noeuds en croissance ou ayant terminé leur allongement. Les plantes étant cultivées en jours longs à 25°, nos prélèvements se placent 5 hr après le début de l'éclairage de la salle. Selon Engelsma [6] nous sommes alors au maximum d'activité pour cette température.

D'après les résultats portés dans le Tableau 1, nous constatons que l'activité PAL est très grande dans les feuilles juvéniles ($F_1 + F_2$ et F_3) et dans les entre-noeuds (E-N 1-3). Exprimée par rapport

Tableau 1. Activité PAL dans les paires de feuilles successives et dans les entre-noeuds des tiges principales volubiles

Organe	Activité PAL	
	µg ac. cinn./h/g de matière fraîche	par feuille en µg d'ac. cinn.
Feuilles		
F ₁ + F ₂	250	1.25
F ₃	140	2.74
F ₄	9	0.92
F ₅	16	1.6
F ₆	8	0.8
F ₇	5	0.5
Tige		
E-N 1-3	56	—
E-N 5	8.5	—

L'activité est exprimée par rapport au poids de matière fraîche et par unité d'organe. Moyenne de 20 mesures. Coefficient de variation: 10%.

au poids frais, l'activité enzymatique des limbes adultes ne représente que 2 à 4% de celle des limbes jeunes. Ainsi l'activité PAL des feuilles se répartit suivant un gradient décroissant du sommet vers les parties adultes de la tige feuillée (Fig. 1). Ce gradient correspond bien aux variations de teneurs en acides-phénols et flavonols observées en fonction de l'âge des tissus [1]. Mais si nous

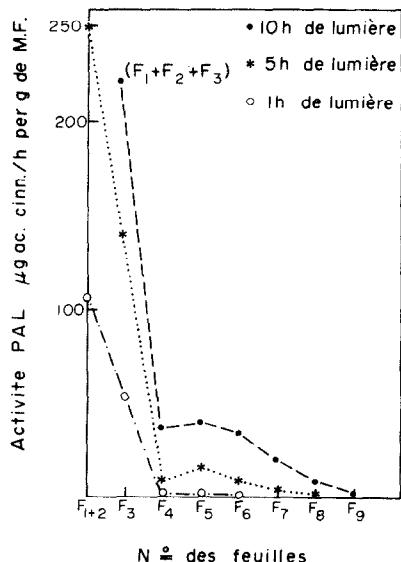


Fig. 1. Activité PAL des feuilles de tiges principales de *P. graeca* L. cultivées à 25° continus, en jours longs (16 hr) sous un éclairage de 16000 lx. Variation de l'activité en fonction du niveau d'insertion des feuilles et de l'heure du prélèvement par rapport au début de la phase lumineuse. Moyenne de 15 analyses.

exprimons l'activité enzymatique par unité d'organe (Tableau 1, colonne de droite) les valeurs sont assez proches les unes des autres quel que soit le niveau d'insertion.

Activité PAL et lumière

Activité PAL au cours de la période lumineuse. Nous rapportons dans la Fig. 1 les résultats obtenus avec les feuilles prélevées 1 hr, 5 hr ou 10 hr après le début de l'éclairage de la salle conditionnée. L'activité PAL augmente avec la longueur de la période lumineuse ce qui ne correspond pas aux résultats d'Engelsma [6] sur le concombre. Il est possible que *Periploca* se comporte comme *Pisum sativum* où deux maximums d'activité se succèdent respectivement 6-8 hr et 12 hr après le début de l'éclairage [7].

Activité PAL et lumière continue. L'activité enzymatique est mesurée dans de jeunes feuilles et de jeunes entre-noeuds (1-3). Les prélèvements ont lieu à la même heure (10 hr 30) que ceux que nous avons envisagés au premier paragraphe, pour limiter les risques d'interférence avec un éventuel rythme endogène. L'activité est nettement moins forte en lumière continue qu'en jours longs (Tableau 2) ce qui s'accorde avec les différences de teneurs en flavonoïdes observées dans les mêmes conditions [2].

