

DÉRIVÉS GLUCOSÉS DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES DE LA TOMATE: ÉVOLUTION AU COURS DE LA VIE DU FRUIT ET FORMATION *IN VITRO**

ANNIE FLEURIET et JEAN-JACQUES MACHEIX

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 34060 Montpellier Cedex, France

(Révisé reçu le 25 janvier 1980)

Key Word Index—*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*; Solanaceae; cherry tomato; growth and maturation; glucosides and esters of hydroxycinnamic acids; glucosyltransferases.

Abstract—Glucose derivatives of hydroxycinnamic acids have been identified in tomato fruits either as esters or glucosides, the latter always being the most abundant and increasing during growth and at the time of ripening. These compounds can be synthesized *in vitro* by a fruit glucosyltransferase from free hydroxycinnamic acids and UDPG; glucosides are always formed in higher amounts than esters.

INTRODUCTION

La présence de nombreux dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques a été signalée chez les végétaux supérieurs [1] et plus particulièrement dans divers fruits [2,3] dont la tomate [4]. L'UDPG est fréquemment impliqué dans la formation des liaisons hétérosidiques établies entre un groupement phénolique et une fonction alcool du sucre: ainsi sont formés de nombreux hétérosides de phénols simples [5–7], de l'acide *o*-hydroxycinnamique [8], de flavonols [9, 10], des anthocyanes [11, 12] et de précurseurs de la lignine [13, 14]. Par ailleurs, dans le cas des acides hydroxycinnamiques, un deuxième type de liaison peut s'établir entre le sucre et la molécule phénolique: il s'agit de l'estérification du groupement carboxylique de l'acide; les esters ainsi formés sont fréquemment signalés dans les fruits [2,4] et, là encore, l'UDPG intervient dans leur biosynthèse [15, 16]. Ces esters peuvent être considérés comme des intermédiaires métaboliques actifs [17, 18] dont on a récemment mis en évidence le turn-over rapide [19].

La nature enzymatique de la formation des esters à partir des acides hydroxycinnamiques libres et de l'UDPG, ainsi que la détermination de plusieurs caractéristiques de la réaction ont déjà été précisées chez la pomme [16]. Le travail présenté ici concerne le fruit de la tomate (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*) et rapporte d'une part, l'évolution des principaux dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques (esters et glucosides†) au cours de la croissance et de la maturation du fruit et, d'autre part, la possibilité de former ces composés *in vitro*.

RÉSULTATS

Evolution des dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques au cours de la croissance et de la maturation

Les dérivés glucosés des acides *p*-coumarique et férulique sont présents dans les fruits de tomate à la fois sous les formes esters et glucosides. Jusqu'à présent, seuls le *p*-coumaroylglucose (P_1) et le feruloylglucose (F_1) avaient été complètement identifiés dans ces fruits; la présence possible de caféoylglucose, signalée dans les fruits mûrs [4] n'a pu encore être confirmée; par contre le glucoside de l'acide caféique (C_2) est présent, comme ceux des acides *p*-coumarique (P_2) et férulique (F_2) à tous les stades de la vie du fruit. L'évolution de chacun des composés a été suivie au cours de la croissance et de la maturation (Fig. 1). Les glucosides sont à tous moments de la vie du fruit beaucoup plus abondants que les esters: par exemple, la teneur globale d'un fruit ayant 14 mm de diamètre est d'environ 224 nmol de glucosides et seulement 4,5 nmol d'esters. Les stades de fin de croissance et de début de maturation (16 mm et rose) sont caractérisés par une teneur maximale en P_2 et C_2 , teneur qui diminue cependant dans les stades ultimes de la maturation; au contraire, dans le même temps, les teneurs en esters et en F_2 diminuent régulièrement. L'évolution de F_2 est très différente de celle des deux autres glucosides ce qui peut suggérer une utilisation différente de ces divers dérivés glucosés.

Nature des dérivés glucosés formés in vitro

Par chromatographie dans le solvant ABAE, on sépare deux composés formés à partir des acides *p*-coumarique (P_1 et P_2) et férulique (F_1 et F_2) mais un seul dérivant de l'acide caféique (C_2). Quelques caractéristiques de ces cinq composés sont rapportées dans le Tableau 1; la cochromatographie a permis d'identifier P_1 et F_1 respectivement au *p*-coumaroylglucose et au feruloyl-

* Partie I de la série "Métabolisme des Dérivés Hydroxycinnamiques chez la Tomate 'Cerise'".

