

PHENYLALANINE-AMMONIAQUE LYASE ET COMPOSES PHENOLIQUES AU COURS DE LA MATURATION DE LA CERISE

CHRISTIAN MELIN, ANNE-MARIE MOULET, JEAN-FRANCOIS DUPIN et CLAUDE HARTMANN

Laboratoire de Physiologie Végétale Université d'Orléans, 45017 Orléans Cedex, France

(Revised received 28 July 1976)

Key Word Index—*Prunus avium*: Rosaceae; cherry; phenylalanine ammonia-lyase; phenolic acids; flavonoids; tannins; neochlorogenic acid; isorhamnetin 3-o-rutinoside; growth and maturation.

Abstract—L-Phenylalanine-ammonia lyase (PAL) activity and phenolic content were investigated during growth and maturation of sweet cherry fruit on the tree. Phenolic acid, flavonoid and tannin contents, were studied in relation to PAL activity over two years. Concomitant variations in PAL activity and in flavonoid or phenolic acid concentrations were found during growth, suggesting that PAL is the major element controlling the synthesis of phenolic compounds in sweet cherry. During ripening, the increase in PAL activity did not appear to be directly related to anthocyanin synthesis. The concentrations of neochlorogenic acid and narcissin measured over the same period were also related to PAL activity.

INTRODUCTION

Parmi les nombreuses réactions enzymatiques impliquées dans la biosynthèse des composés phénoliques, l'une d'elle, la formation de l'acide *trans*-cinnamique par désamination de la L-phénylalanine est très généralement considérée comme une étape fondamentale [1,2]. La protéine enzymatique, assurant ainsi le passage de l'acide aminé à l'acide précurseur des composés phénoliques est la phénylalanine-ammoniaque lyase (PAL, E.C.4.3.1.5) [3].

Mise en évidence chez de nombreux végétaux [4], la PAL a fait l'objet de très nombreuses études [5]. Les travaux de Zucker [6], de Scherf *et al.* [7] et ceux de Creasy [8] ont révélé respectivement une corrélation très étroite entre l'activité PAL et la biosynthèse de l'acide chlorogénique dans les disques de tubercules de pomme de terre, mais aussi, des anthocyanes, des leucoanthocyanes et de divers flavonoïdes dans le sarrasin et les disques de feuilles de fraisier. De même, des relations ont été démontrées entre l'activité de la PAL et le taux d'accumulation de divers composés phénoliques chez un certain nombre de fruits [9-13].

Les changements d'activités enzymatiques, ainsi que les variations de l'intensité respiratoire et des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes, liés à la croissance, à la maturation et à la conservation de la cerise *Prunus avium* L. var. Bigarreau Napoléon, ont fait l'objet de travaux antérieurs [14, 15]. Dès lors, nous avons voulu tenter de comprendre l'importance des composés phénoliques dans la croissance et la maturation de ce fruit sur l'arbre. Pour ce faire, l'étude des variations quantitatives des grands groupes de composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, anthocyanes), le dosage de deux polyphénols (l'acide néochlorogénique et l'isorhamnétine-3 rutinoside), qui se sont révélés comme étant prépondérants dans ce fruit [16], ainsi que la mesure de l'activité PAL ont été entrepris.

RESULTATS

Les variations de l'activité PAL et des teneurs en composés phénoliques (acide néochlorogénique, isorhamnétine-3 rutinoside, composés phénoliques simples, flavonoïdes, tanins, anthocyanes), exprimées par rapport à un gramme de matière sèche, sont suivies en fonction

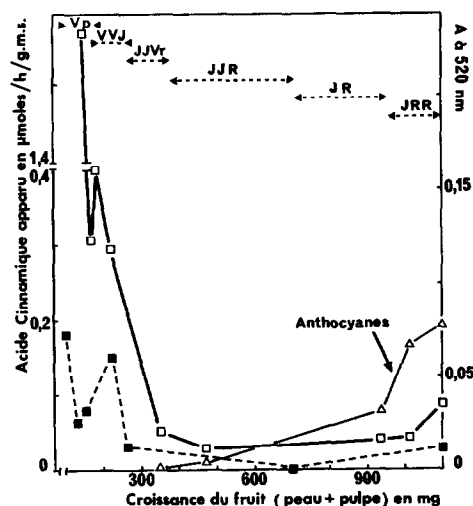


Fig. 1. Variations de l'activité PAL et de la teneur en anthocyanes (A à 520 nm) au cours de la croissance et de la maturation de la cerise. Activité PAL { en tiré : année 1974. Couleur des fruits: Vp = vert pâle; V = vert; J = jaune; r et R = rouge.

de la croissance des fruits (masse de matière sèche correspondant à l'ensemble peau et pulpe d'un fruit aux différentes dates de prélèvement) et ce, pour les années 1974 et 1975.

