

SUR LA PRÉSENCE DE DEUX ISOENZYMES DE LA PHENYLALANINE-AMMONIAC-LYASE CHEZ *AESCULUS HIPPOCASTANUM*

YVETTE CHARRIERE-LADREIX

Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université 1 de Grenoble, France

(Revisé reçu le 16 janvier 1975)

Key Word Index—*Aesculus hippocastanum*; Hippocastanaceae; flavonoid secretion; benzoic acids; PAL isoenzymes.

Abstract—By using the normal techniques of protein separation, two forms of PAL with different properties have been separated from the glandular tissue of *Aesculus hippocastanum*. A hypothesis is proposed for correlating the isoenzyme activities with the accumulation of flavonoid compounds and benzoic acids in the trichomes.

INTRODUCTION

Contrairement aux flavonoïdes hétérosidiques, généralement présents chez les végétaux supérieurs, les flavonoïdes de sécrétion des espèces ligneuses étudiées jusqu'à présent [1-7] sont représentées par des *aglycones* libres souvent méthylés et rejetés hors de la matière vivante. Des travaux récents ont permis de dégager, d'une part, les caractéristiques du métabolisme sécrétoire propre aux espèces *Aesculus hippocastanum* L. et *Populus nigra* L. (localisation anatomique de la sécrétion et cinétique du phénomène sécrétoire [8], rôle des glandes dans l'élaboration du sécrétat flavonoïdique [9-10]), d'autre part, le rôle primordial (chez *Aesculus*) de la L-phénylalanine-ammoniac-lyase (PAL) dans l'élaboration des substances aromatiques présentes dans les tissus des écailles sécrétrices des bourgeons [11]. Ces composés sont représentés par des aglycones flavoniques pour les glandes, par des coumarines pour le parenchyme. Une *corrélation* étroite existe entre l'activité PAL propre aux trichomes et l'accumulation des flavonoïdes de sécrétion dans le tissu glandulaire.

Une étude antérieure [12] fait apparaître qu'à certaines phases du cycle annuel de sécrétion flavonique, la désamination de la L-phénylalanine ne se limite pas à l'élaboration de l'acide *trans*-cinnamique: des unités benzoïques peuvent être

détectées dans le milieu réactionnel. Sans préjuger de la nature exacte du processus enzymatique détecté (désigné par le sigle PAL + X), il a été possible de dégager une étroite *corrélation* entre cette activité enzymatique et l'accumulation d'unités benzoïques dans les trichomes.

La complexité des informations préliminaires acquises nous a conduit à définir les caractéristiques des mécanismes enzymatiques admettant la L-phénylalanine comme substrat et détectés dans le tissu glandulaire à certaines phases du cycle de sécrétion flavonique des bourgeons (soit activité PAL et activité PAL + X). Dans cette communication nous analyserons les résultats obtenus par filtration sur gel de Sephadex et par chromatographie sur DEAE Sephadex d'extraits enzymatiques purifiés par précipitation protéinique au sulfate d'ammonium.

RESULTATS

Purification de la phénylalanine-ammoniac-lyase des trichomes

Ce travail de purification porte sur des extraits protéiques obtenus à partir de trichomes prélevés début Septembre 73 donc à une époque où la désamination de la L-phénylalanine conduit seulement à la synthèse d'acide *trans*-cinnamique [11].

Tableau 1. Purification de la PAL par filtration sur Sephadex G-100 et par chromatographie sur DEAE Sephadex A-50

Etapes de purification	Volume (ml)	Activité PAL (P)	Activité PAL (P')	Facteur de purification
SE ₁	1	75	75	1,0
SE ₂	15	13,4	201	2,7
SE ₃ { E _a E _b	30	8,32	250	18
	42	9,8	414	

La purification de la PAL glandulaire s'effectue selon le protocole suivant: (a) précipitation protéinique au sulfate d'ammonium, taux de saturation = 70% (obtention de la solution enzymatique SE₁); (b) filtration d'une aliquote de SE₁ sur Sephadex G-100 (soit SE₂ l'éluat actif); (c) chromatographie sur DEAE Sephadex d'une aliquote de SE₂ (obtention de l'éluat actif SE₃, qui renferme 2 protéines E_a, E_b (Fig. 1) ayant une activité PAL).

