

INCORPORATION DE PHENYLALANINE, DE GLUCOSE ET D'ACIDE CINNAMIQUE DANS LES FLAVONOLS DE L'OIGNON

MICHEL TISSUT

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France

(Received 15 March 1976)

Key Word Index—*Allium cepa*; Liliaceae; ageing; flavonols; turnover; phenylalanine; cinnamic acid; glucose.

Abstract—In *Allium cepa* bulb scales, incorporation of ^{14}C -phenylalanine, cinnamic acid and glucose were studied in relation to flavonol synthesis. The best incorporation into flavonols is obtained with either cinnamic acid or phenylalanine. ^{14}C -glucose gives a slow incorporation into flavonol aglycone; this is because there is a big pool of free glucose in the scales in which the precursor is diluted. Under certain conditions, free cinnamic acid is quickly incorporated in a complex which may be a glycoside. After short labelling experiments with phenylalanine or cinnamic acid, some free precursor can be found in the scales a few days later but it is not available for flavonol synthesis. In these conditions, flavonol analysis shows in some cases, no turnover and in others, a turnover of 10% per day due to catabolism.

INTRODUCTION

Toute une série de composés phénoliques dérivant, pour une bonne part, de la phénylalanine, sont formés et accumulés par différentes espèces de végétaux supérieurs, au niveau de différents types d'organes. Certains de ces composés, comme les flavonoïdes, sont considérés comme des métabolites terminaux, n'ayant d'autre issue que l'accumulation. Cette conception appelle plusieurs remarques: (1) Il existe de nombreux cas d'accumulation très forte de métabolites secondaires biochimiquement non terminaux (exemple l'acide chlorogénique) (2) Le noyau flavonique peut être scindé, au moins chez certains végétaux supérieurs et, de toute manière, ces composés sont des substrats possibles pour phénolases et peroxydases. (3) En ce qui concerne les flavonoïdes, on peut actuellement les localiser à trois niveaux très différents du matériel végétal: a) dans le suc vacuolaire des tissus superficiels d'organes aériens [1,2] b) dans les chloroplastes de divers végétaux supérieurs [3,4] c) sous forme d'aglycones dans les produits de sécrétion de divers bourgeons, de bois de cœur [5]. S'il est clair que cette dernière catégorie correspond bien à des produits physiologiquement terminaux, cela est beaucoup moins évident pour les deux autres. Aussi, il nous apparaît que des études minutieuses des modalités de la biosynthèse et de l'accumulation de ces corps *in vivo* sont nécessaires pour appréhender la signification physiologique de leur présence dans le matériel végétal.

Nous avons poursuivi l'étude de l'accumulation flavonique dans les épidermes des tuniques de bulbe d'*Allium cepa* L. Dans les tuniques en survie, séparées et maintenues en milieu aéré, humide, se développe une activité PAL importante, associée à une forte accumulation de flavonols. L'activité PAL, comme chez le Maïs, est indifférente à la lumière [6]. Les flavonols s'accumulent dans les épidermes, surtout l'épiderme externe. Ces substances sont essentiellement des dérivés du quercétol,

dont une part importante présente une glycosylation en position 4'.

RESULTATS

Pénétration des substances marquées; répartition dans les tuniques

Par trempage des tuniques dans les solutions aqueuses des molécules marquées, le glucose et la phénylalanine pénètrent en quantités suffisantes aux expériences en 20 et 10 mn, à partir de solutions mères de 0,1 mCi/200 ml. Pour l'acide cinnamique, la pénétration est beaucoup plus rapide: 1-5 mn suffisent pour le même résultat. La répartition de la radioactivité dans l'épaisseur des tuniques se fait de manière sensiblement uniforme: au bout d'un jour, la quantité de radioactivité récupérable par rinçage et frottement des surfaces par un coton imbibé d'eau, représente 1% seulement de la radioactivité incorporée. Si l'on divise la tunique d'oignon en 4 parties successives: fraction superficielle, (épiderme externe + parenchyme immédiatement sous-jacent), parenchyme externe, parenchyme interne, épiderme interne, chacune de ces parties contient respectivement 21, 27, 44 et 7% de la radioactivité incorporée. La teneur par unité de masse sèche est, pour chaque fraction, de 34, 24, 35 et 92 dpm/mg. La radioactivité se répartit donc largement dans la profondeur des tuniques. Les extrémités des tuniques, plus ou moins desséchées, sont éliminées. Huit jours après le marquage, la répartition de la radioactivité dans les différentes parties de la tunique reste sensiblement inchangée.