L'observation de l'évolution pondérale des fruits révèle que, parmi les périodes de croissance habituellement définies chez les fruits à noyaux (I, II, III) [17], seules sont étudiées ici les périodes II et III.

La figure 1 laisse apparaître une étroite similitude entre les variations de l'activité PAL pour les deux années envisagées. Après une chute importante (de 1,572 à 0,305 μmol d'acide *trans*-cinnamique formé/h/g), l'activité augmente légèrement juste avant le virage de teinte du vert au jaune. Cette recrudescence

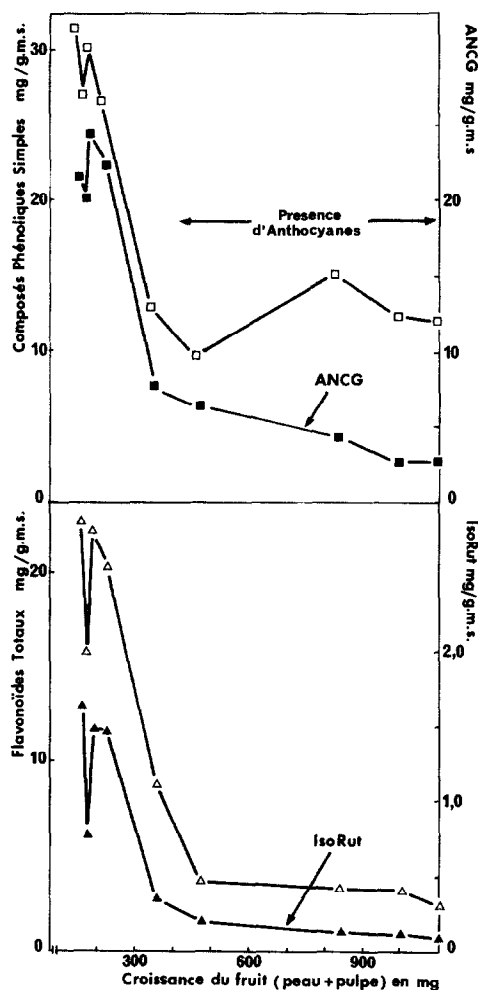


Fig. 2. Variations de la teneur en composés phénoliques simples totaux, en acide néochlorogénique (ANCG), en flavonoïdes totaux et en isorhamnétine-3 rutinosé (IsoRut) au cours de la croissance et de la maturation de la cerise. (Résultats de 1975).

correspond pour les deux années à des fruits ayant atteint le même stade de croissance (environ 200 mg de peau et pulpe). L'activité très faible ensuite (0,050 μmol /h/g) devient à nouveau plus importante lorsque les cerises finissent de prendre leur coloration rouge; il faut toutefois noter que l'apparition de cette coloration, et par conséquent des anthocyanes, précède quelque peu l'augmentation de l'activité.

Les variations relatives du taux en composés phénoliques se sont révélées être tout à fait semblables pour les deux années envisagées bien que toujours plus faibles

pour les fruits de 1974. Les résultats obtenus pour l'acide néochlorogénique et l'isorhamnétine-3 rutinosé confirment les variations relatives mises en évidence pour les fractions composés phénoliques simples et flavonoïdes totaux (Fig. 2). Bien que les dosages de ces composés aient été réalisés pour les deux années envisagées, seuls sont portés sur la figure les résultats de 1975: ils sont tout à fait semblables à ceux de 1974.

