

SITES DE BIOSYNTHÈSE DES COUMARINES CHEZ *PRUNUS MAHALEB*

ÉTUDE PAR GREFFAGE ET ADMINISTRATION D'UN PRÉCURSEUR MARQUÉ

J. FAVRE-BONVIN, M. MASSIAS, C. MENTZER* et
J. MASSICOT

Laboratoire de Phytochimie associé au C.N.R.S., Muséum National d'Histoire Naturelle,
63, rue Buffon, Paris V

(Received 23 February 1968)

Résumé—Après administration de DL-phénylalanine ^{14}C -3 à un plant de *Prunus mahaleb*, on compare l'activité spécifique de la coumarine et de l'herniarine dans les différentes parties de la plante et on en conclut à l'existence de plusieurs sites de synthèse: les feuilles, les fruits, le bois des racines pour les deux coumarines, ainsi que le bois des tiges pour l'herniarine. Quand *P. mahaleb* est greffé sur *P. avium*, le bois de *P. mahaleb* ne semble plus capable de synthétiser les coumarines ce qui peut être interprété soit par l'intervention des différentes parties de la plante dans la transformation de la phénylalanine, soit par la modification des potentialités enzymatiques des cellules vivantes du bois à la suite du greffage.

Abstract—After feeding DL-phenylalanine 3- ^{14}C to *Prunus mahaleb*, the specific activities of coumarin and herniarin in the different parts of the plant were compared. The results show the existence of several sites of biosynthesis: (1) The leaves, the fruits and the wood of roots for both coumarins and (2) the wood of stems for herniarin. When *P. mahaleb* is grafted on *P. avium*, the wood of *P. mahaleb* is no longer able to synthesize the coumarins. A possible interpretation is the intervention of the different parts of the plant in the transformation of phenylalanine; another alternative would be a change in the enzymatic capabilities of the living sapwood cells as a result of grafting.

INTRODUCTION

DANS une précédente publication,¹ trois d'entre nous ont montré que, en greffant des bourgeons ou de jeunes rameaux de *Prunus mahaleb*, espèce qui renferme normalement des coumarines, sur *P. avium*, qui n'en élabore pas, on obtient des plants dont la composition chimique est semblable à celle des plants de *P. mahaleb* non greffé. Par contre, le greffage de *P. avium* sur *P. mahaleb* aboutit à des plants qui sont privés de coumarines.

Ces résultats semblaient donc indiquer que les racines de *P. mahaleb* n'étaient pas capables de synthétiser les coumarines, alors que la partie aérienne pouvait faire à elle seule cette synthèse. De telles données sont en accord avec celles de Gorz et Haskins² qui ont greffé des variétés à coumarines sur des variétés sans coumarines de *Melilotus alba*. D'autres auteurs, utilisant $^{14}\text{CO}_2$ ³ ou des précurseurs en C₆-C₃,^{4,5} sont parvenus à la même conclusion de la non-nécessité des racines dans la biogénèse des coumarines. Par contre, les tissus de racines de *M. officinalis*⁶ et de *Atropa belladonna*⁷ sont susceptibles de synthétiser des coumarines en

* Nous tenons à rendre hommage à la mémoire du Professeur MENTZER qui a été l'instigateur de ce travail.
¹ J. FAVRE-BONVIN, M. MASSIAS et C. MENTZER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **48**, 1359 (1966).

² H. J. GORZ et F. A. HASKINS, *Crop. Sci.* **2**, 255 (1962).

³ K. BLAIM, *Naturwissenschaften* **47**, 206 (1960).

⁴ S. A. BROWN, *Phytochem.* **2**, 137 (1963).

⁵ H. REZNIK et R. URBAN, *Naturwissenschaften* **44**, 13 (1957).

⁶ F. WEYGAND et H. WENDT, *Z. Naturforsch.* **14b**, 421 (1959).

⁷ K. MOTHES et H. KALA, *Naturwissenschaften* **42**, 159 (1955).

portant de divers précurseurs. Enfin, en greffant des rameaux de *M. alba* sur *Trigonella foenum-graecum*, Reppel et Wagenbreth⁸ n'ont trouvé que de faibles quantités de coumarine dans les greffons. Ils en ont conclu que les racines élaborent probablement un précurseur susceptible d'être transporté par le courant de sève ascendante dans les tiges et les feuilles, où il contribue d'une façon non encore élucidée à la synthèse de la molécule hétérocyclique.

