

Analyse des polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques dans les fleurs de vigne et les baies de raisin

par

LAURENCE GENY, LYDIA COLIN, ISABELLE BREZILLON et M. BROQUEDIS

Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université Bordeaux I,
Talence, France

Résumé : La comparaison des deux cépages Merlot et Cabernet-Sauvignon en plein champ montre que les polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques peuvent être considérées comme des marqueurs du début de la floraison et de la croissance du fruit. Des polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques sont présentes en grande quantité dans les organes reproducteurs des boutons floraux et des fleurs. Les ovaires renferment essentiellement des polyamines conjuguées insolubles dans l'eau alors que dans les anthères s'accumulent des composés basiques solubles dans l'eau comme principalement le para-coumaryldiaminopropane. Après la floraison, les teneurs en polyamines conjuguées chutent considérablement pour s'accumuler à nouveau dans les jeunes baies, uniquement sous leur forme soluble dans l'eau et liée à l'acide férulique. L'intervention de ces substances dans les mécanismes liés au contrôle de la reproduction chez la vigne est discutée.

Abbreviations : PA: polyamines, PUT: putrescine, DAP: diaminopropane, SPD: spermidine.

Hydroxycinnamic acid amines in flowers and berries of *Vitis vinifera*

Summary : The determination of phenolamines in flowers and berries of field-grown *Vitis vinifera* (cv. Cabernet-Sauvignon and Merlot) shows that these compounds can be considered as valuable markers of the onset of flowering and growth of berries. Hydroxycinnamic acid amines are found in large amounts in the reproductive organs. The ovaries contain neutral phenolamines and the anthers the basic compound para-coumaryldiaminopropane. After flowering, hydroxycinnamic acid amines rapidly and dramatically decreased. In young berries, levels of polyamines increased; they were found to be soluble in water and conjugated with ferulic acid. The possible role of these molecules in processes controlling reproduction of grape is discussed.

Key words : hydroxycinnamic acid amines, para-coumaric acid, ferulic acid, flowering, flowers, berries, *Vitis vinifera* L.

Introduction

Les polyamines et les phénolamines (complexes d'amines ou de polyamines et de phénols ou d'acides hydroxycinnamiques) constituent un ensemble de substances naturelles qui jouent un rôle très important dans la régulation de la croissance et de développement des végétaux.

L'augmentation de la concentration en polyamines a été observée chez les végétaux à diverses étapes du développement (BAGNI *et al.* 1982) ; mais principalement en relation avec des effets de stress (FLORES 1991), de prolifération active des tissus (ARIBAUD *et al.* 1994) ou de mise à fleur (TARENGHI et MARTIN-TANGUY 1995; MARTIN-TANGUY 1996).

Les phénolamines ou polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques présentent un intérêt particulier car ces substances apparaissent comme des marqueurs du passage de l'état végétatif à la phase de reproduction chez de nombreuses espèces végétales (ARIBAUD et MARTIN-TANGUY 1994; MARTIN-TANGUY 1997). Chez le maïs, les phénolamines sont concentrées dans les organes reproducteurs,

avec des différences entre les organes mâles et femelles (MARTIN-TANGUY *et al.* 1979). Dans le cas du tabac, des phénolamines solubles dans l'eau ou basiques, telles que la caféylputrescine et la férulylputrescine, sont abondantes dans les parties inflorescentielles et les organes reproducteurs des fleurs. L'ablation de la région terminale de la tige provoque l'accumulation de ces substances dans les feuilles basales et en même temps, l'induction florale affecte les bourgeons axillaires jusque là végétatifs (CABANNE *et al.* 1981). Ce fait suggère donc que ces composés soient liés non seulement à l'état floral mais aussi très précocement à l'induction florale elle-même.

Chez la vigne, l'étude des polyamines conjuguées est récente et les travaux de MARTIN-TANGUY *et al.* (1993) et de GENY *et al.* (1997) ont montré que des profils différents en polyamines libres et conjuguées pouvaient être observés dans les organes végétatifs et reproducteurs de la plante au cours de son développement, en particulier dans les grappes, où les polyamines conjuguées s'accumulent au moment de la floraison et de la nouaison. Pour compléter ces

travaux, réalisés à partir de vitroplants et de boutures fructifères cultivées en conditions contrôlées, nous avons recherché, dans la présente étude, les polyamines liées aux acides hydroxycinnamiques dans les boutons floraux, les fleurs et les baies de plants de *Vitis vinifera* L., var. Merlot et Cabernet-Sauvignon, cultivés en plein champ. Notre objectif est de mettre en évidence l'importance de ces composés dans les phénomènes de floraison et de fécondation chez la vigne, comme cela a déjà été démontré chez d'autres plantes.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal: Les dosages de polyamines conjuguées ont été réalisés à partir de boutons floraux, de fleurs (entières et séparées en étamines et ovaires) et de baies de deux variétés de *Vitis vinifera* L., var. Merlot et var. Cabernet-Sauvignon, toutes deux cultivées de manière traditionnelle au château Brown près de Bordeaux.