Répartition de la radioactivité à la suite de l'extraction et de la purification des flavonols

Les glycosides flavoniques des épidermes sont extraits en quantités proches de la totalité par l'acétone à 80%, à température ordinaire. La radioactivité des poudres acétoniques est toujours forte: 50% de la radioactivité

Tableau 1. Rémanence des précurseurs après marquage court

	Dose incorporée dpm/g ($\times 10^5$)	Stades			
		0	1	2	3
Acide cinnamique	1,3	100%	—	54%	38%
		100%	—	37%	25%
Phénylalanine	3	100%	100%	35%	30%
Glucose	1,5	100%	—	92%	70%

Nota: la radioactivité présente sous forme de précurseur libre immédiatement après le marquage est arbitrairement représentée par 100%.

incorporée pour le glucose, 20 à 30% pour la phénylalanine et l'acide cinnamique. Une partie importante de cette radioactivité peut, chez l'oignon, être récupérée en poussant l'extraction hydroacétonique. Il ne s'agit donc pas d'une fraction insoluble réelle, engagée dans des molécules nouvellement synthétisées. Pratiquement, dès l'incorporation de l'acide cinnamique, on peut constater dans la plupart des lots, la disparition d'une fraction importante de la radioactivité cinnamique libre, ce phénomène étant totalement indépendant de la synthèse flavonique. On met en évidence par CCM un composé très polaire qui libère par hydrolyse acide de l'acide cinnamique et qui en est vraisemblablement un dérivé glycosylé.

Cinétique d'incorporation des précurseurs aux substances synthétisées par l'oignon

Acide cinnamique, phénylalanine, glucose, utilisés comme marqueurs, sont dosés au cours de la survie. Des quantités importantes de ces corps sous forme libre persistent tout au long des expériences (10 j), après marquage court. L'acide cinnamique utilisé, qui est un mélange de forme *cis* et *trans* ne peut être utilisé que sous sa forme *trans*. Nous verrons plus loin que la non-utilisation de l'isomère *cis* ne peut rendre compte à elle seule de la persistance de la radioactivité cinnamique en fin d'expérience.

La phénylalanine persiste aussi en quantités importantes en fin d'expérience. Son éventuel engagement dans

Tableau 2. Incorporation de la radioactivité aux flavonols

Précurseur					
Phénylalanine	Acide cinnamique	Glucose			
dpm totale incorporée ($\times 10^4$)	dpm flav.	dpm totale incorporée ($\times 10^4$)	dpm flav.	dpm totale incorporée ($\times 10^4$)	dpm flav.
52	8%	23	10%	22	3%
35	9%	25	5%	—	—
320	9%	150	3,5%	—	—
—	—	250	1%	—	—

la synthèse protéique, alors que le pic d'activité enzymatique est déjà dépassé au moment du marquage, apparaît comme un phénomène mineur qui ne peut épuiser le stock de forme libre. Le glucose présente la persistance maximale parmi les précurseurs utilisés. La molécule marquée s'ajoute à un pool de glucose libre très important qui subit une utilisation proportionnellement faible.