Le schéma de la biogénèse des coumarines a été étudié par différents auteurs et en particulier par Brown^{4, 9} chez *Lavandula officinalis*: on sait que la synthèse suit une voie différente à partir de l'acide cinnamique qui peut être hydroxylé en *ortho* pour donner la coumarine ou en *para* pour être transformé en herniarine (méthoxy-7 coumarine). Nous avons repris le problème du lieu de synthèse des coumarines chez *P. mahaleb* en utilisant un précurseur marqué commun aux deux coumarines, la DL- phénylalanine¹⁴C-3, qui a été administrée respectivement à un *P. mahaleb* non greffé et à un *P. mahaleb* greffé sur *P. avium*. La détermination de la radioactivité spécifique de la coumarine et de l'herniarine des différentes parties de la plante permettait en particulier des comparaisons beaucoup plus précises que les mesures pondérales qui ne sont toujours que semi-quantitatives. Le cas présent était d'autant plus intéressant à étudier que les essais antérieurs avaient montré que les coumarines ne sont métabolisées que très lentement dans la plante.

RESULTATS ET DISCUSSION

*Herniarine**

D'après la Fig. 1 on constate que l'herniarine, dans les 2 cas, a une activité spécifique qui diminue progressivement quand on passe des feuilles aux écorces des tiges et écorces des racines. Cet enchaînement peut s'expliquer par le fait que l'herniarine est synthétisée dans les feuilles (et éventuellement dans les fruits) puis transportée dans le reste de la plante avec la sève élaborée. Le transfert étant très lent, ainsi que l'ont montré les expériences de greffage,¹ l'activité est d'autant plus faible qu'on s'éloigne davantage du lieu de synthèse.

Le fait que l'écorce des racines de *Prunus mahaleb* ne synthétise pas l'herniarine est également montré par la comparaison des activités spécifiques dans le cas du plant greffé et du plant non greffé qui subissent une décroissance du même ordre de grandeur quand on passe de l'écorce des tiges à l'écorce des racines. En effet, dans le cas du plant greffé, les racines sont incapables de synthétiser l'herniarine puisque ce sont des racines de *P. avium* et l'on est certain que la radioactivité de l'herniarine est due uniquement au transport de cette substance à partir du reste de la plante.

Quand on passe de l'écorce des racines au bois des racines et au bois des tiges, la radioactivité continue à décroître pour le plant greffé du fait de la dilution progressive de l'herniarine. Mais on note une augmentation de cette radioactivité, au niveau du bois des racines et surtout du bois des tiges dans le cas du *P. mahaleb* non greffé.

Ces résultats ne peuvent s'expliquer qu'en admettant que le bois des racines et des tiges de *P. mahaleb* constitue un autre site de biosynthèse de l'herniarine. Le bois des tiges ne semble pas capable à lui seul de transformer la phénylalanine en herniarine puisqu'on ne trouve qu'une activité spécifique assez faible dans cette partie de la plante après greffage sur

* Selon certains auteurs⁹ les coumarines seraient présentes dans les plantes principalement sous forme d'*O*-glucosides des acides hydroxy-cinnamiques qui seraient transformés au moment de l'extraction. Cette possibilité n'a pas été montrée dans le cas de *P. mahaleb* et même si cela était le cas, nos conclusions n'en seraient pas modifiées.

⁸ L. REPPEL et D. WAGENBRETH, *Flora* 146, 212 (1958).

⁹ S. A. BROWN, *Can. J. Biochem.* 43, 199 (1965).

P. avium. Le bois des racines ne peut pas non plus à lui seul fabriquer l'herniarine puisque cette dernière disparaît après greffage de *P. avium* sur *P. mahaleb*.¹

Par conséquent, cette synthèse au niveau des tissus du bois semble nécessiter à la fois la présence des racines et de la partie aérienne de *P. mahaleb*. On peut penser que la phénylalanine subit une première transformation dans la partie supérieure de la plante; la substance ainsi formée, transportée dans la sève élaborée viendrait au contact des éléments vivants du

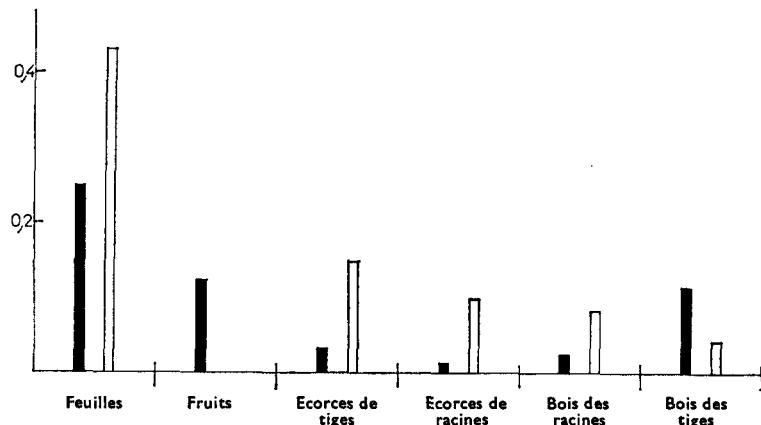


FIG. 1. HERNIARINE. RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (EN $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) DES COUMARINES DANS LES DIFFÉRENTES PARTIES DE LA PLANTE APRÈS ADMINISTRATION DE PHÉNYLALANINE $^{14}\text{C}-3$

