

O-METHYLETRANSFERASES ENDOPLASMIQUES DE *POPULUS NIGRA*

YVETTE CHARRIÈRE-LADREIX

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université 1 de Grenoble, Grenoble Cedex, France

(Received 21 mai 1978)

Key Word Index—*Populus nigra*; Salicaceae; flavonoid secretion; methoxylated cinnamic acids; phenylalanine ammonia lyase; *O*-methyltransferases.

Abstract—*O*-Methyltransferases catalysing the methylation of caffeic acid to ferulic acid, isoferulic acid and di-methylcaffeic acid were extracted from the endoplasmic reticulum of *Populus* glandular tissue. The significance of methoxylated cinnamic acids in secreted flavonoid biosynthesis is discussed.

INTRODUCTION

L'excédant lipophile produit par l'épiderme glandulaire des écailles sécrétantes des bourgeons de *Populus nigra* L. [1] renferme, en plus d'une représentation flavonique massive [2] des unités benzoïques [3], des unités cinnamiques [4] et des triglycérides phénoliques [5]. Parmi ces composés, les dérivés *O*-méthylés prédominent. En particulier, une *O*-méthylation intéresse le noyau A des flavonoïdes (aglycones méthoxylés en position 7, 3, ou 7 et 3) ou bien le noyau B (méthylation en position 3', 4', ou 3' et 4') [6]. De même, les représentants cinnamiques méthoxylés sont courants: acides férulique, iso-férulique [4], diméthylcaféïque [7].

Au cours d'un cycle de sécrétion flavonique, les composés flavoniques et cinnamiques méthoxylés ont une localisation intracellulaire différente [8]. Par exemple, en début de maturation glandulaire, les aglycones flavoniques 7-*O*-méthylés ont une localisation intraplastidiale alors que des unités cinnamiques méthoxylées comme l'acide diméthylcaféïque appartiennent au réticulum endoplasmique (RE). Les réactions d'*O*-méthylation dans le tissu glandulaire de *Populus* apparaissent primordiales dans le métabolisme de sécrétion. Une meilleure connaissance des séquences conduisant aux unités C₆-C₃ méthoxylées et de leur localisation intracellulaire affinera, par conséquent, notre connaissance sur l'organisation subcellulaire des voies de biosynthèse des aglycones flavoniques de sécrétion.

De très nombreux travaux rapportent l'interférence des catéchol *O*-méthyletransferases (OMTs; EC 2.1.1.6) dans la formation des phénylpropanoïdes des séries cinnamique et benzoïque d'espèces ligneuses [9-12] ou herbacées [13-18]. Le rôle des OMTs dans la méthoxylation des noyaux B des flavonoïdes a été démontré [19-23].

Nous rapporterons ici l'étude de quelques OMTs localisées dans le compartiment endoplasmique du tissu glandulaire de *Populus nigra* L. Les OMTs séparées d'autres enzymes endoplasmiques (phénylalanine ammonia-lyase, EC 4.3.1.5 et cinnamate 4-hydroxylase, EC 1.14.13.11) s'avèrent capables de réaliser des *O*-méthylation de l'acide caféïque en position *para* ou *méta*, ou bien simultanément en position *para* et *méta*. Ces enzymes qui utilisent la S-adénosyl-méthionine (SAM) comme donneur de groupement méthyle s'avèrent spécifiques

de substrats C₆-C₃. Par référence aux travaux réalisés chez d'autres végétaux, le rôle des OMTs endoplasmiques de *Populus* dans la biosynthèse de métabolites flavoniques et cinnamiques de sécrétion est analysé.

RESULTATS

Mise en évidence d'une activité OMT dans le RE

Une recherche d'activité *O*-méthyletransferase endoplasmique a été réalisée à deux stades de maturation glandulaire. Ces stades sont définis d'après leurs caractéristiques ultrastructurales. En début de maturation glandulaire (stade 1), des associations RE-plastidome se forment. En fin de maturation glandulaire (stade 2), les associations RE-plasmalemme et RE-vacuole prédominent [8].

