

50376

N° d'ordre: 214

1970

128

50.376

1970

128

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

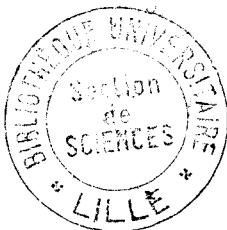
MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES

PAR

FLORE SOSA

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES GLYCOSIDES FLAVONOÏDIQUES DES POLLENS D'ANGIOSPERMES



PRÉSENTÉ LE 27 JUIN 1970 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M.M. J. MONTREUIL, Président
F. PERCHERON, Rapporteur
M. MONSIGNY, Examineur
F. PETEK, Membre invité

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARNOULT, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISSELLE, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY, CORDONNIER.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	I.U.T. Lille
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. COUSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. le Doyen DEFRETIN René	Directeur du Laboratoire de Biologie Maritime de Wimereux
M. DEHORS	Automatique
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Animale
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LIEBAERT	I.U.T. Lille
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	I.U.T. Valenciennes
M. MARTINOT LAGARDE	Mécanique des Fluides
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique
M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	I.U.T. Lille
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée E.N.S.C.L.
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale

.../...

M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BERNABOU Jean	Mathématiques
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. LEBRUN André	C.U.E.E.P.
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHALLER François	Biologie Animale
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BODART Marcel	Biologie Végétale
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cyc
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
Mme LENOBLE Jacqueline*	Physique
M. LINDER Robert	Biologie Végétale
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCE (et chargés de fonctions)

M. ABBAR	I.U.T. Amiens
M. AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BILLARD Jean	Physique
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BUILLET Pierre	Physique
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDoux Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Calcul Numérique
M. CHOQUET Marcel	I.U.T. Lille
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean-Paul	Electronique

.../...

Mme DRAN Raymonde	Chimie Organique
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY	Biologie Animale
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LAURENT François	Automatique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	I.U.T. Lille
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Sciences Appliquées
M. MONSIGNY Michel	Chimie Biologique
M. MONTEL Marc	Physique
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
Mme MORIANEZ BOULLET Claude	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	E.N.S.C.L.
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Bernard	Mécanique des Fluides
M. PONSOLLE	C.S.U. Valenciennes
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY	Radioélectrique
M. ROOS Philippe	I.U.T. Lille
M. ROY Jean-Claude	Psychophysologie
M. SAADA Georges	Physique
M. SALMER Georges	Electronique
M. SMET Pierre	Physique
M. SEQUIER Guy	I.U.T. Béthune
M. THOMAS Daniel	C.S.U. Valenciennes
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme ZINN Justin Nicole	Mathématiques

A Monsieur le Professeur J.E. COURTOIS,

qui a bien voulu nous accueillir dans
son laboratoire et nous confier ce sujet
de recherches.

En témoignage de notre profonde gratitude
et de notre très respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

qui nous a fait l'honneur d'accepter de
présider notre jury.

Nous le prions de bien vouloir agréer l'expression
de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur F. PERCHERON,

qui nous a guidée et conseillée tout au long de
nos recherches.

En témoignage de notre profonde reconnaissance
et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur M. MONSIGNY,

qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

En témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur F. PETEK, Maître de Recherches au C.N.R.S.,

qui a bien voulu accepter de faire partie de
notre jury.

Nous tenons à le remercier pour ses conseils
constants et amicaux.

A la mémoire de mes grands-parents

A mes parents

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
GLYCOSIDES FLAVONOÏDIQUES
DES POLLENS D'ANGIOSPERMES

I N T R O D U C T I O N

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

LE POLLEN

--:--:--:--:--

Dans l'organisation des Phanérogames, le pollen constitue, au cours de la vie de la plante, la phase haploïde conduisant à l'élaboration du gamète mâle. Cette phase, libre après maturation, dessiccation et déhiscence de l'anthère, contribue à la dissémination de l'espèce. Transporté par l'air ou les insectes, mis en contact avec le stigmate de la fleur, le pollen se fixe, se réhydrate et germe, donnant naissance au tube pollinique, qui, se développant à travers le style conduira l'anthérozoïde jusqu'à l'ovule où doit s'effectuer la fécondation.

Une étude générale des pollens engloberait donc les deux étapes de l'haplonte :

- 1) Le pollen mûr, partiellement deshydraté à l'état quiescent, tel qu'il est libéré de l'anthère.
- 2) Le pollen en germination, donnant naissance à l'antérozoïde.

Nous n'envisagerons ici que la première étape, la plus stable au point de vue chimique.

Les cellules polliniques sont pourvues de membranes épaisses et résistantes qui constituent une masse importante, variable suivant les groupes botaniques.

Extérieurement, le sporoderme possède des particularités morphologiques qui sont utilisées par les botanistes

dans la description des espèces et sont l'objet principal de la palynologie.

Son constituant fondamental, la sporopollénine a été considérée par ZETSCHE et VICARI comme étant de nature polyterpénique (1), (2).

Sa structure chimique n'a pas encore été complètement élucidée.

Les travaux récents de BROOKS et SHAW (3) suggèrent qu'elle est formée par polymérisation des caroténoïdes et de leurs esters, qui constituent la majeure partie de la fraction lipidique de l'anthère au moment du développement de l'exine : en effet, les polymères synthétiques de caroténoïdes et d'esters de caroténoïdes ont donné les mêmes produits de dégradation oxydative et de fusion alcaline que la sporopollénine (4).

Les membranes internes du pollen sont constituées essentiellement par des polysaccharides tels que la cellulose et des hémicelluloses diverses.

La localisation cellulaire des constituants du pollen a fait l'objet de recherches cytochimiques, plus particulièrement sur le pollen en état de germination, dont nous ne parlerons pas ici.

La plupart des résultats sur la composition chimique des pollens se réfèrent à l'extraction des divers produits à partir du pollen entier (5 à 9).

On a ainsi extrait des oses, des itols, des oligosaccharides (saccharose en particulier), des acides aminés, des vitamines, des lipides, des cires et des stérols (10 à 17), des

pigments, des acides nucléiques, des polysaccharides, des protéines dont certaines sont particulièrement étudiées en raison de leurs propriétés allergéniques.

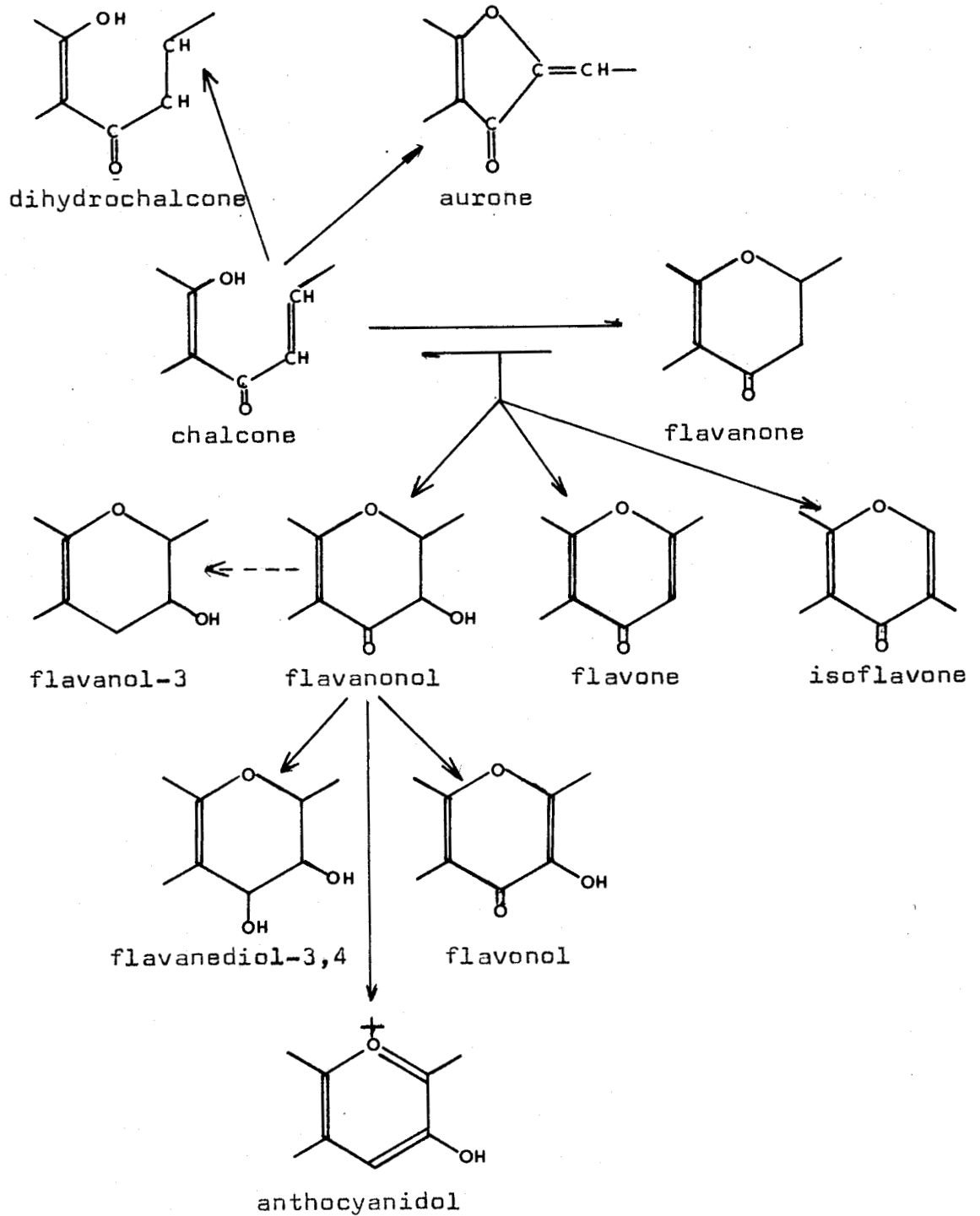
Les premiers travaux sur les constituants du pollen ne faisaient pas apparaître sa diversité. Des études plus récentes sur leur composition comparée suivant les groupes botaniques ont dégagé des différences en rapport avec leur position systématique (18), (19). Ces différences peuvent être significatives au même titre que celles trouvées chez d'autres organes de la plante et fournir des indications utiles à la chimiotaxonomie.

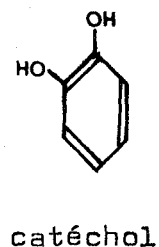
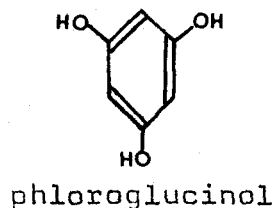
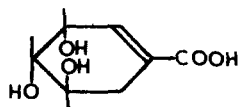
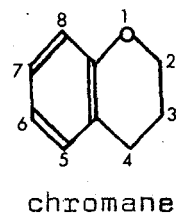
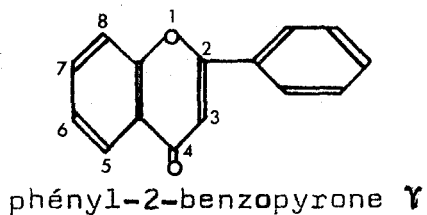
Le but de ce travail est de préciser la composition en pigments des pollens de diverses espèces et d'examiner leur répartition botanique.

Parmi les pigments trouvés chez les pollens, certains appartiennent au groupe des caroténoïdes (20 à 25), d'autres au groupe des flavonoïdes. Ces derniers se trouvent le plus souvent sous la forme de glycosides. Ce sont ceux-ci qui ont fait l'objet de notre recherche.

Nous avons donc recherché les hétérosides flavonoïdiques chez des espèces non étudiées précédemment. Notre travail a consisté à les isoler, les identifier, et au besoin, à déterminer ou à préciser leur structure chimique.

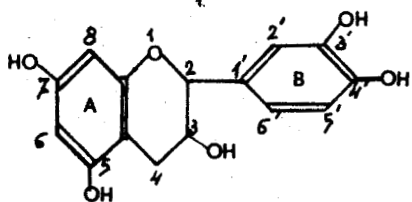
les différentes familles de flavonoïdes (27 à 30) de la façon suivante :





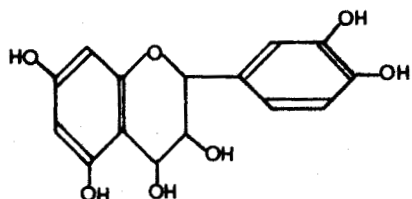
Nous donnerons en exemple la structure d'un membre de chacune de ces familles, en indiquant les synonymes qui abondent dans la littérature. La grande majorité des flavonoïdes naturels, à l'exception des chalcones, possédant un noyau A de type phloroglucinol et un noyau B de type catéchol, ce sont des substances présentant ce mode d'hydroxylation que nous avons choisies pour ce tableau.

Les flavones et flavonols constituent le groupe le plus nombreux parmi les flavonoïdes et comptent de 200 à 300 substances connues.

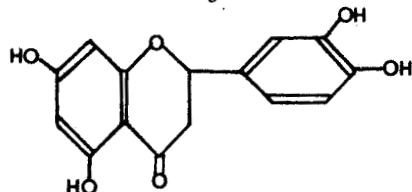


flavanols-3 (catéchines)

catéchine

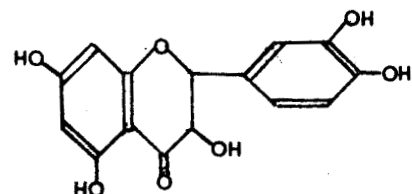


flavane-diols 3,4
(leucoanthocyanes)
leucocyanidol (-ine)

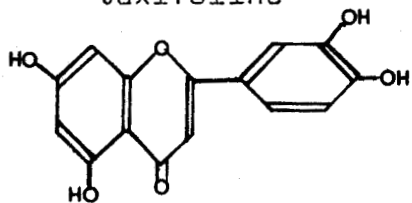


flavanones (dihydroflavones)

ériodictyol

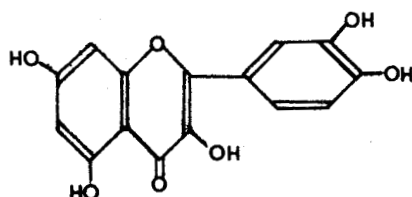


flavanonols (hydroxy-3 flavanones, dihydroflavonols)
taxifoline

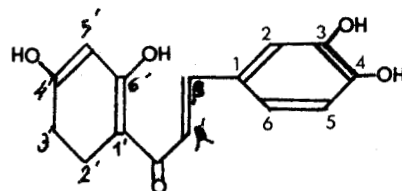


flavones

lutéoline

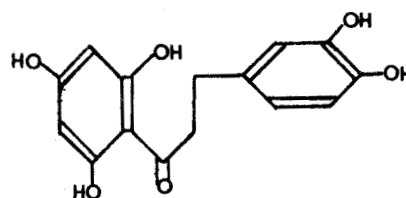


flavonols (hydroxy-3 flavones)
quercétol



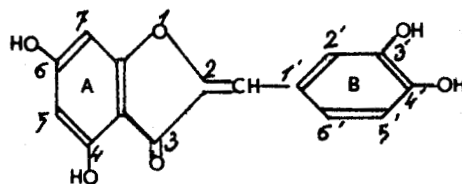
chalcones

butéine



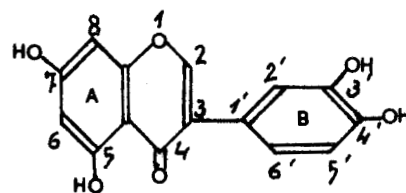
dihydrochalcones

hydroxy-3 phlorétine



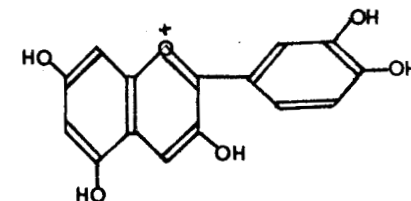
aurones (2-benzalcoumaranones,
2-benzylidène-3 coumaranones)

aureusidine



isoflavones

orobol



anthocyanidols (-ines)
cyanidol (-ine)

Système de numérotation des flavonoïdes

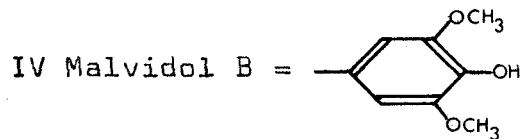
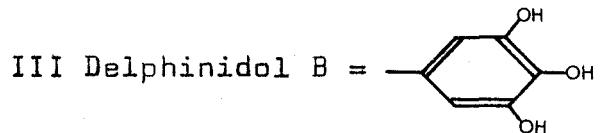
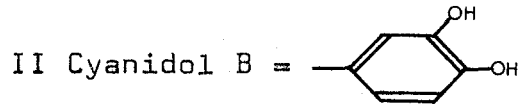
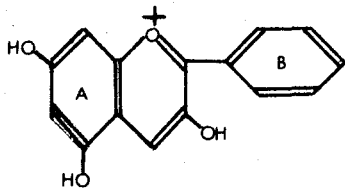
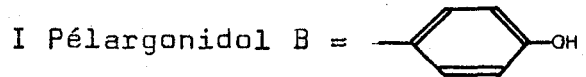
I) Pour les substances possédant le squelette du phényl-2-chromane et du phényl-3-chromane, la numérotation des atomes commence par l'hétérocycle, le numéro 1 étant l'atome d'oxygène, et va jusqu'à 8 pour le noyau A, le noyau phényl latéral (B) est numéroté de 1' à 6'.

II) Le principe est le même pour les aurones, mais du fait que l'hétérocycle est pentagonal, l'atome de carbone du cycle A, numéroté 8 dans le cas précédent, se trouvera, ici, numéroté 7, le noyau B est toujours numéroté de 1' à 6'.

III) Les chalcones et dihydrochalcones n'ayant pas d'hétérocycle, sont numérotées de 1' à 6' pour le noyau phényl qui, par cyclisation avec le fragment en C_3 , constituera le noyau A des flavanones, par exemple; le noyau phényl en β de la fonction cétonique de la chalcone est numéroté de 1 à 6. Si bien que la position 5 d'une flavanone équivaut soit à la position 2', soit à la position 6' d'une chalcone. La position 7 d'une flavanone correspond toujours à la position 4' d'une chalcone.

Les flavonoïdes, excepté les flavanes, se trouvent chez les végétaux, le plus souvent combinés sous forme d'O-glycosides, un ou plusieurs de leurs hydroxyles se trouvant engagés dans une liaison acétalique avec l'hydroxyle anomérique d'une molécule glucidique. Les quinze dernières années ont apporté la connaissance d'un certain nombre de flavones, de deux isoflavones, deux flavanones, deux flavonols, un flavanonol et une dihydrochalcone, sous forme de C-glycosides (28), (31 à 34).

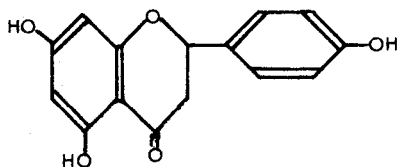
Nous utiliserons le système de nomenclature qui nous paraît le plus explicite et qui est courant en France, où la terminaison -ol désigne l'aglycone et -oside, le glycoside. Cependant, dans les travaux en langue anglaise ou allemande, malgré quelques exceptions (-énine, -tine, -génine) on utilise la terminaison -idine pour les aglycones et -ine pour les glycosides, et plus particulièrement dans la famille des anthocyanes.



Le constituant principal du pollen d'Anémone coronaria serait un monoarabinoside du delphinidol (TAPPI (35)).

Selon VIVINO et PALMER (36) le pollen que récoltent les abeilles est dépourvu d'anthocyanes (et de chlorophylle).

2) Aglycone flavanonique =====



Naringénol (trihydroxy-5,7,4' flavanone)

Deux cas se présentent :

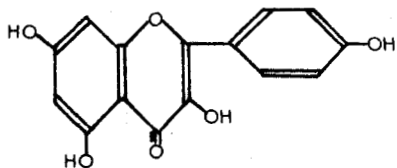
a) 1 molécule de glucose est liée en position 7, c'est la prunine ou naringéno

b) 2 molécules de glucose sous forme de disaccharide se trouvent liées en position 5. Il semble que ce glycoside n'ait pas été signalé ailleurs.

Ces deux flavanonosides ont été trouvés, accompagnés de flavonolosides, dans le pollen d'Acacia dealbata, le premier par SPADA et CAMERONI(37), le deuxième par TAPPI (38).

3) Aglycone flavonolique

=====



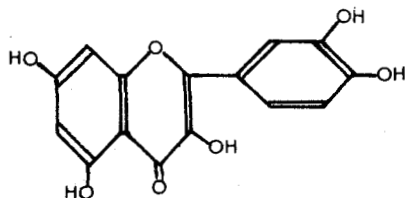
Kempférol (trihydroxy-5,7,4' flavonol). Du pollen de Petunia hybrida, FRITZ a isolé en 1960, trois glycosides du kempférol, la portion glucidique étant

liée dans tous les cas en position 3 de l'aglycone. Les disaccharides correspondants sont les suivants (39) :

a) α -lycobiase (4- β -glucosidogalactose). Ce glycoside présente le même spectre I R que le kempférol-3-sophoroside de BIRKOFFER et KAISER (157).

b) méthylpentosidogalactose

c) rhamnosido- α -galactose



Quercétol (Tétrahydroxy-5,7,3',4' flavonol). Les quatre glycosides suivants qui en

dérivent ont tous leur fraction glucidique liée à l'hydroxyle en 3.

a) 1 molécule de rhamnose :

Quercitroside (Quercétol-3-rhamnoside). Il a été isolé par KUHN et LÖW (40) et par MOEWUS (41) du pollen des fleurs à court style de Forsythia intermedia Zabel.

b) 1 molécule de glucose :

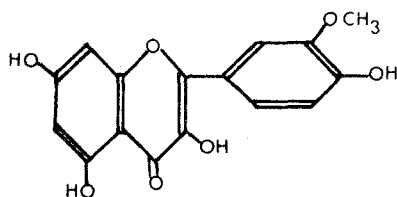
Isoquercitroside (Quercétol-3-glucoside). Il a été isolé du pollen d'Ambrosia artemisifolia (HEYL (42)) (STEVENS (43)) et

de Typha angustata (FUKUDA (44)).

c) 1 molécule de rutinose
(6- α -L-rhamnosido-D-glucose): Rutoside (Quercétol-3-rutinoside).

Il a été signalé dans le pollen de deux Monocotylédones : Dactylifera palmae L. (EL RIDI (45)) et Lilium lancifolium (TOGASAWA et Coll.(46)) et trois Dicotylédones : Forsythia intermedia Zabel à long style (KUHN et LÖW (40)) (MOEWUS (41)) et d'autres espèces de Forsythia par FUJITA (47). D'après ce dernier, ce serait le seul flavonoïde existant dans le pollen des Forsythia examinés. SPADA et CAMERONI (48) l'ont également signalé dans le pollen d'Acacia dealbata et HARBORNE (49) dans le pollen de Solanum tuberosum.

d) 1 molécule d' α -lycobiase
(4- β -glucosido-galactose) (Quercétol-3- α -lycobioside). Il a été isolé du pollen de Petunia hybrida (FRITZ (39)).