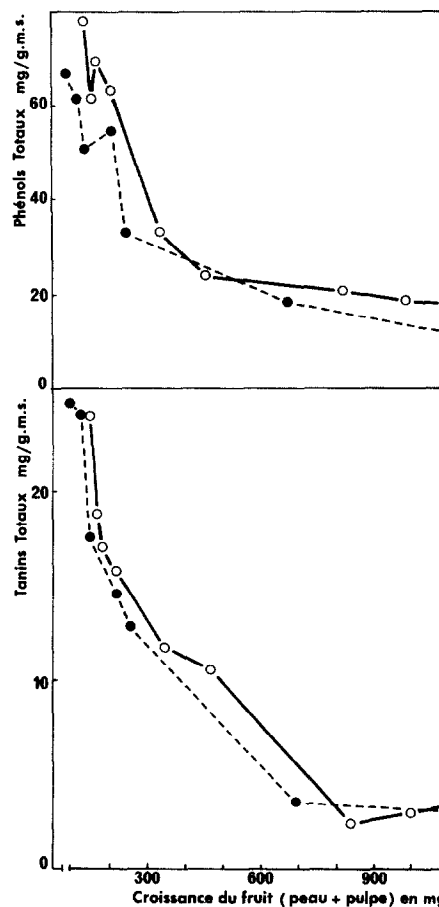


Fig. 3. Variations de la teneur en phénols totaux et en tanins totaux au cours de la croissance et de la maturation de la cerise. en tiré: année 1974; en trait plein: année 1975.

Il est facile d'observer ici aussi une chute de la teneur, immédiatement suivie d'une augmentation (42% pour la fraction flavonoïdes totaux et 82% pour l'isorhamnétine-3 rutinosé) qui précède le virage de teinte au jaune des cerises et leur entrée dans la phase exponentielle de croissance. En ce qui concerne l'acide néochlorogénique, la variation de teneur observée est du même ordre que celle de la fraction composés phénoliques simples: 10 à 12%. Rudnicki *et al* [18] ont obtenu des variations encore plus importantes au niveau des esters de l'acide para-coumarique chez *Prunus cerasus* et ce au stade II de la croissance. Au cours de la maturation, le taux de ces composés (ANCG et ISO Rut) décroît lentement pour atteindre lorsque le fruit est "mûr" une valeur 7 à 10 fois plus faible que dans le fruit vert. Ce résultat confirme les travaux de Wolf [19] sur l'acide chlorogénique et de Walker [20] sur les esters

hydroxycinnamiques, chez diverses variétés de cerises. Durant ce même intervalle, le taux des composés phénoliques simples diminue de 4 fois et celui des flavonoïdes de 7 fois: nous avons pu vérifier [16] que l'augmentation du taux global de la fraction composés phénoliques simples était due à la présence d'anthocyanes dans les extraits, la teneur réelle en composés phénoliques simples continue en fait à décroître.

La teneur en "phénols totaux" évolue, comme le montre la figure 3, de manière tout à fait semblable à celles en acides phénoliques totaux et en flavonoïdes totaux. Les tanins, quant à eux, voient leur taux diminuer sans jamais réaugmenter (Fig. 3).

DISCUSSION

L'existence d'une activité PAL chez la cerise, assurant la synthèse de l'acide *trans*-cinnamique à partir de la L-phénylalanine a pu être mise en évidence. Nous n'avons pu déceler, avec les méthodes d'analyse utilisées, les dérivés de cet acide et il est probable que leur transformation est suffisamment rapide pour qu'aucune accumulation ne se produise.

L'étude de la variation de l'activité PAL, ainsi que des teneurs en composés phénoliques simples et en flavonoïdes au cours de la croissance et de la maturation sur l'arbre, fait apparaître une évolution semblable (Fig. 1 et 2). En effet, la chute de l'activité enzymatique observée chez le fruit de petite taille s'accompagne d'une diminution tant du taux des acides phénoliques que des flavonoïdes. Elle est suivie d'une augmentation simultanée de l'activité PAL et des teneurs globales en ces deux catégories de composés phénoliques. Ce phénomène correspond à des fruits de 353 mg en 1975 et 377 mg en 1974 (Fig. 1). Il est d'ailleurs très probable que cette remontée, précédant dans les deux cas le virage au jaune, corresponde à un stade important dans la croissance et la maturation du fruit: la peau et la pulpe d'un fruit représentent alors une masse de matière sèche d'environ 200 mg. L'apparition de la couleur jaune des cerises s'accompagne d'une nouvelle diminution de l'activité PAL, du taux des flavonoïdes et des composés phénoliques simples. A ce stade, la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes devient très faible [15].

Il faut noter qu'au moment du virage de teinte (vert à jaune), c'est-à-dire quand l'activité PAL présente un maximum, une synthèse importante d'enzyme malique (L malate-NADP oxydoréductase décarboxylante, E.C.1.1.1.40) a été mise en évidence [14]. Cette période de la vie du fruit semble donc coïncider avec une étape importante de la maturation de la cerise qui, rappelons-le, mûrit sans crise respiratoire (climactérique).