† On appellera ici glucosides les dérivés impliquant une liaison entre le glucose et une fonction phénolique.

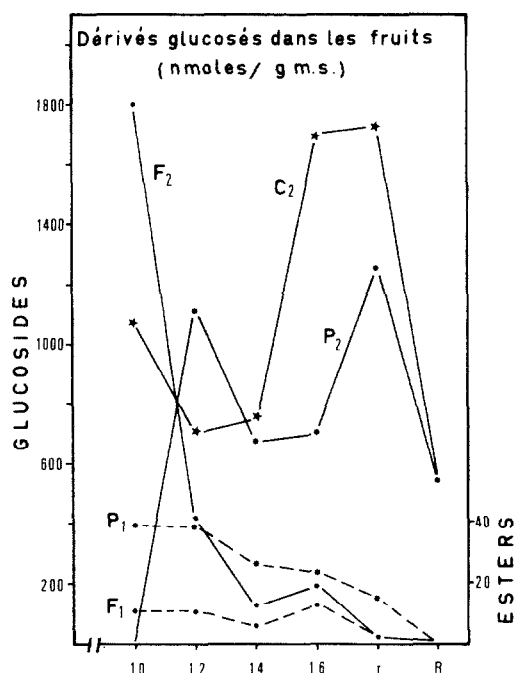


Fig. 1. Evolution des dérivés glucosés des acides *p*-coumarique (P), férulique (F) et caféique (C), au cours de la croissance et de la maturation des fruits. 10, 12, 14 et 16: stades de croissance (diamètre du fruit en mm); r et R: stades de maturation rose et rouge. P₁ et F₁: esters; P₂, F₂ et C₂: glucosides.

glucose; par contre, il ne se forme pas de cafeoylglucose dans nos conditions expérimentales.

De l'évolution des maximums d'absorption des dérivés glucosés en milieu acide, neutre et basique (Tableau 1) il découle que: P₁ et F₁ ont une fonction phénolique libre et pas de fonction carboxylique libre; P₂ et F₂ ont par contre une fonction carboxylique libre alors que la fonction phénolique est masquée; et C₂ a une fonction carboxylique et une fonction phénolique libres ce qui explique son comportement identique à celui d'un monophénol au réactif de Benedikt.

Par ailleurs les indications précédentes sont confirmées et complétées par le résultat des hydrolyses (Tableau 1): P₁

et F₁, hydrolysés aussi bien par la soude que par la β -glucosidase sont respectivement les esters glucosés des acides *p*-coumarique et férulique; et P₂, F₂ et C₂, hydrolysés seulement par la β -glucosidase, sont les glucosides des acides *p*-coumarique, férulique et caféique; dans ce dernier cas, rien ne permet de préciser dans nos expériences quel est celui des deux groupements phénoliques qui est impliqué. De même, nous n'avons aucune indication sur la position de la fonction alcoolique du glucose qui intervient dans les liaisons: cependant, comme cela a été montré par divers auteurs, il est vraisemblable que ce soit la position 1.

Caractéristiques de la formation *in vitro* des dérivés glucosés

Trois aspects de la réaction ont été étudiés. Le rendement reste toujours très faible ainsi que cela avait déjà été signalé dans la pomme [16] mais il varie avec le substrat phénolique et la nature des produits formés (Tableau 2); ainsi, il est nettement plus important pour l'acide *p*-coumarique que pour l'acide férulique et l'incorporation des acides libres dans les glucosides est nettement plus importante que dans les esters.

Cinétique en fonction du temps: la formation au cours du temps de réaction du *p*-coumaroylglucose est comparable à celle de feruloylglucose déjà étudiée [16] dans le cas de la pomme: le maximum est atteint au bout de 3 hr; par contre le glucoside correspondant continue à s'accumuler régulièrement pendant un temps beaucoup plus long. Trois facteurs susceptibles de limiter la vitesse de réaction ont été envisagés: l'inactivation de la glucosyltransférase (GT) au cours de l'incubation peut être écartée. En effet, si un extrait est conservé 3 hr à 30° sans UDPG mais en présence des autres produits réactionnels (pre-incubation) on constate seulement une faible baisse d'activité (de l'ordre de 25-30%) qui ne peut être responsable de l'arrêt complet de l'accumulation de P₁ ou F₁ après 3 hr, tel qu'il est observé habituellement. La dégradation de l'UDPG par les extraits enzymatiques végétaux est fréquemment rapportée [6]: elle se produit sous l'action d'une uridine diphosphatase dont l'activité maximale est obtenue chez le pois dans des conditions expérimentales très proches de celles déterminées pour les GT [20]. Il en est de même pour un extrait enzymatique de tomate maintenu en préincubation pendant 3 hr en présence d'UDPG: l'accumulation des esters et des