Activité PAL et température à laquelle se développent les plantes

Nous avons montré que la vitesse d'allongement des tiges variait avec la température ainsi que la teneur en flavonoïdes [1]. Nous mesurons l'activité PAL dans les jeunes feuilles et jeunes entre-noeuds en fonction de la température à

Tableau 2. Activité PAL de tissus jeunes de tiges principales

Feuilles jeunes E-N 1-3	Activité PAL (µg ac. cinn./h/g)	
	Jours longs Prélèvement à 10 hr 30 (soit T ₀ + 5 hr)	Lumière continue, Prélèvement à 10 hr 30
Feuilles jeunes E-N 1-3	204	132
	54	35

Variation en fonction du rythme lumineux; jours longs et lumière continue pour le même éclairage (16000 lx) et la même température (25°). T₀ = allumage de la salle. Moyenne de 10 analyses. Coefficient de variation: 10%.

Tableau 3. Variations de l'activité PAL et Teneur en Acides-phénols en fonction de la température

	Activité PAL en μg d.ac. cinn./g/h et entre parenthèses, teneur en acides-phénols (dérivés) en mg/g de matière fraîche	15°	20°	25°	31°	34°
Feuilles juvéniles ($F_1 + F_2 + F_3$)	280 (21.2)	215 (20.7)	204 (17.8)	94 (14)	136 (12)	
Tiges jeunes (E-N 1-3)	84 (7.5)	74 (6.7)	56 (6)	24 (5)	47 (4.7)	
Allongement journalier au moment du prélèvement (en mm)	7	20	51	25	18	
Age moyen des tissus analysés (en jours)	20	10	5-6	10	12	

Comparaison avec les variations de l'allongement journalier des tiges et de la teneur en acides-phénols. Moyenne de 10 analyses. Coefficient de variation: 10%.

laquelle ils se développent. La lumière est distribuée en jours longs (16 hr). Les prélèvements de matériel végétal sont faits toujours à la même heure: 10 hr 30 soit 5 hr après l'allumage de la salle de culture.

L'activité PAL (Tableau 3) décroît entre 15° et 31° puis augmente un peu à 34°. Ainsi la variation de l'activité enzymatique suit celle de la teneur en acides phénoliques (Tableau 3) entre 15° et 31°. A 34° la discordance entre les résultats peut s'expliquer, d'abord en tenant compte du fait qu'à 34° le développement des plantes est anormal; de plus on peut admettre, puisque Engelsma l'a démontré pour le concombre [6], que la courbe de variation de l'activité en fonction de la durée de l'éclairage n'est pas la même pour toutes les températures.

Si l'on tient compte de l'âge moyen des tissus au moment de l'extraction, l'activité PAL totale donne des quantités d'acides-phénols synthétisées supérieures à celles des tissus, sauf à 31°. Cette différence correspond aux transformations des molécules en C₆-C₃, en particulier à l'incorporation dans les flavonols et anthocyanes. C'est ce que montrent bien les courbes de la Fig. 2. A 31° et à 34° cette incorporation est très réduite. A 31° tout se passe comme si l'activité PAL était inhibée par l'accumulation des produits de réac-

tion. A 34° la reprise de l'activité enzymatique n'est pas expliquée par les résultats biochimiques en notre possession.

Incorporation de phénylalanine (U)-¹⁴C

Nous incorporons, selon le protocole expérimental décrit, le radiocarbone de la phénylalanine (U)-¹⁴C dans les tissus de tiges développées en alternance nuit-jour. L'incorporation se fait toujours pendant la période lumineuse ce qui limite au maximum à 16 hr la durée de contact du métabolite avec les cellules vivantes.

Repérage des substances radioactives. Les extraits méthanoliques réalisés à partir des feuilles et des tiges séparées sont chromatographiés. Les autoradiogrammes des extraits montrent que tous les dérivés des acides-phénols et de coumarine qui sont normalement synthétisés dans *P. graeca* L. contiennent du radiocarbone provenant de la phénylalanine. En fonction de la durée de l'expérience, l'ordre d'apparition des molécules radioactives semble être, acide *p*-coumarique, acide caféïque, acide férulique et esculétine. Mais aucune trace de radioactivité n'est décelable dans les hétérosides de flavonols, même dans un extrait réalisé 16 hr après l'incorporation de la phénylalanine.