Lorsque le fruit commence à rougir, le taux des flavonoïdes continue à diminuer ainsi que celui des composés phénoliques simples, tandis que l'activité enzymatique augmente légèrement. Les dosages de l'acide néochlorogénique et de l'isorhamnétine-3 rutinoside confirment tout à fait les résultats obtenus pour les composés phénoliques simples et les flavonoïdes pris dans leur ensemble (Fig. 2). De nombreux auteurs ont mis en évidence d'étroites relations entre l'activité PAL et l'apparition des anthocyanes sous l'influence de divers facteurs [7, 8, 10]. Dans la pêche et dans la fraise, une corrélation entre l'activité et la teneur en anthocyanes a pu être établie [11, 12]. Toutefois, dans le cas de la

cerise, les résultats présentés sur la figure 1 montrent que l'apparition des anthocyanes précède légèrement la remontée de l'activité PAL. Néanmoins, il est possible de penser que l'augmentation de l'activité PAL, au moment où les fruits sont "mûrs", est nécessaire à la biosynthèse finale des anthocyanes, le taux des flavonoïdes étant alors trop faible.

Les variations quantitatives en acide néochlorogénique et en isorhamnétine-3 rutinoside ou même en composés phénoliques simples et en flavonoïdes totaux sont synchrones et étroitement reliées aux variations de l'activité PAL. D'autre part, il nous a été impossible de caractériser une activité TAL. Dès lors, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle la synthèse des principaux polyphénols de la cerise est déterminée par le niveau de l'activité PAL ou tout du moins par celui d'un ensemble enzymatique comprenant la PAL et susceptible d'être régulé comme elle [21-23].

PARTIE EXPERIMENTELLE

Matériel végétal. Les cerises (*Prunus avium* L. var. Bigarreau Napoléon), prélevées régulièrement dans un verger de la région orléanaise, sont pesées avant et après lyophilisation, et conservées sous pression réduite. Le poids moyen d'un fruit est calculé sur la base de 100 fruits. Chaque année la récolte a été faite sur un arbre différent. Lors de chaque extraction, une quantité utile de matériel lyophilisé (peau + pulpe) est réduite en poudre à l'aide d'un broyeur à billes de type Dangoumau.

Extraction et détermination de l'activité enzymatique. L'extraction est réalisée selon la méthode précédemment décrite par Hartmann [24]; quelques modifications ont dû toutefois y être apportées. Du PVP insoluble, préalablement mis à gonfler dans du tampon Tris-H₃BO₃ de pH 8,6, est ajouté au milieu réactionnel, à raison de 1 g pour 1 g de matériel végétal et 10 ml de soln extractive. L'équilibrage et le développement de la colonne de Séphadex sont réalisés dans le tampon Tris-H₃BO₃ 0,1M de pH 8,6. L'extrait protéique ainsi obtenu est directement utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique. Celle-ci est déterminée selon une technique proche de celle de Zucker [6]. L'activité TAL (Tyrosine ammoniaque-lyase) a été recherchée dans des conditions voisines de celles utilisées par Maier *et al.* [9].

Essai de mise en évidence d'un inhibiteur de l'activité PAL. La recherche d'un inhibiteur de l'activité enzymatique pouvant être extrait dans les conditions utilisées, est réalisée. Pour ce faire: un aliquot de l'extrait enzymatique de jeunes fruits (152 mg) est mélangé à un même volume d'un extrait de fruits plus âgés (470 mg). L'activité PAL du mélange est égale à 90 % de la somme des activités des deux extraits; des quantités égales de matériel lyophilisé issu de jeunes fruits (152 mg) et de fruits plus âgés (470 mg) sont extraites simultanément. L'activité PAL de cet extrait est égale à 97 % de la somme des activités des deux extraits.

Extraction des composés phénoliques. L'extraction est réalisée à la température ambiante selon le dispositif décrit par Alibert *et al.* [25] et adapté à notre matériel. 2 g poudre de cerises sont extraits successivement par: -21 MeOH 80%,-1 l. MeOH-EtOAc (1:1),-500 ml H₂O bidistillée. L'épuisement du matériel végétal est toujours constaté par l'absence de réaction de l'extrait au réactif de Smith. L'extrait brut aq. obtenu est dépigmenté 3 fois, vol. à vol., par l'éther de pétrole (PE 35-50°): la phase étherée est éliminée, la phase aqueuse purifiée est conservée et ajustée à 100 ml.