Tous les prélèvements (du stade 17 au stade 38, définis par EICHHORN et LORENZ en 1977) ont été réalisés à la même heure de la journée et dans de l'azote liquide. Jusqu'à l'extraction, les échantillons ont été conservés à -50°C .

Extraction, séparation et quantification des polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques: Les techniques utilisées pour extraire, séparer et quantifier les polyamines liées aux acides hydroxycinnamiques ont été décrites précédemment par plusieurs auteurs (MARTIN-TANGUY *et al.* 1978; CABANNE *et al.* 1981; GENY *et al.* 1997).

Extraction, séparation: Après broyage avec du méthanol absolu, l'extrait filtré sur laine de verre est centrifugé (10 000 g, 5 min), et le surnageant est évaporé sous vide partiel jusqu'à 1 ml. Le résidu dilué avec 3 ml d'eau est traité: (1) avec 3 volumes d'éther de pétrole; (2) avec 3 volumes d'acétate d'éthyle, cette fraction contenant les polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques neutres ou insolubles dans l'eau, est évaporée à sec et reprise par 2 ml de méthanol absolu. La phase aqueuse restante est déposée sur une colonne de résine échangeuse de cations Amberlite Serva 50 I (H⁺), et divisée en trois fractions par une élution à 3 temps avec successivement 400 ml d'eau, 300 ml d'éthanol, 40 % aqueux (v/v) et 400 ml d'acide acétique 3M. Seule la fraction acide acétique 3M qui contient les polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques basiques ou solubles dans l'eau, est évaporée à sec et reprise avec 2 ml de méthanol absolu.

Les acides hydroxycinnamiques (acide férulique, caféique et para-coumarique) contenus dans les fractions sont analysés par chromatographie à 2 dimensions sur papier (Whatman n°2) en utilisant en première dimension le mélange butanol : éthanol : eau (4 : 1 : 2 v/v) et en seconde dimension l'eau. Ces composés sont localisés en utilisant d'une part leurs fluorescences en ultra-violet (254 et 360 nm) sans et avec vapeurs d'ammoniaque et, d'autre part leurs Rf's et les colorations avec la ninhydrine.

Quantification: Les phénolamines sont quantifiées en dosant les polyamines libérées après hydrolyse acide. L'hydrolyse acide est faite à 110°C sous reflux pen-

dant 10 h par de l'HCl 6N. La séparation et l'identification de ces composés sont réalisées après dansylation par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur fluorimétrique selon les méthodes de FLORES et GALSTON (1982) pour la dérivation (dansylation) et de SMITH et DAVIES (1985) adaptées à notre matériel végétal par GENY *et al.* (1997) pour la chromatographie.

Les résultats sont exprimés en nmol de polyamines par g de matière fraîche et correspondent à la moyenne \pm SD de 3 répétitions par échantillon.

Résultats

Quel que soit le cépage, au cours du développement des grappes, le profil des polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques se modifie profondément (Fig. 1).

Dans les grappes, les polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques solubles dans l'eau sont le diaminopropane en forte majorité et la putrescine. Les polyamines conjuguées insolubles dans l'eau sont le diaminopropane, la putrescine et la spermidine (Fig. 2).

Dans les boutons floraux et les fleurs, avant la fécondation (stades 18 et 19), il y a un maximum d'amines conjuguées à l'acide para-coumarique. Dans un premier temps, les polyamines conjuguées solubles s'accumulent dans les organes mâles puis dans un second temps les polyamines conjuguées insolubles dans les organes femelles. Dans les étamines, les dérivés solubles du diaminopropane sont prédominants alors que dans les ovaires la spermine insoluble est la polyamine majoritaire (Fig. 1, Tableau). Ainsi à une différenciation sexuée se superpose une différenciation biochimique.