Isorhamnétol Méthyl-3'-éther
du quercétol
(trihydroxy-5,7,4',méthoxy-
3'flavonol)

a) 1 molécule de glucose
(Isorhamnétol-3-glucoside). Il a été isolé du pollen de Typha angustata Bory et Chaub par FUKUDA (44).

b) 2 molécules de glucose en
position 3 et 4' : Dactyline (Isorhamnétol-3,4'-diglucoside).

Il a été trouvé dans le pollen de deux Graminées :
Dactylis glomerata par MOORE (50) puis par INGLETT (52) qui en

donna la formule brute correcte (52) et Phleum pratense par MOORE (50). KUHN et LÖW (53) l'ont mis en évidence dans le pollen d'une autre Monocotylédone, le Safran : Crocus "Sir John BRIGHT".

Selon ces derniers, l'isorhamnétol agirait sur l'algue Chlamydomonas eugametos comme gymnotermone, ce qui a été con - testé ultérieurement.

D'après les travaux de JOHNSON et Coll. (58) la dactyline posséderait une activité allergénique.

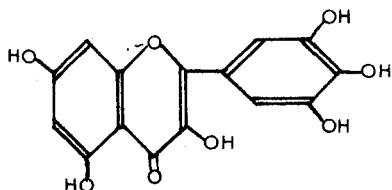
c) 1 molécule de rutinose en position 3 : Narcissine (Isorhamnétol-3-rutinoside).

Il a été trouvé dans le pollen de Lilium auratum par ARAKAWA (54) KOTAKE (55) et de Lilium lancifolium Thumb. par TUGASAWA et Coll. (46).

d) 1 molécule d'un trisaccharide en position 3 (glucose-rhamnose-galactose).

Il a été isolé du pollen de Lilium candidum par TAPPI et MENZIANI (56).

On peut remarquer que les glycosides de l'isorhamnétol n'ont été trouvés que dans les pollens de Monocotylédones et que Lilium candidum se distingue de L. auratum et de L. lanci- folium par la présence d'un ose supplémentaire dans la chaîne glucidique liée à l'isorhamnétol.



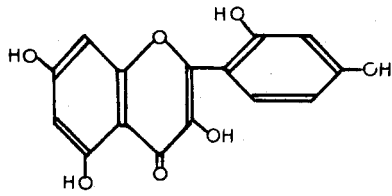
Myricétol : Pentahydroxy 5,7,3;

4',5' flavonol

1 molécule de glucose est liée en position 3 : Myricétol-3-

glucoside. Il a été isolé du pollen d'Acacia dealbata par SPADA et CAMERONI (48).

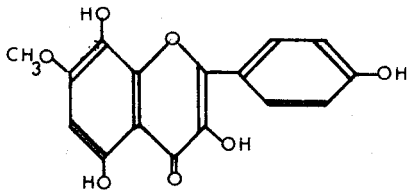
Morine : Tétrahydroxy-5,7,2',4' flavonol



Un glycoside en a été isolé par SPADA et CAMERONI (59) du pollen d'Acacia dealbata

Par hydrolyse, cet hétéroside libère du glucose et du rhamnose.

Pollénitine : Trihydroxy-5,8,4', méthoxy-7 flavonol.



Trois glycosides de ce flavonol qui n'a pas été signalé ailleurs, ont été isolés par SAKAMOTO (57) du pollen de thé.

a) une molécule de glucose (pollénine b)

en position 3.

b) une molécule de rhamnosidoglucose,

dont la séquence n'a pas été étudiée, en position 3 (pollénine a).

c) La pollénine c semble être une autre

glycoside de la pollénitine mais sa fraction glucidique est encore inconnue.

Cette méthode est criticable pour diverses raisons :

- Même si la récolte se fait en un lieu donné où une espèce majoritaire est en fleurs on ne peut éviter la contamination de son pollen par celui d'autres espèces.

- On ne peut déterminer avec sécurité si telle substance isolée par le chimiste provient du pollen lui-même ou de l'insecte. A l'appui de ceci, vient la remarque de LOUVEAUX (63) "que le pollen des trappes est biologiquement plus actif sur les abeilles que le pollen récolté directement à la main sur les plantes"

- Il peut y avoir interférence avec des substances provenant du nectar des fleurs et non du pollen.

- Des actions enzymatiques peuvent modifier certains constituants du pollen au cours de la confection des pelotes par malaxage des grains avec le miel ou le nectar régurgité. D'ailleurs REITER (64) a montré que la couleur des pelotes est sensiblement différente de la couleur du pollen recueilli sur les étamines.

- Enfin, dans cet agglomérat humide, on ne peut éviter que la germination du pollen ou une fermentation se produisent et provoquent une dégradation ou une transformation chimique de ses constituants.

Afin d'éviter toute contamination, interférence ou modification et cerner au plus près la composition exacte du pollen, nous avons préféré la méthode, plus longue et plus fastidieuse mais plus rigoureuse de récolte directe. Nous nous adressons soit à des Gymnospermes, soit à des Apétales, dont

on peut cueillir les cônes ou les chatons au moment de leur déhiscence, le pollen se trouvant à maturité.

Les cônes ou les chatons sont étalés sur de grandes feuilles de papier lisse, et on les laisse sécher à l'air à température ordinaire jusqu'à ce qu'ils ne libèrent plus de pollen.

On sépare les inflorescences sur un tamis grossier, puis on passe sur un tamis à mailles moyennes (n° 140) et on finit d'éliminer les écailles ou débris d'étamines sur un tamis plus fin (n° 180 à 220 selon les espèces).

Nous avons bien pris soin de vérifier que le pollen était sec, n'était pas aggloméré, n'avait subi aucune fermentation.

La teneur en eau est déterminée sur quelques décigrammes de pollen par la perte de poids à l'étuve à 100° pendant 2 heures.

2) Stabilisation et extraction

Le pollen est précipité par petites portions dans l'éthanol bouillant, à raison de 100 g de pollen pour 300 à 600 ml d'éthanol à 90-95° (selon l'espèce, les pollens ailés de certains Conifères retenant une quantité considérable de solvant). L'ébullition est maintenue pendant 20 minutes à reflux. Le pollen est essoré sur büchner et extrait deux fois encore dans les mêmes conditions.

Délipidation.

Les extraits alcooliques sont filtrés à chaud sur filtre à plis, réunis, et l'alcool est éliminé par distillation

sous pression réduite à une température ne dépassant pas 45°. L'extrait concentré est agité avec 2 à 3 volumes d'éther éthylique, L'opération est renouvelée deux fois. A ce stade, on observe généralement, avec les extraits de pollen d'Apétales l'apparition au sein de la phase aqueuse, d'un précipité, ou parfois même de cristaux donnant les réactions des flavonoïdes. Le précipité est recueilli par centrifugation ou filtration sur bûchner.

Les extraits étherés sont lavés à l'eau. Ces eaux de lavage sont concentrées et réunies à la phase aqueuse obtenue précédemment.

Cet extrait délipidé est additionné de 4 volumes d'alcool à 95° et conservé au réfrigérateur.

3) Techniques chromatographiques

Nous avons employé la chromatographie sur papier aussi bien à l'échelle préparative pour isoler et purifier les hétérosides, aglycones, oligosaccharides ou oses méthylés, qu'à des fins d'identification ou de vérification de la pureté des substances que nous avons isolées.

La chromatographie a fait l'objet de revues générales par DEDONDER (65), COURTOIS et PERCHERON (66), PERCHERON (67). Nous nous limiterons donc à décrire les conditions que nous avons utilisées :

A - Choix du papier

Nous avons généralement employé le papier Whatman n° 1 pour la détermination des Rf, et le papier Schleicher et Schull n° 2043 b Mgl, plus épais, pour la détermination des Rg.

Les papiers Whatman n° 3 et n° 3 MM nous ont servi pour les chromatographies préparatives.

B - Mélanges - Solvants.

Voir tableau n° 1

C - Technique

Nous avons effectué des chromatographies monodimensionnelles descendantes, excepté dans le cas de l'identification des oses méthylés.

Pour la séparation d'oses ou d'oligosaccharides, nous laissons le solvant s'écouler par le bas de la feuille : selon le cas, le développement varie de 36 à 72 heures.

Pour la détermination des Rf des flavonoïdes, nous laissons le papier s'équilibrer avec les vapeurs de solvant pendant 18 heures avant le développement.

D - Révélation

a) Flavonoïdes

Les chromatogrammes sont examinés en lumière ultra-violette à 366 nm et 254 nm. Les flavones et les flavonols dont l'hydroxyle en 3 est osidifié apparaissent en brun-rouge.

Les flavonols et leurs dérivés dont l'hydroxyle en 3 est libre ont une fluorescence jaune, qui s'intensifie par exposition à des vapeurs d'ammoniaque.

b) Oses et Oligosaccharides

Les oses et oligosaccharides sont révélés par pulvérisation des divers réactifs suivants, selon le cas :

TABLEAU N° 1

MELANGES-SOLVANTS

A. Octane-Isopropanol-Solution aqueuse d'ammoniaque à 10%	50 : 25 : 2
B. Eau	
C. Benzène-Acide acétique-Eau	125 : 72 : 3
D. Butanol-Ethanol-Eau	4 : 1 : 5
E. Acide acétique 5%	
F. Butanol-Acide acétique-Eau	12 : 3 : 5
G. Acide acétique 10%	
H. Acide acétique 15%	
I. Acide acétique 30%	
J. Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau	10 : 2 : 3
K. Isopropanol-n-Butanol-Acétate d'éthyle-eau	7 : 1 : 2 : 2
L. n-Butanol-Acide acétique-Eau	4 : 1 : 5
M. n-Butanol-Isopropanol-eau	1 : 7 : 2
N. n-Butanol-Pyridine-Eau	9 : 5 : 4
O. Isopropanol-Eau	11 : 39
P. Acétate d'éthyle-n-Butanol-Pyridine-Eau	8 : 9 : 7 : 5
Q. Ethanol-Eau	3 : 2
R. Butanol-Chloroforme-Eau	1 : 2 : 2
S. Isopropanol-Méthyléthylcétone-Acétate d'éthyle- Butanol-Eau	6 : 5 : 3 : 2 : 5
T. n-Butanol-Ethanol-Eau	5 : 1 : 4
U. n-Butanol-Acide acétique-Eau	10 : 3 : 7
V. n-Butanol-Ethanol-Eau	20 : 5 : 11
W. Isopropanol-Acide formique-Eau	2 : 5 : 5
X. Acide acétique 7,5%	

- Sucres réducteurs ou non réducteurs

Nitrate d'argent en milieu sodique, selon la technique de TREVELYAN (68). Ce réactif est très sensible, mais peu spécifique. En effet, des traces d'aglycone ou d'hétéroside sont révélées, rendant les chromatogrammes ininterprétables.

- Sucres réducteurs ou non réducteurs facilement hydrolysables.

Révélateur à la β -naphtylamine et au thymol selon la modification apportée par PETEK (69) à la formule de NOVELLIE (70) : β -naphtylamine : 0,10 g; thymol : 1 g; éthanol à 80°C : 150 ml; dissoudre et ajouter : acide phosphorique à 80% : 2 ml.

Révélateur à l'o-phénylènediamine (102) : Dissoudre séparément : o-phénylènediamine : 0,200 g dans 30 ml d'éthanol et acide oxalique : 1 g dans 20 ml d'eau distillée; mélanger.

- Aldoses méthylés

Révélateur à l'oxalate d'aniline (71) : n-butanol : 80 ml; éthanol : 50 ml, aniline : 1 ml; eau distillée : 40 ml; acide oxalique : 2 g.

4) Méthodes spectrophotométriques d'étude des flavonoïdes

Etant donné l'importance et l'utilité des méthodes spectrophotométriques en lumière ultra-violette et visible dans l'étude structurale et l'identification des flavonoïdes, nous les décrirons de façon détaillée ainsi que leurs développements les plus récents.

Les flavones et flavonols absorbent dans deux régions du spectre ultra-violet entre 250 et 270 nm (bande I) d'une part et entre 330 et 350 nm pour les flavones, entre 350 et 390 nm pour les flavonols d'autre part, (bande II).

La bande I est principalement associée au noyau A et la bande II au noyau B selon l'étude par JURD (72) de l'influence de la substitution des noyaux A et B sur les spectres des flavonols.

Les méthodes utilisées mettent en jeu soit le caractère acide des fonctions phénol, soit l'aptitude de la molécule flavonoïde à former des complexes métalliques par chélation avec les groupes dihydroxyphénol ortho, hydroxyle-3-carbonyle-4 ou hydroxyle-5-carbonyle-4. L'ionisation ou la formation de complexes provoquent des modifications caractéristiques du spectre.

A) Réactions utilisant le caractère acide des fonctions phénol

Ethylate de sodium.

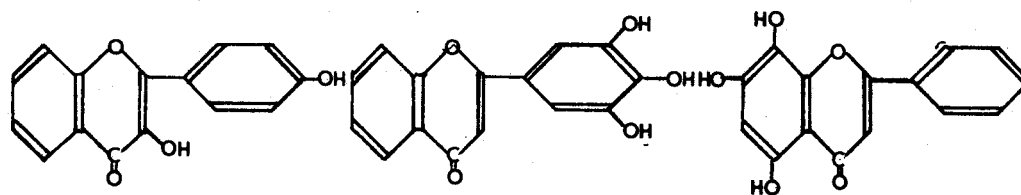
L'éthylate de sodium (0,002 M) ionise entièrement les fonctions phénol et provoque un déplacement bathochrome caractéristique des deux bandes de 40 à 60 nm, qui peut servir à distinguer entre elles des flavones ayant le même spectre en solution neutre (73), (74).

D'autre part, les flavonols ou leurs glycosides ayant les deux hydroxyles en 3 et 4' libres sont décomposés tandis que les autres montrent des spectres stables dans le visible (75). Cependant les dérivés du myricétol et du gossypétol comportant un noyau pyrogallol sont décomposés indépendamment du fait que l'hydroxyle en 3 soit protégé ou non.

Acétate de sodium

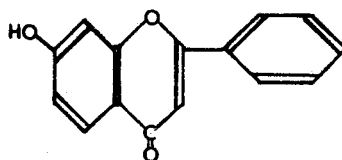
L'acétate de sodium ionise uniquement les fonctions phénol ayant le caractère acide le plus accentué (75), (76), (77). C'est l'hydroxyle en 7 qui est le plus fortement ionisé provoquant ainsi un déplacement bathochrome caractéristique de 8 à 19 nm de la bande d'absorption I qui est principalement associée au noyau A et au noyau hétérocyclique.

A) Réactions utilisant le caractère acide des phénols



+ Ethylate de sodium

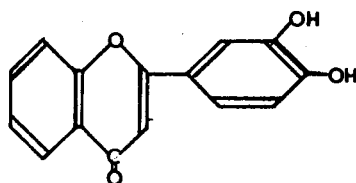
↓
Maximum II disparaît



+ Acétate de sodium

↓
Maximum I + 8 à + 19 nm

B) Réactions utilisant la formation de complexes



+ Acide borique/acétate de sodium

↓
Maximum II + 15 à + 30 nm

Il se produit un déplacement simultané du maximum II de 15 à 30 nm par ionisation du groupe hydroxyle 4', mais s'il se trouve un hydroxyle libre en position 3, cet effet est annulé (78).

B) Réactions utilisant la formation de complexes

Acide borique/acétate de sodium

L'acide borique en présence d'acétate de sodium forme des complexes de chélation avec les composés phénoliques contenant un groupement o-dihydroxyle, ce qui a pour effet un déplacement bathochrome du maximum II, de 15 à 30 nm (79), (75). En ce qui concerne les flavonolosides, ceci ne se produira évidemment qu'avec les glycosides du quercétol ou du myricétol, qui ont un noyau pyrocatechol dans leur structure.

Chlorure d'aluminium

L'aluminium, utilisé sous forme de chlorure forme des complexes soit avec le groupement hydroxyle-3-carbonyle-4 soit avec le groupement hydroxyle-5-carbonyle-4 ce qui provoque un déplacement bathochrome de tout le spectre, avec quelquefois, dédoublement des bandes I et II. Avec l'hydroxyle en 3, le complexe est plus stable, et l'effet bathochrome sur la bande II plus important (60 nm) qu'avec l'hydroxyle en 5 (40 nm); (76), (80)

En étudiant la répartition du quercétol-3-sophoroside nous avons observé un effet bathochrome du chlorure d'aluminium anormalement grand quand nous opérons en solution méthanolique (78 nm au lieu de 43 nm en solution éthanolique). JURD (81) vient d'en fournir l'explication : en solution méthanolique, il se

forme un complexe supplémentaire avec le groupe dihydroxyle-3'-4' du quercétol, ce qui ne se produit pas en solution éthanolique.

En effet, les dérivés 3-alkylés du kempférol présentent, avec le chlorure d'aluminium, le même déplacement de la bande II (45-48 nm) dans les deux solvants. De même, JURD a étudié plusieurs hydroxy-5-flavones dépourvues du groupe dihydroxyle-3',4'. Celles-ci ne montrent aucune différence entre leur spectre en solution méthanolique et éthanolique en présence de chlorure d'aluminium (42-46 nm).

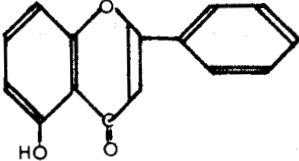
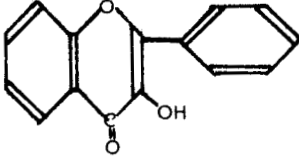
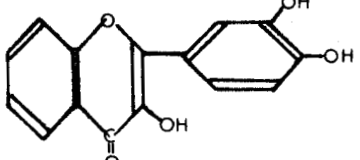
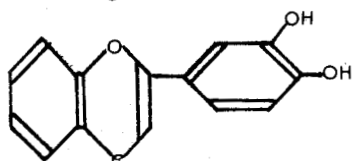
Une dizaine d'hydroxy-3-flavones ont été étudiées de la même façon. Dans l'éthanol tous ces flavonols donnèrent des déplacements de 58-62 nm. Dans le méthanol, ceux qui étaient dépourvus de groupe dihydroxyle 3'-4' donnèrent des déplacements de même grandeur; pour ceux qui contenaient un groupe dihydroxyle 3'-4' le déplacement fut de 75-80 nm.

JURD confirme encore cette chélation spécifique en milieu méthanolique par l'étude des spectres de dihydroxy-3',4' flavones dépourvues d'hydroxyle en position 3 et en position 5. En solution éthanolique, l'addition de chlorure d'aluminium ne provoque aucun changement dans leur spectre. En solution méthanolique, cependant, leur spectre subit un déplacement de 20-40 nm.

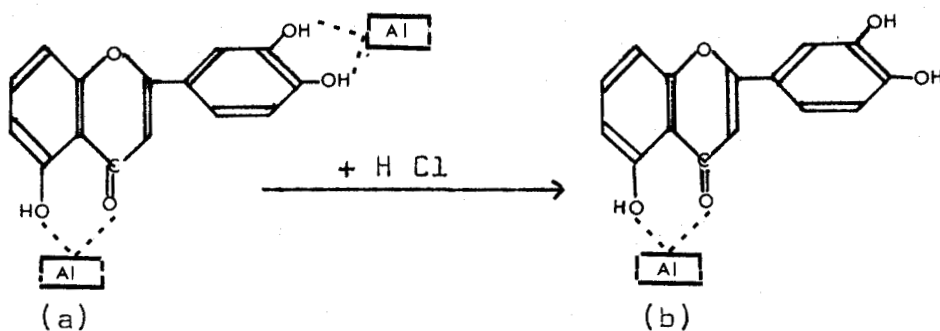
La comparaison des spectres en présence de chlorure d'aluminium en solution éthanolique constitue donc un test pour la détection des groupes dihydroxyle-3;4' qui s'ajoute à celui de l'acide borique/acétate de sodium.

Enfin, le chlorure d'aluminium permet de déceler les

+ Chlorure d'aluminium

	Maximum II	
<u>Ethanol</u>		<u>Méthanol</u>
+ 42 à +48 nm		+ 42 à + 48 nm
+ 58 à + 62 nm		+ 58 à + 62 nm
+ 58 à + 62 nm		+ 75 à + 80 nm
0		+ 20 à + 40 nm

Chlorure d'aluminium anhydre en solution méthanolique



Déplacement hypsochrome du maximum II par rapport à (a)

Oxychlorure de zirconium



ne se forme pas en présence d'acide citrique, spectre non modifié

stable en présence d'acide citrique déplacement bathochrome du maximum II

groupes dihydroxyle ortho aussi bien sur le noyau A que sur le noyau B, suivant la méthode décrite dernièrement par MARKHAM et MABRY (82).

En solution méthanolique, le chlorure d'aluminium anhydre forme des chélats tant avec les groupes hydroxyle-5-carbonyle-4 qu'avec les groupes dihydroxyle ortho. Seuls les chélats de ces derniers, cependant, sont labiles en milieu acide. Il suffit d'ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique dilué à la solution méthanolique de flavonoïdes et chlorure d'aluminium anhydre, pour observer un déplacement hypsochrome par rapport au spectre du flavonoïde en présence de $AlCl_3$, dû à la destruction du complexe $AlCl_3$ -groupe dihydroxyle ortho uniquement.

Oxychlorure de zirconium/acide citrique

Le zirconium, employé sous forme d'oxychlorure, forme des complexes de chélation colorés en jaune, en cycle pentagonal avec le groupe hydroxyle-3-carbonyle-4 et hexagonal avec le groupe hydroxyle-5-carbonyle-4 (83). Seul le chélat pentagonal est stable en présence d'acide citrique.

L'oxychlorure de zirconium, en présence d'acide citrique, n'aura donc d'effet bathochrome que sur les spectres des flavonols ou de ceux de leurs dérivés ayant leur hydroxyle en 3 libre.

5) Hydrolyse des liaisons hétérosidiques des flavonoïdes

La vitesse d'hydrolyse des hétérosides dépend essentiellement de la nature de l'ose et de l'emplacement de la liaison hétérosidique sur l'aglycone. La nature de l'aglycone

a peu d'influence excepté dans le cas des anthocyanes.

Les L-rhamnosides et les L-arabinosides se comportent de façon identique et sont les plus rapidement hydrolysés; puis viennent les D-glucosides et les D-galactosides, et enfin, les D-glucuronosides qui sont très difficilement hydrolysés.

La vitesse d'hydrolyse selon l'emplacement de la liaison sur l'aglycone décroît dans l'ordre suivant : 3-glycosides > 4'-glycosides > 7-glycosides. La résistance des liaisons situées en 7 est telle que certains 7-O-glycosides ont pu être confondus avec des C-glycosides.

Ces différences de vitesse d'hydrolyse ont été mises à profit pour préparer certains glycosides. Nous en donnerons quelques exemples :

Hydrolyse préférentielle de certaines liaisons osidiques et hétérosiques.

- L'acide formique à la température de 75° a été utilisé pour obtenir le kempférol-4'-O-arabinoside à partir du kempférol-3-O-rhamnoside, 4'-arabinoside (85).