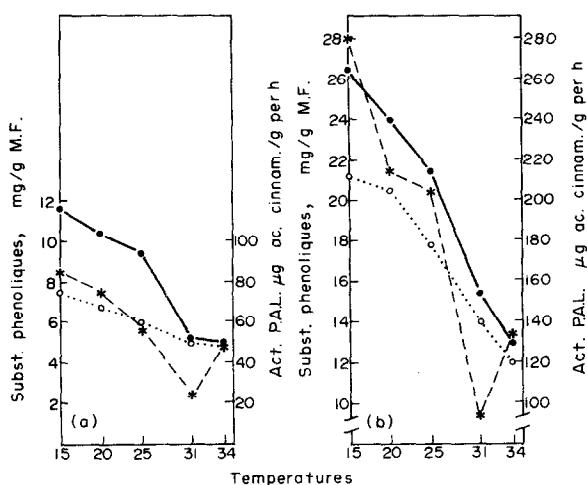


Fig. 2. Variations de l'activité PAL et des teneurs en flavonoïdes et en acides-phénols en fonction de la température à laquelle sont cultivées les plantes. (a) Entre-noeuds jeunes (E-N 1-3); (b) Feuilles juvéniles. ●● Teneur en flavonoïdes exprimée en mg par g de matière fraîche (M.F.), ○○ teneur en acides-phénols exprimée en mg par g de matière fraîche, ** activité PAL en μg d'acide cinnamique formé par g de matière fraîche et par heure.

Tableau 4. Activités spécifiques des acides caffeylquiniques et *p*-coumaryl-quiniques en fonction du temps de contact avec les cellules du matériel végétal

Temps de contact (hr)	Activité spécifique en $\mu\text{Ci}/\mu\text{M} \times 10^3$		Acides considérés
	Feuilles	Tiges	
2,5	1,5	28,6	caféyl-5 quinique
	1,45	58,5	caféyl-3 quinique
	3,5	123	<i>p</i> -coumarylquiniques
6	122		caféyl-5 quinique
	61		caféyl-3 quinique
	242		<i>p</i> -coumarylquiniques
16	17,5	10	caféyl-5 quinique
	34	4	caféyl-3 quinique
	6	11,5	<i>p</i> -coumarylquiniques

Radioactivité spécifique des dérivés d'acides phénols. La radioactivité spécifique a été déterminée pour les acides caféyl-quiniques et *p*-coumarylquiniques. Les résultats sont portés dans le Tableau 4. Ils nous permettent d'attribuer une position d'intermédiaire aux acides *p*-coumarylquiniques dans la synthèse des acides chlorogéniques et nous pensons que l'estérification avec l'acide quinique se produit avant l'hydroxylation en acide caféïque. Ainsi nos résultats sont en accord avec ceux de Levy et Zucker [8] et Hanson [9]. Les radioactivités spécifiques élevées des dérivés dans la tige après une expérience de courte durée montrent que la biosynthèse est active à ce niveau comme le laissait envisager d'ailleurs la forte activité PAL des axes.

DISCUSSION

Pour les limbes un gradient décroissant de l'activité PAL va des feuilles jeunes aux feuilles adultes. A ce dernier niveau l'activité est très faible, d'où une teneur moindre des flavonoïdes par rapport aux niveaux juvéniles [1]. La biosynthèse des dérivés phénoliques en C₆-C₃ se déroule dans les limbes foliaires et dans les tiges; les mesures d'activité PAL montrent que cette enzyme est très active dans l'axe.

L'activité PAL varie au cours de la phase lumineuse dans le cas d'un régime avec alternance nuit-jour. Elle augmente entre la première et la dixième (limite de nos observations) heure de la période lumineuse. Donc son comportement n'est pas classique (1 maximum après 4-5 hr) mais pour le décrire convenablement nous devons

effectuer d'autres mesures. Comme dans d'autres espèces, l'activité enzymatique est plus élevée dans des plantes qui croissent sous une température basse (15°) que dans celles cultivées à des températures élevées (≥30°). C'est ce qui explique que le froid (relatif) favorise la flavonogenèse [10], et l'anthocyanogenèse [11]. Variant avec les conditions de milieu la PAL semble bien avoir un rôle de régulateur de la synthèse des acides-phénols et des coumarines dans *P. graeca*.