Lors de la fécondation, de profondes modifications sont observées dans le métabolisme de ces différents composés. Dès le début de la libération du pollen (stade 19), les teneurs en polyamines conjuguées chutent de manière spectaculaire jusqu'au stade dit "petit fruit" (stade 29) où il y a, à nouveau, accumulation de conjugués de diaminopropane et de putrescine solubles dans l'eau et liés, à ce stade, à l'acide férulique. Par la suite, au cours de la croissance et de la maturation du fruit, les teneurs en polyamines conjuguées chutent régulièrement pour n'être détectées que sous forme de traces au moment de la récolte (Fig. 1).

Discussion et Conclusion

Nous avons mis en évidence la présence de phénolamines dans les grappes de Merlot et de Cabernet-Sauvignon au cours de leur développement. Ces composés, présents dans les jeunes grappes dès leur apparition, s'accumulent brutalement dans les organes reproducteurs juste avant la libération du pollen (stades 17 et 19) et au début de la croissance de la jeune baie (stade 29). Il s'agit principalement de polyamines liées à l'acide para-coumarique avant la fécondation et de polyamines conjuguées basiques liées à l'acide férulique (férulylputrescine et férulyldiaminopropane) dans les jeunes baies. Au début de la floraison, les phénolamines sont trouvées dans les organes repro-

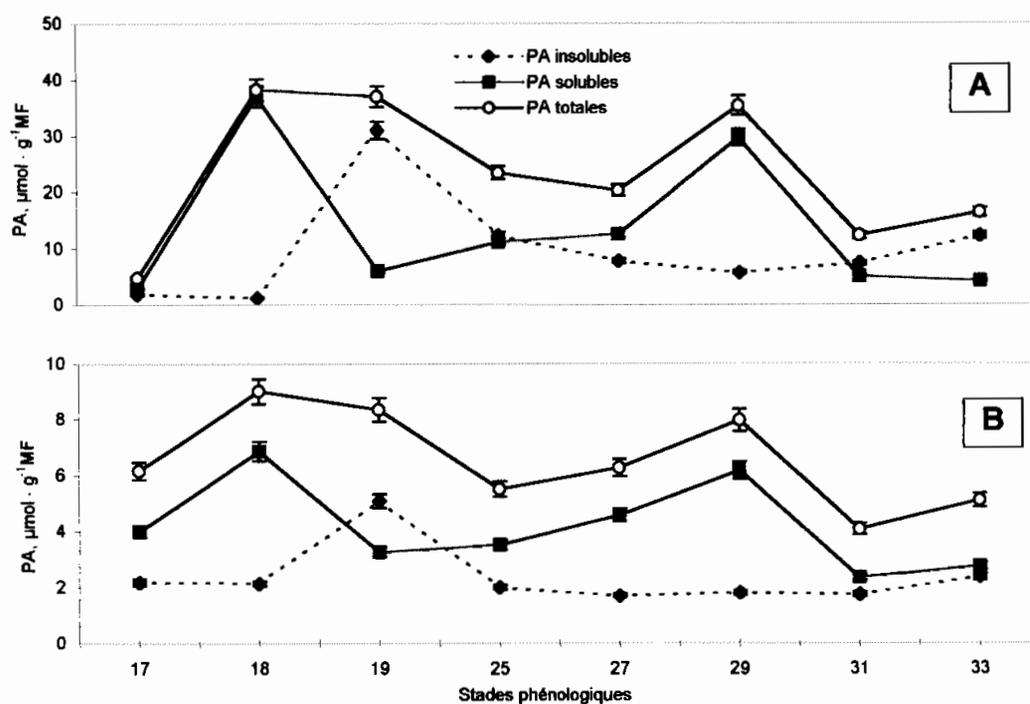


Fig. 1: Polyamines (PA) totales, solubles et insolubles dans l'eau des grappes de Cabernet-Sauvignon (A) et de Merlot (B) au cours de leur développement (stades phénologiques décrits par EICHHORN et LORENZ 1977). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 3 répétitions par échantillon.

Total water soluble and insoluble polyamines (PA) of berries of Cabernet-Sauvignon (A) and Merlot (B) during their development. Phenological stages are according to EICHHORN and LORENZ (1977). Results are mean \pm SD of 3 replicates.