Marquage des flavonols

Les trois précurseurs utilisés s'incorporent aux flavonols. Les rendements d'incorporation les plus forts obtenus sont de l'ordre de 10% (Tableau 2). Si l'on admet que la radioactivité se répartit uniformément dans l'épaisseur des tuniques et que le rapport masse des épidermes/masse totale de la tunique est inférieur ou égal à 1/5, on atteindrait pour les épidermes des taux d'incorporation supérieurs ou égaux à 50% dans ce cas.

Le taux d'incorporation de l'acide cinnamique, dans les conditions optimales, atteint 10%. Compte-tenu du fait que le marqueur est constitué d'un mélange *cis-trans*, ce rendement est vraisemblablement supérieur pour la forme *trans*, à celui de l'incorporation de phénylalanine. Comme nous l'avions signalé antérieurement [7], l'incorporation de la phénylalanine aux flavonols constitue, au niveau des épidermes, la voie essentielle de transformation de ce précurseur. Le glucose est incorporé en quantités plus faibles que les deux autres précurseurs.

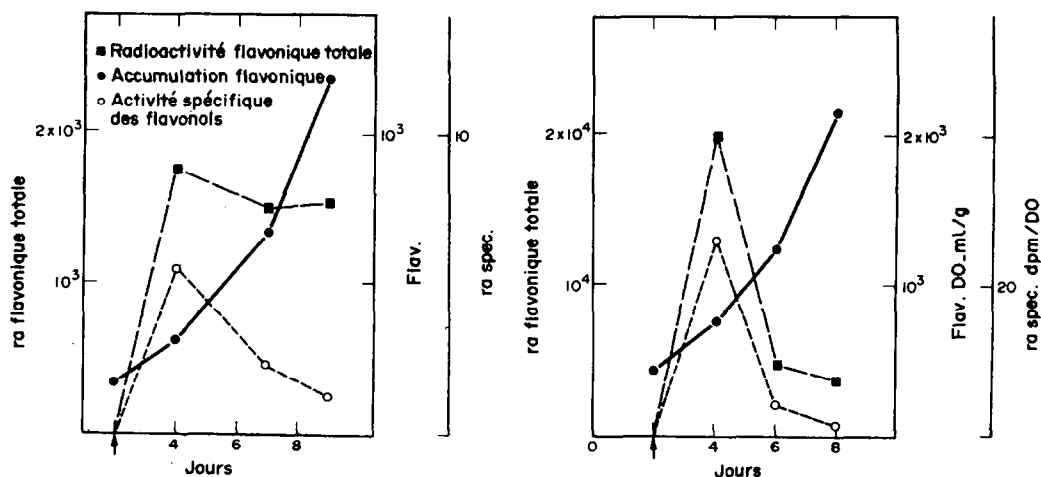


Fig. 1. Deux types d'incorporation de la phénylalanine ou de l'acide cinnamique dans les flavonols de l'oignon, après marquage court.

Cinétique des incorporations après marquage ponctuel

Nous avons antérieurement décrit une cinétique d'incorporation de la phénylalanine dans les flavonols d'une race d'oignons, à la suite d'un marquage ponctuel de 10 mn. Nous avons répété cette expérience avec des lots d'oignons d'état physiologique différent; Les résultats obtenus montrent (Fig. 1) une très forte incorporation dans les deux jours qui suivent le marquage. Deux cas peuvent ensuite se produire: (1) La radioactivité flavonique totale reste alors stable, bien que la masse flavonique accumulée continue de s'accroître. (2) Dans un certain nombre de cas, la radioactivité, flavonique totale décroît lentement à partir du troisième jour après marquage. Les marquages avec l'acide cinnamique nous donnent des courbes du même type avec les deux possibilités: maintien ou légère décroissance au cours du temps de la radioactivité flavonique totale (Fig. 1). Le marquage avec le glucose apporte un élément physiologique nouveau (Fig. 2): contrairement à ce qui se passe avec les autres précurseurs, la radioactivité flavonique totale croît constamment pendant toute la durée de l'expérience. Le précurseur stocké est donc libéré et utilisé progressivement.