En noir: *Prunus mahaleb* non greffé.
En blanc: *Prunus mahaleb* greffé sur *P. avium*.

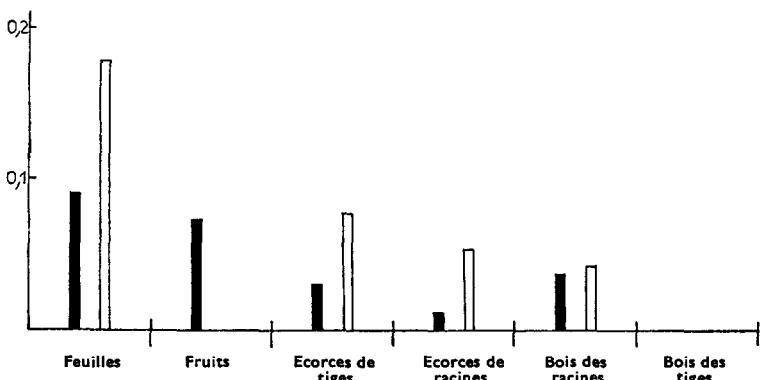


FIG. 2. COUMARINE.

bois où elle serait transformée en herniarine. Cela expliquerait que l'activité soit plus faible dans le bois des racines que dans le bois des tiges. L'intervention des racines dans la biosynthèse de l'herniarine au niveau du bois des tiges pourrait s'interpréter par le fait qu'elles fournissent un coenzyme nécessaire à la réaction.

Une autre possibilité est que la partie supérieure de la plante réalise une première transformation de la phénylalanine, que les racines effectuent une deuxième étape et le bois des tiges et des racines la dernière. Il est alors plus difficile d'expliquer l'activité plus forte au niveau des tiges, à moins que par une température plus basse dans le sol, qui pourrait inhiber partiellement les systèmes enzymatiques des racines.

TABLEAU 1. *Prunus mahaleb* NON GREFFÉ

		Feuilles	Ecorce tiges	Ecorce racines	Bois racines	Bois tiges	Fruits
Poids sec		22,5 g	57 g	10,6 g	23 g	149 g	2,2 g
Radioactivité totale en μ Ci	C*	0,700	0,060	0,010	0,008	—	0,020
	H†	0,100	0,080	0,015	0,010	0,007	0,014
Radioactivité spécifique en μ Ci/mmolé	C	0,091	0,030	0,011	0,038	—	0,072
	H	0,251	0,033	0,013	0,024	0,115	0,124

TABLEAU 2. *Prunus mahaleb* GREFFÉ SUR *Prunus avium*

		Feuilles	Ecorce tiges	Ecorce racines	Bois racines	Bois tiges
Poids sec		29 g	62 g	30,4 g	70 g	127 g
Radioactivité totale en μ Ci	C*	0,600	0,10	0,15	0,06	—
	H†	0,640	0,370	0,10	0,07	0,006
Radioactivité spécifique en μ Ci/mmolé	C	0,179	0,076	0,053	0,042	—
	H	0,431	0,147	0,097	0,084	0,042

* C = Coumarine.

† H = Herniarine.

Coumarine (Fig. 2)

Les déterminations concernant la coumarine ont fourni des résultats voisins de ceux de l'herniarine: diminution d'activité quand on passe des feuilles aux écorces des tiges et aux écorces des racines avec, pour le bois des racines, diminution ultérieure dans le cas du plant greffé ou au contraire augmentation dans le cas de *P. mahaleb* non greffé. Conformément aux résultats antérieurs, nous n'avons pas trouvé de coumarine dans le bois des tiges.