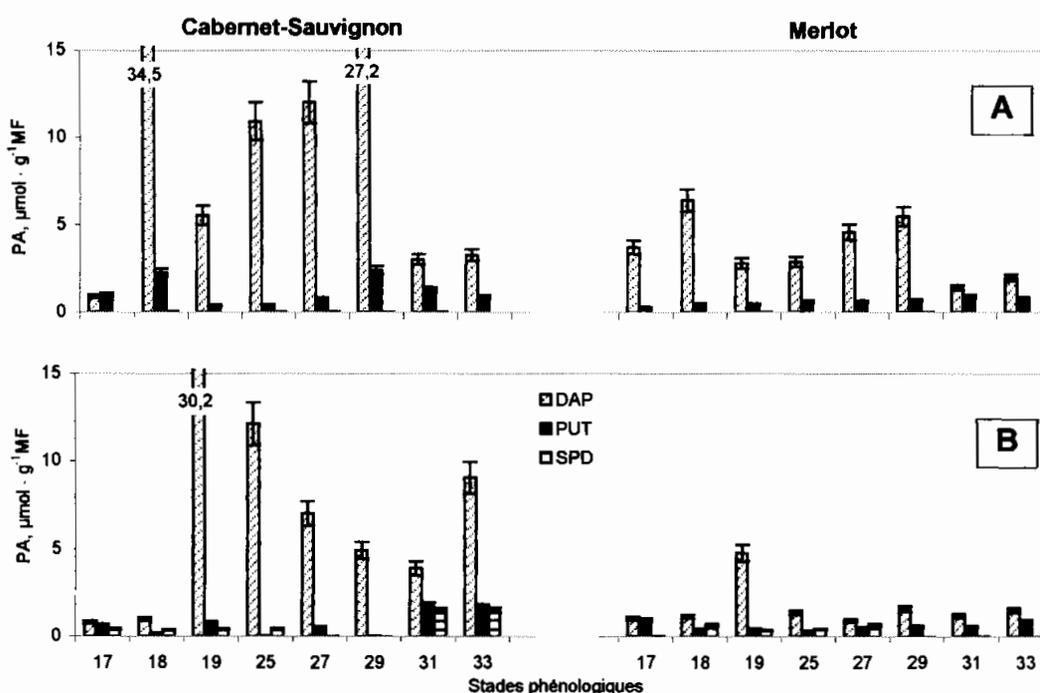


Fig. 2: Polyamines (PA) solubles (A) et insolubles (B) dans l'eau des grappes de Cabernet-sauvignon et de Merlot au cours de leur développement (stades phénologiques décrits par EICHHORN et LORENZ 1977). Les résultats correspondent à la moyenne \pm SD de 3 répétitions par échantillon.

Soluble (A) and insoluble (B) polyamines (PA) in berries of Cabernet-Sauvignon and Merlot during their development. Phenological stages are according to EICHHORN and LORENZ (1977). Results are mean \pm SD of 3 replicates.

ducteurs selon une différenciation sexuelle: les composés insolubles dans l'eau (spermine et spermidine) au niveau des ovaires et les composés solubles dans l'eau (diaminopropane principalement) au niveau des anthères.

Les changements de métabolisme observés lors de la floraison et de la croissance de la baie de raisin sont similaires à ceux déjà décrits chez d'autres plantes (MARTIN-TANGUY 1985; TARENGHI et MARTIN-TANGUY 1995). La fonction des polyamines conjuguées au cours de la division et de la

différenciation cellulaire reste encore floue; sont-elles des formes de stockages ou sont-elles, sous leur forme conjuguée, physiologiquement actives? SLOCUM et GALSTON (1985) pensent qu'il n'y aurait que des échanges limités entre les formes libres et conjuguées chez le tabac. Au contraire, pour FLORES et FILNER (1985) la conjugaison avec les acides hydroxycinnamiques serait un moyen de régulation du pool de polyamines libres dans la cellule. Dans les plantes, les amines oxydases jouent un rôle dans la régulation et le

Tableau

Proportions relatives (%) des différentes polyamines (PA) conjuguées aux acides hydroxycinnamiques dans les organes floraux de Cabernet-Sauvignon

Percentages of hydroxycinnamic acid-conjugated polyamines (PA) in floral organs of Cabernet-Sauvignon

		Etamines	Ovaires
PA solubles totales		78	4
PA insolubles totales		22	96
		PA insolubles	PA solubles
Etamines	DAP	3	79
	PUT	14	21
	SPD	43	-
	SPM	40	-
Ovaires	DAP	12	33
	PUT	11	63
	SPD	30	-
	SPM	37	4

DAP = Diaminopropane, SPD = Spermidine, PUT = Putrescine, SPM = Spermine.

transport subcellulaire selon la nature des tissus (ARIBAUD *et al.* 1994). Chez la vigne, le diaminopropane (le produit des polyamines oxydases) est la polyamine majoritaire dans les fleurs et les baies au cours du développement. Dans les autres espèces, la putrescine et la spermidine prédominent (EGEA-CORTINES et MIZRAHI 1991). Les travaux de SHIH *et al.* (1982) montrent que le diaminopropane est un puissant inhibiteur de la sénescence en inhibant la production d'éthylène lors de la floraison, la perte des chlorophylles et les activités protéases puisqu'en se liant aux polyribosomes il affecte la synthèse protéique au cours de la croissance du fruit.