L'activité PAL (P) est exprimée par le nombre de mmol d'acide *trans*-cinnamique formé par heure d'incubation enzymatique, par ml de solution enzymatique et rapporté à 1 gramme-sec de trichomes. L'activité PAL (P') est exprimée par le nombre de mmol d'acide *trans*-cinnamique formé par heure d'incubation et rapporté à 1 ml de solution enzymatique et à 1 g-sec de trichomes.

L'adjonction au milieu d'extraction de polyéthylèneglycol 6000 et d'un agent réducteur (thioglycolate de sodium) a pour conséquence d'accroître l'activité PAL (activité multipliée par 5). Ce résultat dénote l'existence dans le milieu de composés phénoliques complexant les protéines et rendant difficile leur solubilisation. C'est précisément ce matériel phénolique qui sera partiellement éliminé par précipitation protéinique au sulfate d'ammonium, entièrement éliminé par filtration sur colonne de Sephadex G-100.

Les fractions protéiques actives précipitent pour une concentration en sulfate d'ammonium de 70%. La filtration sur gel de Sephadex G-100 (éluant tampon tris ou borate HCl) de ces fractions a pour conséquence d'accroître l'activité enzymatique (Tableau 1). Cet accroissement d'activité est due à la séparation sur tamis moléculaire de la protéine enzymatique (E) des substances protéino-phénoliques (PR) de poids moléculaire supérieur (Fig. 1). Seules les fractions actives E sont l'objet d'une chromatographie sur DEAE Sephadex A-50 (éluant: tampon tris, gradient linéaire de NaCl). L'intérêt de ce procédé est l'obtention d'un extrait enzymatique purifié environ 18 fois mais aussi et surtout la détection de plusieurs formes isofonctionnelles de l'enzyme.

L'adjonction au milieu d'extraction de PEG 6000 permet donc de réaliser une bonne extraction de la PAL contenue dans les trichomes riches en polyphénols. De plus, la filtration moléculaire sur Sephadex suivie d'une chromatographie sur DEAE Sephadex conduisent à l'obtention d'un extrait purifié permettant d'effectuer l'étude des

propriétés spécifiques de la PAL à localisation glandulaire.

Aux époques où la désamination de la L-phénylalanine conduit à l'élaboration d'unités C₆-C₁ les