- Le mélange acide formique-cyclohexanol permet de libérer le rhamnose et ainsi d'obtenir : le quercétol-3-glucoside (iso-quercitroside) à partir du rutoside; l'hespérétol-7-glucoside à partir de l'hespéridoside; le naringénol-7-glucoside à partir du naringoside (86).

- Le mélange méthanol-acide chlorhydrique, aussi, a été utilisé pour l'hydrolyse ménagée du naringoside (87).

Hydrolyse totale, choix de l'acide

L'agent le plus fréquemment utilisé, pour une hydrolyse totale est l'acide chlorhydrique (HARBORNE (88)), (BATE-SMITH (89)). Nous en avons rejeté l'emploi après l'expérience suivante :

Du quercétol-3-sophoroside en milieu chlorhydrique normal est chauffé à 100° pendant 1 heure; les chromatogrammes de l'hydrolysats montrent en plus du glucose, une tache de gentiobiose.

Nous avons renouvelé l'expérience dans les mêmes conditions avec une solution de sophorose à 0,25% dans l'acide chlorhydrique 1 N. A la chromatographie sur papier on constate la présence de gentiobiose en quantité assez importante et de glucose, le sophorose ayant été totalement hydrolysé. Une réversion semblable a été signalée par OVEREND (90) au cours de l'hydrolyse du méthyl-D-glucopyranoside catalysée par l'acide chlorhydrique 2 N.

Nous avons donc adopté l'acide sulfurique qui ne présente pas de tels inconvénients (ce que nous avons vérifié).

6) Détermination du rapport moléculaire aglycone/osés.

A- Dosage de l'aglycone

L'hydrolyse totale du flavonoloside est effectuée au bain-marie à l'ébullition, à reflux pendant 2 heures avec de l'acide sulfurique N ou 2 N. L'hydrolysats est mis au réfrigérateur pendant quelques heures afin de parfaire la précipitation de l'aglycone insoluble.

L'aglycone est rapidement essorée sur büchner, lavée à l'eau glacée, desséchée à poids constant et pesée.

Quand on opère sur de petites quantités de glucoside le filtrat est agité à l'éther pour en extraire les traces d'aglycone qui pourraient rester en solution, l'éther est lavé à l'eau, et évaporé dans un cristallisoir taré.

B - Dosage des oses totaux

Au cours de nos recherches, nous avons utilisé diverses microméthodes suivant les cas :

1) La méthode volumétrique de G. BERTRAND (91) basée sur la réduction de $\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^+$.

2) La méthode colorimétrique de SOMOGYI-NELSON à l'arsénomolybdate (92 à 95).

3) La méthode colorimétrique à l'antrone.

4) La méthode colorimétrique au résorcinol présulfoné.

Les méthodes 1,2 et 3 sont appliquées après hydrolyse acide totale et séparation de l'aglycone par filtration.

Dans les cas 1 et 2, le filtrat doit être neutralisé (soit directement par $\text{Na CO}_3\text{H}$, soit par SrCO_3 suivi de filtration).

Le tableau ci-dessous rend compte des résultats que nous avons obtenus par les différentes méthodes :

	Teneur en glucose				
	Calculé pour 2 moles de glucose	trouvé par les méthodes			
		1 Bertrand	2 Somogyi-Nelson	3 Anthrone	4 Résorcinol présulfoné
Quercétol-3-sophoroside	57,51	57,6	58	57	
Kempférol-3-sophoroside	59,02		60	58	

La méthode 3 ne donne pas des résultats très constants. Quant à la méthode 4, elle peut être directement appliquée à la solution aqueuse du flavonoloside, sans hydrolyse préalable. Elle nous a donné de bons résultats quand l'hétéroside ne contenait que du glucose.

C'est la méthode 1 qui nous a donné les résultats les plus précis. Elle présente l'inconvénient d'exiger des quantités d'hétéroside beaucoup plus importantes que les méthodes colorimétriques. Le manque de précision de ces dernières provient sans doute de ce qu'il reste en solution des traces d'aglycone ou d'hétéroside dont l'absorption interfère avec celle des réactifs utilisés.

Méthode à l'antrone

Le réactif à l'antrone de DREYWOOD (96) a été diversement utilisé. Nous avons employé les conditions expérimentales suivantes :

Réactif

50 mg d'anthrone sont dissous dans 25 ml de mélange acide sulfurique-eau (4 : 1, v/v).

Dosage

De larges tubes à essais contenant 6 ml du réactif sont refroidis dans la glace pendant 3 min. On ajoute à la surface du réactif 1 ml de la solution à doser. Les tubes sont maintenus encore 5 min. dans la glace, les deux couches de liquide sont mélangées. Puis on porte les tubes recouverts de boules de verre au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, pour le dosage du glucose. Ils sont enfin refroidis dans l'eau courante.

Après 30 minutes, la densité optique est mesurée à 620 nm et comparée à une gamme étalon établie avec des quantités de glucose allant de 25 à 100 μ g.

Méthode au résorcinol présulfoné

Cette méthode est utilisable directement sur l'hétéroside, néanmoins il est parfois préférable d'effectuer l'hydrolyse à cause de la coloration propre de l'aglycone (notamment dans le cas des anthocyanes) qui peut interférer dans la mesure spectrophotométrique. On opère alors de la façon suivante :

Après hydrolyse par HClN, une heure sous azote à semi-obscurité, l'aglycone est extraite par l'alcool hexylique, et la phase aqueuse est désacidifiée par agitation avec une solution chloroformique à 10% de N-N di-n-octylméthylamine (97),

puis lavée au chloroforme. La solution aqueuse d'oses est concentrée à froid sous vide et servira au dosage selon la méthode de DEVOR, CONGER et GILL (98) décrite ci-dessous :

Réactif au résorcinol présulfoné

100 ml de H_2SO_4 concentré sont mélangés avec 10 ml d'une solution aqueuse de résorcinol à 2,1%. Le mélange est abandonné 45 à 90 minutes pour permettre la sulfonation du phénol.

Dosage

Dans un tube à essais contenant 2 ml de la solution aqueuse d'hétéroside ou d'oses (10 à 60 μg) on ajoute rapidement à la pipette 5,5 ml du réactif. Le tube est maintenu au bain-marie à l'ébullition pendant 5,5 minutes, puis recouvert et laissé à la température ordinaire pendant 45 minutes.

La densité optique est alors mesurée à 496 nm pour le glucose, et comparée à une gamme étalon établie avec des quantités d'ose témoin allant de 10 à 60 μg .

7) Détermination du rapport moléculaire glucose/rhamnose.

La méthode de dosage simultané d'hexoses et de méthylpentoses de DISCHE et SHETTLES (99, 100), selon les techniques décrites par MONTREUIL et SPIK (101), dans les hydrolysats totaux de flavonosides ne nous a pas donné de résultats satisfaisants pour les mêmes raisons que dans le dosage des oses totaux.

Nous avons donc été obligée d'effectuer une séparation chromatographique sur papier du rhamnose et du glucose que nous avons dosés selon deux méthodes. Dans les deux cas nous avons utilisé le papier Whatman n° 1 et le mélange solvant V.

L'hydrolysate est d'abord neutralisé par le carbonate de strontium et filtré.

A - Dosage après révélation du chromatogramme

Nous avons essayé la technique décrite par DAVY (102) de révélation à la phénylhydrazine (réactif de Delsal), élution des taches par le même réactif et lecture au spectrophotomètre à 400 nm.

Si ce procédé convient bien pour le dosage du glucose, du galactose et du fructose, et révèle les taches de rhamnose, les densités optiques des éluats de ce dernier ose ne sont pas proportionnelles aux quantités déposées sur le chromatogramme.

Nous avons adopté la technique décrite par MONTREUIL, SPIK et KONARSKA (103).

Nous déposons sur le papier des quantités croissantes de témoins de glucose et de rhamnose allant de 50 à 250 μ g en des points espacés de 4 cm, et l'hydrolysate, éventuellement après concentration, en un point central du chromatogramme. Après développement et séchage à l'air froid on pulvérise régulièrement le réactif au citrate d'aniline de DATE (104) sur les deux faces du chromatogramme. On laisse le chromatogramme s'imbiber du réactif pendant 3 mn puis on le porte à l'étuve à 105° pendant 15 minutes.

On découpe des rectangles de papier de surfaces égales contenant la totalité de la tache correspondante, ainsi que des rectangles témoins de la coloration de fond du papier que l'on prélève à des niveaux différents du chromatogramme.

On introduit les rectangles de papier dans des tubes bouchés émeri contenant 15 ml d'éthanol à 80% 0,1 N en acide chlorhydrique (élution selon HUGUES et JEANLOZ (105)). On laisse en contact pendant 4 heures à température ordinaire, et on mesure la densité optique à 398 nm pour le glucose et 382 nm pour le rhamnose. Les densités optiques données par la gamme de témoins sont reportées sur un graphique, et on déduit les quantités de glucose et de rhamnose contenus dans l'hydrolysate.

B - Dosage après élution des oses du chromatogramme

Nous déposons la solution à doser en une ligne continue s'arrêtant à 4 cm des bords de la feuille de papier. Après développement et séchage, nous découpons de chaque côté de la feuille une bande de 7 cm que nous révélons au réactif à l'o-phénylènediamine par exemple. On repère ainsi l'emplacement des deux oses et on découpe les deux bandes transversales en laissant une marge assez large par rapport aux bandes d'oses révélés.

Chaque bande non révélée est cousue selon sa plus petite dimension à un rectangle du même papier à chromatographie.

C'est ce dernier qui est plongé dans l'augette contenant de l'eau distillée et on procède à une chromatographie

descandante dans une enceinte close pendant 24 heures à 36 heures. Le liquide de développement est recueilli dans des fioles jaugées surmontées d'un entonnoir et contenant une goutte de toluène. A la fin de l'opération on s'assure que les oses ont bien été élués en révélant les bandes de papier.

Sur les solutions d'oses ainsi séparés, nous effectuons le dosage par le réactif à la cystéine sulfurique (99, 100). Le temps de chauffage pour le dosage du glucose est de 3 minutes et la lecture effectuée au maximum d'absorption à 412 nm. Le rhamnose est dosé avec un temps de chauffage de 10 minutes et mesure de l'absorption à 398 nm.

8) Obtention d'oligosaccharides par hydrolyse ménagée

1) Microméthodes

Les hétérosides que nous avons isolés comportent tous un oligosaccharide dans leur molécule. Afin d'étudier ou d'identifier ce dernier, nous avons recherché les moyens d'en obtenir la plus grande quantité possible. Par les microméthodes d'hydrolyse ménagée et chromatographie, nous déterminons d'abord l'agent et le temps d'hydrolyse qui concilient le maximum d'hydrolyse de la liaison hétérosidique avec le minimum d'hydrolyse des liaisons des oses entre eux. De plus cet éventail de méthodes qui ne consomment chacune que de 1 à 5 mg d'hétéroside, permet de vérifier dans les cas douteux, que le ou les oligosaccharides obtenus sont toujours de même Rg et ne sont pas des artéfacts.

- Méthanol chlorhydrique

Nous avons adapté la méthode d'ABE et HAYASHI (106) dans le but de suivre l'apparition d'oligosaccharides et d'oses au cours de l'hydrolyse de l'hétéroside de Populus, qui par la suite s'est révélé comporter un trisaccharide branché.

5 mg d'hétéroside sont dissous dans 0,4 ml de méthanol puis on ajoute 0,2 ml d'eau et 0,3 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le liquide est aspiré dans des tubes capillaires. Les tubes sont scellés à la flamme et plongés dans un bain-marie à 70°. On prélève successivement les capillaires à intervalles réguliers. Le liquide est transvasé dans une micro-pipette et nous en déposons 20 μ l sur le chromatogramme sans neutralisation préalable, mais en prenant la précaution de sécher les dépôts à l'air froid.

Par la suite nous n'avons plus utilisé le méthanol chlorhydrique, car nous n'obtenions après 15 minutes d'hydrolyse qu'une faible tache du trisaccharide qui nous intéressait, une tache de disaccharide, et des monosaccharides en proportion trop importante. Après 45 mn la tache de trisaccharide avait disparu.

- Acide sulfurique

Pour la méthode de routine, nous avons adopté l'acide sulfurique 0,02 N. Nous dissolvons 1 à 2 mg d'hétéroside dans 0,2 ml d'eau, ajoutons 0,2 ml d'acide sulfurique 0,04 N et mettons en capillaires comme précédemment. Ceux-ci sont plongés dans un bain-marie à l'ébullition. 20 à 30 μ l d'hydrolysat sont

chromatographiés sans neutralisation préalable, après des temps de chauffage de 10 - 20 - 40 - 80 - et 120 mn.

- Acide acétique

En utilisant l'acide acétique à 10% (107, 108) au bain-marie à l'ébullition, l'hydrolyse est beaucoup plus lente qu'avec l'acide sulfurique dilué et la proportion de monosaccharides aussi grande. Dans le cas de l'hétéroside de Populus, nous obtenions une trace de trisaccharide après 1 h 30 d'hydrolyse; après 4 heures, la tache s'accroissait mais apparaissaient aussi le disaccharide et les monosaccharides.

- Oxydation permanganique

Pour l'étude de ce même hétéroside, nous avons également utilisé la méthode de CHANDLER et HARPER (109). 2 à 3 mg d'hétéroside sont dissous dans 0,7 ml d'acétone et additionnés de 0,02 ml d'ammoniaque 0,1 N et de 0,3 ml d'une solution de permanganate de potassium 0,5 N. On laisse à température ordinaire pendant 45 minutes. La solution est additionnée de 2 à 3 gouttes d'aldéhyde formique à 10% et filtrée. Le filtrat est agité avec quelques grains de DOWEX 50 X 8 forme H⁺. 200 µl du surnageant sont chromatographiés sur papier.

Nous avons ainsi obtenu une tache de trisaccharide et une trace de disaccharide.

2) Hydrolyses ménagées à l'échelle préparative

- Acide sulfurique (Préparation du sophorose)

1 gramme de quercétol-3-sophoroside est dissous à chaud dans 100 ml d'acide sulfurique 0,04 N. On maintient au

bain-marie à l'ébullition à reflux pendant 1 heure.

L'hydrolysat est abandonné au réfrigérateur pendant une nuit. Le précipité qui s'est formé est éliminé par filtration. Le filtrat est neutralisé par le carbonate de strontium et filtré, puis évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris à l'ébullition par un peu d'eau et de l'éthanol à 95°, filtré et abandonné à la cristallisation. Nous avons obtenu 0,14 g de sophorose en longues aiguilles.

En employant un mélange d'acétate d'éthyle - éthanol à 95° (5 : 4), il cristallise en forme d'oursins.

- Résine de polystyrène sulfoné

A la suite des travaux de MONTREUIL et CHOSSON (110), CHOSSON, MONTREUIL et SCHEPPLER (111) et ADAM-CHOSSON et MONTREUIL (112) sur l'hydrolyse de l'ovomucoïde au moyen des résines de polystyrène sulfoné, nous avons pensé pouvoir appliquer ce procédé à l'obtention d'oligosaccharides à partir d'hétérosides. Il nous a été particulièrement utile dans l'étude du flavonoloside de Populus.

a) Hydrolyse du flavonoloside de Populus

Nous avons d'abord déterminé le temps optimum d'hydrolyse de cet hétéroside sur une trentaine de milligrammes. Par le procédé de dosage après révélation des chromatogrammes au citrate d'aniline, nous avons établi les cinétiques de libération de trisaccharide, disaccharide, de glucose et de rhamnose. Nous avons alors adopté les conditions suivantes :

300 mg du flavonoloside dissous dans 60 ml d'eau sont hydrolysés par 24 ml de Dowex 50 x 8 (200-400 mesh) forme H⁺ au bain-marie à l'ébullition, avec agitation pendant 80 minutes.

Le mélange chaud est rapidement filtré sur une colonne comportant une base de verre fritté, en s'aidant du vide, au besoin, ceci pour éviter que l'aglycone et l'hétéroside partiellement hydrolysé s'insolubilisent à froid, ne colmatent la résine. La résine est ensuite lavée par 500 ml d'eau. Les effluents réunis sont abandonnés une nuit au réfrigérateur, filtrés et concentrés sous pression réduite à température inférieure à 45°.

Isolement des oligosaccharides

Cet hydrolysate est chromatographié sur papier Whatman n° 3 MM dans le solvant V qui permet de bien séparer les oligosaccharides du glucose et du rhamnose ainsi que des pigments restant en solution. Les bandes contenant le disaccharide et le trisaccharide sont éluées par l'eau. Chacun est à nouveau purifié par chromatographie sur papier dans le solvant K.

Après élution, ils sont précipités de leur solution hydroalcoolique par l'éther éthylique.

Rendement

Au total, nous avons obtenu 66 mg de disaccharide et 96 mg de trisaccharide à partir de 600 mg de l'hétéroside de Populus.

b) Préparation du rutinose

Pour préparer à partir du rutoside le rutinose dont nous avons besoin comme témoin de chromatographie, nous avons opéré dans les mêmes conditions avec le Dowex 50 x 8. Le rutinose a été séparé du rhamnose et du glucose par chromatographie sur colonne de charbon-célite. Le lavage de la colonne par l'eau élimine les monosaccharides; le rutinose est ensuite élué par l'éthanol à 10°.

c) Hydrolyse de naringoside

Il a été impossible d'obtenir le néohespéridose à partir du naringoside. Par le même procédé aux résines échangeuses de cations, l'hydrolyse ne libère que les monosaccharides.

L'acide sulfurique 0,02 N fait de même. Sur les chromatogrammes des prélèvements faits à des intervalles de 10 minutes au cours de l'hydrolyse, on vérifie que le rhamnose est libéré en premier, puis apparaît le glucose, mais à aucun moment, on n'observe de tache de disaccharide.

9) Détermination de la position des liaisons hétérosidiques et holosidiques par méthylation.

Sous l'action d'agents tels que le diazométhane, le sulfate de méthyle ou l'iodure de méthyle, les hydroxyles libres sont substitués par des groupes méthoxy. Ce sera le cas des hydroxyles phénoliques de l'aglycone non engagés dans une liaison hétérosidique et, dans la chaîne glucidique de ceux des hydroxyles alcooliques qui ne participent ni à la liaison

des oses entre eux ni à leur cyclisation.

Après hydrolyse du produit complètement méthylé, on pourra identifier l'aglycone et les oses O-méthylés libérés et en déduire la position des liaisons dans la molécule d'hétéroside.

La réactivité des hydroxyles phénoliques étant bien plus grande que celle des hydroxyles alcooliques des sucres, on est obligé de mettre en oeuvre deux types de techniques de méthylation différentes, selon que l'on veut étudier par la suite l'aglycone ou la partie glucidique.

Il est logique de penser que les deux types de méthylation appliqués successivement sur l'hétéroside permettraient d'obtenir un unique dérivé complètement méthylé, à partir duquel, après hydrolyse on pourrait identifier les oses et l'aglycone méthylés par les méthodes adéquates.

Nous avons pu constater qu'il n'en est rien, en effet - L'hétéroside de Populus a été méthylé selon une des méthodes convenant aux polyphénols, puis par la méthode appropriée aux glucides la plus efficace. Après les deux traitements, la méthylation de la chaîne glucidique était à peine plus avancée qu'après la première étape.

- Les méthodes dont relèvent les glucides sont très drastiques et se font en milieu alcalin, ce qui dégrade profondément la partie flavonoïdique de la molécule. L' "aglycone" alors recueillie après hydrolyse est inutilisable aux fins d'identification.

Il est donc nécessaire d'effectuer séparément les deux méthylations, l'une pour déterminer l'emplacement de la liaison hétérosidique sur l'aglycone, l'autre pour situer les liaisons entre les molécules d'oses.

A) Méthylation du noyau flavonoïdique

a) Diazométhane

Les hydroxyles phénoliques sont aisément méthylés, et sans addition de catalyseur, par le diazométhane.

Nous l'avons parfois utilisé pour méthyler de petites quantités de substance, car dans le cas des flavonoïdes, un excès de ce réactif ne provoque pas d'isomérisations.

- Diverses méthodes de préparation du diazométhane

Elles sont très nombreuses et la plupart d'entre elles sont basées sur la décomposition en milieu alcalin des combinaisons du type $\text{CH}_3 - \text{N} \begin{matrix} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{X} \end{matrix} = \text{O}$ (113) :

- X = $\text{CO}_2\text{-C}_2\text{H}_5$ nitrosométhyluréthane (114)
- = CO-NH_2 nitrosométhylurée (115, 116, 117)
- = CO-CH_3 nitrosométhylacétamide (117)
- = $\text{CO-C}_6\text{H}_5$ nitrosométhylbenzamide (118)
- = $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{-CO-CH}_3$ méthylnitroso-méthylaminoisobutylcétone (119, 120)
- = $\text{CH}(\text{NH})\text{NH-NO}_2$ nitrosométhylnitroguanidine
- = $\text{SO}_2\text{C}_7\text{H}_7$ nitrosométhyl-p-toluène sulfonamide (121, 122)
- = $\text{CO-C}_6\text{H}_4\text{-CO-N}(\text{NO})\text{CH}_3$ bis-(N-méthyl-N-nitroso) téréphtalamide (123)

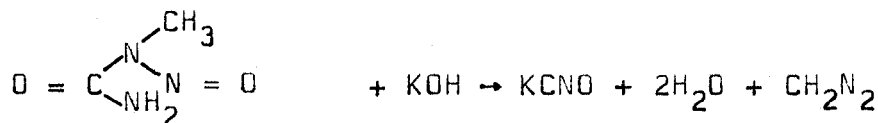
D'autres méthodes sont basées sur les réactions suivantes :

- Hydrazine (+ KOH + CHCl_3) (124)
- N, N' dinitroso-N, N'-diméthylloxamide (+ butoxyde de sodium) (125)
- Chlorure de nitrosyle + méthylamine (→ méthyldiazotates alcalins) (126)
- Formaldéhyde-oxime (sel de Na) + chloramine (127), etc (128)

Les références 116 et 122 décrivent les méthodes d'obtention du diazométhane marqué (^{14}C).

- Méthode employée

Parmi toutes ces méthodes nous avons utilisé celle qui est basée sur la décomposition, en milieu alcalin, à froid, de la N-nitrosométhylurée (115) : le rendement est bon, les 2/3 environ de la théorie :



Préparation

Le diazométhane étant un gaz explosif et toxique, on l'obtient et on l'utilise en solution étherée.

2,5 g (0,024 mole) de nitrosométhylurée récemment cristallisée dans le méthanol sont ajoutés peu à peu (pendant 5 minutes environ) dans un erlenmeyer refroidi dans un bain de glace contenant une solution aqueuse de potasse (KOH : 3 g; H_2O : 7 ml) et 25 ml d'éther éthylique, en agitant de temps en temps.

La solution étherée de diazométhane est décantée, filtrée rapidement, et séchée pendant 2 h sur quelques pastilles de potasse, au réfrigérateur.

La solution étherée de diazométhane est finalement décantée et gardée au réfrigérateur où elle se conserve assez bien.

Dosage

Le diazométhane est dosé en retour : on fait réagir à 0° une partie aliquote de la solution étherée avec une solution étherée d'acide benzoïque 0,2 N, puis l'excès d'acide benzoïque est titré par la soude 0,1 N (115, 117).