L'analyse chromatographique et spectrophotométrique des produits réactionnels après séparation sur CCM de silice révèle l'existence des composés suivants: *Stade 1*: ac. *p*-coumarique, ac. férulique, ac. *t*-cinnamique; *Stade 2*: (a) concentration en substrat *saturante*. En plus des produits réactionnels du stade 1, les acides férulique, iso-férulique, diméthylcaféïque et des composés non identifiés X₁-X₄ sont présents. L'acide *p*-coumarique peut se détecter sous les formes *cis* et *trans*; et (b) concentration en substrat *non saturante*. En plus des produits réactionnels du Stade 1, les acides férulique et iso-férulique sont présents. A ces derniers peut se substituer le composé non identifié X₁. Aucune trace d'acide diméthylcaféïque n'est détectable dans ces conditions expérimentales.

Le composé non identifié X₁ a été antérieurement isolé par Wollenweber à partir du sécrétat de *Populus lasiocarpa* et à partir de l'incubat de la 'PAL' endoplasmique de *Populus* [7]. Les caractéristiques chromatographiques (solvent 1) de X₁-X₄ sont respectivement 0.13; 0.47; 0.81; 0.66. Ces produits ont en commun les constantes spectrophotométriques λ_{max} 290, i 320 nm.

L'existence d'au moins 3-*O*-méthyletransférases admettant comme substrat l'acide caféïque exogène est à envisager. Elles assurent la synthèse en présence de SAM des acides iso-férulique, férulique et diméthylcaféïque. Une *O*-méthylation en position *para* ou *méta* et une *O*-méthylation simultanée en position *para* et *méta* s'avèrent possibles. En l'absence d'acide caféïque ou de SAM

aucun produit méthoxylé ne se forme. Par contre, dans ces conditions, la détection des acides *p*-coumarique et *t*-cinnamique confirme l'existence d'une phénylalanine-ammoniac-lyase (PAL) et d'une cinnamate-4 hydroxylase (CA4H). Le taux élevé en L-phénylalanine endogène rend possible la manifestation d'une activité PAL. Les activités enzymatiques détectées PAL, CA4H, OMT sont spatialement regroupées. L'organisation des protéines catalytiques est, en effet, telle que l'acide cinnamique issu de la PAL sert de substrat à la CA4H.

Essai de purification des OMT endoplasmiques

L'extrait brut (=filtrat de Sephadex G-25) est chromatographié sur Sephadex G-200. Le stade de maturation glandulaire choisi pour l'expérimentation est 2. Par tamisage moléculaire, les protéines *I* et *II* de masse moléculaire respective 405000 et 240000 sont élues. La détermination des masses moléculaires est réalisée d'après l'étalonnage de la colonne avec des substances de référence [7]. En présence d'acide caféïque et de SAM, *I* synthétise tous les produits méthoxylés signalés ci-dessus avec une très forte représentation des isomères *cis,trans*. Il n'a pas été possible de déterminer s'il s'agissait d'une mésomérie apparue, *in vitro*, ou bien résultant de l'activité OMT [24]. Dans les même conditions expérimentales *II* n'est pas fonctionnel. Par contre, l'utilisation de L-phénylalanine comme substrat conduit à la détection d'acide cinnamique. Cette caractéristique permet d'identifier *II* à une PAL endoplasmique ce qui est en accord avec les résultats antérieurs [7]. Contrairement aux résultats obtenus chez d'autres végétaux, la technique de chromatographie sur DEAE-Sephadex ne conduit pas à une purification plus poussée.

Affinité des OMTs vis à vis d'effecteurs O-diphénoliques

Après l'étape de filtration moléculaire, la purification des OMTs n'est pas suffisante pour envisager une étude rigoureuse des affinités de chaque OMT (dans l'hypothèse où à chaque type de méthoxylation correspond une enzyme) ou des OMTs présentes à l'exclusion d'autres enzymes 'contaminantes' comme la PAL. vis à vis d'*O*-diphénols. Mentionnons seulement les résultats préliminaires correspondant à l'affinité de *I* pour le catéchol, des aglycones flavoniques hydroxylés en 3' et 4', pour des unités C₆-C₁ (ac protocatéchique, ac. vanillique) et une unité C₆-C₃ (ac. férulique). Les valeurs trouvées sont exprimées en % de l'activité OMT pour l'acide caféïque (= 100 %).