Effet des doses croissantes de marqueur en incorporation ponctuelle

En marquage ponctuel, des essais, de doses, de phénylalanine et acide cinnamique ont été effectués. Dans un essai antérieur, nous avons défini une dose de phénylalanine qui entraînait une croissance continue de la radioactivité flavonique (4×10^6 dpm/g), et qui correspondait donc à un comportement physiologique différent de celui obtenu avec les doses inférieures. Avec des doses comprises entre 30×10^5 et 25×10^4 dpm de phénylalanine ou d'acide cinnamique par g de matériel végétal, les courbes de radioactivité flavonique totale en fonction du temps sont d'aspect très semblable (Fig. 3). Cependant, alors que le rendement d'incorporation de la phénylalanine aux flavonols reste constant quelle que soit la

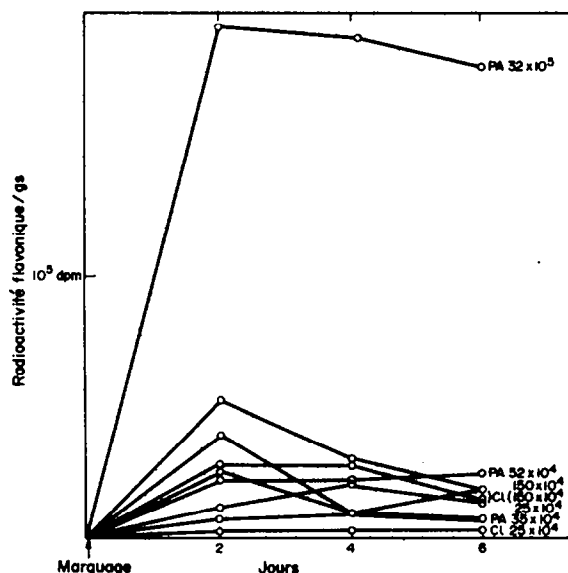


Fig. 3. Evolution de la radioactivité flavonique totale après marquage court avec la phénylalanine ou l'acide cinnamique.

dose employée (9% environ) (tableau 2), le rendement d'incorporation de l'acide cinnamique dans les mêmes composés décroît de 10 à 1% lorsque la dose appliquée augmente. Ce phénomène semble correspondre à la mise en place d'un cloisonnement physiologique qui détournerait l'acide cinnamique plus que la phénylalanine des sites de synthèse flavonique.

Application des mesures réalisées à des estimations de turn over

Contrairement au glucose, avec la phénylalanine et l'acide cinnamique, la radioactivité totale incorporée dans les flavonols reste stationnaire voire décroît. Or, des quantités non négligeables de précurseurs persistent à l'état libre dans le matériel végétal. Il nous faut donc conclure qu'elles ne peuvent avoir accès aux sites de synthèse flavonique. Si l'on admet que ce blocage est total et que les conditions de détermination d'un turn over sont parfaitement réalisées, on peut déterminer les

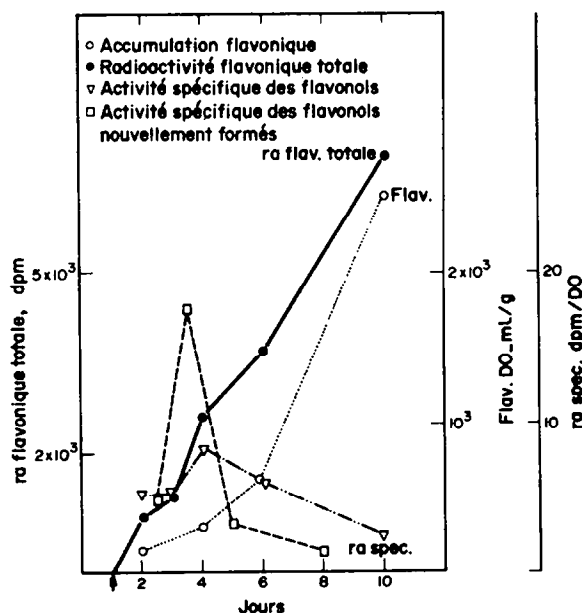


Fig. 2. Incorporation du glucose, après marquage court, dans les flavonols.