Tableau 1. Caractéristiques des esters et des glucosides formés *in vitro*

Composés formés <i>in vitro</i>	UV		Hydrolyse		EtOH 80° λ_{\max}	Absorption en UV	
	-NH ₃	+NH ₃	NaOH (2 N)	β glucosidase		+NaOH $\Delta\lambda_{\max}$	+HCl $\Delta\lambda_{\max}$
P ₁	SnF	B	+	+	320	+44	0
P ₂	SnF	SnF	-	+	275	0	+21
F ₁	B	vB	+	+	328	+54	0
F ₂	V	V	-	+	260	0	+50
C ₂	V	J	-	+	278	+12	+16

SnF, Sombre non fluorescent; B, bleu; vB, vert bleu; V, violet; J, jaune.

Identification des produits formés: P₁ et P₂: ester et glucoside de l'acide *p*-coumarique; F₁ et F₂: ester et glucoside de l'acide férulique; C₂: glucoside de l'acide caféique.

Tableau 2. Activité glucosyltransférase: rendement de la réaction; importance relative des esters et des glucosides

Composés formés	Rendement de la réaction (en %)	Rapport des deux types de dérivés formés glucosides esters
P ₁	0,12	11
P ₂	1,3	
F ₁	0,04	17,5
F ₂	0,70	

Abréviations: voir Tableau 1.

glucosides est réduite d'environ 70 % au cours de l'incubation classique. La dégradation, par les enzymes mêmes de la tomate, des dérivés glucosés formés intervient également pour limiter l'accumulation des dérivés sucrés; ainsi en 3 hr à 30°, on libère 8 % de l'acide *p*-coumarique initialement apporté sous forme de *p*-coumaroylglucose et de glucoside. Tous ces facteurs limitent à la fois l'accumulation des esters et des glucosides mais pour ces derniers cette action est grandement compensée par une vitesse de formation plus importante.

Rôle du pH: l'accumulation optimale des dérivés glucosés est obtenue pour des pH variant de 6–7 pour les esters et de 6,5–8,5 pour les glucosides, indépendamment de la nature du substrat phénolique.

DISCUSSION

La présence simultanée d'esters et de glucosides des acides hydroxycinnamiques dans la tomate 'cerise' est un fait intéressant qui n'a été jusqu'à maintenant rapporté que dans un nombre très restreint de fruits dont les baies de pomme de terre [1] et les aïrelles [21]. En effet, la liaison des acides hydroxycinnamiques avec les sucres se fait plutôt par l'intermédiaire de la fonction carboxylique que par celui du groupement phénol [22] et on ne signale en général dans les fruits que les esters avec les acides quinique ou shikimique [23], certaines amines [24] ou les sucres [2, 25]. Contrairement au cas de la pomme où les seuls dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques sont P₁ et F₁ [3], ceux-ci sont en très faible quantité dans la tomate alors que les glucosides sont toujours beaucoup plus abondants, quelque soit le stade de croissance et de maturation. Les glucosides sont d'ailleurs formés *in vitro* beaucoup plus intensément que les esters par les extraits enzymatiques de tomates.

Alors que les variations, au cours de la vie de la tomate, de l'acide chlorogénique [4] ou des acides hydroxycinnamiques libérés par hydrolyse [26, 27] ont déjà été signalées, aucune donnée n'existe, à notre connaissance, concernant les esters glucosés. L'évolution obtenue pour P₁ et F₁ rappelle celle déjà rapportée pour P₁ dans la pomme [28]: les esters présentent un maximum dans les jeunes fruits et diminuent ensuite au cours de la croissance. Par contre, pour P₂ et C₂, l'évolution est très différente et a pour conséquence une augmentation continue, au cours de la vie du fruit, du rapport des teneurs des glucosides aux

esters glucosés; la fin de la croissance et le début de la maturation du fruit sont donc caractérisés par une accumulation particulièrement importante des deux glucosides. La signification physiologique de ces variations reste actuellement inconnue mais est vraisemblablement de grande importance, compte-tenu des propriétés chimiques différentes des esters et des glucosides. Le cas de F₂ semble par contre devoir être dissocié de celui des autres glucosides: en effet, ce composé méthylé, précurseur classique des lignines [29] ne s'accumule pas et il est possible qu'il participe à la formation des téguments des nombreuses graines du fruit.