On note (a) une efficacité très grande de *I* pour un *O*-diphénol sans chaîne latérale comme le catéchol (= 180 %); (b) une efficacité nulle pour les C₁₅ (lutéoline, quercétine) et les acides benzoïques testés; et (c) qu'en présence d'acide férulique comme substrat, *I* synthétise de l'acide syringique. L'activité OMT dosée d'après le taux de l'acide syringique présent dans le milieu réactionnel est de l'ordre de 53 à 60 %. Nous reviendrons, par ailleurs, sur le problème que pose la détection de cette unité benzoïque et non pas de l'acide sinapique.

DISCUSSION

Chez *Populus*, l'hypothèse d'une PAL endoplasmique 'associée' à un système enzymatique regroupant plusieurs protéines catalytiques a déjà été avancée [7]. La solubilité de *I* se produit dans des conditions expérimentales qui

rendent aussi possible l'extraction d'une PAL et d'une CA4H. Après filtration sur Sephadex G-200 l'activité OMT de *I* n'est pas dissociable des activités PAL et CA4H. Ces données suggèrent un regroupement spatial et un arrangement des enzymes PAL-CA4H-OMT tel que l'acide cinnamique endogène issu de la PAL peut être utilisé comme substrat par la CA4H. La présence d'une *p*-coumarate hydroxylase endoplasmique s'intercalant dans cette séquence est à exclure. Des polyphénol-oxydases d'origine chloroplastique ont été d'ailleurs impliquées dans cette étape d'hydroxylation [25, 26]. L'association d'une PAL à des cinnamate-hydroxylases et leur liaison avec des structures membranaires microsomaux est démontrée chez *Cucumis* [27].

Ainsi, à l'exception de la *p*-coumarate hydroxylase de localisation indéfinie chez *Populus* les enzymes en jeu appartiendraient au RE. L'acide caféïque s'avère indispensable à la synthèse de l'acide férulique. La formation de cette unité C₆-C₃ selon les modalités définies par McCalla et Neish [28] est donc la première hypothèse à formuler. La synthèse des acides férulique, isoférulique et diméthylcaféïque nécessite l'intervention d'une O-méthylation respectivement en position *méta*, *para* et simultanément en positions *para* et *méta*. Si la *méta* O-méthylation d'*O*-diphénols ou de phénols trihydroxylés est largement distribuée dans le règne végétal [10, 12, 13, 17, 19], celle d'une O-méthylation en position *para* est moins connue [20, 21, 29-31]. Cependant des différences d'efficacité d'*O*-méthylation en *para* ou *méta* ou bien des exemples d'*O*-methylations simultanées en *para* et *méta* sont récemment rapportées [14, 15, 22, 23, 33].

Dans le cas de *Populus*, 3 types d'*O*-méthylation faisant intervenir 1 ou plusieurs enzymes sont possibles. D'autre part, l'existence d'une 5-O-méthylation à partir d'*O*-diphénols méthoxylés est aussi à envisager. L'existence d'activité enzymatique surnuméraire à la synthèse d'acide férulique déjà signalée [24] se trouve ici posée par la formation d'acide syringique. En présence d'acide férulique et de SAM, *I* se montre apte à réaliser une β -oxydation. Sur l'origine métabolique de cet acide benzoïque, 2 modalités sont communément admises [16]: (a) l'une, impliquant l'intervention de l'ac. 5-hydroxy-férulique, fait dériver l'acide syringique de l'acide sinapique par β -oxydation; (b) l'autre met en jeu une voie plus directe à partir de l'acide vanillique. Les résultats préliminaires acquis chez *Populus* ne permettent pas d'opter, mais dans les deux cas, une 5-O-méthylation s'avère indispensable. Renforçant cette hypothèse d'*O*-méthylation plus poussée se situe la détection d'acide triméthylcaféïque dans le sécrétat libre de *Populus*. Enfin, les OMTs de *Populus* apparaissent spécifiques des substrats cinnamiques. Cette caractéristique les distingue de OMTs de *Petroselinum hortense* [19] ou de *Nicotiana* [14]. Par contre, cette observation va dans le sens des données de Poulton [22] qui a montré l'existence de 2 OMTs l'une spécifique des flavonoïdes, l'autre des unités C₆-C₃.