Méthylation

La méthylation, en solution étherée, est aisée, l'azote étant le seul produit secondaire de la réaction



Chez quelques flavonoïdes on a signalé une certaine résistance à la méthylation de l'hydroxyle en position 5. Etant donné que l'éther éthylique diminue parfois la réactivité du diazométhane, ce dernier peut être aussi employé à l'état naissant (119).

Le flavonoïde est mis en solution dans du méthanol anhydre, et, parfois l'éther éthylique. L'acétone peut aussi être utilisée, dans des opérations de courte durée seulement; on a utilisé également la diméthylformamide (129).

Technique

On dissout, dans un flacon bouché émeri, 50 à 100 mg de flavonoïde dans 10 à 20 ml de méthanol. On ajoute peu à peu la solution étherée de diazométhane en excès (25 ml contenant 0,7 g de CH_2N_2) en évitant la précipitation du flavonoïde, si nécessaire, par addition d'un peu de méthanol. On laisse 24 h au réfrigérateur, en agitant de temps en temps, puis 16 à 20 h à la température ordinaire.

On laisse les solvants s'évaporer spontanément, et on recueille le dérivé méthylé cristallisé. Dans certains cas il est recristallisé dans le méthanol ou l'éthanol; on peut encore le purifier par chromatographie sur colonne de Florisil (130).

b) Sulfate de méthyle

Le sulfate de méthyle a été diversement utilisé : en solution méthanolique et en présence de potasse aqueuse, dans ce cas, les hydroxyles en 5, chélatés, ne sont pas méthylés (131). En solution acétonique et en présence de soude la méthylation est complète (131).

Nous avons employé la méthode de RAO et SESHADRI (132) où l'on fait agir le sulfate de méthyle en solution acétonique et en présence de carbonate de potassium anhydre. La méthylation est complète (74).

Technique

150 mg de flavonoloside sont dissous à chaud dans 50 ml d'acétone anhydre. On ajoute 2,5 ml de sulfate de méthyle puis, peu à peu, 3 gr de K_2CO_3 anhydre. On maintient à l'ébullition à reflux pendant 30 heures. Le mélange est ensuite filtré sur verre fritté et le résidu lavé par de petites quantités d'acétone. Le filtrat est concentré sous pression réduite, et, par addition d'un excès d'eau, le dérivé méthylé précipite.

B) Méthylation de la chaîne glucidique

Nous avons d'abord appliqué aux hétérosides les techniques couramment utilisées dans notre laboratoire et réalisant une parfaite méthylation des oligosaccharides. Ces techniques font appel à plusieurs systèmes d'agents de méthylation :

- iodure de méthyle/oxyde d'argent
- iodure de méthyle/baryte

Il est nécessaire de faire agir les réactifs plusieurs fois sur la substance et de la séparer à chaque fois des produits de la réaction, ce qui provoque inévitablement des pertes. La quantité minimale d'oligosaccharide que l'on pouvait étudier par méthylation était d'une dizaine de milligrammes.

D'autre part, on a constaté qu'une alternance des systèmes d'agents de méthylation donnait les meilleurs résultats.

N'obtenant pas sur les hétérosides les résultats escomptés, nous avons employé le système :

- iodure de méthyle/hydrure de lithium (133)

La méthylation se trouvait plus avancée que par les systèmes précédents mais n'était pas encore totale.

Enfin la méthode de HAKOMORI (134) avec le système :

- iodure de méthyle/hydrure de sodium

nous a permis en même temps de résoudre le problème de la méthylation des flavonosides et d'abaisser jusqu'à quatre milligrammes les quantités d'oligosaccharide à mettre en oeuvre dans une étude par méthylation.

a) Iodure de méthyle/oxyde d'argent

Dans un erlenmeyer à col rodé on introduit dix à vingt milligrammes d'oligosaccharide que l'on met en solution dans 3 ml de diméthylsulfoxyde et de 3 ml de diméthylformamide. On ajoute 1 g d'oxyde d'argent et 4 ml d'iodure de méthyle. On laisse à l'abri de la lumière, sous réfrigérant à reflux et avec agitation constante pendant une nuit ou 24 heures, à température ordinaire.

On filtre sur papier en lavant soigneusement le résidu solide et le filtre avec du chloroforme. Le filtrat est complété à une centaine de ml avec du chloroforme et mis au réfrigérateur pendant 1 heure. Le précipité qui s'est formé est éliminé par filtration. La solution chloroformique est lavée avec une solution de thiosulfate à 2% jusqu'à décoloration puis trois fois avec de l'eau. On déshydrate sur sulfate de

sodium, filtre, et le chloroforme est éliminé par distillation sous pression réduite.

b) Iodure de méthyle/oxyde de baryum

Le résidu est repris et entraîné en plusieurs fois dans un erlenmeyer par les mêmes réactifs que précédemment, mais l'oxyde d'argent est remplacé par 0,2 g d'oxyde de baryum pulvérisé. L'extraction et les lavages se font de la même façon.

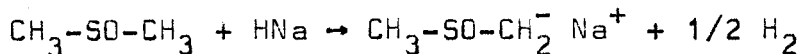
c) Iodure de méthyle/hydrure de lithium

Une centaine de milligrammes d'hétéroside est dissoute dans 10 ml de diméthylformamide, on ajoute 2,5 ml d'iodure de méthyle et 0,5 g d'hydrure de lithium. On porte au bain d'huile à 60° sous réfrigérant à reflux, avec une agitation constante pendant 20 heures, en ajoutant de l'iodure de méthyle quand on n'aperçoit plus de reflux dans le réfrigérant. On dilue le mélange avec du chloroforme et on filtre en lavant soigneusement le résidu solide et le filtre. La solution chloroformique est lavée avec une solution de thiosulfate de sodium à 2%, puis trois fois avec de l'eau et enfin déshydratée. Le chloroforme est éliminé par distillation sous pression réduite.

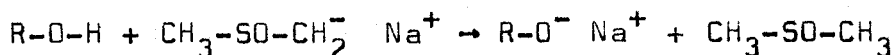
d) Iodure de méthyle/hydrure de sodium

Nous avons adopté la technique décrite par SANDFORD et CONRAD (135) qui s'effectue en trois temps :

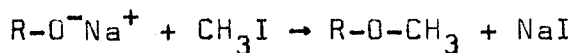
- Préparation de l'anion méthylsulfinique



- Action de l'anion méthylsulfinique sur l'hétéroside



- Méthylation proprement dite



- Préparation de l'anion méthylsulfinique

Dans un flacon à 3 tubulures, dont l'une sera surmontée d'un réfrigérant muni d'un bouchon, l'autre contiendra un thermomètre et la troisième sera obturée par un bouchon de caoutchouc, on introduit 1,5 g d'hydrure de sodium (en dispersion dans l'huile 50%) et un barreau aimanté.

L'hydrure de sodium est lavé plusieurs fois par décantation avec du n-pentane. Puis on évapore le reste du pentane en plusieurs fois, au moyen d'une pompe à vide par l'intermédiaire d'une aiguille à injection piquée dans le bouchon de caoutchouc. Entre chaque évaporation on injecte de l'azote. Puis on fait circuler continuellement de l'azote, et au moyen d'une seringue, on ajoute 30 ml de diméthylsulfoxyde. On agite à 50°, jusqu'à ce que le dégagement d'hydrogène cesse et que la solution soit devenue parfaitement limpide et d'une couleur verdâtre, ce qui demande de deux à trois heures.

Nous avons pu conserver pendant cinq mois l'anion méthylsulfinique ainsi préparé, sous une couche d'octane, au congélateur.

- Action de l'anion méthylsulfinique sur l'hétéroside

Dans un flacon à trois tubulures, équipé comme précédemment, on dissout 250 mg d'hétéroside bien sec dans 20 ml de diméthylsulfoxyde et, sous courant d'azote on injecte 10 ml de la base. La solution devient alors trouble. On agite à température ordinaire pendant quatre heures.

- Méthylation

On ajoute sans interrompre l'agitation, lentement, 4 ml d'iodure de méthyle en refroidissant le flacon de façon à ce que la température ne s'élève pas au-dessus de 25°. La solution devient alors limpide.

Après une vingtaine de minutes on dilue la solution avec du chloroforme; on lave à l'eau, dessèche et le chloroforme est évaporé sous pression réduite.

e) Hydrolyse des hétérosides méthylés

Le résidu est dissous dans quelques gouttes d'éthanol absolu et hydrolysé par l'acide sulfurique 4 N au bain-marie à l'ébullition, sous réfrigérant, pendant quatre heures. Après un séjour de quelques heures au réfrigérateur, l'aglycone est éliminée par filtration sur verre fritté. L'hydrolysate est neutralisé par un excès de carbonate de strontium, filtré, et concentré sous pression réduite à température inférieure à 40°.

f) Identification chromatographique des oses méthylés

Les oses tri- et tétraméthylés sont identifiés par chromatographie sur papier selon la technique de PETEK (136)

et comparés à des témoins préparés à partir de saccharides ou d'hétérosides de structure connue. On utilise le papier Whatman n° 1, ou, pour une identification rapide, le "Chromagram Eastman" (Kodak) imprégnés de chlorure d'ammonium en chromatographie ascendante dans le solvant A.

g) Comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes de méthylation

Nous avons réuni en un tableau les diverses substances que nous avons méthylées soit pour en étudier la structure, soit pour préparer des témoins d'oses méthylés, soit enfin pour éprouver l'efficacité des méthodes, avec, pour chacune, le nombre et la nature des traitements qu'elles ont subi. Nous avons apprécié le degré de méthylation atteinte d'après les résultats de la chromatographie sur papier des oses méthylés libérés par hydrolyse.

Dans le cas des hétérosides, la seule méthode qui nous ait permis de réaliser une méthylation complète, est celle de HAKOMORI.

Dans le cas des oligosaccharides et du ribose, elle permet d'atteindre en une seule séquence de quelques heures, des résultats qui nécessitaient plusieurs traitements de 24 heures chacun.

Enfin, les pertes au moment des extractions et des lavages s'en trouvant réduites, nous avons pu diminuer de moitié les quantités de saccharide nécessaires à une étude par méthylation.

		Nombre de traitements par					Nombre total d'opérations	Degré de méthylation	
		Diazométhane	Sulfate de méthyle/ K_2CO_3	Iodure de méthyle					
				Oxyde d'argent	Oxyde de baryum	Hydruure de lithium			Hydruure de sodium
Raffinose	a)			3	2			5	Complète
	b)						1	1	Complète
Sophorose				2	1			3	Complète
Quercétol-3-sophoroside	a)		1	1	1			3	Incomplète
	b)						1	1	Complète
Rutoside	a)			16				16	Incomplète et apparition de tétraméthylglucose
	b)					1		1	Incomplète mais plus avancée que a) et sans dégradation
	c)			2	4			6	Incomplète
	d)						1	1	Complète
Naringoside							1	1	Complète
Hétéroside de <u>Populus</u>	a)		1	4				5	Incomplète
	b)			2		5		7	Incomplète mais plus avancée que a)
	c)	1					1	2	Incomplète
	d)						1	1	Complète
Ribose	a)			5	1			6	Incomplète
	b)						1	1	Incomplète mais au même stade que a)

II. ISOLEMENT ET ETUDE D'UN FLAVONOL-TRIOSIDE DU POLLEN DE

POPULUS YUNNANENSIS DODE ET DE P. LASIOCARPA OLIVER.

INTRODUCTION : Les trisaccharides liés aux flavonols.

Peu de flavonolosides comportant un trisaccharide ont été signalés, et d'une façon générale, l'étude de la structure de leur partie glucidique ne semble pas avoir intéressé les auteurs.

MUMFORD et coll. (137) ont isolé un p-hydroxycinnamoyl-triglucoside en 3 du kempférol des pousses de pois étiolés.

FURUYA et coll. (138) ont isolé de Pisum sativum L. un p-coumaroyl-triglucoside en 3 du kempférol, et (139) un quercétol-3-triglucoside, et un kempférol-3-triglucoside ainsi que leur ester p-coumarique de divers organes de cette même plante. Selon HARBORNE (140) ces triglucosides comporteraient une, sinon deux, liaisons β (1 \rightarrow 2).

HARBORNE et SHERRAT (141) ont isolé des pétales de Primula sinensis un triglucoside en 3 du quercétol et un triglucoside en 3 du kempférol; ce dernier libère par hydrolyse ménagée du glucose et du gentiobiose caractérisé par ses Rg.

HEDIN et coll. (142) ont isolé, des pétales de Hibiscus esculentus un triglucoside en 3 du quercétol qui leur semble être celui de Primula sinensis.

NAITO (143) a isolé des feuilles de mûrier des glucosides du quercétol, dont l'un, nommé moracétine semble être un quercétol-3-triglucoside.

A partir d'une préparation commerciale de xanthorhamnoside, probablement extrait de Rhamnus infectoria, NYSTROM et coll. (144) ont séparé trois glycosides, l'un du quercétol, l'autre du rhamnétol (méthyl-7-quercétol) le troisième de la rhamnazine (diméthyl-7, 3'-quercétol), tous substitués en position 3 et libérant par hydrolyse 2 molécules de rhamnose et 1 molécule de glucose. Le trisaccharide doit correspondre au rhamninose de TANRET et TANRET (145).

OSHIMA et NAKABAYASHI (146 à 148) et ROBERTS et coll. (149, 150) ont isolé des feuilles de thé des rhamnodiglycosides en position 3 du kempférol et du quercétol.

HARBORNE (49) a également isolé des pétales de Solanum tuberosum des rhamnodiglycosides en 3 du kempférol et du quercétol qui libèrent par hydrolyse ménagée des rutinosides en 3 du quercétol et du kempférol, et du rutinose. Par leurs Rf, ces rhamnodiglycosides diffèrent de ceux du thé (151).

Enfin, comme nous l'avons déjà signalé TAPPI et MENZIANI (56) ont isolé du pollen de Lilium candidum un glucosido-rhamnosido-galactoside en 3 de l'isorhamnétol.

Analyses

$C_{33}H_{40}O_{20} = 756,68$	H_2O		Masse Moléculaire	C %	H %
	%	moles			
Produit de la première précipitation à l'éther	trouvé	6,6	810,73	48,81	5,73
	calculé	6,66		3	48,68
Produit de la deuxième précipitation à l'éther	trouvé	10,80	846,76	46,82	5,86
	calculé	10,64		5	46,81

2) Propriétés physiques

=====

Le flavonoloside à 5 molécules d'eau fond avec décomposition à 285° en capillaire et à 345-46° au bloc (instantanée).

Le flavonoloside anhydre a un pouvoir rotatoire de :
 $[\alpha]_{546} = - 105,6^\circ$; $[\alpha]_{578} = - 87,4^\circ$ (c = 1,57 dans l'éthanol à 50%).

Le pouvoir rotatoire de son dérivé acétylé est de :
 $[\alpha]_{546} = - 97^\circ$; $[\alpha]_{578} = - 84,1^\circ$ (c = 1,23 dans le méthanol)

Les Rf x 100 du flavonoloside se trouvent résumés ci-dessous :

Mélanges-solvants							
C	B	J	L	E	G	H	I
4	47	48	50	63	70	78	84

Ils permettent d'observer que le rapport 100.

$$\frac{Rf(H) - Rf(B)}{Rf(H)} = 39 \text{ est celui d'un trioside de flavonol (152).}$$

Son spectre ultra-violet (Fig. 1) présente deux maximums d'absorption : (I) à 266 nm et (II) à 350 nm.

Il est, évidemment, de par la nature de l'aglycone et la position de la liaison hétérosidique, très voisin du spectre u.v. du kempférol-3-rhamnoglucoside de Solanum tuberosum* et subit les mêmes modifications en présence de Al Cl₃ par exemple, mais son comportement chromatographique, que nous avons déterminé (tableau ci-dessous), est différent, ce qui souligne la différence de structure dans la partie glucidique.

	Mélanges-solvants			
	B	J	L	H
Rf x 100 du kempférol-3-rhamnoglucoside de <u>Solanum tuberosum</u>	44,5	64,5	36	76,9

* Nous remercions vivement M. le Professeur J.B. HARBORNE pour l'envoi d'un échantillon de kempférol-3-rhamnoglucoside.

Les pics principaux de son spectre infra-rouge (fig.) se situent à 3.400 (hydroxyles); 2.930; 1.666 (carbonyle de l'hétérocycle); 1.617 (liaisons C = C aromatiques); 1.515; 1.452; 1.370 (hydroxyles phénoliques); 1.076; 990; 892 cm^{-1}

3) Hydrolyse acide quantitative du flavonoloside
=====

A) Détermination du rapport moléculaire aglycone/oses

L'hydrolyse acide totale de 0,0289 g de flavonoloside anhydre libère 0,0109 g d'aglycone (soit 37,7%; calculé pour un rhamnosidodiglycoside du kempférol : 37,82%).

Le pouvoir réducteur du filtrat, déterminé par cuprimétrie correspond à celui de 18,15 mg de glucose (soit 62,8% exprimé en glucose; calculé pour deux molécules de glucose et une de rhamnose 69,31% d'oses).

Par chromatographie sur papier, nous avons mis en évidence du rhamnose et du glucose.

B) Identification de l'aglycone

L'aglycone a été recristallisée dans l'éthanol à 80°.

Analyse

Trouvé % C = 62,62 ; H = 3,67

Calculé pour $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ % C = 62,94 ; H = 3,52

F 282°-3° (en capillaire) non abaissé après mélange avec du kempférol authentique.

Ses Rf (x 100, ci-dessous) sont identiques à ceux du kempférol

Mélanges solvants		
C	L	J
39	84	85

Son spectre ultra-violet, avec ses deux maximums (I) 266 nm et (II) 368 nm, et son spectre infra-rouge sont identiques à ceux du kempférol.

C) Détermination du rapport moléculaire glucose/rhamnose

- Par dosage spectrophotométrique, après élution des taches révélées par le citrate d'aniline sur les chromatogrammes de l'hydrolysat total du flavonoloside, nous avons trouvé un rapport glucose/rhamnose de 1,86.

- Par dosage à la cystéine sulfurique de chaque ose après séparation chromatographique sur papier et élution, le rapport moléculaire trouvé est de 2,02.

Les résultats de l'hydrolyse totale du flavonoloside, permettent de conclure qu'il est constitué de :

1 mole de kempférol

2 moles de glucose

1 mole de rhamnose

4) Emplacement de la liaison hétérosidique
=====

A) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet du flavonoloside.

Les figures 3,4 et 5 représentent les spectres de l'hétéroside en présence des divers réactifs décrits dans la première partie de ce travail.

Nous avons résumé la position de leurs maximums d'absorption respectifs dans le tableau ci-dessous :

Maximums d'absorption dans l'u.v. en nm du flavonoloside			
	I		II
Méthanol	266		350
	$\epsilon_m = 17.550$		
Acétate de sodium	274	(302)	366-372
Méthylate de sodium	274	326	397
ZrOCl ₂ /acide citrique	266		350
Cl ₃ Al	274	304-306	355 400

Le déplacement bathochrome de 8 nm du maximum I en présence d'acétate de sodium révèle un hydroxyle libre en position 7 du kempférol. Sous l'effet de ce réactif, le déplacement de 20 nm du maximum II indique l'ionisation de l'hydroxyle en position 4' (78).

La stabilité du flavonoloside en présence de méthylate de sodium et le déplacement de 47 nm du maximum II sans diminution de son intensité montrent que soit l'hydroxyle en position 3, soit l'hydroxyle en position 4' est protégé. On parvient à la même conclusion en observant que le maximum II du flavonoloside est décalé de -18 nm par rapport au maximum II de son aglycone (80).

L'absence de modification du spectre du flavonoloside par l'oxychlorure de zirconium en présence d'acide citrique confirme que c'est l'hydroxyle en 3 qui se trouve protégé.

Enfin, le déplacement bathochrome de 45 nm seulement du maximum II par addition de chlorure d'aluminium indique que l'hydroxyle en 5 est libre.

B) Méthylation du noyau flavonoïdique

60 mg du flavonoloside en solution acétonique ont été méthylés par le sulfate de méthyle en présence de carbonate de potassium, à l'ébullition à reflux pendant 30 heures; le produit ne donne alors plus de coloration avec le chlorure ferrique. Après hydrolyse acide, l'aglycone méthylée a été recueillie par filtration sur verre fritté, purifiée par chromatographie sur papier dans le solvant (J) et cristallisée dans l'éthanol.

Aglycone méthylée

F = 132° (bloc instantané)

M = 328 (par spectrométrie de masse) ce qui correspond à un triméthyl kempférol. Calculé pour $C_{18}H_{16}O_6$: 328,31. Ses maximums d'absorption se trouvent résumés dans le tableau ci-dessous :

Triméthylkempférol			
Maximums d'absorption dans l'ultra-violet, nm			
	I		II
Méthanol	256-257		355
ZrOCl ₂ / acide citrique	256	285	410
Cl ₃ Al	267	335	416-420
Acétate de sodium/acide borique	256-257	310	356
Acétate de sodium	256-257	310	354-356
Ethylate de sodium	258		370-375

L'ensemble de ces données montre qu'il s'agit du triméthyl 5,7,4' kempférol.

En effet, à l'inverse de ce qui se produit avec le flavonoloside, l'addition d'acétate de sodium ne provoque aucune modification du spectre.

Le triméthylkempférol est stable en milieu alcalin et son déplacement du maximum II de + 17 nm sans diminution de son intensité montre que, soit l'hydroxyle en 3, soit l'hydroxyle en 4' est protégé.

Il se forme un complexe avec l'oxychlorure de zirconium stable en présence d'acide citrique, ce qui provoque un déplacement bathochrome du maximum II de 55 nm; ceci montre que c'est l'hydroxyle en 3 qui se trouve libre.

Enfin, le déplacement important de + 66 nm du maximum II en présence de chlorure d'aluminium correspond bien à un hydroxyle libre en position 3.

Les données spectrales du flavonoloside et l'identification au triméthyl-5,7,4' kempférol de l'aglycone après méthylation et hydrolyse du flavonoloside montrent qu'il s'agit d'un glycoside en 3 du kempférol et que les trois molécules d'oses libérés par hydrolyse acide doivent se trouver sous forme de trisaccharide.

5) Emplacement des liaisons holosidiques
=====

A) Méthylation de la chaîne glucidique du flavonoloside.

Nous avons méthylié 25 mg du flavonoloside anhydre par la méthode de HAKOMORI. Après hydrolyse, nous avons identifié les composés suivants :

- tri-O-méthyl-2,3,4, rhamnose
- tétra-O-méthyl-2,3,4,6 glucose

et une tache dont la migration chromatographique correspond à celle d'un glucose diméthylé.

La chaîne glucidique consiste donc en un trisaccharide branché.

Isolement du di-O-méthyl-4,6 glucose

Nous ne disposons que de deux témoins (di-O-méthyl 2,3 glucose et di-O-méthyl 2,4 glucose*) des six glucoses

diméthylés possibles, et, de plus, leur migration en chromatographie sur papier ne permet pas de les différencier par cette méthode.