Ce fait peut paraître surprenant puisque la coumarine qui est transportée dans le bois des racines de *P. avium* sur lequel on a greffé *P. mahaleb* devrait ensuite passer dans le bois des tiges avec la sève ascendante. On peut donc se demander si elle n'est pas métabolisée à ce niveau. Elle n'est pas transformée en herniarine puisque l'activité spécifique de cette dernière est plus élevée que celle de la coumarine des racines; une telle transformation aurait d'ailleurs été en désaccord avec les résultats de Brown.^{4, 9}

Une autre possibilité serait que la coumarine soit intégrée dans la lignine après ouverture de l'hétérocycle. Kosuge et Conn¹⁰ ont montré en effet que la coumarine marquée, administrée à *Melilotus alba*, était très rapidement transformée principalement en β -glucoside de l'acide *O*-hydroxycinnamique. Or on sait que les acides cinnamiques sont incorporés dans la lignine:¹¹ des essais ont été réalisés avec l'acide cinnamique et les acides *p*-coumarique, cafféique, férulique et sinapique, mais il ne semble pas qu'on ait examiné le cas des acides *O*-hydroxylés pour savoir s'ils peuvent également être utilisés lorsqu'ils sont présents dans la plante.

Cette possibilité de métabolisation de la coumarine au niveau du bois des tiges nous amène à réexaminer les conclusions antérieures tirées des expériences de greffage:¹ on peut s'étonner en particulier de ce que les coumarines mettent plusieurs années à disparaître

¹⁰ T. KOSUGE et E. E. CONN, *J. Biol. Chem.* **236**, 1617 (1961).

¹¹ S. Z. EL-BASYOUNI, A. C. NEISH et G. H. N. TOWERS, *Phytochem.* **3**, 627 (1964).



ABB. 1. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMM: 5 WOCHEN ALTE WURZELKULTUREN VON *Datura innoxia* UND TESTSUBSTANZEN.

1. Hyoscyamin. 2. Cuskygrin (unten) und Acetyl tropin (oben). 3. Scopolamin. 4. Pflanzen-extrakt (von unten nach oben): Spur einer nicht identifizierten Substanz, Tropin, Hyoscyamin, Scopolamin, Cuskygrin, Acetyl tropin und zwei nicht identifizierte Substanzen. 5. Acetyl tropin. 6. (von unten nach oben): Hyoscyamin, Scopolamin, Cuskygrin, Acetyl tropin.

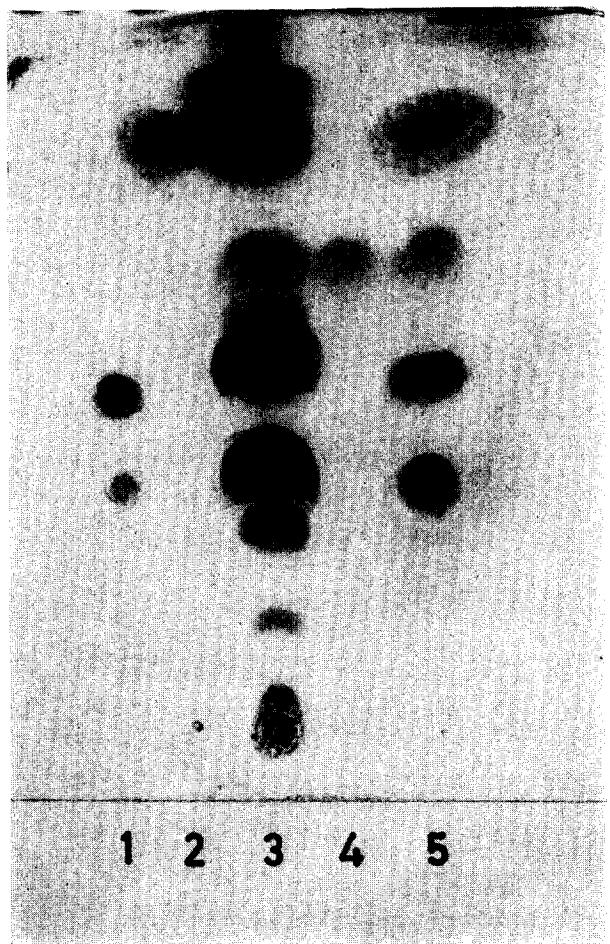


ABB. 2. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMM: WURZELN FRISCH GEKEIMTER *Datura stramonium* UND TESTSUBSTANZEN.

1. Tropin (unten) und Hyoscyamin (oben). 2. Acetyltropin. 3. Pflanzenextrakt (von unten nach oben): Spur einer nicht identifizierten Substanz, nicht identifizierte Substanz, Tropin, Hyoscyamin, Spur Scopolamin, Cuskygrin, Acetyltropin, nicht identifizierte Substanz. 4. Cuskygrin. 5. (von unten nach oben): Tropin, Hyoscyamin, Cuskygrin, Acetyltropin.

après greffage de *P. avium* sur *P. mahaleb* alors que les essais présents montrent qu'elles circulent assez facilement dans la plante. On pourrait envisager que les racines peuvent effectuer la synthèse sans avoir besoin de la partie supérieure de la plante, mais qu'elles perdent peu à peu cette possibilité par une modification de leurs systèmes enzymatiques qui serait due à l'action du greffon.