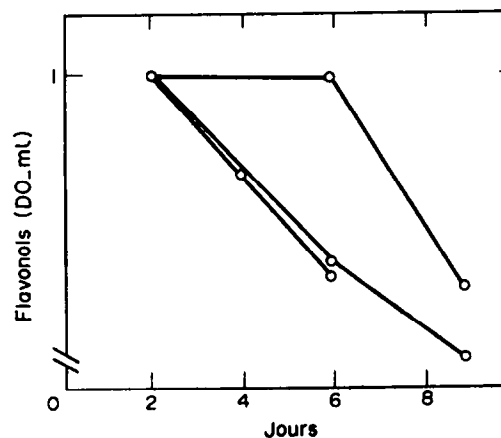


Fig. 4. Cinétique apparente de disparition des flavonols dans les cas où elle se produit.

ordes de grandeur du turn over en différents états physiologiques:

(a) Lorsque la radioactivité flavonique totale reste stable le turn over serait nul.

(b) Lorsque la radioactivité flavonique totale décroît, on peut exprimer le turn over (T.O.) (Fig. 4) par la formule

$$\text{T.O.} = \frac{100(Q_1 A_1 - Q_2 \cdot A_2)}{(T_2 - T_1) A_1 \cdot Q_1}$$

Q_1 , Q_2 représentent le contenu flavonique et A_1 et A_2 l'activité spécifique des flavonols aux temps T_1 et T_2 (en jours). T.O. exprime donc la proportion dégradée par jour d'une unité flavonique synthétisée au moment du marquage. La figure 4 montre qu'un tel calcul appliqué aux décroissances observées dans un certain nombre de cas permet d'évaluer l'ordre de grandeur de la dégradation flavonique à 10% par jour.

DISCUSSION

Chez l'oignon, la physiologie du bulbe en "survie" est telle que les précurseurs incorporés sont partiellement accumulés pendant des temps assez longs. Contrairement à la phénylalanine, le stockage du glucose permet un accès progressif aux sites de synthèse flavonique pendant toute la durée d'expérience. On peut donc penser que le glucose incorporé est accumulé dans les mêmes conditions que la réserve glucidique naturelle des tuniques, qui est effectivement constituée de glucides simples, solubles, présents en quantités très importantes dans la vacuole. La très grande taille du pool de glucose libre a pour conséquence une dilution inerte du précurseur marqué et peut certainement expliquer la continuité de l'incorporation dans les flavonols après marquage court. La respiration n'entraîne pas, en cours d'expérience, de baisse visible de la réserve. Cependant, l'intensité d'incorporation aux flavonols, très forte immédiatement après marquage, est beaucoup plus faible par la suite, alors que la teneur en glucose ^{14}C libre est inchangée ou presque. Un changement de localisation doit donc intervenir entre ces deux étapes: si l'hypothèse d'un changement au niveau histologique est peu vraisemblable, par contre des modifications au niveau cytotologique seraient possibles: le glucose aurait, seulement au cours de la deuxième étape, une localisation limitée, vraisemblablement, vacuolaire.

Phénylalanine et acide cinnamique ont en commun avec le glucose un marquage flavonique intense immédiatement après l'incorporation. Par la suite, l'incorporation paraît très faible voire nulle pour les deux premiers composés. Tout se passe comme si le précurseur libre n'accédait plus aux sites de synthèse flavonique. Pour l'acide cinnamique, la possibilité qu'à l'oignon de l'engager dans une molécule plus complexe joue vraisemblablement un rôle important dans son cloisonnement.