Nous avons donc méthylé une quantité de 450 mg d'hétéroside en deux fois. L'hydrolysate a été chromatographié sur papier Whatman 3 MM dans le solvant T; la zone correspondant au glucose diméthylé est découpée et éluee trois fois par de l'éthanol absolu.

Le glucose diméthylé cristallise dans l'éthanol en longues aiguilles blanches.

F = 158°-160° (bloc, instantanée)

$[\alpha]_D^{20} = + 66,5^\circ$ (18 heures) (c = 0,6 dans l'eau)

Ces propriétés correspondent à celles que donnent les auteurs pour le di-D-méthyl-4,6 glucose.

B) Hydrolyse ménagée du flavonoside

L'hydrolyse ménagée du flavonoside par les diverses techniques décrites dans la première partie libre en plus du rhamnose et du glucose, deux oligosaccharides dont les Rg se trouvent résumés ci-dessous :

	Mélanges-solvants			
	N	M	S	P
Disaccharide	76	75	79	75
Trisaccharide	56	59	66	52

Nous avons obtenu 66 mg de disaccharide et 96 mg de trisaccharide par hydrolyse au moyen d'une résine de polystyrène sulfoné.

a) Disaccharide

Hydrolyse enzymatique

2 mg de disaccharide ont été hydrolysés à pH = 5, à 37°, par 0,1 mg de β -glucosidase d'amandes** à 420 U I/mg. Après 45 minutes d'incubation nous avons identifié du glucose seulement, par chromatographie sur papier.

Méthylation

5 mg de disaccharide ont été méthylés par la méthode de HAKOMORI. Après hydrolyse, nous avons identifié les composés suivants : - tétra-O-méthyl-2,3,4,6 glucose
- tri-O-méthyl-2,4,6 glucose

Le disaccharide est donc le β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3) glucopyranose. Ceci est confirmé par les constantes physiques suivantes, qui correspondent à celles que l'on trouve dans la littérature pour le laminaribiose :

Propriétés physiques

$[\alpha]_D^{20} = + 18^\circ$ (10 minutes) $\rightarrow + 11^\circ$ (24 heures) (c = 1,32 dans l'eau)
F = 207°- 208° (bloc instantané)

Enfin sa migration chromatographique (tableau ci-dessus) est identique à celle d'un échantillon de laminaribiose authentique.***

Dérivé acétylé

F = 95° (bloc instantané)

* Nous remercions vivement M. le Dr van CLEVE pour l'envoi d'un échantillon de di-O-méthyl-2,4 glucose.

** Nous remercions vivement M. le Dr J.R. TURVEY pour son échantillon de laminaribiose

*** et M. LALEGERIE pour la β -glucosidase purifiée

b) Trisaccharide

Analyse

Trouvé % C = 43,28 H = 6,79

Calculé pour

$C_{18}H_{32}O_{15}$ % C = 44,26 H = 6,60

Propriétés physiques

$[\alpha]_D^{20} = 13,7^{\circ}$ (15 minutes) $\rightarrow [\alpha]_D^{20} = -8,2^{\circ}$ (24 heures)

(c = 2,08 dans l'eau)

F = 169°-170° en capillaire avec décomposition après ramollissement à 125°

F = 210° (au bloc, instantané)

Méthylation

5 mg du trisaccharide ont été méthylés par la méthode de HAKOMORI. Après hydrolyse, les chromatogrammes montrent trois taches dont les migrations sont respectivement identiques à celles de l'hydrolysât du flavonoside méthylé, c'est à dire :

- tri-D-méthyl-2,3,4 rhamnose
- tétra-D-méthyl-2,3,4,6 glucose
- di-D-méthyl-4,6 glucose

Hydrolyse ménagée

1 mg de trisaccharide a été hydrolysé par l'acide sulfurique 0,4 N (153) en tubes capillaires à 37°. Après plusieurs jours, nous avons mis en évidence par chromatographie sur papier une libération de

- rhamnose
- laminaribiose

Le trisaccharide est donc constitué d'une molécule de laminaribiose sur laquelle vient se brancher une molécule de rhamnose en position 2 du glucose réducteur.

Le laminaribiose est dextrogyre; le trisaccharide a un pouvoir rotatoire de signe contraire; le rhamnose étant de la série L, nous pouvons déduire de ceci qu'il s'y trouve attaché par une liaison α -glycosidique.

Tentatives d'hydrolyse enzymatique

Par action de la β -glucosidase qui s'était révélée active sur le laminaribiose nous pensions pouvoir scinder le trisaccharide en glucose et néohespéridose (α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2) glucopyranose). Or cette enzyme a laissé le trisaccharide intact, malgré des temps d'incubation prolongés.

D'autres préparations enzymatiques (extrait enzymatique de graines de Luzerne, extrait enzymatique d'Ips typographus, "takadiastase", rhamnodiastase) à activité β -glucosidasique se sont montrées aussi inefficaces.

Comparaison avec le solatriose

Cette particularité, et le fait que, au cours des hydrolyses ménagées différentes effectuées sur le trisaccharide ou sur l'hétéroside lui-même, nous n'ayions jamais observé l'apparition du deuxième disaccharide théoriquement possible, permet d'établir un parallèle entre notre trisaccharide et le solatriose de KUHN (154).

KUHN avait isolé, à partir d'un glucoside alcaloïdique, l' α -solanine extraite des feuilles de pomme de terre, un trisaccharide, le solatriose, de structure très proche de celle du trisaccharide de Populus, puisque le glucose réducteur de ce dernier y est simplement remplacé par un galactose.

Comme ci-dessus, KUHN n'obtenait que du solatriose et du solabiose (β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3) D-galactopyranose) par hydrolyse ménagée de l' α -solanine.

La glucosidase hydrolysait aisément le solabiose, comme elle hydrolyse le laminaribiose, mais n'avait aucune action sur le solatriose.

Enfin, par hydrolyse ménagée du solatriose, il obtenait du rhamnose et du solabiose, de même que nous obtenons du rhamnose et du laminaribiose.

KUHN a cependant obtenu du rhamnosido (1 \rightarrow 2) galactose mais par un procédé différent : parmi les produits de dégradation de l' α -solanine péracétylée, par le mélange acide bromhydrique-acide acétique, à côté du solatriose et du solabiose, se trouvait en très petites quantités, le disaccharide à rhamnose.

Les quantités d'hétéroside dont nous disposions ne nous permettaient pas de tenter ce mode de dégradation pour mettre en évidence l'unité rhamnosido (1 \rightarrow 2) glucose.

Labilité de la liaison rhamnosyl (1 \rightarrow 2) glucose

S'il est aisé d'obtenir du rutinose (α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6) glucopyranose) par hydrolyse ménagée du rutoside, il nous a été impossible d'obtenir par les mêmes procédés du

néohespéridose (α -L-rhamnopyranosyl (1→2) glucopyranose) à partir du naringoside.

Dans le cas du naringoside, on peut objecter, comme l'a fait KOEPPEN (155) que ceci tient à la position sur l'aglycone de la liaison hétérosidique qui se fait par l'hydroxyle en 7 du naringétol, alors que dans le rutoside c'est l'hydroxyle en 3 du quercétol qui est osidifié, et il est connu que les glycosides en 7 sont beaucoup plus résistants à l'hydrolyse que les glycosides en 3.

Cependant, c'est par hydrolyse ménagée que HARBORNE (156) a démontré la présence d'un trisaccharide branché à glucose et à rhamnose dans les anthocyanosides extraits de Begonia et de Rubus, en mettant en évidence les sophorosides et rutinosides en 3 de la cyanidine produits. Le trisaccharide lui-même était hydrolysé par une glucosidase en glucose et rutinose. Ce trisaccharide, par la suite, s'est révélé être identique (28) au trisaccharide du kempférol-3-O-rhamnodiglucoiside isolé des fleurs de Solanum tuberosum (49).

Dans nos tentatives pour obtenir le néohespéridose à partir du flavonoloside de Populus nous nous sommes donc heurtée à deux facteurs défavorables qui s'ajoutent :

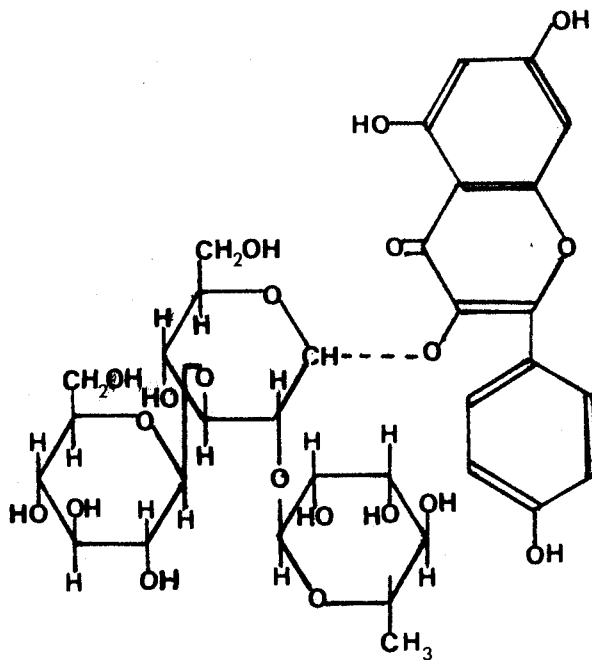
- la liaison rhamnosyl → glucose est plus labile que la liaison glucose → glucose du laminaribiose.
- De tous les types de liaisons osidiques c'est la liaison 1 → 2 qui est la plus labile vis à vis des acides dilués.

6) Structure de l'hétéroside

=====

L'hétéroside extrait du pollen de Populus yunnanensis Dode est donc un flavonoloside nouveau par sa fraction glucidique. Celle-ci est constituée d'un trisaccharide branché dont la structure est celle d'un (Q-β-D-glucopyranosyl (1→3))-(Q-α-L-rhamnopyranosyl (1→2))-D-glucopyranose.

L'hétéroside est un kempférol-3-Q-rhamnosido-2¹-laminaribioside et répond à la formule ci-dessous :



7) Le kempférol-3-O-2¹ rhamnosidolaminaribioside du
=====

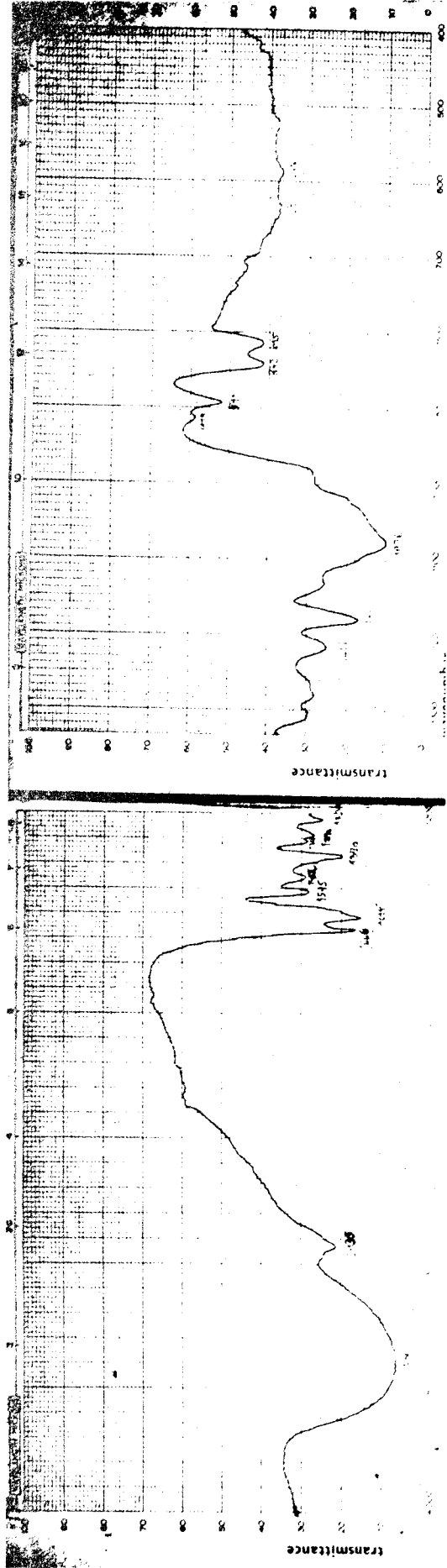
pollen de Populus lasiocarpa Oliver.
=====

A - Isolement et purification

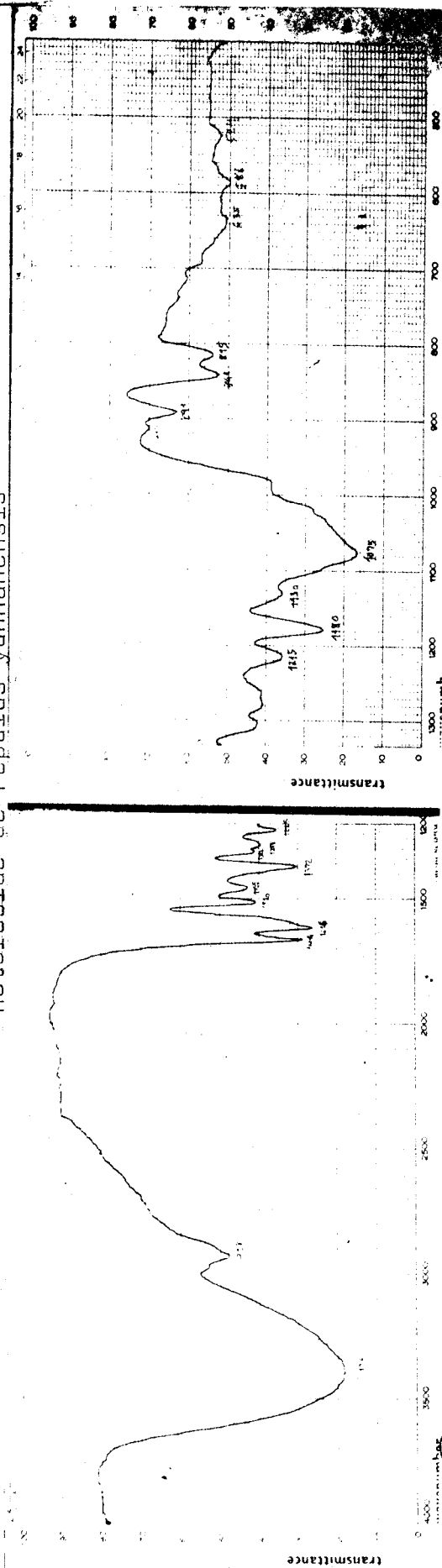
Dans l'extrait alcoolique délipidé, obtenu à partir de 47,4 g de pollen de Populus lasiocarpa (teneur en eau : 11,3%) il se dépose progressivement des cristaux jaunes, au total 800 mg.

Ceux-ci sont repris par un mélange éthanol-eau (2 : 4). Dans la solution il se dépose un solide peu coloré qui est éliminé par filtration, et enfin un flavonoloside dont les migrations chromatographiques sont identiques à celles du flavonoloside de Populus yunnanensis.

Nous sommes parvenue au même résultat en fractionnant par chromatographie sur papier l'extrait de 48,5 g de pollen de la même espèce. De nombreuses purifications ont été nécessaires, par chromatographie dans les solvants L, B, J, V, H et Q successivement mais, par cette technique, le produit final devient de plus en plus difficilement cristallisable. Nous l'obtenons enfin par précipitation de sa solution méthanolique par l'éther éthylique.



Hétéroside de Populus yunnanensis



Hétéroside de Populus lasiocarpa

Figure n° 2



Figure n° 1 - spectre U.V.

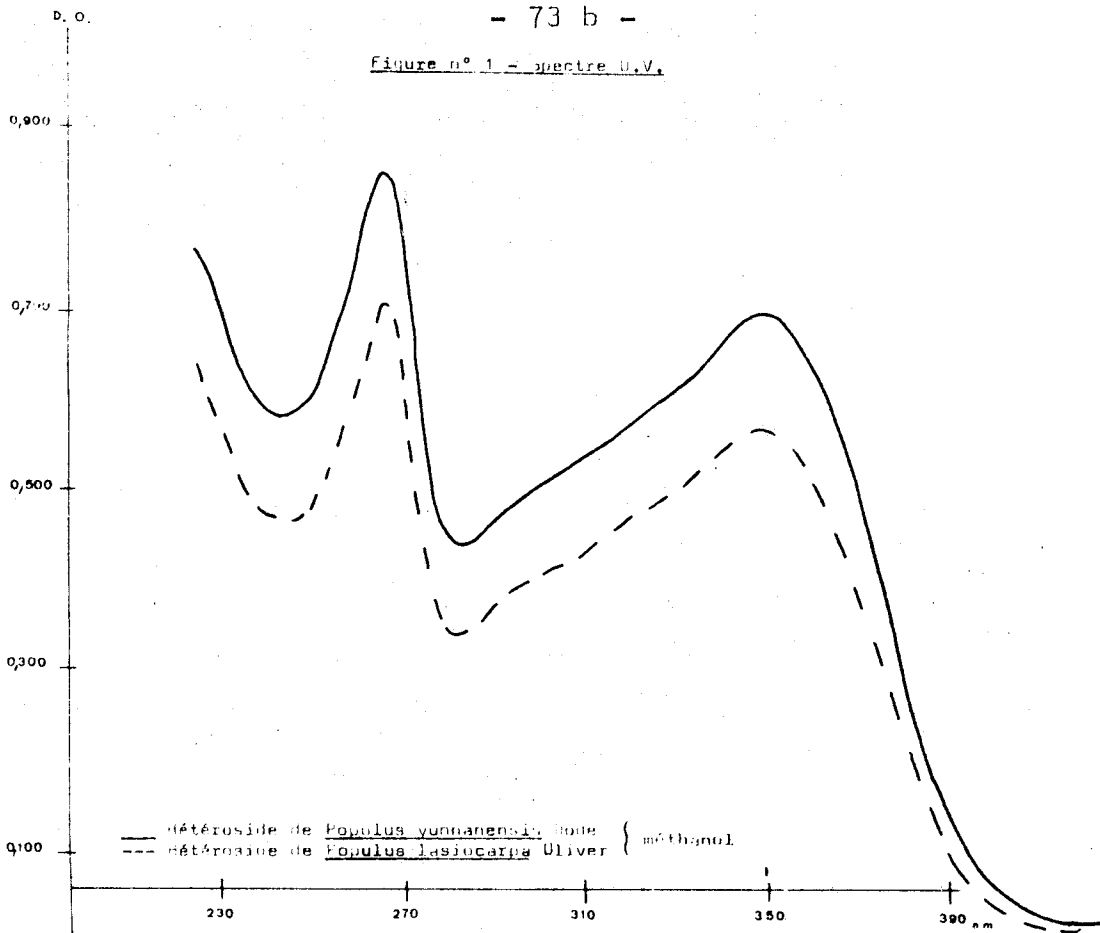
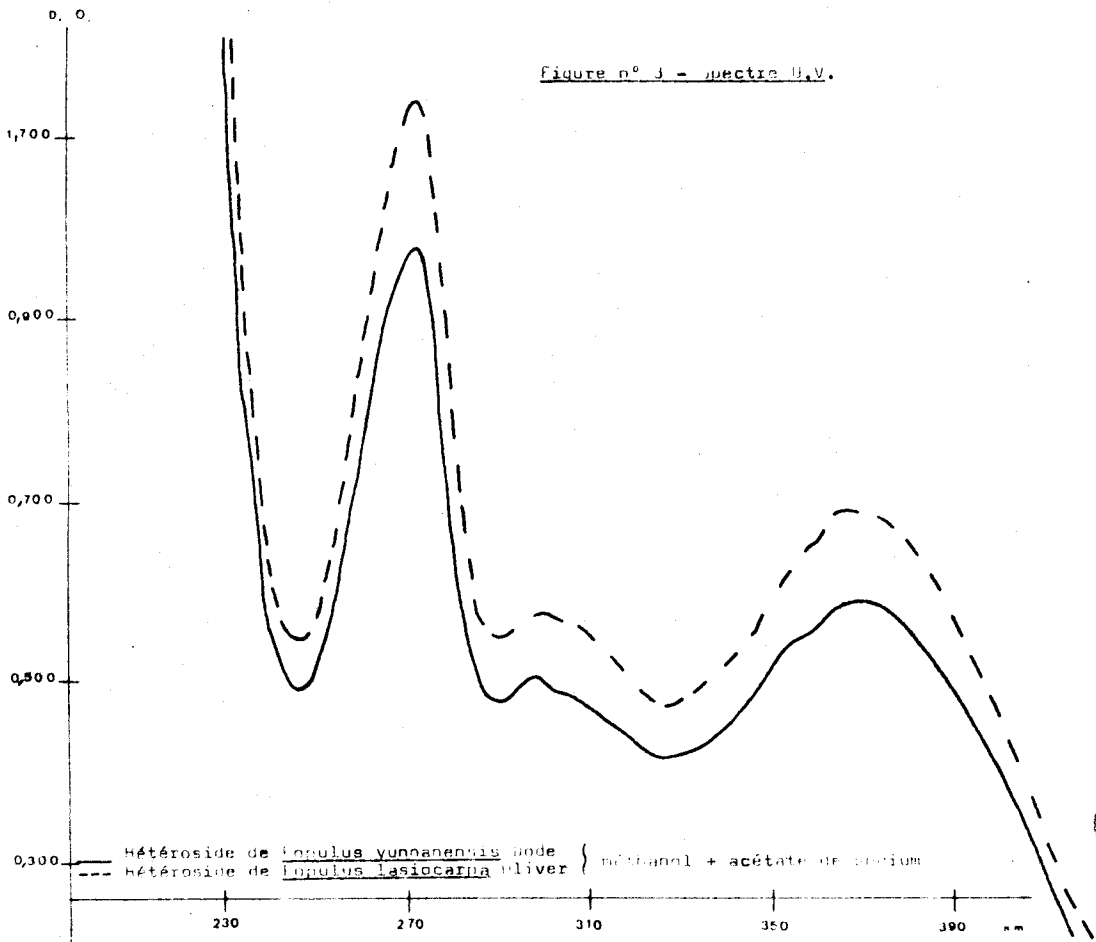
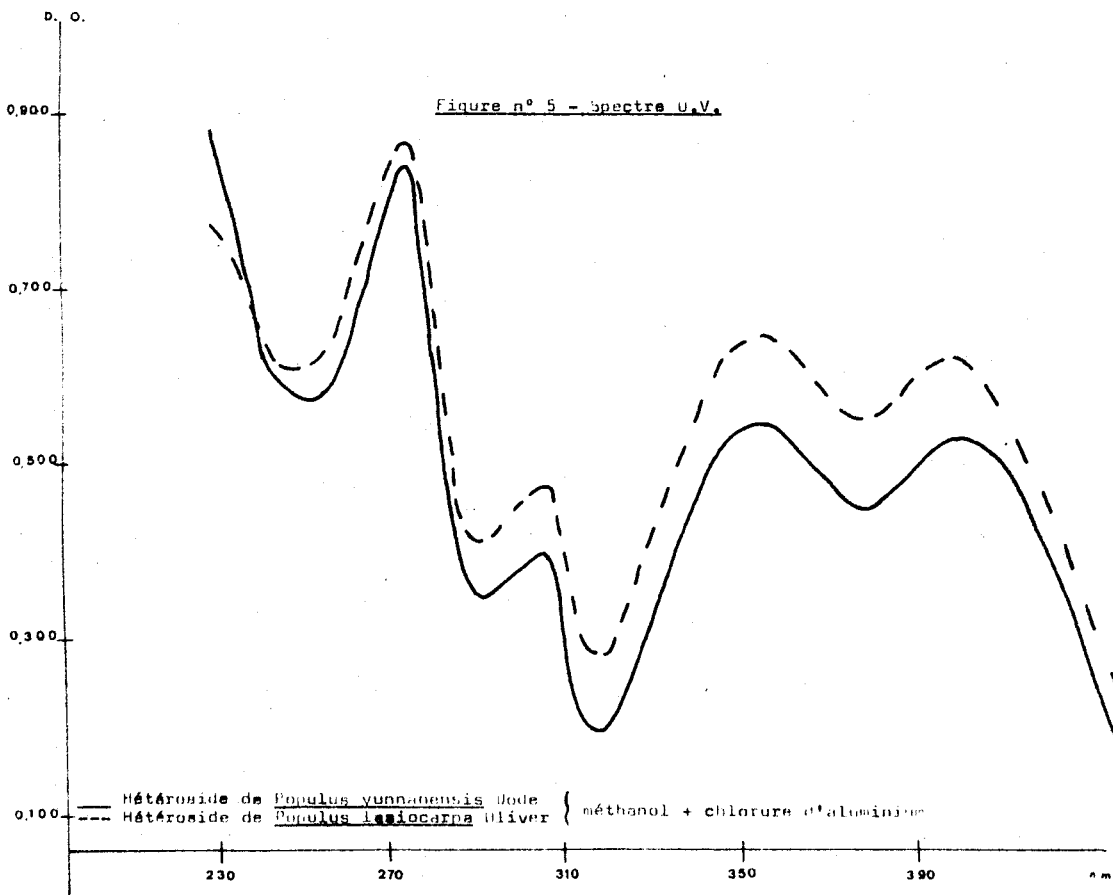
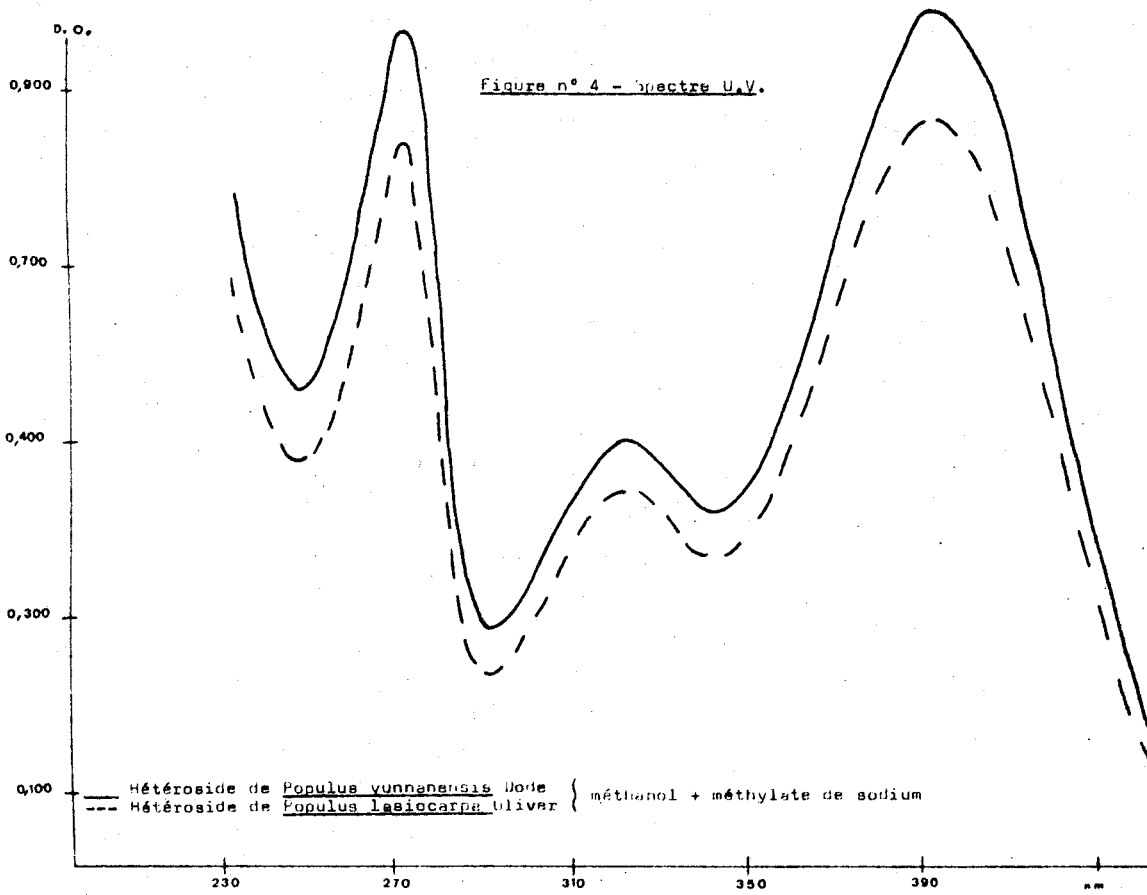