La possibilité de former *in vitro*, à partir de l'UDPG, les esters et les glucosides d'un même acide hydroxycinnamique met l'accent sur l'importance que doivent avoir les GT dans l'accumulation de ces composés au cours de la croissance et de la maturation du fruit. Cette étude, en cours d'investigation, devrait permettre de montrer s'il s'agit de la même enzyme ou de deux enzymes distinctes qui sont impliquées dans la formation des esters et des glucosides et si leur affinité est la même vis-à-vis des divers acides hydroxycinnamiques.

Enfin, il existe dans les fruits de tomate, à côté des dérivés glucosés, des esters quiniques qui sont quantitativement très importants, particulièrement l'acide chlorogénique [4]. La présence simultanée dans le même organe de plusieurs dérivés d'un même acide hydroxycinnamique à des concentrations différentes pose le problème de la régulation de l'accumulation de ces substances, en particulier par l'intermédiaire des variations d'activité des GT et des CoA ligases au cours de la vie du fruit. Nous rapporterons dans la deuxième partie de cette étude les principaux résultats concernant la comparaison quantitative des dérivés glucosés et quiniques de la tomate.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel. Les fruits de tomate (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*) sont récoltés à différents stades physiologiques précédemment définis [4] selon deux critères (couleur et diamètre), lyophilisés, puis broyés en présence d'azote liquide. La poudre obtenue est utilisée pour analyser les composés phénoliques des fruits et préparer les extraits enzymatiques.

Analyse et dosage des dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques des fruits. L'extraction et la séparation de la plupart des composés phénoliques présents dans la tomate et en particulier des esters glucosés des acides hydroxycinnamiques, ont déjà été décrits [4]. Les glucosides sont séparés par chromatographie descendante sur papier Whatman No. 3, dans le solvant ABAE (acétate de butyle 4, HOAc 1, H₂O 5; phase supérieure) pendant 48 hr. Après repérage en lumière UV, les dérivés glucosés sont élues par EtOH 80 % et dosés par spectrophotométrie à leur maximum d'absorption, les coefficients d'extinction utilisés étant ceux des acides hydroxycinnamiques libres. Les résultats sont exprimés en nmol par g de matière sèche.

Préparation des extraits enzymatiques. Elle se fait à partir d'un gramme de poudre selon les techniques déjà décrites [30]. Après élution sur Séphadex G25 dans le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,5, l'extrait protéique est concentré 4 × par ultrafiltration sur membrane Amicon (PM 10) à 4°.

Mesure des activités enzymatiques. (a) Le milieu réactionnel est celui utilisé par Macheix [16]: 2 ml du pool protéique concentré contenant 25 µl de mercaptoéthanol (10 %), 10 µl de MnCl₂ (10⁻² M), 50 µl d'acides *p*-coumarique, férulique, caféique, ou sinapique (0,1 M) et 20 µl d'UDPG (5 µM); sauf indications contraires, l'incubation est poursuivie pendant 3 hr à 30°, à pH 7,5.

(b) Les dérivés formés sont extraits par l'acétate d'éthyle selon les modalités déjà décrites [16]; après concentration, ils sont séparés par chromatographie dans le solvant ABAE, puis élués et dosés comme il a été dit ci-dessus pour les dérivés naturellement présents dans les fruits.

Identification des dérivés glucosés. Elle est basée sur trois types de résultats: (a) Cochromatographie, dans divers systèmes de solvants [4] avec des produits de référence isolés à partir de végétaux où ils ont été préalablement identifiés [1, 4, 31]; dans le cas des esters glucosés nous avons pu comparer les produits isolés avec ceux obtenus par synthèse chimique. Le réactif de Benedikt [32] permet de distinguer les monophénols des *o*-diphénols; (b) Analyses spectrophotométriques en UV: elles utilisent en particulier les déplacements des maximums d'absorptions observés sous l'action du pH, en fonction de l'état d'ionisation des fonctions carboxyliques ou phénoliques des molécules [33, 34]; (c) Hydrolyses sous l'action d'une base ou de la β -glucosidase selon des techniques classiques.