Le compartiment endoplasmique de *Populus* est le site de synthèse d'unités C₆-C₃ méthoxylées. Quel est le devenir de ces composés? Dans quelle mesure un rôle de précurseurs flavoniques peut leur être attribué?

La perméabilité du plastidome à ces substances est connue [8]. L'intervention d'unités fonctionnelles 'chromoplaste-RE' dans la synthèse flavonique a été retenue [8]. Ces données jointes à celles obtenues chez *Petunia*

[34] dont les chloroplastes isolés sont aptes à synthétiser la naringénine en présence d'un apport exogène d'unités cinnamiques activées argumentent en faveur d'un *pool endoplasmique* alimentant le plastidome en unités méthoxylées. Si l'on admet que la méthoxylation sur B des aglycones s'opère au stade cinnamique [21, 35] cette hypothèse s'avère vraisemblable pour les aglycones de sécrétion: rhamnazine, 3'OCH₃-quercétol, 3,3'-OCH₃-quercétol, isorhamnétine... Cependant compte tenu de la distribution, *in situ*, de ces aglycones, l'hypothèse d'un *pool flavonique endoplasmique* est à formuler. Certains aglycones dérivés de l'acide férulique (isorhamnétine) sont spécifiques du RE.

Si l'on exclut une éventuelle déméthoxylation des précurseurs cinnamiques [36], une autre modalité de synthèse flavonique est à formuler pour les aglycones hydroxylés ou non sur B. Pour ces derniers, un *pool flavonique plastidial* interviendrait indépendamment. L'existence de plusieurs pools flavoniques de localisation intracellulaire différente renforcerait la notion de compartimentation métabolique avancée antérieurement et qui repose chez *Populus* sur la présence d'unités fonctionnelles temporaires telles que 'chromoplaste-RE'.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal—isolement du RE. Toutes les opérations d'isolement d'organites ou d'extraction enzymatique sont réalisées à 4°. Aux différents stades de maturation glandulaire des bourgeons de *Populus* (définis d'après des données de microscopie électronique [1]) un fractionnement cellulaire est réalisé à partir de l'épiderme sécréteur des écailles. Le protocole d'obtention du RE et le contrôle de l'intégrité des organites isolés ont été décrits par ailleurs [8]. Rappelons ici que la recherche d'activité enzymatique OMT porte sur des tubules endoplasmiques rugueux séparés de globules lipophiles qui leur sont associés. Le contrôle morphologique des fractions isolées est réalisé en microscopie électronique. Le contrôle biochimique de l'intégrité du RE repose sur les recherches d'une activité NADPH-cytochrome *c* oxydoréductase.

Extraction de la O-méthyletransferase. La fraction RE isolée est broyée au mortier dans un tampon tris saccharose 0.01 M de pH 7.5 renfermant du β -mercaptoéthanol (10 mM) et du charbon actif (10 mg/100 ml tampon). L'homogénat est filtré puis centrifugé (14000 rpm pendant 30 min). Après addition de EDTA (5 mM) dans le surnageant, une précipitation protéique est réalisée au sulfate d'ammonium 60 %. Le surnageant est ensuite enrichi en sulfate d'ammonium 80 %. Le culot protéique dessalé par filtration sur gel de Sephadex G-25 est concentré à l'aide d'un bêcher à dialyse.

Purification de la O-méthyletransferase. Le filtrat G-25 est l'objet d'une filtration sur gel de Sephadex G-200. L'élution par le tampon tris 0.01 M de pH 7.5 est réalisée dans les conditions expérimentales antérieurement décrite [7].

Essai enzymatique. La réaction enzymatique s'effectue au 37° pendant 1 hr. L'incubat renferme:—0.5 ml de solution enzymatique tamponnée, —50 μ l d'acide caféïque 2.5 mM (ou autres substrats); —50 μ l de *S*-adénosylméthionine non marquée (Sigma) 500 μ M. Le tampon est une solution phosphate 0.1 M de pH 7.5 renfermant 0.1 M de MgCl₂. La réaction est arrêtée par apport de HCl 5N. Les produits réactionnels sont extraits par Et₂O. Après séparation des phases étherées le résidu est repris dans du McOH.