PARTIE EXPERIMENTALE

L'expérience a été réalisée parallèlement sur deux jeunes plants cultivés dans le jardin du Laboratoire et mesurant environ 1,20 m: *Prunus mahaleb* âgé de 4 ans; et *P. mahaleb* greffé sur *P. avium* depuis 4 ans (la greffe ayant été effectuée à la base de la tige).

Administration du Précurseur marqué

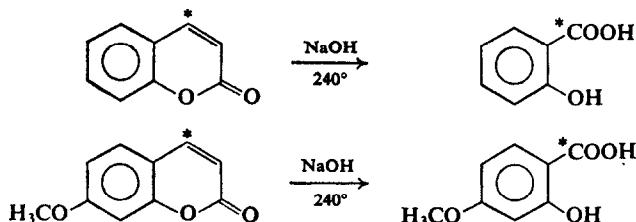
On administre 100 μ Ci de DL-phénylalanine ^{14}C -3 (activité spécifique 10 mCi/mmol), dissous dans 2 ml d'eau sous forme de chlorhydrate le 21 Mai 1964 à chacun des plants sur une branche à mi-hauteur, selon la technique décrite par l'un d'entre nous.¹² L'absorption se fait en quelques heures et sans préjudice apparent pour la plante. Les arbres sont laissés en terre pendant 12 jours puis on sépare les différentes parties et les place aussitôt dans l'éther.

Extraction et Purification des Coumarines

Le matériel végétal brut est extrait trois fois par l'éther au reflux pendant 2 heures. Après évaporation du solvant et séchage sous vide, le résidu est soumis à la sublimation fractionnée sous 0,1 mm: la coumarine se sépare à la température ordinaire et la méthoxy-7 coumarine à 100°. Il est également possible de sublimer la coumarine à 70° à pression ordinaire. Les composés obtenus par sublimation sont ensuite recristallisés plusieurs fois dans l'eau, jusqu'à ce qu'on obtienne une radioactivité spécifique et un point de fusion constants. La pureté est en outre vérifiée par les spectres u.v. et la microanalyse.

Dégredation

Après dilution isotopique, les coumarines sont soumises à la fusion alcaline pour localiser la radioactivité:



La technique utilisée dérive de celle décrite par Brown:¹³ un échantillon de 10 mg de coumarine est placé dans un creuset en nickel avec 2 ml d'eau et 2 pastilles de NaOH. On chauffe doucement pour tout dissoudre et on élimine l'eau sous un courant d'air chaud. Le creuset est ensuite porté à 240–250° dans un bain métallique pendant 2 heures. Après refroidissement on ajoute de l'eau, acidifie et le précipité est essoré et recristallisé dans l'eau. Le point de fusion et surtout la détermination de la radioactivité spécifique montrent que l'acide ainsi obtenu est pur sans qu'il soit nécessaire d'utiliser la dissolution dans le bicarbonate et l'extraction à l'éther.

Mesure de la Radioactivité

Celle-ci a été obtenue à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide Tri-carb modèle 3214 (Packard). Elle a porté sur les coumarines avant et après dilution isotopique et sur les produits de dégradation. Les différences observées entre ces valeurs ne s'écartent pas des limites des erreurs statistiques sur les mesures de radioactivité (environ 2%). La solution scintillante avait la composition suivante: PPO 5 g/l; diméthyl-POPOP 0,3 g/l; Solvant: Toluène. Les coumarines extraites sont directement solubles dans ce milieu. Mais

¹² C. MENTZER, *Compt. Rend.* **245**, 2354 (1957).

¹³ S. A. BROWN, G. H. N. TOWERS et D. WRIGHT, *Can. J. Biochem.* **38**, 143 (1960).

les acides benzoïques obtenus par dégradation ne le sont pas et il a été nécessaire de les solubiliser dans 0,05 ml d'hydroxyde d'hyamine 10-X (hydroxyde de *p*-(diisobutyl-crésoxyéthoxy-éthyl)diméthylbenzylammonium), en solution molaire dans le méthanol, avant d'ajouter 5 ml de liquide scintillant.

En déterminant le rendement du système de comptage lorsqu'on fait croître la concentration des coumarines dans le milieu, on constate que celui-ci ne varie pas tant que l'on ne dépasse pas 0,5 mg/ml. Ce rendement a été déterminé en outre pour chaque échantillon par la méthode de l'étalon interne.