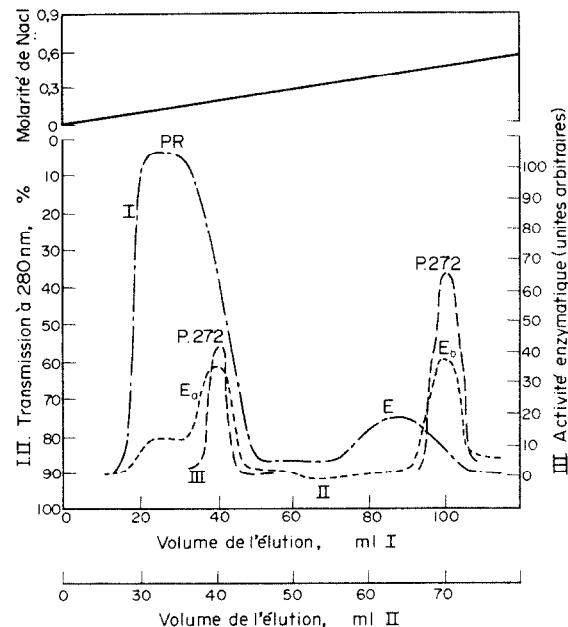


Fig. 1. Diagramme d'élution de l'extrait enzymatique obtenu à partir des trichomes d'*Aesculus*. I. La filtration sur gel de Sephadex G-100 de l'extrait (éluant: tampon borate-HCl, pH 8,8) permet la séparation des protéines tannées (PR) sans activité enzymatique de la fraction protéique active (E). II. La chromatographie sur DEAE Sephadex de l'enzyme (E) (éluant: tampon tris-HCl, pH 8,6; gradient linéaire de NaCl) conduit à la dissociation des protéines E_a et E_b ayant chacune une activité PAL. III. La détermination de l'activité PAL des protéines E_a et E_b (P.272) est réalisé par dosage spectrophotométrique à 272 nm de l'acide *trans*-cinnamique synthétisé dans les conditions expérimentales définies page 7.

Tableau 2. Sensibilité des protéines E_A et E_B à différents effecteurs phénoliques

Protéines	Effecteur					
	Acide cinnamique	Rhamnocitrine	Kaempferol	Quercétine	Acide OH-benzoïque	Acide benzoïque
E_A	94	100	98	100	22	14,5
E_B	12	75	43	48	95	91

Les résultats sont exprimés en % d'activité d'un essai réalisé sans effecteur phénolique. Concentration de l'effecteur $8 \times 10^{-4} M/3$ ml de milieu réactionnel.

Résultats concernant la purification de l'enzyme par filtration sur Sephadex et par chromatographie sur DEAE Sephadex sont analogues à ceux exposés ci-dessus.

Mise en évidence de deux formes isofonctionnelles de la PAL

Cette analyse porte sur des trichomes prélevés début septembre 73 (activité PAL seule détectable à cette période du cycle sécrétoire).

Nous avons souligné que la filtration sur gel de Sephadex G-100 de l'extrait enzymatique conduit à la dissociation de protéines tannées (PR) de la fraction active (E). L'analyse chromatographique de (E) sur DEAE Sephadex A-50 aboutit à l'isolement de 2 protéines E_A et E_B élues respectivement pour des concentrations en NaCl de 0,15 et 0,46 mmol et capables l'une et l'autre de désaminer la L-phénylalanine en conduisant à l'élaboration de l'acide trans-cinnamique (Fig. 1).

Ces 2 formes isofonctionnelles de la PAL ainsi isolées présentent une sensibilité différente vis à vis des substances phénoliques: E_B se révèle inhibée par l'acide trans-cinnamique et avec une intensité moindre par des composés flavoniques tels que quercétine, kaempferol, rhamnocitrine; E_A par l'acide benzoïque et par l'acide OH-benzoïque (Tableau 2).

Dissociation des activités PAL et PAL + X localisées dans les trichomes

Cette étude porte sur des trichomes prélevés en octobre 73 donc à une période du cycle sécrétoire où l'incubation de l'extrait enzymatique en présence de L-phénylalanine conduit à la détection d'acide benzoïque dans le milieu réactionnel [12].

L'analyse chromatographique sur DEAE Sephadex de la fraction protéique active (E) aboutit à l'isolement de 3 protéines E_c , E'_a , E'_b

élues respectivement pour des concentrations en NaCl de 0,076; 0,15; 0,46 mmol. Les produits réactionnels issus de l'incubation des protéines en présence de L-phénylalanine sont de l'acide benzoïque pour E_c , de l'acide trans-cinnamique pour E'_a et E'_b (Fig. 2). La sensibilité de E'_a et de E'_b vis à vis des substances phénoliques est analogue