Identification des produits réactionnels. L'identification des produits réactionnels a été effectuée par analyse spectrophotométrique après séparation sur CM de silice Merck 60F 254 (Solvant 1) ou de polyamide, Macherey-Nagel (Solvant 2) et par comparaison avec des échantillons de référence commerciaux ou fournis par E. Wollenweber, Heidelberg. Solvant 1: C₆H₆-AcOH, 90:8 v/v; Solvant 2: C₆H₆-pétrole-MeOH-MeCOEt, 30:60:8:8 v/v.

BIBLIOGRAPHIE

1. Charrière-Ladreix, Y. (1973) *J. Micros. (Paris)* **17**, 299.
2. Wollenweber, E. (1975) *Biochem. Sys. Ecol.* **3**, 35.
3. Goris, A. et Canal, H. (1936) *Bull. Soc. Chim.* 1982.
4. Klimczak, M., Kahl, W. et Grodzinka, Z. (1972) *Diss. Pharm.* **24**, 181.
5. Asakawa, Y., Takemoto, T. Wollenweber, E. et Aratani, T. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1791.
6. Wollenweber, E. (1971) *Phytochemistry* **10**, 225.
7. Charrière-Ladreix, Y. (1978) *Physiol. Vég. (sous presse)*.
8. Charrière-Ladreix, Y. (1977) *Physiol. Vég.* **15**, 619.
9. Alibert, G. (1975) Thèse Doct. Sci., Toulouse.
10. Shimada, M., Ohashi, H. et Higuchi, T. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2463.
11. Shimada, M., Fushiki, H. et Higuchi, T. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2657.
12. Shimada, M., Fushiki, H. et Higuchi, T. (1972) *Mokuzai Gakkaishi* **18**, 43.
13. Finkle, B. J. et Masri, M. S. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **85**, 167.
14. Legrand, M., Fritig, D. et Hirth, L. (1976) *FEBS Letters* **70**, 131.
15. Poulton, J., Hahlbrock, K. et Grisebach, H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **176**, 449.
16. El-Basyouni, S., Chen, D., Ibrahim, R. K., Neish, A. C. et Towers, G. H. N. (1964) *Phytochemistry* **3**, 485.
17. Poulton, J. E. et Butt, V. S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **403**, 301.
18. Maule, A. J. et Ride, J. P. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1661.
19. Ebel, J., Hahlbrock, K. et Grisebach, H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **269**, 313.
20. Ebel, J., Achenbach, H. V., Barz, W. et Grisebach, H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **215**, 203.
21. Ebel, J., Barz, W. et Grisebach, H. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1529.
22. Poulton, J., Grisebach, H., Ebel, J., Schallaer-Hekeler, B. et Hahlbrock, K. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **173**, 301.
23. Hess, D. (1968) *Biochemische Genetik*. Springer, Berlin.
24. Hartley, R. D. et Jones, E. C. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1157.
25. Sato, M. (1966) *Phytochemistry* **5**, 385.
26. Bartleh, D. J., Poulton, J. E. et Butt, V. S. (1972) *FEBS Letters* **23**, 265.
27. Czichi, U. et Kindl, H. (1977) *Planta* **134**, 133.
28. McCalla, D. R. et Neish, A. C. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 537.
29. Mann, J. D., Fales, H. M. et Mudd, S. H. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3820.
30. Basmadjian, G. P. et Paul, A. G. (1971) *Lloydia* **34**, 91.
31. Kaneko, K. (1962) *Chem. Pharm. Bull.* **10**, 1085.
32. Finkle, B. J. et Kelly, S. H. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1719.
33. Müller-Enoch, D., Thomas, H., Streng, H., Wildfevern, W. et Kaferkam, P. O. (1976) *Z. Naturforsch.* **31**, 509.
34. Ranjeva, R., Alibert, G. et Boudet, A. M. (1977) *Plant. Sci. Letters* **10**, 235.
35. Hess, D. (1964) *Planta* **60**, 568.
36. Barz, W. et Grisebach, H. (1967) *Z. Naturforsch.* **22**, 627.