

RECHERCHES SUR LES ENZYMES CATALYSANT LA BIOSYNTHESE DES ACIDES PHÉNOLIQUES CHEZ *QUERCUS PEDUNCULATA* (EHRH.): I – FORMATION DES PREMIERS TERMES DES SERIES CINNAMIQUE ET BENZOÏQUE

G. ALIBERT et R. RANJEVA

Enzymologie et Métabolisme, Equipe de Recherche associée au CNRS Centre de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31-Toulouse, France

Received 29 September 1971

Occurrence of PAL, cinnamate-hydroxylase and p-coumarate-hydroxylase, is found in cell-free extracts from *Quercus pedunculata* roots; moreover, an enzyme system which catalyzes benzoic acid formation from cinnamic acid is characterized for the first time. Role of these enzymes and their interactions within the same organ are discussed.

1. Introduction

L'apport, *in vivo*, de phénylalanine marquée à de jeunes plants de Chêne (*Quercus pedunculata* Ehrh.) montre que cet acide aminé est à l'origine de la plupart des acides phénoliques du végétal [1]. L'acide cinnamique, produit par désamination, conduirait, selon les hypothèses généralement admises [2, 3], aux autres acides en C₆–C₃, ou aux acides en C₆–C₁ par perte de deux atomes de carbone de la chaîne latérale (schéma).

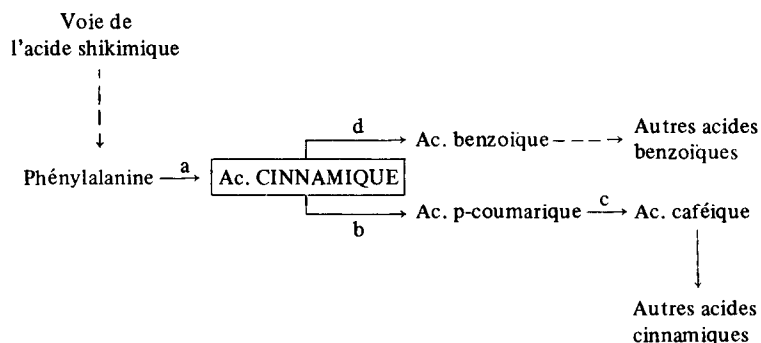
Parmi les enzymes qui catalysent cet ensemble de réactions seule la phénylalanine–ammoniaque–lyase (PAL) a fait l'objet d'études approfondies [4–7]; les autres biocatalyseurs ont été rarement identifiés et demeurent bien moins connus.

Ce travail concerne la caractérisation de la PAL (a), des hydroxylases des acides cinnamique (b) et p-coumarique (c) ainsi que du système assurant la formation de l'acide benzoïque (d), dans un extrait acellulaire de jeunes racines de *Quercus pedunculata*.

2. Partie expérimentale

2.1. Matériel

La mise en évidence des enzymes porte sur des racines obtenues après germination des glands, dans la tourbe humide, à l'obscurité et à 20° pendant une semaine. La phénylalanine U¹⁴C d'activité spécifique 187 mCi/m mole et l'acide cinnamique 3¹⁴C d'activité spécifique 9 mCi/m mole (CEA) ont été purifiés avant



emploi par chromatographie préparative sur papier; les substrats inertes sont des produits Merck.

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparations enzymatiques

Toutes les opérations d'extraction sont effectuées à des températures comprises entre 0 et 4°. L'homogénéisat obtenu après broyage dans un milieu décrit par ailleurs [8] est centrifugé pendant 15 min à 1 500 g (MSE H.S. 18) afin d'éliminer les débris cellulaires. On précipite ensuite les protéines solubles par le sulfate d'ammonium à 80% de saturation (le pH est maintenu entre 7–7,5 par addition d'ammoniaque concentrée). On centrifuge enfin à 40 000 g pendant une hr et on reprend le culot par 2 ml de tampon phosphate mono-di potassique M/10 de pH 7,5. La suspension obtenue qui contient les protéines précipitables par le sulfate d'ammonium et les particules qui sédimentent à 40 000 g a été utilisée, telle quelle (S_1) ou après purification sur gel de Séphadex G50 (S_2), comme source d'enzyme.