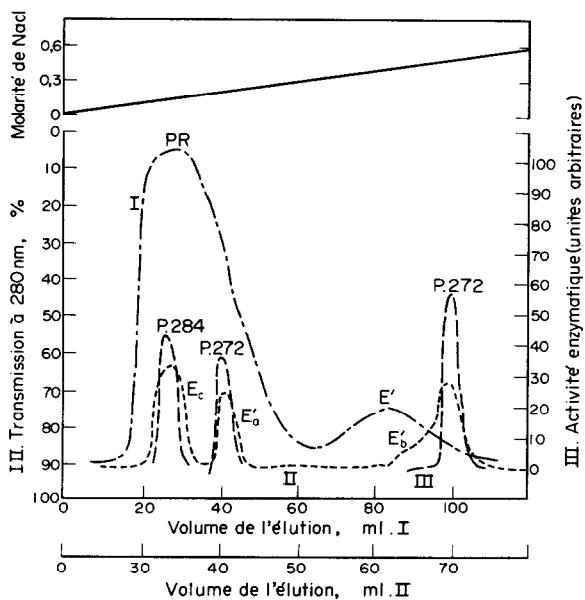


Fig. 2. Diagramme d'éluion de l'extrait enzymatique obtenu à partir des trichomes d'*Aesculus*. I. La filtration sur gel de Sephadex G-100 de l'extrait (éluant: tampon borate-HCl, pH 8,8) permet la séparation des protéines tannées (PR) sans activité enzymatique de la fraction protéique active (E'). Les produits résultant de l'incubation enzymatique de (E') en présence de L-phénylalanine sont de l'acide trans-cinnamique et de l'acide benzoïque. II. La chromatographie sur DEAE Sephadex de (E') (éluant: tampon tris-HCl, pH 8,6; gradient linéaire de NaCl) conduit à la dissociation des protéines E'_a , E'_b , E_c . III. Les protéines E'_a et E'_b ont une activité PAL dont la mesure (P.272) s'effectue par dosage spectrophotométrique à 272 nm de l'acide trans-cinnamique synthétisé; par incubation de E_c en présence de L-phénylalanine de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque sont synthétisés. L'activité enzymatique de E_c (P.284) est estimée par dosage densitométrique sous UV. 284 nm de l'acide benzoïque élaboré.

à celle de E_a et de E_b précédemment décrite (Tableau 2). En présence de L-phénylalanine, les fractions protéiques E' et E_c (Fig. 2) conduisent l'une et l'autre à la synthèse d'acide benzoïque. De l'acide *trans*-cinnamique est cependant détectable dans le milieu réactionnel soit (a) sous forme de traces pour une durée d'incubation de 2 heures environ; soit (b) en quantité élevée pour une durée d'incubation voisine de 30 mn (dans ce cas l'acide benzoïque est absent).

La L-phénylalanine est le substrat spécifique de E' ; par contre, E_c admet comme substrat possible en plus de la L-phénylalanine de l'acide cinnamique exogène: si, après 2 heures d'incubation enzymatique on enrichit le milieu réactionnel en acide cinnamique, le taux final d'acide benzoïque synthétisé est augmenté.

Enfin, 3 points sont à souligner: (a) E_c se révèle inhibée par les composés benzoïques tout comme E_a (Tableau 2); (b) en présence de cofacteurs d'hydroxylation adjoints au milieu réactionnel de l'acide *para*-OH benzoïque est synthétisé par incubation enzymatique de E_c ; (c) E_c se détecte dans tissu glandulaire des bourgeons d'octobre; l'activité enzymatique de E_c apparaît synchrone d'une phase de forte accumulation des acides benzoïques dans ce tissu. Néanmoins, remarquons qu'en septembre au pic E_c se substitue une inflexion (Fig. 1).

DISCUSSION

Ces résultats qui tendent à établir l'existence de 2 isoenzymes de la PAL dans les trichomes d'*Aesculus* (E_a et E_b dans les glandes des bourgeons de septembre; E_a' et E_b' pour les bourgeons d'octobre) vont dans le sens des données déjà présentées sur la régulation de l'activité PAL chez d'autres végétaux [13-20] et sont à rapprocher des indices obtenus sur la présence de 2 formes isofonctionnelles de cette enzyme dont l'une serait inductible par la lumière [21-22].