Pour les turn over, les estimations obtenues constituent une limite inférieure puisque l'on ne peut exclure absolument une faible poursuite de l'incorporation du précurseur radioactif. L'existence d'un turn over apparent nul dans certains cas, et d'un turn over apparent de 10% par jour dans d'autres, peut être interprétée de deux manières différentes: (1) dans le cas du turn over apparent nul, on ne peut exclure totalement l'éventualité

d'un équilibre constamment maintenu entre incorporation et dégradation, la fourniture de phénylalanine radioactive se poursuivant tout au long de l'expérience, comme c'est le cas pour le glucose. Cependant, le stockage de précurseur est assez faible, on n'enregistre pas de baisse convenable de celui-ci en fin d'expérience et une compensation exacte de la dégradation par la synthèse, amenant au maintien de l'activité flavonique globale paraît inconcevable. Au total, cette hypothèse paraît donc très improbable. (2) Ce turn over apparent nul correspondrait à une activité nulle des processus de dégradation flavonique dans l'oignon, dans certaines races physiologiques ou, pour toutes les races, à certaines étapes de la vie du bulbe (dormance?). A d'autres étapes, (avant l'entrée en dormance ou après la sortie de dormance?), ces processus pourraient fonctionner. Il nous faut d'ailleurs noter à ce niveau que certains lots ne possèdent pas l'aptitude à complexer l'acide cinnamique. De plus, dans le bulbe en conditions normales, la persistance de quantités fortes de quercétol libre dans les tuniques sénescences montre que le catabolisme flavonique est un phénomène très limité comme le suggérait déjà le niveau d'activité PAL des épidermes, trop faible pour assurer une synthèse de quantités de flavonols bien supérieure à celles qui sont accumulées. Notons d'ailleurs que les flavonols de l'oignon sont, pour une très large part, représentés par des 4'-glucosides qui pourraient être plus résistants à la dégradation que les glycosides en 3 [8]. Cependant, la teneur en flavonols des tuniques périphériques, sèches, nettement plus basse (par unité de surface) que celle des tuniques vivantes, pourrait s'expliquer par des dégradations prenant place *in vivo* et non après la mort de la tunique. L'amplitude maximale du catabolisme mesurée chez l'oignon est très vraisemblablement sans commune mesure avec celle qui concerne les polyphénols de jeunes pousses en croissance. Par contre, elle est du même ordre de grandeur que celle du turn over noté par Barz et Hosel [9] dans les feuilles de *Cicer arietinum*. Cette comparaison nous incite d'ailleurs à penser que, même pour les organes aériens où la relation entre flavonoïdes et lumière se manifeste de nombreuses manières, le rôle physiologique des flavonols pourrait également comprendre des fonctions de protection contre divers être vivants du même biotope (fonctions qui paraissent être celles des flavonols du bulbe d'oignon). Il se pourrait que ces fonctions soient, au moins partiellement, assurées par l'intermédiaire des produits d'oxydation de la molécule en C 15.

PARTIE EXPERIMENTALE

Des bulbes d'oignon au repos sont désinfectés en surface et coupés diamétralement. Les demi-tuniques obtenues sont déboîtées et disposées sur du papier filtre dans lequel circule de l'eau [6]. Ce dispositif est au préalable désinfecté. Au bout de 24-48 hr, le contenu flavonique des épidermes d'oignon augmente à peu près linéairement jusqu'à une limite de 12 jours environ, moment à partir duquel il est très difficile d'assurer un bon état sanitaire du matériel végétal. L'incorporation se fait par trempage des demi-tuniques (en général au troisième jour de survie) dans les solutions aqueuses de précurseur à 100 $\mu\text{Ci}/200\text{ ml}$. Le temps de trempage varie de 1 à 20 mn suivant l'expérience. L'acide cinnamique pénètre beaucoup plus rapidement que la phénylalanine ou le glucose. Le matériel trempé est maintenu 10 mn à l'air avant de le rincer abondamment. Après marquage, des tuniques sont prélevées