Figure n° J - spectre U.V.





B - Propriétés physiques

a) Rf x 100 du flavonoloside de Populus lasiocarpa

Mélanges solvants							
B	J	L	E	X	G	H	I
49	49	50	63	69	70	79	85

b) Le spectre ultraviolet présente deux maximums d'absorption, l'un à 266 nm, l'autre à 350 nm et subit les mêmes déplacements par addition de divers réactifs que le spectre du kempférol-2¹-rhamnosidolaminaribiose de Populus yunnanensis, comme le montrent les figures n° 1, 3, 4 et 5.

c) Enfin les spectres infra-rouge des flavonolosides des deux espèces de Populus sont identiques (figure n° 2).

III - LES SOPHOROSIDES DE FLAVONOLS DE QUELQUES

POLLENS D'ARBRES.

1) Isolément et étude du quercétol-3-sophoroside du pollen d'*Alnus cordata* Desf.

Le quercétol-3-sophoroside n'est connu que depuis 1962. C'est BIRKOFER et KAISER (157) qui l'isolèrent pour la première fois des fleurs de *Petunia hybrida* (Solanacées F = 203°). Par la suite, il a été isolé des feuilles (158) et des fleurs (159) (F = 194-200°) de *Sorbus aucuparia* (Rosacées) et enfin des fleurs de *Gossypium barbadense*, Malvacées (F = 202-203°) (160).

Selon HARBORNE (140) le quercétol-3-diglucoside qu'il avait signalé dans plusieurs espèces de pomme de terre sauvages (49) serait le quercétol-3-sophoroside; on le trouverait également dans les feuilles de Pois, et dans les pétales de plusieurs espèces de roses.

Enfin, WAGNER et Coll. (161) en ont réalisé la synthèse (F = 203°). Dans cet article, les auteurs décrivent également la synthèse du kempférol-3-sophoroside.

A) Isolement

Au cours de la délipidation par l'éther de l'extrait obtenu à partir de 2,14 kg de pollen d'Alnus cordata Desf. nous avons recueilli par centrifugation de la phase aqueuse un précipité jaune granuleux, donnant les réactions des flavonols. Après lavage à l'eau du précipité et dessiccation, nous avons obtenu 51,36 g de produit brut (Rendement 2,4 %).

Ce produit a été cristallisé deux fois dans l'éthanol aqueux. Les cristaux correspondent à un tétrahydrate. En effet, ils perdent 10,44% de leur poids à 100° sous vide (0,05 mm de mercure) calculé pour $C_{27}H_{30}O_{17} \cdot 4H_2O$: 10,32%.

Analyse du produit anhydre

Trouvé % C	51,36;	H = 4,99
	51,49;	H = 4,92
Calculé pour $C_{27}H_{30}O_{17}$	C = 51,76;	H = 4,83

B) Propriétés physiques

Les cristaux de tétrahydrate fondent à 210°-212° en capillaire après ramollissement à 195°. Il y a décomposition vers 225°.

Au bloc Maquenne (instantané) ils fondent à 232°-237°. Le pouvoir rotatoire est de $[\alpha]_D^{20} = 30,1^\circ$ (c = 5,54% dans l'éthanol exprimé en produit anhydre).

Ses migrations chromatographiques dans différents solvants sont résumées dans le tableau , et sont identiques à celles de l'hétéroside décrit par BIRKOFER (157).

Le rapport $100 \frac{Rf(H)-Rf(B)}{RfH} = 53$ permet de diagnostiquer un dioside de flavonol (152).

Son spectre ultra-violet présente deux maximums d'absorption : I à 255 nm et II à 355 nm, comme celui de l'hétéroside décrit par BIRKOFER (157).

Les pics principaux de son spectre infra-rouge sont les suivants :

\approx 3370 (hydroxyles); 2928; 1666 (carbonyle de l'hétérocycle central); 1613 (liaisons C = C aromatiques) 1565, 1508, 1460, 1367 (hydroxyles phénoliques); 1305; 1208; 1170; 1115, 1067; 1015, 1000 (vibration de déformation des liaisons O-H, vibration de la bande C-O des sucres).

C) Hydrolyse acide quantitative du flavonoside

a) Détermination du rapport moléculaire aglycone/oses

L'hydrolyse acide totale de 377,2 mg de flavonoside anhydre libère 48,26% d'aglycone (calculé pour un glycoside du quercétol contenant deux restes d'hexose, $C_{27}H_{30}O_{17}$: 48,24%).

Le dosage dans le filtrat des sucres réducteurs par cuprimétrie révèle une teneur de 57,6% de glucose (calculé pour deux molécules de glucose : 57,51%).

La chromatographie sur papier de l'hydrolysât révèle la présence du seul glucose.

b) Identification de l'aglycone

L'aglycone a été recristallisée dans l'éthanol aqueux F 315-316° (capillaire, non corrigé), non abaissé après mélange avec du quercétol authentique.

Le produit est homogène à la chromatographie sur papier. Ses Rf sont identiques à ceux du quercétol (tableau ci-dessous) :

Rf x 100

	Solvants				
	H	J	U	L	C
	3	81	71	70	19

Son spectre ultra-violet avec ses deux maximums (I) et (II) : 256 nm et 373 nm, et son spectre infra-rouge sont identiques à ceux du quercétol.

D) Fraction glucidique

a) Méthylation

L'hétéroside a été méthylié selon la méthode de HAKOMORI. Après hydrolyse, nous avons obtenu sur les chromatogrammes deux taches :

l'une de tétra-O-méthyl-2,3,4,6, glucose

l'autre de tri-O-méthyl-3,4,6, glucose

La partie glucidique est donc constituée par un glucosido 1→ 2 glucose.

b) Hydrolyse ménagée

L'hydrolyse ménagée du flavonoloside, par l'acide sulfurique dilué, nous a permis d'isoler le sophorose qui

crystallise en aiguilles incolores dans l'éthanol à 90%.

F = 201-202° (bloc instantané), non abaissé après mélange avec du sophorose de référence (162) $[\alpha]_D^{20} = + 32^{\circ},3 \rightarrow + 19^{\circ},8$ (c = 3,1 dans l'eau).

Il est homogène à la chromatographie sur papier avec des R_g identiques à ceux du sophorose (tableau ci-dessous).

De plus, la révélation par l'O-phénylène diamine en milieu oxalique donne une tache brun-rougeâtre alors que les autres glucosido-glucoses réducteurs sont révélés en bleu par ce réactif. De même, le néohespéridose donne une tache beige-rosé tandis que le rutinose donne une tache bleue.

tableau des R_g des disaccharides réducteurs, page 80.

Disaccharides réducteurs R_d x 100

	Mélanges-solvants			
	N	M	S	P
<u>glucosido-glucoses</u>				
β (1→ 2) sophorose	63	73	73	54
β (1→ 3) laminaribiose	76	75	79	75
α (1→ 4) maltose	61	67	65	56
β (1→ 4) cellobiose	59	63	62	51
β (1→ 6) gentiobiose	46	64	57	39
<u>rhamnosido-glucoses</u>				
α (1→ 6) rutinose	81	87	84	77
α (1→ 2) néohespéridose*	86	91	90	86

* Nous remercions vivement M. le Professeur B.H. KOEPPEN pour l'envoi d'un échantillon de néohespéridose et M. le Professeur R.M. HOROWITZ pour l'envoi d'un échantillon de β-hepta-acétate de néohespéridose.

E) Emplacement de la liaison hétérosidique

a) Méthylation

150 mg d'hétéroside sec ont été méthylés par le sulfate de méthyle en solution acétonique en présence de carbonate de potassium, à l'ébullition à reflux pendant 30 heures.

Nous avons obtenu un composé ne donnant plus de coloration avec le chlorure ferrique et présentant une fluorescence bleue en lumière ultra-violette.

Après hydrolyse acide, l'aglycone est séparée et cristallisée dans l'éthanol aqueux.

Aglycone méthylée

Analyse

trouvé % C = 63,44 ; H = 5,05

calculé pour $C_{19}H_{18}O_7$ % C = 63,68 ; H = 5,06

Méthoxy

trouvé % C = 34,78

calculé pour 4 OCH_3 % C = 34,64

F 197-198° (capillaire non corrigé). Ce point de fusion n'est pas abaissé après mélange avec le tétraméthyl-5,7,3',4' quercétol obtenu par méthylation et hydrolyse, dans les mêmes conditions, du rutoside. Les spectres infra-rouges des deux aglycones méthylées sont identiques.

L'aglycone tétraméthylée conduit après acétylation à un dérivé F = 174° (capillaire) identique à l'acétyl-3 tétraméthyl-5,7,3',4' quercétol préparé à partir du rutoside.

Les deux produits présentent de plus les mêmes maximums d'absorption ultra-violette à 246 et 332 nm.

Les migrations chromatographiques de l'aglycone tétraméthylée et de son dérivé monoacétylé sont respectivement identiques à celles des deux substances préparées dans les mêmes conditions à partir du rutoside et se trouvent résumées dans le tableau ci-dessous :

Rf x 100

	Solvants			
	H	J	U	L
tétraméthyl-5,7,3',4' quercétol	4	90	80	74
acétyl-3,tétraméthyl-5,7,3',4' quercétol		96	94	

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et le visible.

Les modifications par les différents réactifs du spectre de l'hétéroside (fig. n° 6) et du tétraméthyl-quercétol se trouvent résumées dans le tableau ci-dessous :

	Déplacement des maximums d'absorption en nm			
	Hétéroside		Tétraméthylquercétol	
	Maximum I	Maximum II	Maximum I	Maximum II
Méthanol	255 nm	355 nm	250 nm	360 nm
Acétate de sodium	+15	+28	0	0
Acide borique/ acétate de sodium	+ 5	+19	0	0
Méthylate de sodium	+15	+52	+10	+32
Chlorure d'alu- minium en solution éthanolique	+13	+43		
Chlorure d'alu- minium en solution méthanolique	+19	+78	+10	+60
Oxychlorure de zirconium/ acide citrique	0	0	+12	+56

L'acétate de sodium déplace le maximum I de l'hétéroside de + 15 nm montrant que l'hydroxyle en 7 se trouve libre. Le maximum II est déplacé de + 28 nm, suggérant l'ionisation d'un hydroxyle en position 4' en l'absence d'un hydroxyle libre en position 3. Le spectre de l'aglycone méthylée ne subit aucune modification.

Le déplacement du maximum II de + 19 nm de l'hétéroside sous l'action de l'acide borique en présence d'acétate de sodium révèle la présence d'un groupe dihydroxyle ortho libre en position 3' et 4'. Le même réactif ne provoque aucune modification dans le spectre de l'aglycone méthylée.

La stabilité de l'hétéroside ainsi que de son aglycone méthylée vis à vis du méthylate de sodium montre que les hydroxyles en 3 et en 4' ne s'y trouvent pas libres simultanément.

Le déplacement de + 43 nm relativement faible du maximum II de l'hétéroside par le chlorure d'aluminium, en solution éthanolique, dénote la formation d'un chélat entre le groupement carbonyle en 4 et un hydroxyle en position 5. En solution méthanolique le déplacement de + 78 nm révèle la formation d'un complexe supplémentaire, confirmant la présence du groupe dihydroxyle ortho libre en position 3' et 4'.

Le spectre de l'aglycone méthylée subit un déplacement de 60 nm correspondant à la chélation de l'aluminium entre le carbonyle en 4 et un hydroxyle en position 3.

Le test à l'oxychlorure de zirconium en présence d'acide citrique, confirme que c'est l'hydroxyle en position 3 qui se trouve osidifié dans l'hétéroside, car le spectre ne subit aucune modification; corrélativement, le spectre de l'aglycone méthylée subit un déplacement bathochrome de 56 nm pour le maximum II, montrant la formation d'un complexe stable avec un hydroxyle en position 3.

Les données spectrales observées sur l'hétéroside et sur l'aglycone méthylée concordent avec les résultats de l'étude chimique pour assigner la position 3 à la liaison hétérosidique.

Le flavonoloside extrait du pollen d'Alnus cordata Desf, répond donc à la formule ci-dessous :

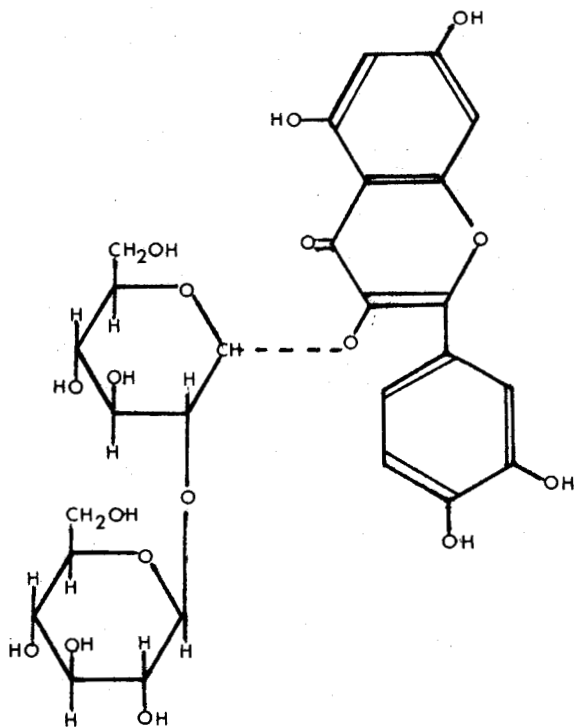
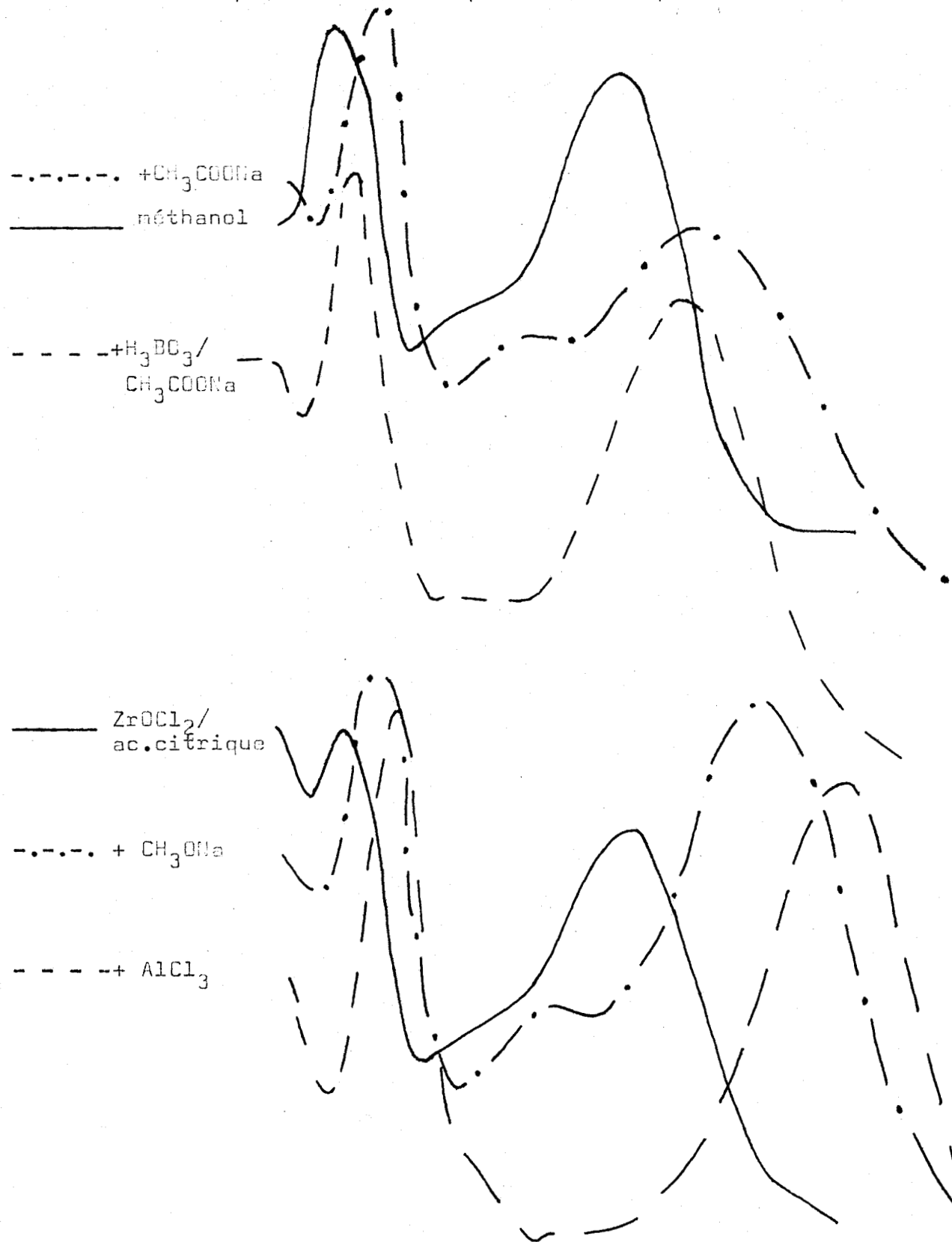


Figure n° 6

Spectres U.V. du quercétol-3-sophoroside



BUS
LILLE

2) Isolement, identification et répartition du quercétol-3-sophoroside dans les pollens de quelques Bétulacées, Juglandacées et Oléacées.

Cherchant à déterminer l'hétéroside flavonoïdique principal dans d'autres pollens d'arbres nous avons isolé à l'état cristallisé et identifié le quercétol-3-sophoroside dans deux Juglandacées, cinq autres Bétulacées et une Oléacée.

A) Isolement et purifications

Les pollens ont été traités selon le procédé décrit dans la première partie de ce travail.

Dans le cas de l'Aulne et du Noyer, le glycoside cristallise dans la phase aqueuse au moment de la délipidation de l'extrait par l'éther éthylique. Une deuxième cristallisation a suffi pour obtenir le glycoside pur.