Séparation et dosage des différents composés phénoliques. La séparation et le dosage des différents groupes de composés phénoliques (phénols totaux, composés phénoliques simples, tanins, flavonoïdes) sont réalisés sur la moitié de la phase aq. obtenue, selon la technique de Marigo [26]. Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide chlorogénique

par référence à une gamme étalon effectuée dans les mêmes conditions avec l'acide témoin (FLUCKA). Le reste de la phase aq. est extrait 5 fois avec EtOAc (vol. à vol.) après addition de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, d'acide *m*-phosphorique et d'EtOH selon la méthode mise au point par Macheix [27]. La phase EtOAc ainsi recueillie est concentrée à 5 ml puis chromatographiée en bande sur papier Whatmann no. 3 dans le solvant de Hulme. Les bandes correspondant à l'acide néochlorogénique (ANCG) et à l'isorhamnétine-3 rutinose (IsoRut) (narcissine) sont éluées 8 hr à l'obscurité avec du MeOH 80%. La lecture de A des éluats à 327 et 356 nm permet de déterminer la teneur des différents extraits en ces deux composés. Deux gammes étalons sont réalisées dans les mêmes conditions à l'aide de témoins d'acide chlorogénique et de rutine (FLUCKA). Les résultats sont exprimés en mg de chacun des composés par g de masse de matière sèche (g.m.s). La teneur en anthocyanes des extraits (pH = 2) est déterminée par lecture de A à 520 nm.

REFERENCES

1. Harborne, J. B. (1967) *Comparative Biochemistry of the Flavonoids* (Harborne, J. B. ed.) Academic Press, London.
2. Conn, E. E. (1964) *Biochemistry of Phenolic Compounds* (Harborne, J. B. ed.) p. 399. Academic Press, New York.
3. Koukol, J. et Conn, E. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2692.
4. Young, M. R., Towers, G. H. N. et Neish, A. C. (1965) *Can. J. Botany* **44**, 341.
5. Camm, E. L. et Towers, G. H. N. (1973) *Phytochemistry* **12**, 961.
6. Zucker, M. (1965) *Plant Physiol.* **40**, 779.
7. Scherf, H. et Zenk, M. H. (1967) *Z. Pflanzenphysiol.* **56**, 203.
8. Creasy, L. L. (1968) *Phytochemistry* **7**, 441.
9. Maier, V. P. et Hasegawa, S. (1970) *Phytochemistry* **9**, 139.
10. Aoki, S., Araki, C., Kaneko, K. et Katayama, O. (1970) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **17**, 507.
11. Aoki, S., Araki, C., Kaneko, K. et Katayama, O. (1971) *Agr. Biol. Chem.* **35**, 784.
12. Hyodo, H. (1971) *Plant Cell Physiol.* **12**, 989.
13. Hyodo, H. et Asahara, S. (1973) *Plant Cell Physiol.* **14**, 823.
14. Hartmann, C. (1975) *Colloques Internationaux C.N.R.S. no. 238*. Facteurs et régulation de la maturation des fruits, 235.
15. Okombi, G., Billot, J. et Hartmann, C. (1975) *Physiol. Vég.* **13**, 417.
16. Melin, C. (1976) Thèse Doct. Spécialité, Orléans, 160 p.
17. Bollard, E. G. (1970) *The Biochemistry of Fruits and their Products* (HULME, A. C. ed) vol. 1, p. 387. Academic Press, London.
18. Rudnicki, R., Hammond, R. K. et Bukovac, M. J. (1973) *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **98**, 225.
19. Wolf, J. (1958) *Planta* **51**, 547.
20. Walker, J. R. L. (1963) *N.Z. J. Sci.* **6**, 492.
21. Pacheco, H. (1969) *Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég.* **15**, 3.
22. Creasy, L. L. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2705.
23. Tissut, M. et Chulia, J. (1973) *Compte-rendu de l'Assemblée Générale Annuelle du Groupe Polyphénols*, Bulletin de liaison **4**.
24. Hartmann, C. (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris* **276**, 1851.
25. Alibert, G., Marigo, G. et Boudet, A. (1969) *Physiol. Vég.* **7**, 57.
26. Marigo, G. (1973) *Analisis* **2**, 106.
27. Macheix, J. J. (1974) Thèse Doct. Sci. Nat., Paris VI, 168 p.