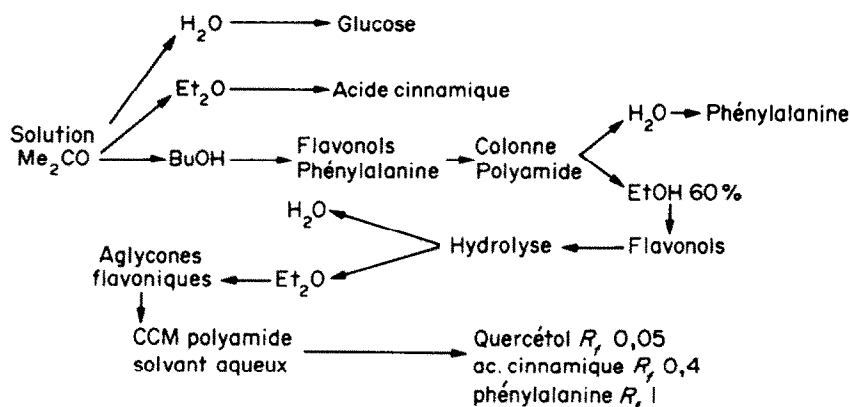


Fig. 5. Protocole expérimental de purification du quercétol marqué.

tous les deux jours, pesées et immédiatement immergées dans l'acétone et stockées à -15° .

Extraction, purification

Le problème posé réside dans l'obtention de flavonols—totalement exempts de traces de précurseurs,—exempts de composés provenant du matériel végétal et ayant pu se marquer,—exempts de substances pouvant perturber le dosage spectrophotométrique des flavonols. De plus, l'obtention doit se faire dans un délai compatible avec la poursuite d'une expérimentation physiologique. Il faut donc que le protocole soit aussi simple que possible et s'applique à de petites quantités. Après divers essais [10], le protocole que nous avons mis au point et le plus couramment utilisé est le suivant: L'échantillon (150 g de matière fraîche) est extrait par 500 ml d'acétone à température du laboratoire. Le rendement de l'extraction pour les flavonols est de 90%. Une deuxième extraction fournit 8% de la quantité flavonique initialement obtenue. La solution acétonique est ramenée à 20 ml. Une petite aliquote sert au dosage des flavonols par spectrophotométrie différentielle en présence de AlCl_3 . Une aliquote plus importante subit des purifications résumées dans la Fig. 5.

Le quercétol élué de la CCM de polyamide par EtOH est dosé par spectrophotométrie différentielle et sa radioactivité est mesurée par scintillation dans le mélange PPO, POPOP, toluène, dans une bande d'énergie allant de 0.65 à 4.70 Kev

qui limite à très peu l'effet de quenching dû aux flavonols et permet de très bonnes mesures, même avec $5 \mu\text{M}$ de ces corps. La phénylalanine est séparée par chromatographie bidimensionnelle sur papier et l'acide cinnamique par CCM de silice, à partir de l'extrait acétonique concentré.

Remerciements—Je remercie Mme Christiane Pitre pour son aide technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tronchet, J. (1968) *Compt. Rend.* **266**, 882.
2. Tissut, M. (1970) Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Grenoble, France.
3. Monties, B. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.* **15**, 29.
4. Weissenböck, G. (1973) *Ber. Deut. Bot. Ges.* **86**, 351.
5. Charrière, Y. et Tissut, M. (1972) *Compt. Rend.* **274**, 2659.
6. Tissut, M. (1972) *Physiol. Vég.* **10**, 381.
7. Tissut, M. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2155.
8. Dittrich, P. et Kandler, O. (1971) *Ber. Deut. Bot. Ges.* **84**, 465.
9. Barz, W., Hostel, W. et Adamek, C. (1971) *Phytochemistry* **10**, 343.
10. Tissut, M. (1975) Congrès du Groupe Polyphénols, Milan, Italie.
11. Egger, K. et Keil, M. (1965) *Z. Anal. Chem.* **210**, 201.