Les corrélations observées entre les teneurs en polyamines conjuguées, la maturation des organes floraux et la présence de certains acides hydroxycinnamiques suggèrent, mais ne prouvent pas, que ces composés jouent un rôle important dans le développement. Cependant, la superposition d'une différenciation sexuée et biochimique permet de penser que la présence de ces composés est directement liée à la maturation des organes sexués. De plus, en dissociant la floraison et le début de la croissance du fruit, nous étayons fortement l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des polyamines conjuguées aux acides hydroxycinnamiques (en particulier le diaminopropane et la putrescine liés à l'acide para-coumarique) dans les tissus pourrait être directement liée à l'induction florale et à la floraison. L'étape ultérieure de l'expérimentation devra être l'application d'inhibiteurs de la biosynthèse des polyamines à différentes étapes du développement floral, afin de savoir si ces composés sont seulement des marqueurs de la floraison ou s'ils jouent eux-mêmes un rôle déterminant dans l'une ou l'autre des étapes du développement de la fleur et de la baie.

Références

- ARIBAUD, M.; CARRÉ, M.; MARTIN-TANGUY, J.; 1994: Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation of chrysanthemum leaf explant. *Plant Growth Regul.* **15**, 143-155.
- ; MARTIN-TANGUY, J.; 1994: Polyamine metabolism, floral initiation and floral development in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Growth Regul.* **15**, 23-31.
- BAGNI, N.; SERAFINI FRACASSINI, D.; TORRIGIANI, P.; 1982: Polyamines and cellular growth processes in higher plants. In: P. F. WAREING (Ed.): *Plant Growth Substances 1982*, 473-482. Academic Press, New York.
- CABANNE, F.; DALEBROUX, M.; MARTIN-TANGUY, J.; MARTIN, C.; 1981: Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. *Physiol. Plant.* **53**, 399-404.
- EGEA-CORTINES, M.; MIZRAHI, Y.; 1991: Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. In: R. SLOCUM, H. E. FLORES (Eds.): *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, 144-154. CRC Press, Boca Raton, FL.
- EICHHORN, K. W.; LORENZ, D. H.; 1977: Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenbl. Dt. Pflanzenschutzd.* **29**, 119-120.
- FLORES, H. E.; 1991: Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. In: R. SLOCUM, H. E. FLORES (Eds.): *The Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, 214-225. CRC Press, Boca Raton, FL.
- ; FILNER, P.; 1985: Polyamine catabolism in plant: Characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* **3**, 277-291.
- ; GALSTON, A. W.; 1982: Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* **69**, 701-706.
- GENY, L.; BROQUEDIS, M.; MARTIN-TANGUY, J.; BOUARD, J.; 1997: Free, conjugated and wall-bound polyamines in various parts of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* at different stages of development. *Amer. J. Enol. Viticult.* **48** (1), 80-84.
- MARTIN-TANGUY, J.; 1985: The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul.* **3**, 381-399.
- ; 1996: Flowering, polyamines, inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis. *Flower. Newslett.* **21**, 10-20.
- ; 1997: Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* **100**, 675-688.
- ; CABANNE, F.; PERDRIZET, E.; MARTIN, C.; 1978: The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry* **17**, 1987-1928.
- ; CARRÉ, M.; 1993: Polyamines in grape microcuttings cultivated *in vitro*. Effects of amines and inhibitors of polyamine biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regul.* **13**, 269-280.
- ; DESHAYES, A.; PERDRIZET, E.; MARTIN, C.; 1979: Hydroxycinnamic acid amides (HCA) in *Zea mays*. *FEBBS Lett.* **108**, 176-178.
- SHIH, L.; KAUR-SAWHNEY, R.; FURHER, J.; SAMANKA, S.; GALSTON, A. W.; 1982: Effects of exogenous 1-3 diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. I. Inhibition of protease activity, ethylene production and chlorophyll loss as related to polyamine content. *Plant Physiol.* **70**, 336-343.
- SLOCUM, R. D.; GALSTON, A. W.; 1985: Changes in polyamine biosynthesis associated with post-fertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiol.* **79**, 336-343.
- SMITH, T. A.; DAVIES, P. J.; 1985: Separation and quantification of polyamine in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.* **79**, 89-91.
- TARENGHI, E.; MARTIN-TANGUY, J.; 1995: Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Plant Growth Regul.* **17**, 157-165.