Les coefficients de variations sont respectivement de 8% pour les dosages des composés phénoliques des fruits et de 18% pour ceux formés *in vitro*.

Calcul du rendement de la réaction. Pour ce calcul, afin d'éliminer la possibilité d'une différence de coefficient d'absorption entre l'ester et le glucoside, chacun des dérivés est hydrolysé enzymatiquement et c'est l'acide libéré qui est dosé; le résultat ainsi obtenu est exprimé en % de la quantité du substrat phénolique fourni.

RÉFÉRENCES

1. Harborne, J. B. et Corner, J. J. (1961) *Biochem. J.* **81**, 242.
2. Macheix, J. J. (1971) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **272**, 1097.
3. Macheix, J. J., Rateau, J., Fleuriet, A. et Bureau, D. (1977) *Fruits* **32**, 397.
4. Fleuriet, A. (1976) *Fruits* **31**, 117.
5. Tabone, D. (1955) *C.R. Acad. Sci.* **241**, 1521.
6. Jacobelli, G., Tabone, M. J. et Tabone, D. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 955.
7. Yamaha, T. et Cardini, C. E. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 127.
8. Kleinhofs, A., Haskins, F. A. et Gorz, J. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1313.
9. Barber, G. A. et Chang, M. T. Y. (1968) *Phytochemistry* **7**, 35.
10. Hahlbrock, K. et Grisebach, H. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. et Mabry, H., eds.) p. 866. Chapman & Hall, London.
11. Saleh, N. A. M., Fritsch, H., Witkop, P. et Grisebach, H. (1976) *Planta (Berlin)* **133**, 41.
12. Saleh, N. A. M., Poulton, J. E. et Grisebach, H. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1865.
13. Ibrahim, R. K. et Grisebach, H. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **176**, 700.
14. Ibrahim, R. K. (1977) *Z. Pflanzenphysiol.* **85**, 253.
15. Corner, J. J. et Swain, T. (1965) *Nature* **207**, 634.
16. Macheix, J. J. (1977) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **284**, 33.
17. Runeckles, V. C. et Woolrich, K. (1963) *Phytochemistry* **2**, 1.
18. Kojima, M. et Uritani, I. (1972) *Plant Cell Physiol.* **13**, 1075.
19. Molderez, M., Nagels, L. et Parmentier, F. (1978) *Phytochemistry* **17**, 1747.
20. Staver, M. J., Glick, K. et Baisted, D. J. (1978) *Biochem. J.* **169**, 297.
21. Chu, N. T., Clydesdale, F. M. et Francis, F. J. (1973) *J. Food Sci.* **38**, 1038.
22. Harborne, J. B. (1979) in *Biochemistry of Plant Phenolics* (Swain, T., Harborne, J. B. et Van Sumere, C. F., eds.) p. 457. Plenum Press, New York.
23. Van Buren, J. (1970) in *The Biochemistry of Fruits and their Products* (Hulme, A. C., ed) p. 269. Academic Press, London.
24. Wheaton, T. A. et Stewart, I. (1965) *Nature* **206**, 620.
25. Ong, B. Y. et Nagel, C. W. (1978) *J. Chromatogr.* **157**, 345.
26. Walker, J. R. L. (1962) *J. Sci. Food Agric.* **13**, 363.
27. Wardale, D. A. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1523.
28. Macheix, J. J. (1974) *Physiol. Vég.* **12**, 25.
29. Sarkanen, K. V. (1971) in *Lignins* (Sarkanen, K. V. et Ludwig, C. H., eds.) p. 95. Wiley-Interscience, New York.
30. Fleuriet, A. et Macheix, J. J. (1977) *Physiol. Vég.* **15**, 239.
31. Macheix, J. J. (1974) Thèse Doct., Univ. Paris VI. No. C.N.R.S.: A.O.10703.
32. Reznik, H. et Egger, K. (1961) *Z. Analyt. Chem.* **183**, 196.
33. Jurd, L. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* **66**, 284.
34. Sutherland, G. K. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 412.