2.2.2. Recherche des enzymes

On ajoute aux constituants des milieux réactionnels qui figurent dans le tableau 1 de 0,1 à 0,5 ml d'extrait protéique, pour un volume final de 2 ml.

Après 30 min d'action à 30°, sous agitation constante, la réaction est arrêtée par addition d'HCl concentré. Les produits formés, extraits par l'éther

éthylique, sont concentrés sous pression réduite, identifiés et isolés par chromatographies successives dans divers systèmes solvants [9, 10].

On mesure la radioactivité des substances marquées au spectromètre à scintillation liquide Packard (modèle 2211) et on estime la quantité d'acide caféique, spectrophotométriquement à 320 nm (Beckman DU) dans l'éthanol à 95° G.L.

Des témoins effectués parallèlement, pour chaque essai, permettent de s'assurer de la nature enzymatique des réactions.

3. Résultats et discussion

Les préparations enzymatiques peuvent réaliser les quatre réactions envisagées; les résultats mentionnés dans le tableau 2, n'ont qu'une valeur qualitative, seuls les essais effectués sur une même enzyme (expériences A et B) sont comparables.

La PAL, déjà identifiée dans les feuilles de *Quercus pedunculata* [5] retrouve également dans les racines. La détermination de quelques-unes de ses propriétés montre que dans les deux organes, cette enzyme possède des caractères analogues (même pH optimum d'action, instabilité, faible niveau d'activité).

La cinnamique-hydroxylase n'a pu être extraite par les méthodes habituellement utilisées pour l'obtention des biocatalyseurs solubles [8]; il semblerait que

Tableau 1

Réaction étudiée	Substrat	Tampon M/10	Autres constituants	
			Expériences	
			A	B
Désamination de la phénylalanine	Phénylalanine inerte 10 μ M marquée 0,1 μ Ci	Tris-HCl pH 8,8	—	—
Hydroxylation de l'ac. cinnamique	Ac. cinnamique inerte 10 μ M marqué 0,1 μ Ci	Phosphate mono-di K pH 8	—	Ac. ascorbique 30 μ M NADPH 1 μ M
Hydroxylation de l'ac. p-coumarique	Ac. p-coumarique inerte 10 μ M	Phosphate mono-di K pH 5,3	—	Ac. ascorbique 30 μ M NADPH 1 μ M
Formation de l'ac. benzoïque	Ac. cinnamique inerte 10 μ M marqué 0,1 μ Ci	Phosphate mono-di K pH 7,5	—	ATP 10 μ M Coenzyme A 0,1 μ M

Tableau 2

Enzyme mise en évidence	Source d'enzyme	Composé formé en nM	Expériences	
			A	B
PAL (a)	S ₂	Ac. cinnamique	—	20
Cinnamique-hydroxylase (b)	S ₁	Ac. p-coumarique	10	16
Cinnamique-hydroxylase (c)	S ₂	Ac. caféique	0	70
Formation de l'acide benzoïque (d)	S ₁	Ac. benzoïque	91	150

l'enzyme soit liée aux structures cellulaires précipitables à 40 000 g recueillies dans le culot [12–15]. Nous avons constaté, par ailleurs, sa grande labilité, cause probable du nombre restreint de mises en évidence dont elle a fait l'objet.

Contrairement aux résultats obtenus par Nair et Vining chez l'Epinard [11] et par Russel et Conn chez le Pois [12], l'hydroxylation de l'acide cinnamique peut être réalisée, chez le Chêne, sans addition de réducteurs au milieu réactionnel (expérience A); la présence d'acide ascorbique et de NADPH provoque cependant une augmentation d'activité d'environ 60% (expérience B).