La sensibilité différente des isoenzymes isolées (d'une part E_a ou E_a' ; d'autre part E_b ou E_b') accrédite l'hypothèse de l'existence de 2 pools d'activité PAL dans les trichomes, l'un en relation avec le métabolisme flavonique, l'autre en relation avec le métabolisme benzoïque. La localisation intracellulaire des isoenzymes, les modalités de la régula-

tion de la synthèse des unités C_6-C_3 et C_6-C_1 restent à établir.

La nature exacte du processus enzymatique conduisant à la synthèse de l'acide benzoïque n'est pas définie; les informations relatives à ce processus sont les suivantes: (a) la détection d'acide benzoïque dans le milieu réactionnel est liée à la présence de la protéine E_c ; (b) l'acide *trans*-cinnamique apparaît comme un intermédiaire de synthèse susceptible d'être libéré dans le milieu réactionnel (pour une durée d'incubation égale à 30 mn seul l'acide cinnamique se détecte; (c) l'acide *trans*-cinnamique exogène non utilisable par (E') est un substrat possible pour E_c (donc après purification de E' par chromatographie sur DEAE Sephadex; et (d) les conditions d'élution sur DEAE Sephadex sont proches; en outre, E_c qui est capable de synthétiser de l'acide benzoïque en présence de L-phénylalanine (ou d'acide cinnamique) peut aussi conduire à l'élaboration d'acide *para*-OH benzoïque.

Ces données posent le problème de l'identification de l'activité enzymatique de la protéine E_c : est-on en présence d'un arrangement spatial de protéines catalytiques résultant de l'association à la PAL E_a' d'une benzoate synthase? ou bien est-on en présence d'une 3ème forme isofonctionnelle de PAL qui dans les conditions expérimentales utilisées n'est pas dissociée d'enzymes surnuméraires?

Les trichomes d'*A. hippocastanum* L. qui élaborent des flavonoïdes de sécrétion et des acides benzoïques constitue un nouvel exemple de régulation, chez les végétaux ligneux, mettant vraisemblablement en jeu plusieurs formes isofonctionnelles de la PAL.

PARTIE EXPERIMENTALE

Extraction enzymatique. 1-2 g de poudre acétonique obtenue par broyage du matériel végétal (=trichomes glandulaires, parenchyme des écailles sécrétives des bourgeons d'*Aesculus*) en milieu acétonique sont homogénéisés dans 10-20 ml de soln tamponnée pH 8.8 (=tampon borate-HCl 0.1 M, thioglycolate de sodium 0.01 M; polyéthylèneglycol 6000 1%). La fraction insoluble est écartée par précipitation. Le surnageant protéique est purifié par précipitation fractionnée au $(NH_4)_2SO_4$.

Purification enzymatique: précipitation fractionnée au sulfat d'ammonium. La concentration en $(NH_4)_2SO_4$ varie de 30 à 85% de saturation; le pH est maintenu à 8.8 par addition de NH_4OH ; durée de la précipitation: 2 hr. Le culot protéique de chaque fraction est écarté puis repris dans 5 ml de tampon borate-HCl. Les fractions actives obtenues par précipitation

en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70% de saturation sont dialysées (12 h à 0°C) avant d'être chromatographiées sur Sephadex.

Chromatographies sur colonne de Sephadex G100 et DEAE Sephadex A-50. Les paramètres d'élution sont les suivants: dimensions du gel (1,8 × 20 cm); volume de l'échantillon 1,5 ml; éluant: tampon borate-HCl 0,1 M pH 8,8 (pour Sephadex G-100), tampon tris-HCl 0,2 M pH 8,6 et gradient continu de NaCl de force ionique croissant de 0 à 0,9 M (pour DEAE Sephadex); débit: 0,3 ml/mn; pression de travail constante de 80 cm H_2O . Les fractions collectées sont analysées sous UV, 280 nm (LKB 4701 A Uvicord Ultraviolet Absorptiometer) et collectées automatiquement (LKB 3400 B Radirac). Les opérations de purification sur colonnes de Sephadex se déroulent dans l'ordre suivant: (1) filtration sur gel G-100 des solutions protéiques; (2) concentration des fractions actives sous vide à l'aide d'un bêcher à dialyse (limite d'exclusion nominale 30000 daltons); (3) chromatographie des fractions concentrées sur DEAE Sephadex A-50.