Pour les autres espèces, l'extrait alcoolique délipidé a été chromatographié sur papier Whatman 3 MM au moyen du solvant L.

La bande principale apparaissant en brun-rouge en lumière ultra-violette à 350 et 254 nm est découpée et éluée par le méthanol puis un mélange méthanol-eau.

Généralement, après une deuxième chromatographie dans le solvant B, nous avons obtenu le glycoside pur.

Il a cependant été parfois nécessaire d'effectuer une dernière purification dans les solvants J, V ou D.

Enfin, chaque échantillon a été cristallisé soit dans l'eau, soit dans l'acétone, soit dans l'éthanol aqueux (5 : 1). Nous avons obtenu des rendements en produit cristallisé allant de 0,11 à 3,4% du poids initial de pollen.

Le détail des purifications et le rendement en glycoside, ainsi que la teneur en eau et la quantité du pollen traité sont donnés pour chaque espèce dans le tableau n° 2.

B) Identification

Les produits cristallisés ainsi obtenus ont été identifiés au quercétol-3-sophoroside du pollen d'Alnus cordata selon les critères ci-dessous; les résultats pour chaque espèce sont rassemblés dans le tableau n° 2.

a) Point de fusion

Il varie légèrement suivant l'espèce végétale et le mode de purification.

b) Pouvoir rotatoire

L' $[\alpha]_D^{20}$ dans l'éthanol est de $- 30^\circ$ ($c = 2,81$) et il baisse jusqu'à $- 28^\circ$ lorsque la concentration en hétéroside augmente ($c = 8,36$).

c) Rf dans neuf systèmes solvants

Il a été déterminé dans les conditions suivantes : papier Whatman n° 1 et saturation à 20° environ pendant 18 heures.

d) Analyse spectrophotométrique dans l'ultra-violet et le visible

L'identification a été également réalisée au moyen du

spectre d'absorption U.V. en présence des différents réactifs permettant de détecter la position des hydroxyles libres (tableau n° 3).

Nous avons observé, au cours de cette étude, que lorsque nous opérons en solution méthanolique pour étudier l'effet du chlorure d'aluminium sur le spectre, l'effet bathochrome sur le maximum II était presque le double de celui que nous obtenions en solution éthanolique; ceci par la suite s'est trouvé expliqué dans la publication récente de JURD (81). Nous avons donc standardisé les conditions expérimentales de la façon suivante :

Solution (A) : 1 mg de flavonoïde + 30 ml d'éthanol pour U.V.

- 1) Acétate de sodium anhydre : 84 mg + 4 ml de (A); agiter, décanter
- 2) Acétate de sodium anhydre : 93 mg + 1 ml d'une solution saturé d'acide borique dans l'éthanol + 4 ml de (A); agiter, décanter
- 3) Ethylate de sodium 0,35 N : 3 gouttes (\approx 0,05 ml) + 3 ml de (A) dans la cuve; agiter.
- 4) Trichlorure d'aluminium : 0,28 ml d'une solution à 3% dans l'éthanol pour U.V. + 1,85 ml d'éthanol + 1,40 ml de (A) dans la cuve, agiter.
- 5) Oxychlorure de zirconium : 0,13 ml d'une solution de 1% dans l'éthanol + 0,13 ml d'une solution d'acide citrique à 5% dans l'éthanol + 3 ml de (A) dans la cuve, mélanger.

Aux erreurs d'expérience près, le résultat a été le même dans tous les cas.

Maximums d'absorption du quercétol-3-sophoroside en solution dans l'éthanol I = 257 nm ; II = 357 nm

	Déplacement des maximums en nm	
	I	II
Acétate de sodium	+ 18	+ 28
Acétate de sodium + Acide borique	+ 5	+ 21
Ethylate de sodium	+ 18	+ 53
Trichlorure d'aluminium	+ 13	+ 43
Oxychlorure de zirconium + acide citrique	0	0

e) Spectre d'absorption infra-rouge

Il était identique dans tous les cas à celui du quercétol-3-sophoroside d'Alnus cordata.

C) Les flavonolosides des autres organes des familles étudiées

Parmi les trois familles d'où nous avons isolé le quercétol-3-sophoroside comme flavonoside majeur du pollen, c'est la famille des Bétulacées qui a été le mieux étudiée en

ce qui concerne les flavonoïdes. En effet, HÖRHAMMER et coll. ont examiné par chromatographie sur papier la feuille d'une soixantaine d'espèces représentant environ la moitié des espèces de cette famille. Aucune ne compte le quercétol-3-sophoroside parmi ses constituants hétérosiques, ni aucun autre sophoroside. Il en est de même pour les deux autres familles (163).

En revanche HÖRHAMMER et coll. ont pu classer les Bétulacées en trois types selon la nature du flavonoside prépondérant dans la feuille.

Nous ne citerons ici que les constituants qui ont été isolés et identifiés chimiquement dans les genres dont nous avons étudié le pollen.

Bétulacées - feuille
=====

Alnus subcordata C.A. Mey Quercétol-3-galactoside(hypéroside)
(164)

Alnus incana Moench. Quercétol-3-galactoside (164)
Quercétol-3-rhamnoside(quercitroside)
(164)

Betula alba (L.) Vill. Quercétol-3-galactoside (165)

Betula pubescens Myricétol-3-digalactoside (166)

Betula verrucosa Ehrh. Myricétol-3-digalactoside (166)
Quercétol-3-galactoside (167)

Betula humilis Schrank Quercétol-3-rutinoside (rutoside)(166)

- Carpinus orientalis Mill. Quercétol-3-galactoside (164)
Quercétol-3-rhamnoside (164)
- Corylus avellana L. Myricétol-3-rhamnoside (myricitroside)
(169) (165)
Quercétol-3-rhamnoside (164)

Juglandacées - feuille

=====

- Juglans regia L. Quercétol-3-galactoside (170)
Quercétol-3-arabinoside (avicularine)
(170)
- Juglans regia L. var. Kempférol-3-arabinoside (171)
Sinensis

Oléacées - feuille

=====

- Fraxinus angustifolia Wahl. Quercétol-3-rutinoside (172)
- Fraxinus excelsior L. Quercétol-3-rutinoside (173)
- Fraxinus nigra Marsh. Quercétol-3-rutinoside (173)
- Fraxinus ornus L. Quercétol-3-rutinoside (173)

Tous les hétérosides ont leur partie glucidique liée à l'hydroxyle en position 3, le quercétol étant l'aglycone la plus commune.

La partie glucidique est très variable et peut être constituée par de l'arabinose, du rhamnose, du galactose, un galactosylgalactose, ou du rutinoside.

Dans tous les cas, elle est différente du sophorose, celui-ci paraît donc être un disaccharide caractéristique du pollen dans ces espèces.

Tableau n° 2

Pollen		Sol- vants de pu- rifi- cation	Rende- ment %	R.F. instan- tanée	Quercétol-3-sophoroside									
Poids	Teneur en eau				B	D	L	F	J	R	H	O	Q	
2147g	9,31	<u>Bétulacées</u> Alnus cordata Desf. Alnus incana (L.) Vill. Betula Medwediewii Regel Carpinus carpinzza Kit. Corylus avellana L. Ostrya carpinifolia Scop.	2,4	232°-3°	29	39	44	42	47	51	64	65	80	
314			0,4	231°	"	"	43	"	"	"	"	"	"	81
700	6,85		0,16	235°-7°	30	40	"	"	"	"	"	"	"	80
345	10,09		0,11	235°-6°	"	"	"	44	48	"	63	63	"	"
438	5,75		0,69	236°-7°	29	"	44	"	"	50	"	64	"	"
213	7,16		0,58	235°	30	"	43	43	49	"	64	"	"	"
233			<u>Juglandacées</u> Juglans cordiformis Maxim. Juglans sieboldana Maxim.	1,40	234°-5°	30	39	43	43	48	51	64	64	80
72	7,53			3,40	234°-6°	"	40	"	"	49	52	65	65	"
95	6,80			0,27	235°	30	40	43	43	49	51	64	64	81
			<u>Oléacées</u> Fraxinus sogdiana Bunge En moyenne											
			234°-6°	30	40	43	43	47	51	64	64	80		



Tableau n° 3

Analyse spectrophotométrique : max. en nm											
Spectre d'absorption dans l'éthanol		Spectres d'absorption dans l'éthanol avec									
I	II	Acétate de sodium	Acétate de sodium + acide borique	Ethylate de sodium	Al Cl ₃	ZrO Cl ₂					
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
257	358	273	384	260	376	275	410	270	400	256	355
"	357	275	380	"	376	"	"	"	"	257	357
"	"	"	"	265	380	"	"	"	"	"	"
"	"	270	"	"	"	"	"	"	"	"	"
"	"	275	"	"	"	"	"	"	"	255	"
"	"	"	"	260	"	"	"	"	"	"	"
257	357	275	380	260	380	275	410	270	400	255	357
"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
257	357	275	385	260	380	275	410	270	400	255	357

Bétulacées

Alnus cordata Desf.

Alnus incana (L.) Vill.

Betula Medwediewii Regel

Carpinus carpinizza Kit.

Corylus avellana L.

Ostrya carpinifolia Scop.

Juglandacées

Juglans cordiformis Maxim.

Juglans sieboldiana Maxim.

Oléacées

Fraxinus sogdiana Dunge



3) Autres glycosides flavonoliques des pollens

Les glycosides que nous avons étudiés jusqu'ici étaient relativement abondants, ce qui a permis une identification complète. Ils peuvent être accompagnés d'autres flavonolosides en plus petites quantités ou décelables seulement par chromatographie sur papier. Nous avons pu extraire de Juglans cordiformis un deuxième glycoside, le kempférol-3-sophoroside; il a été identifié avec un produit de référence, le sophoroflavonoloside de RABATE (174).

Chez Betula Medwediewii, nous avons isolé un flavonoloside vraisemblablement identique au précédent.

En ce qui concerne Fagus sylvatica, les glucosides du kempférol sont prédominants, il existe néanmoins de très faibles quantités d'un glycoside du quercétol, probablement le quercétol-sophoroside.

Nous avons obtenu dans ce pollen le kempférol-3-sophoroside cristallisé à côté du coumaroyl glucoside correspondant au tiliroside.

HÖRHAMMER (175) proposait pour ce dernier la structure d'un kempférol-7-p-coumaroyl-3 glucoside. HARBORNE (176) considère que l'ester-p-coumarique du glucose se trouve relié à l'hydroxyle en 3 du kempférol. Les résultats chromatographiques et spectrophotométriques de TISSUT (177) concordent avec cette dernière structure. Il faut aussi signaler que

DIETRICH et SCHAICH ont trouvé dans les bourgeons de Fagus un kempférol-4'-coumaroyl-3-glucoside (178).

Les migrations chromatographiques et les propriétés spectrales U.V. des glycosides que nous avons isolés sont résumées dans les tableaux n° 4 et n° 5.

Notons ici les difficultés que nous avons éprouvées pour séparer par chromatographie sur papier les sophorosides du quercétol et du kempférol.

Le tableau ci-dessous est explicite à cet égard :

Rf x 100

	Solvants							
	B	E	L	U	H	J	I	W
quercétol-3-sophoroside	33	48	46	53	58	70	78	82
kempférol-3-sophoroside	33	46	53	58	64	62	81	86

Les meilleurs résultats ont été obtenus par l'utilisation des solvants H, J, K, et L, successivement.

Tableau n° 4

Glycosides du kempférol et leurs aglycones Rf x 100

	Solvants					H - B
	B	H	L	U	C	H
<u>Juglans cordiformis</u> Maxim.						
glycoside	32	62	54	56-57		46
aglycone				85	50	
kempférol de référence				85	48-50	
<u>Betula Medwediewii</u> Regel						
glycoside	33	60	55	55		48
aglycone					48	
<u>Fagus sylvatica</u> L.						
glycoside	34	61	51			44
aglycone				85	48	
tiliroside	6-7	30-31	85-86			77
hydrolyse acide						
aglycone					48	
hydrolyse alcaline						
acide p- coumarique		46			59-60	
acide p- coumarique de référence		47			60	



Tableau n° 5

Glycosides du kempférol et leurs aglycones Spectres U.V.

	Ethanol		Acet. Na/ Acide borique		Al Cl ₃ (méthanol)	
	I	II	I	II	I	II
<u>Juglans cordiformis</u>						
Maxim.						
glycoside	266	355	266	358	275	400
aglycone	266	370	265	375	270	440
kempférol de référence	268	369	266	373	270	426
<u>Betula Medwediewii</u>						
Regel						
glycoside	265	355	265	358	275	420
<u>Fagus silvatica L.</u>						
glycoside	266-267	356	266	355	277 éthanol	400 éthanol
aglycone	267	370	267	375	272	430
tiliroside	270(305)*	317(357)*	270	317	276	402
hydrolyse acide						
aglycone	269	368	269	372	273	426
hydrolyse alcaline						
acide p-coumarique	226	311	226	285		
acide p-coumarique de référence	227	312		285		312

()* inflexion



A - Juglans cordiformis Maxim.

Lors de l'isolement du quercétol-3-sophoroside par chromatographie dans le solvant L, à partir de la bande de Rf plus grand, apparaissant en brun-rouge en lumière ultra-violette, nous avons isolé le kempférol-3-sophoroside. Il a été purifié par chromatographie sur papier successivement à l'aide des solvants H et J (rendement 0,1 à 0,54%).

Nous l'avons finalement recristallisé dans l'éthanol aqueux.

Propriétés physiques

Cristaux jaunes F 209-11°(au bloc). Le point de fusion n'est pas abaissé après mélange avec du kempférol-3-sophoroside authentique. Les spectres I R sont identiques.

Hydrolyse acide

8,2 mg ont été hydrolysés par l'acide sulfurique I N pendant 1 heure au bain-marie bouillant.

Aglycone 3,78 mg (46%) calculé 46,88% F 282-284°
Glucose (méthode au résorcinol) 60% calculé 59,02%.

L'hydrolyse ménagée libère du sophorose, caractérisé par sa migration chromatographique.

B - Betula medwediewii Regel

De la bande brun-rouge, de Rf \approx 0,5 dans le solvant L (premier solvant utilisé pour la séparation du quercétol-3-sophoroside) et après 3 purifications dans les solvants :

acide acétique 2%, H et J nous avons obtenu une très petite quantité de flavonoloside (tableaux n° 4 et 5). L'aglycone, après hydrolyse acide, est chromatographiquement identique au kempférol.

C - Fagus silvatica L.

Dans l'extrait alcoolique délipidé et concentré, il se dépose peu à peu un solide : le tiliroside. Après séparation par filtration, on en retrouve encore dans les eaux-mères. Sa séparation des autres constituants par chromatographie sur papier est aisée à l'aide des solvants L, H et J.

Par contre, la séparation des autres flavonolosides entre eux est assez laborieuse. Nous sommes parvenue à obtenir le kempférol-3-sophoroside après purification par chromatographie dans les solvants L, B, J et K. (tableaux n° 4 et 5).

Nous avons obtenu le tiliroside cristallisé.

Cristaux jaunes F 247-8° (Litt. 247°)

Hydrolyse acide (SO₄H₂ 1,5 N)

aglycone: kempférol; après cristallisation dans
l'éthanol aqueux,

F = 283° (bloc, instantané)

sucre : glucose

Hydrolyse alcaline (KOH 1N, 3 heures à température ordinaire, suivie d'extraction à l'éther éthylique de la solution acidifiée).

acide p-coumarique : F = 208° - 10° (bloc, instantané)



D I S C U S S I O N G E N E R A L E

---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---:---

La répartition systématique des hétérosides flavo-noïdiques signalés dans les pollens d'Angiospermes jusqu'à ce jour se trouve résumée dans le tableau n° 6. Dans notre travail nous nous sommes surtout adressée à la série des Apétales.

Dans les genres Juglans, Alnus, Betula, Carpinus et Ostrya nous avons isolé le quercétol-3-sophoroside comme glycoside majeur.

Chez Juglans cordiformis nous avons également isolé de plus faibles quantités de kempférol-3-sophoroside. Ce dernier corps paraît exister aussi chez Betula medwediewii, et il est probable que des glycosides du kempférol existent comme constituants mineurs chez d'autres espèces (179).

Dans le genre Populus, à côté du kempférol-3-0-rhamnosidolaminaribioside comme constituant majeur, il est possible qu'il existe un glycoside du quercétol (179).

Chez Fagus silvatica, les glycosides du kempférol prédominent sous la forme acylée et sous la forme de sophoroside.

Quant au Myrica, il contient un galactoside du quercétol à l'étude.

Dans l'ensemble, ce sont les glycosides du quercétol ou du kempférol qui prédominent alternativement. Le quercétol-3-sophoroside paraît caractériser plus particulièrement le groupe des Bétulacées, peut être des Juglandacées.

Les renseignements que nous avons sur les autres familles s'étendent à trop peu d'espèces pour en tirer des conclusions chimiotaxonomiques. Cependant, on peut remarquer que le kempférol rhamnosidolaminaribioside prédomine chez Populus (Salicacées) et le kempférol coumaroylglucose accompagné de kempférolsophoroside chez Fagus (Fagacées).

La comparaison peut être faite avec les hétérosides trouvés dans d'autres organes de la plante, notamment par HÖRHAMMER (164-168). Il semble y avoir un appauvrissement dans la variété des aglycones quand on passe de la feuille ou de la fleur au pollen (179). La fraction glucidique présente également une uniformité plus grande, si on la compare aux glycosides de la feuille, le sophorose constituant le sucre prédominant dans neuf espèces sur onze.

Le fait que le pollen mûr et sec, représente la fin d'un cycle métabolique, peut faire considérer les flavonoïdes comme des produits terminaux. Seule l'étude sur le pollen germé d'une part, et sur les cellules-mères lors de sa formation dans l'anthère d'autre part, pourrait nous renseigner sur leur rôle physiologique.

Enfin, sur l'ensemble des pollens d'Angiospermes nous pouvons constater d'après le tableau n° 6 que peu de travaux ont été effectués dans le domaine des hétérosides

flavonoïdiques et qu'ils sont trop dispersés pour que l'on puisse en tirer des conclusions d'ordre chimiotaxonomique .

Cependant, on peut remarquer que l'on ne trouve des glycosides de l'isorhamnétol (méthyl-3'-éther du quercétol) que chez les Monocotylédones et que celui-ci constitue la seule aglycone à se trouver éventuellement osidifiée sur deux hydroxyles.

D'un point de vue structural, la constatation générale que chez les flavonols, l'hydroxyle en 3 est osidifié préférentiellement se trouve vérifiée.

Tableau n° 6

REPARTITION SYSTEMATIQUE DES HETEROSIDES FLAVONOÏDIQUES

DANS LES POLLENS D'ANGIOSPERMES

L'astérisque dans les colonnes de références désigne les substances dont nous avons ici décrit l'isolement et l'étude structurale.

I) DICOTYLEDONES

1) Apétales

<u>Juglandales</u>	Espèce	Références	Hétéroside
Juglandacées	Juglans cordiformis Maxim.	*	quercétol-3-sophoroside
	Juglans sieboldiana Maxim.	*	kempférol-3-sophoroside (constituant mineur)
		*	quercétol-3-sophoroside
<u>Salicales</u>			
Salicacées	Populus yunnanensis Dode	*	kempférol-3-2 ¹ rhamnosido-laminaribioside
	Populus lasiocarpa Oliver	*	kempférol-3-2 ¹ rhamnosido-laminaribioside
<u>Fagales</u>			
Bétulacées	Alnus cordata Desf.	*	quercétol-3-sophoroside
	Alnus incana (L) Vill.	*	quercétol-3-sophoroside
	Betula Medwediewii Regel	*	quercétol-3-sophoroside
	Carpinus carpinzza Kit.	*	kempférol-3-sophoroside (constituant mineur)
	Corylus avellana L.	*	quercétol-3-sophoroside
	Ostrya carpinifolia Scop.	*	quercétol-3-sophoroside
Fagacées	Fagus silvatica L.	196717	tiliroside
		*	tiliroside
		*	kempférol-3-sophoroside (constituant mineur)



2) Dialypétales

Ranunculales

Ranunculacées Anemone coronaria

1955 35 delphinidol arabinoside

Guttiférales

Theacées

1969 57 pollénitine-3-glucoside

pollénitine-3-rhamnose
glucose

Rosales

Légumineuses

Acacia dealbata

1956 37 naringénol-7-glucoside

1955 38 naringénol-5-glucosido-glucoside

1956 48 quercétol-3-rutinoside

1956 48 myricétol-3-glucoside

1955 59 morine-
{ rhamnose
glucose

3) Gamopétales

Oléales

Oléacées

Fraxinus sogdiana Bunge

* quercétol-3-sophoroside

Forsythia intermedia Zabel

1950 40,41 quercétol-3-rhamnoside = quercitroside

1949 40,41 quercétol-3-rutinoside

Forsythia, plusieurs espèces

1960 47 quercétol-3-rutinoside (par chromatographie)



Tubiflorales

Solanacées	Petunia hybrida	1960	39	kempférol-3- α -lycobioside = 4- β -glucosidogalactose
			39	kempférol-3- $\left\{ \begin{array}{l} \text{méthylpentose} \\ \text{galactose} \end{array} \right.$
			39	kempférol-3-rhamnosidogalactoside
			39	quercétol-3- α -lycobioside
	Solanum tuberosum	1962	49	quercétol-3-rutinoside (par chromatographie)
<u>Campanulales</u>				
Composées	Ambrosia artemisifolia	1951	43	quercétol-3-glucoside = isoquercitroside
		1919	42	

II) MONOCOTYLEDONES

<u>Liliiflores</u>						
Liliacées	Lilium auratum	1956	54	isorhamnétol-3-rutinoside = narcissine		
		1957	55			
	Lilium candidum L.	1955	56	isorhamnétol-3- $\left\{ \begin{array}{l} \text{glucose} \\ \text{galactose} \\ \text{rhamnose} \end{array} \right.$		
		1959	180	2 complexes polypeptides-sucres-flavonols		
	Lilium lancifolium Thumb	1966	46	quercétol-3-rutinoside		
			46	isorhamnétol-3-rutinoside		
Iridacées	Crocus "Sir John Bright"	1944	53	isorhamnétol-3,4'-diglucoside		
<u>Graminales</u>						
Graminées	Dactylis glomerata	1931	50	isorhamnétol-3,4'-diglucoside = dactyline		
		1956	51			
		1957	52			
Palmales	Phleum pratense	1931	50	isorhamnétol-3,4'-diglucoside		
Palmacées	Dactylifera palmae L.	1952	45	quercétol-3-rutinoside		
<u>Pandanales</u>						
Typbacées	Typha angustata Bory et Chaub	1928	44	isorhamnétol		glucoside

BUS
LILLE

C O N C L U S I O N E T R E S U M E

---:---

Les glycosides flavonoïdiques dans les pollens d'arbres ont été l'objet de ce travail, pour lequel nous avons mis en oeuvre les techniques particulières à l'étude des polyphénols d'une part et des oligosaccharides d'autre part.