La biosynthèse de ces composés phénoliques se réalise à partir de la phénylalanine selon le schéma classique. *In vivo* l'acide cinnamique formé est immédiatement transformé en acide *p*-coumarique puisqu'il n'est jamais mis en évidence. Si l'étude de la biosynthèse des flavonoïdes que nous avons réalisée n'apporte pas de connaissance originale sur la formation de l'acide caféïque, elle nous montre la difficulté du passage de la structure C₆-C₃ à la structure C₆-C₃-C₆. De plus cette étude nous permet d'envisager le blocage d'une étape de la biosynthèse pour en suivre la répercussion sur la morphogenèse de la plante.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal. Nous utilisons de jeunes plantes issues de la germination de graines. Ces plantes sont cultivées dans des salles conditionnées où les conditions ambiantes sont les suivantes: temp. constante de 25°, humidité relative de 70% (±5%), lumière de 16000 lx au niveau des apex, distribuée de manière continue ou en rythme de jours longs (16 hr par cycle de 24 hr) selon les essais. Les essais sont réalisés sur l'extrémité des tiges volubiles (4 entre-noeuds sous-apicaux).

Mesure de l'activité PAL. L'extraction est réalisée selon une méthode précédemment décrite [12,13]. Dans les essais avec une alternance nuit-jour le matériel végétal est prélevé après des temps d'illumination bien définis, puisque l'activité de l'enzyme varie avec la lumière [6, 14].

Mesure du radioélément. Les extrémités de tiges sont sectionnées sous l'eau et plongées dans le tube contenant 0,5 ml de soln de phénylalanine radioactive (act sp: 129 mCi/mM, Origine: C.E.A. Saclay). L'opération se déroule dans une petite enceinte d'expérience où le gaz carbonique est piégé par une solution de soude. L'absorption dure 2 hr environ; ensuite on maintient de l'eau dans les tubes pour les rincer et éviter le flétrissement des tiges. Selon les essais il s'écoule 2-5, 6 hr ou 16 hr entre la mise au contact de la soln radioactive et le blocage du métabolisme par l'alcool. Le matériel est pesé très rapidement, feuilles et tiges séparément (on jette le bourgeon terminal et la base de la tige qui plongeait dans la solution radioactive) puis plongé dans le MeOH froid pour l'extraction des pigments. La radioactivité des extraits est comptée dans un scintillateur. Des parties aliquotes de chaque extrait sont chromatographiées sur papier dans le système de solvants: B.E.W. (BuOH-EtOH-H₂O, 4:1:2 en volumes) et HOAc à 2%. Après autoradiographie on localise les taches radioactives. La radioactivité est comptée avec un compteur d'impulsions

Tracerlab et la teneur est obtenue par le dosage colorimétrique avec le réactif de Folin et Ciocalteu [15, 16].

Remerciements—Ce travail a été réalisé en grande partie au Laboratoire de Physiologie végétale de la Station de l'I.N.R.A. à Dijon. Nous remercions Mr. Martin C., Directeur, et ses collaborateurs de cet accueil et de cette aide.

BIBLIOGRAPHIE

1. Melin, D. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2119.
2. Grisebach, H. (1965) *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Goodwin, T. W., ed.), pp. 279-308. Academic Press, New York.
3. Swain, T. and Williams, A. C. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2115.
4. Hillis, W. E. and Ishikura, N. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1517.
5. Harborne, J. B. (1967) *Comparative Biochemistry of the Flavonoids* (J. B. Harborne Ed.), pp. 267-277. Academic Press, London.
6. Engelsma, G. (1968) *Acta Bot. Neerl.* **17**, 499.
7. Smith, H. et Attridge, T. H. (1970) *Phytochemistry* **9**, 487.
8. Levy, C. C. et Zucker, M. (1960) *J. Biol. Chem.* **236**, 2043.
9. Hanson, K. R. (1966) *Phytochemistry* **5**, 491.
10. Voirin, B. et Lebreton, P. (1972) *Phytochemistry* **11**, 3435.
11. Paynot, M. et Martin, C. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.* **15**, 47.
12. Rissland, I. et Mohr, H. (1967) *Planta* **77**, 239.
13. Paynot, M., Melin, D. et Martin, C. (1971) *C. R. Acad. Sci., D, Fr.* **273**, 749.
14. Engelsma, G. (1970) *Acta Bot. Neerl.* **19**, 403.
15. Keith, R. W., Le Tourneau, D. et Mahlum, D. (1958) *J. Chromatog.* **1**, 534.
16. Tanguy, J. et Martin, C. (1972) *Phytochemistry* **11**, 19.