Réalisation des essais enzymatiques. A 1 ml de substrat (=L-phénylalanine à 1% dans le tampon borate-HCl) on ajoute 2 ml de solution enzymatique. L'incubation enzymatique s'effectue pendant 2 h à 40°. A chaque essai (E) correspond 2 témoins T_1 et T_2 (T_1 dépourvu de phénylalanine—dans ce cas le substrat est limité à la phénylalanine endogène—; T_2 renferment 2 ml de solution enzymatique bouillie. La réaction enzymatique est arrêtée par HCl 5 N.

Détermination de l'activité enzymatique. Les produits issus de la réaction enzymatique sont extraits de la solution acidifiée par Et_2O qui est ensuite évaporée à sec. Le résidu est repris par du MeOH. Le dosage de l'acide trans-cinnamique s'effectue par spectrophotométrie directe à 272 nm. L'activité PAL sera exprimée en μmol d'acide trans-cinnamique formé par g/sec de matériel végétal et par heure d'incubation enzymatique. Les acides benzoïques sont chromatographiés sur couche mince de silice (solvant C_6H_6 -dioxane-AcOH 100:10:4) (silice fluorescent sous UV, 254 nm). Le dosage des unités $\text{C}_6\text{--C}_1$ s'effectue par densitométrie dans l'UV court à l'aide d'un appareil Chromoscan.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mahesh, U. B. et Seshadri, T. R. (1954) *J. Sci. Ind. Res.* **13**, 5 835.
2. Chadenson, M., Molho-Lacroix, L., Molho, D. et Mentzer, C. (1955) *Compt. Rend.* **240**, 1362.
3. Wollenweber, E. et Egger, K. (1969) *Phytochemistry* **10**, 225.
4. Wollenweber, E. et Lebreton, P. (1971) *J. Biochem.* **53**, 935.
5. Wollenweber, E. et Egger, K. (1971) *Tetrahedron* **21**, 1767.
6. Wollenweber, E., Bouillant, M. L., Lebreton, P. et Egger, E. (1971) *Z. Naturforsch.* **26**, 11.
7. Egger, K., Charrière, Y. et Tissut, M. (1972) *Z. Pflanzenphysiol.* **68**, 92.
8. Charrière, Y. et Tissut, M. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1443.
9. Charrière-Ladrix, Y. (1972) *Bull. Soc. Botanique* **119**, 543.
10. Charrière-Ladrix, Y. (1973) *J. Microscopie* **17**, 299.
11. Charrière-Ladrix, Y. (1974) *Z. Pflanzenphysiol.* **73**, 95–102.
12. Charrière-Ladrix, Y. (1974) (travaux non publiés).
13. Boudet, A., Ranjeva, R. et Gadal, P. (1971) *Phytochemistry* **10**, 997.
14. Alibert, G. et Ranjeva, R. (1971) *FEBS Letters* **19**, 11–14.
15. Alibert, G., Ranjeva, R. et Boudet, A. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 282.
16. Alibert, G., Ranjeva, R. et Boudet, A. (1972) *Physiol. Plant* **27**, 240.
17. Havir, E. A. and Hanson, K. R. (1968) *Biochemistry* **7**, 1896.
18. Harper, D. B., Austin, D. J. and Smith, H. (1970) *Phytochemistry* **9**, 497.
19. Parkhurst, J. R. and Hodgins, D. S. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2997.
20. Minimikawa, T. and Uritani, I. (1965) *J. Biochem.* **58**, 53.
21. Attridge, T. H. and Smith, H. (1973) *Plant Sci. Letters* **1**, 247–252.
22. Ahmed, S. I. and Swain, T. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2287.