Dans le cas de la coumarique-hydroxylase, la présence de réducteur (acide ascorbique-NADPH) est essentielle à la formation d'acide caféique, conformément aux données déjà obtenues chez d'autres végétaux [16, 17].

Enfin, à notre connaissance, la transformation de l'acide cinnamique en acide benzoïque par un système acellulaire est mise, ici, en évidence pour la première fois. Selon l'hypothèse de Geissman et Hinreiner [18] les acides benzoïques se formeraient par β -oxydation de leurs homologues cinnamiques, après activation en cinnamoyl-coA et la formation de tels complexes a déjà été montrée *in vitro* [19, 20]. Nous avons constaté, pour notre part, une augmentation notable de l'activité (60%) après addition d'ATP et de coenzyme A au milieu, résultat qui semble militer en faveur de cette hypothèse.

La mise en évidence des hydroxylases (b et c) conduisant à l'acide caféique et du système enzymatique (d) formant l'acide benzoïque, montre que l'acide cinnamique est à l'origine de deux voies métaboliques, acides en C₆—C₃ en C₆—C₁). Si le contrôle de la biosynthèse de cet acide, qui s'effectue par l'intermédiaire de la PAL, commence à être élucidé [5–7] les mécanismes qui assurent sa distribution ordonnée entre

les deux voies ne sont pas connus. Existe-t-il deux pools distincts de ce composé, chacun à l'origine d'une série d'acides phénoliques? Les deux séquences métaboliques sont-elles spatialement séparées?

Une étude approfondie du mode d'action de ces diverses enzymes et la détermination de leur localisation intracellulaire, actuellement en cours, devraient nous apporter des éléments essentiels dans la compréhension du fonctionnement de ces voies de biosynthèse.

Remerciements

Nous tenons à remercier vivement Monsieur Alain Boudet pour ses suggestions constructives.

Références

- [1] G. Marigo, Thèse Doct. Spé. Toulouse, 1970.
- [2] D.R. Mac Calla et A.C. Neish, Can. J. Biochem. Physiol. 37 (1959) 537.
- [3] S.Z. El Basyouni, D. Chen, R.K. Ibrahim, A.C. Neish et G.H.N. Towers, Phytochemistry 3 (1964) 485.
- [4] J. Koukol et E.E. Conn, J. Biol. Chem. 236 (1961) 2692.
- [5] A. Boudet, R. Ranjeva et P. Gadal, Phytochemistry 9 (1971) 997.
- [6] G. Engelsma, Planta 75 (1967) 207.
- [7] S.I. Ahmed et T. Swain, Phytochemistry 9 (1970) 2287.
- [8] A. Boudet, FEBS Letters 14 (1971) 257.
- [9] G. Alibert, G. Marigo et A. Boudet, Physiol. Vég. 7 (1969) 57.
- [10] L. Reio, J. Chromatog. 1 (1958) 338.
- [11] P.M. Nair et L.C. Vining, Phytochemistry 4 (1965) 161.
- [12] D.W. Russel et E.E. Conn, Arch. Biochem. Biophys. 122 (1968) 256.
- [13] H.A. Stafford, Phytochemistry 8 (1969) 743.
- [14] N. Amrhein et M.H. Zenk, Z. Pflanzenphysiol. 64 (1971) 145.
- [15] D.W. Russel, J. Biol. Chem. 246 (1971) 3870.

- [16] M. Sato, *Phytochemistry* 8 (1969) 353.
- [17] P.F.T. Vaughan et V.S. Butt, *Biochem. J.* 113 (1969) 109.
- [18] T.A. Geissman et E. Hinreiner, *Botan. Rev.* 18 (1952) 77.
- [19] G.G. Gross et M.H. Zenk, *Z. Naturforsch.* 21 (1966) 683.
- [20] E. Walton et V.S. Butt, *J. Exptl. Botany* 21 (1970) 887.