Nous avons isolé du pollen de deux espèces de Populus (P. yunnanensis et P. lasiocarpa, Salicacées) un hétéroside nouveau dont nous avons déterminé la structure : c'est un kempférol-3-O-rhamnosidodiglycoside. Nous avons obtenu et décrit le trisaccharide nouveau, également, qui constitue sa partie glucidique, il s'agit d'un [O-β-D-glucopyranosyl (1→3)] - [O-α-L-rhamnopyranosyl- (1→2)]-D-glucopyranose.

Nous avons étudié la structure du quercétol-3-sophoroside que nous avons isolé du pollen d'Alnus cordata. Ce flavonoside n'avait pas été signalé auparavant comme constituant du pollen.

Nous avons encore isolé cette substance et l'avons obtenue à l'état cristallisé à partir du pollen de cinq autres Bétulacées (Alnus incana, Betula Medwediewii, Carpinus carpini-
nizza, Corylus avellana, Ostrya carpinifolia), de deux Juglandacées (Juqlans cordiformis et J. sieboldiana) et d'une Oléacée (Fraxinus sogdiana).

Dans chaque cas elle a été identifiée par son point de fusion, sa mobilité chromatographique, son pouvoir rotatoire, l'analyse de ses propriétés spectrales en ultra-violet et son spectre infra-rouge.

Le quercétol-3-sophoroside est l'hétéroside majeur du pollen des espèces citées. Il est différent de l'hétéroside majeur de la feuille de ces espèces, où il n'a même pas été signalé comme constituant mineur.

Nous avons isolé un autre sophoroside comme hétéroside mineur du pollen de Juglans cordiformis, de Betula Medwediewii et de Fagus silvatica le kempférol-3-sophoroside (sophoraflavonoside de Rabaté).

Enfin, de Fagus silvatica, nous avons isolé un glucoside acylé du kempférol, le tiliroside.

* * *

13. B.A. KNIGHTS
Phytochemistry, 1968, 7, 1707.
14. E. KVANTA
Acta Chem. Scand. Danem., 1968, 22, 2161.
15. M. DEVYS, D. ANDRE et M. BARBIER
C.R. Acad. Sci., 1969, 269, 798.
16. C.Y. HOPKINS, A.W. JEWANS et R. BOCH
Can. J. Biochem., 1969, 47, 433.
17. S. el AMIN, OLFAT AWAD, M. ABDEL SAMAD et M.N. ISKANDER
Phytochemistry, 1969, 8, 295.
18. C. SOSA-BOURDOUIL
C.R. Acad. Sci., 1937, 205, 336.
19. C. SOSA-BOURDOUIL
8ème Congrès Inter. Botanique, Sect.6, 251,
(Paris, 1954).
20. G. TAPPI
Gazz. Chim. Ital., 1951, 81, 621.
21. G. TAPPI et E. MENZIANI
Atti. Soc. Naturalisti Matematici Modena, 1954,
85, 28.
22. G. TAPPI et E. MENZIANI
Atti Soc. Naturalisti Matematici Modena, 1955,
86, 31.
23. S. HISAMICHI
J. Pharm. Soc. Japan, 1960, 81, 446.

24. K. TSUKIDA et IKEUCHI
Bitamin, 1965, 32, 222.
25. M. LEPAGE et R. BOCH
Lipids, USA, 1968, 3, 530.
26. T.A. GEISSMAN et E. HINREINER
Bot. Rev., 1952, 18, 77.
27. H. GRISEBACH
in Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments
GOODWIN, 1965.
28. J.B. HARBORNE
Comparative Biochemistry of the Flavonoids,
Academic Press, London, 1967.
29. E. WONG
Chemical Communications, 1968, 395.
30. H. GRISEBACH et W. BARZ
Naturwissenschaften, 1969, 56, 538.
31. L.J. HAYNES
Adv. Carbohyd. Chem., 1963, 18, 227.
32. L.J. HAYNES
Adv. Carbohyd. Chem., 1965, 20, 357.
33. V.K. BHATIA et T.R. SESHADRI
Curr. Sci. India, 1967, 36, 111.
34. R. ALSTON
Recent Adv. Phytochem., Netherl., 1968, 1, 305.

35. G. TAPPI et A. MONZIANI
Gazz. Chim. Ital., 1955, 85, 732.
36. A.E. VIVINO et L.S. PALMER
Arch. Biochem., 1944, 4, 129.
37. A. SPADA et R. CAMERONI
Gazz. Chim. Ital., 1956, 86, 980.
38. G. TAPPI, A. SPADA et R. CAMERONI
Gazz. Chim. Ital., 1955, 85, 703.
39. H.G. FRITZ
Beitrag zur Kenntnis der Polleninhaltsstoffe von
Petunien, Thèse Univ., Köln, 1960.
40. R. KUHN et I. LÖW
Chem. Ber., 1949, 82, 474.
41. F. MOEWUS
Biol. Zentr. 1950, 69, 181.
42. F.W. HEYL
J. Amer. Chem. Soc., 1919, 41, 1285.
43. F.A. STEVENS, D. MOORE et H. BAER
J. Allergy, 1951, 22, 165.
44. M. FUKUDA
Bull. Chem. Soc. Japan, 1928, 3, 53.
Sci. Reports Tohoku Imp. Univ. First Series,
1928, 17, 711.
Chem. Abstr. 1928, 22, 1993.
45. M.S. EL RIDI, L.A. STRAIT et M.H. ABOUL Wafa
Arch. Biochem. Biophys., 1952, 39, 317.

46. Y. TOGASAWA, T. KATSUMATA, H. KAWAJIRI et N. ONODERA
J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1966, 40, 461.
47. M. FUJITA, S. HISAMICHI, T. ANDO et N. MURAKAMI
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 1960, 8, 1124.
Chem. Abstr. 1962, 56, 7707.
48. A. SPADA et R. CAMERONI
Gazz. Chim. Ital., 1956, 86, 965.
49. J.B. HARBORNE
Biochem. J., 1962, 84, 100.
50. M.B. MOORE et E.E. MOORE
J. Amer. Chem. Soc., 1931, 53, 2744.
51. G.E. INGLETT
Nature, 1956, 178, 1346.
52. G.E. INGLETT
J. Org. Chem., 1957, 22, 189.
53. R. KUHN et I. LÖW
Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1944, 77B, 196.
54. H. ARAKAWA
Nippon Kagaku Zasshi, 1956, 77, 1057.
Chem. Abstr., 1959, 53, 20316.
55. M. KOTAKE et H. ARAKAWA
Bull. Chem. Soc. Japan, 1957, 30, 862.
56. G. TAPPI et E. MENZIANI
Gazz. Chim. Ital., 1955, 85, 694.

57. Y. SAKAMOTO
Agric. Biol. Chem. Japan, 1969, 33, 818.
58. M.C. JOHNSON, S.F. HAMPTON, A.W. WCIELE, et S. FRANKEL.
J. Allergy, 1954, 25, 82.
59. A. SPADA et R. CAMERONI
Gazz. Chim. Ital., 1955, 85, 1043.
60. J.A. GOSS
Bot. Rev., 1968, 34, 332.
61. F. POHL
Beih. Bot. Cbl., 1937, 56/A, 365.
62. F.E. TODD et R.K. BISHOP
J. of Econ. Ent., 1940, 33, 866.
63. J. LOUVEAUX
Th. Doct. Etat Sc. Nat., Paris, 1958.
64. REITER
The Ohio J. of Sc., 1947, XLVII, (4), 137.
65. R. DEDONDER
in Chromatographie en Chimie Organique et
Biologique, LEDERER, Masson, Paris 1960.
66. J.E. COURTOIS et F. PERCHERON
J. Pharm. Belg., 1963, 18, 23.
67. F. PERCHERON
in Chromatography, HEFTMANN, New York, 1967.
68. W.E. TREVELYAN, D.P. PROCTER et J.S. HARRISSON
Nature, 1950, 166, 444.

69. F. PETEK
Th. Doct. Univ. Pharm., Paris 1962.
70. L. NOVELLIE
Nature, 1950, 166, 745.
71. S.M. PARTRIDGE
Nature, 1949, 164, 443.
72. L. JURD
in The Chemistry of Flavonoid Compounds,
GEISSMAN, Pergamon Press, Oxford, 1962.
73. G.H. MANSFIELD, T. SWAIN et C.G. NORDSTRÖM
Nature, 1953, 172, 23.
74. C.G. NORDSTRÖM et T. SWAIN
J. Chem. Soc., 1953, 2764.
75. L. JURD et R.M. HOROWICTZ
J. Org. Chem., 1957, 22, 1618.
76. L. JURD
J. Amer. Chem. Soc., 1958, 80, 5531.
77. R.M. HOROWICTZ et L. JURD
J. Org. Chem., 1961, 26, 2446.
78. E. HASLAM
Chemistry of vegetable Tanins, Academic Press,
London, 1966.
79. L. JURD
Arch. Biochem., 1956, 63, 376.
80. L. JURD et T.A. GEISSMAN
J. Org. Chem., 1956, 21, 1395.

81. L. JURD
Phytochemistry, 1969, 8, 445.
82. K.R. MARKHAM, et T.J. MABRY
Phytochemistry, 1968, 7, 1197.
83. L. HÖRHAMMER et R. HÄNSEL
Arch. Pharm., 1953, 286/58, 425.
84. T. SWAIN
Chem. A. Ind. (Lond.), 1954, 1480.
85. L. HÖRHAMMER, L. ENDRES, H. WAGNER et F. RICHTHAMMER.
Arch. Pharm., 1957, 290, 342.
86. D.W. FOX, W.L. SAVAGE et S.H. WENDER
J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 2504.
87. M.K. SEIKEL
J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 5685.
88. J.B. HARBORNE
Phytochemistry, 1965, 4, 107.
89. E.C. BATE-SMITH
Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 1956, 27, 165.
J. Linn. Soc., London (Botany), 1962, 58, 95.
90. W.G. OVEREND, C.W. RESS et J.S. SEQUEIRA
J. Chem. Soc., 1962, 3429.
91. G. BERTRAND et P. THOMAS
Guide pour les manipulations de chimie biologique
Dunod et Pinat, Paris, 1913.
92. M. SOMOGYI
J. Biol. Chem., 1952, 195, 19.

93. N. NELSON
J. Biol. Chem., 1944, 153, 375.
94. L.G. PALEG
Anal. Chem., 1959, 31, 1902.
95. R.L. WHISTLER et M.L. WOLFROM
Methods in Carbohydrate Chemistry, I, 387, (1962)
96. R. DREYWOOD
Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.), 1946, 18, 499.
97. L.E. SMITH et J.E.E. PAGE
J. Soc. Chem. Ind., 1948, 67, 48.
98. A.W. DEVOR, C. CONGER et I. GILL
Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, 20.
99. Z. DISCHE et L.B. SHETTLES
J. Biol. Chem., 1948, 175, 595.
100. Z. DISCHE, L.E. SHETTLES et M. OSNOS
Arch. Biochem., 1949, 22, 169.
101. J. MONTREUIL et G. SPIK
Microdosage des glucides-1-Méthodes colorimétriques
de dosage des glucides totaux, 1966.
102. J. DAVY
Th. Doct. Univ. Pharm., Paris 1963, 33.
103. J. MONTREUIL, G. SPIK et A. KONARSKA
Microdosage des glucides 3 Méthodes chromatogra-
phiques de dosage des oses "neutres", 1967.

104. J. DATE
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1958, 10, 444.
105. R.C. HUGHES et R.W. JEANLOZ
Biochemistry, 1964, 3, 1535.
106. Y. ABE et K. HAYASHI
Bot. Mag. Tokyo, 1956, 69, 577.
107. G. ZEMPLÉN et H. GERÉCS
Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1938, 71, 2520.
108. H. ARAKAWA
Nippon Kagaku Zasshi, 1956, 77, 1314.
109. B.V. CHANDLER et K.A. HARPER
Australian J. Chem., 1961, 14, 586.
110. J. MONTREUIL et A. CHOSSON
C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3071.
111. A. CHOSSON, J. MONTREUIL et N. SCHEPPLER
C.R. Acad. Sci., 1962, 255, 3261.
112. A. ADAM-CHOSSON et J. MONTREUIL
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 1881.
113. C.D. GUTSCHE
Organic Reactions, 1954, VIII, 364.
114. W.D. Mc PHEE et E. KLINGSBERG
Organic synthesis, Coll., 1955, 3, 119.
115. F. ARNDT
Org. Synth., 1943, 2, 165.
116. D.A. SEMENOV, E.F. COX et J.D. ROBERTS
J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3221.

117. B. HEISTERT et Coll.
in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie
X/4 Stickstoffverbindungen I, 1968, 473-893.
118. K. HEYNS et O.F. WOYRSCH
Chem. Ber., 1953, 86, 76.
119. D.W. ADAMSON et J. KENNER
J. Chem. Soc., 1935, 186.
J. Chem. Soc., 1937, 1551.
120. C.E. REDEMANN, F.O. RICE, R. ROBERTS et H.P. WARD
Org. Synth., 1955, 3, 119.
121. T.J. de BOER et H.J. BACKER
Org. Synth., 1954, 34, 96.
Org. Synth., 1956, 36, 16.
Org. Synth., 1963, 4, 250.
122. H. SCHLENK et J.C. GELLERMAN
Anal. Chem., 1960, 32, 1412.
123. J.A. MOORE et D.E. REED
Org. Synth., 1961, 41, 16.
124. C. CROTTE, A. NULE et N.E. PLANCHE
Bull. Soc. Chim. Biol., 1970, 52, 108.
125. H. REIMLINGER
Chem. Ber., 1961, 94, 2547
126. E. MÜLLER et Coll.
Chem. Abstr., 1960, 54, 10861.
Chem. Abstr., 1962, 56, 11445.
127. W. RUNDEL
Angew. Chem., 1962, 74, 469.

128. M.T. SUBBIAH, A. KUKSIS et S. MOOKERJEA
Broc. Can. Federation Biol. Soc., 1967, 10, 5.
129. P.E. NOTT et J.C. ROBERTS
Phytochemistry, 1967, 6, 741.
130. P. DELRICHS, J.T.B. MARSHALL et D.H. WILLIAMS
J. Chem. Soc., 1968, 8, 941.
131. W. BARKER et R. ROBINSON
J. Chem. Soc., 1928, 3115.
132. P.R. RAD et T.R. SESHADRI
Proc. Indian Acad. Sci., Sect. A, 1948, 27, 104.
133. L. BIRKOFER, C.N. KAISER, M. DONICKE et W. KOCH
Ztschr. f. Naturforsch., 1965, 20^B, 424.
134. S. HAKOMORI
J. Biochem., 1964, 55, 205.
135. P.A. SANDFORD et H.L. CONRAD
Biochemistry, 1966, 5, 1508.
136. F. PETEK
Bull. Soc. Chim. Fr., 1965, 263.
137. F.E. MUMFORD, D.H. SMITH et J.E. CASTLE
Pl. Physiol. Lancaster, 1961, 36, 752.
138. M. FURUYA, A.W. GALSTON et B.B. STOWE
Nature, 1962, 193, 456.
139. M. FURUYA et A.W. GALSTON
Phytochemistry, 1965, 4, 285.

140. J.B. HARBORNE
Experientia, 1963, 19, 7.
141. J.B. HARBORNE et H.S.A. SHERRATT
Biochem. J., 1961, 70, 298.
142. P.A. HEDIN, P.L. LAMAR, A.C. THOMPSON et J.P. MINYARD
Amer. J. Bot., 1968, 55, 431.
143. K. NAITO
J. Agric. Chem. Soc. Japan, 1968, 42, 450.
144. C.W. NYSTROM, W.L. HOWARD et S.H. WENDER
J. Org. Chem., 1957, 22, 1272.
145. C. TANRET et G. TANRET
C.R. Acad. Sci., 1899, 129, 725.
146. Y. OSHIMA et T. NAKABAYASHI
J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1953, 27, 759.
Chem. Abstr., 1954, 48, 5943 b.
147. Y. TAKINO, H. IMAGAWA et H. YOSHIDA
J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1953, 27, 150.
Chem. Abstr., 1955, 49, 14915 i.
148. Y. TAKINO, H. IMAGAWA et H. YOSHIDA
J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1954, 28, 182.
Chem. Abstr., 1956, 50, 7958 f.
149. E.A.H. ROBERTS, R.A. CARTWRIGHT et D.J. WOOD
J. Sci. Food Agr., 1956, 7, 637.
150. E.A.H. ROBERTS et D.J. WOOD
Biochem. J., 1951, 49, 414.

151. J.B. HARBORNE
J. Chromat., 1959, 2, 581.
152. C. SOSA-BOURDOUIL et A. SOSA
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1593.
153. D. FRENCH, G.M. WILD, B. YOUNG et W.J. JAMES
J. Amer. Chem. Soc., 1953, 75, 709.
154. R. KUHN, I. LÖW et H. TRISCHMANN
Chem. Ber., 1955, 88, 1492.
155. B.H. KOEPPEN
Carbohydr. Res., 1969, 10, 105.
156. J.B. HARBORNE et E. HALL
Biochem. J., 1963, 88, 41 p.
157. L. BIRKOFFER et C. KAISER
Ztschr. f. Naturforsch., 1962, 17, 359.
158. W. LANGENBECK
Pharmazie, 1964, 19, 4761.
159. M. KROLIKOVSKA et J. KAMECKI
Roczn. Chem., 1965, 39, 1937.
160. Z.P. PAKUDINA et A.S. SADYKOV
Dokl. Akad. Nauk Uz.SSSR, 1964, 21, (9), 30
Chem. Abstr., 1965, 62, 9457.
161. H. WAGNER, L. HÖRHAMMER, R. DISCHERI, L. FARKAS et M. NÓGRADI
Chem. Ber., 1968, 101, 1186.

162. J. RABATE et J. DUSSY
Bull. Soc. Chim. Biol., 1938, 20, 467.
163. R. HEGNAUER
Chemotaxonomie der Pflanzen, IV et V, Birkhäuser,
Basel, 1969.
164. L. HÖRHAMMER, E. VORNDRAN et H. WAGNER
Arch. Pharm., 1956, 289, 316.
165. R. HÄNSEL, L. HÖRHAMMER
Arch. Pharm., 1954, 287, 117.
166. L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et R. LUCK
Arch. Pharm., 1957, 290, 338.
167. P. CASPARIS, P. SPRECHER et H.J. MÜLLER
Pharm. Acta Helv., 1946, 21, 341.
168. L. HÖRHAMMER, R. HÄNSEL et P. FRANK
Arch. Pharm., 1953, 286, 481.
169. A.M. COLLOT et C. CHARAUX
Bull. Soc. Chim. Biol., 1939, 21, 455.
170. K. HERRMANN
Arch. Pharm., 1955, 288, 362.
171. T. NAKAOKI et N.J. MORITA
J. Pharm. Soc. Japan, 1958, 78, 521.
172. R. PARIS et A. STAMBOULI
C.R. Acad. Sci., 1961, 253, 313.

173. R. PARIS et A. STAMBOULI
Ann. Pharm. Franç. 1960, 18, 873.
174. J. RABATE et J. DUSSY
Bull. Soc. Chim. Biol., 1938, 20, 459.
175. L. HÖRHAMMER, L. STICH et H. WAGNER
Arch. Pharm., 1961, 294, 687.
176. J.B. HARBORNE
Phytochemistry, 1964, 3, 151.
177. M. TISSUT
Phytochemistry, 1967, 6, 1291.
178. H.H. DIETRICHS et E. SCHAICH
Naturwissenschaften, 1963, 50, 478.
179. R. WIERMANN
Ber. Dtsch. Bot. Ges., 1968, 81, 3.
180. V. ROSSETTI
Ann. Chim. (Rome), 1959, 49, 793.

INDEX ALPHABETIQUE DES NOMS D'AUTEURS

Les chiffres entre parenthèses désignent le numéro de la référence bibliographique; les autres chiffres désignent les pages où la référence apparaît.

ABE (Y.)	(106)	38
ADAM-CHOSSON (A.)	(112)	40
ADAMSON (D.W.)	(119)	44, 46
ALSTON (R.)	(34)	9
AMIN (S. e1)	(17)	2
ARAKAWA (H.)	(108)	39, 107
ARAKAWA (H.)	(54)	14
ARNDT (F.)	(115)	44, 45, 46
BARKER (W.)	(131)	47
BATE-SMITH (E.C.)	(89)	30
BERTRAND (G.)	(91)	31
BHATIA (V.K.)	(33)	9
BIRKOFFER (L.)	(157)	12, 75, 76, 77
BIRKOFFER (L.)	(133)	49
BOER (T.J. de)	(121)	44
BROOKS (J.)	(3)	2
BROOKS (J.)	(4)	2
CASPARIS (P.)	(167)	90
CHANDLER (B.V.)	(109)	39
CHOSSON (A.)	(111)	40

COLLOT (A.M.)	(169)	91
COURTOIS (J.E.)	(66)	19
CROTTE (C.)	(124)	45
DATE (J.)	(104)	34, 61
DAVY (J.)	(102)	22, 35
DEDONDER (R.)	(65)	19
DEVOR (A.W.)	(98)	34
DEVYS (M.)	(15)	2
DIETRICHS (H.H.)	(178)	95
DISCHE (Z.)	(99)	34, 37, 61
DISCHE (Z.)	(100)	34, 37, 61
DREYWOOD (R.)	(96)	32
FOX (D.W.)	(86)	29
FRENCH (D.)	(153)	68
FRITZ (H.G.)	(39)	12, 13, 106
FUJITA (M.)	(47)	13, 105
FUKUDA (M.)	(44)	13, 105
FURUYA (M.)	(139)	55
FURUYA (M.)	(138)	55
GEISSMAN (T.A.)	(26)	4
GOSS (J.A.)	(60)	16
GRISEBACH (H.)	(27)	4
GRISEBACH (H.)	(30)	5
GUTSCHE(C.D.)	(113)	44

HAKOMORI (S.)	(134)	49,53,65,67,68,78
HÄNSEL (R.)	(165)	90, 91, 101
HARBORNE (J.B.)	(151)	56
HARBORNE (J.B.)	(49)	13,56,59,71,75, 105
HARBORNE (J.B.)	(140)	55, 75
HARBORNE (J.B.)	(176)	94
HARBORNE (J.B.)	(88)	30
HARBORNE (J.B.)	(28)	5, 9, 71
HARBORNE (J.B.)	(156)	71
HARBORNE (J.B.)	(141)	54
HASLAM (E.)	(78)	25, 62
HAYNES (L.J.)	(31)	9
HAYNES (L.J.)	(32)	9
HERMANN (K.)	(170)	91
HEDIN (P.A.)	(142)	54
HEGNAUER (R.)	(163)	90
HEISTERT (B.)	(117)	44, 46
HEYL (F.W.)	(42)	12, 105
HEYNS (K.)	(118)	44
HISAMICHI (S.)	(23)	3
HOPKINS (C.Y.)	(16)	2
HÖRHAMMER (L.)	(85)	29
HÖRHAMMER (L.)	(83)	28
HÖRHAMMER (L.)	(168)	90, 101
HÖRHAMMER (L.)	(175)	94

HÖRHAMMER (L.)	(164)	90, 91, 101
HÖRHAMMER (L.)	(166)	90, 101
HOROWICTZ (R.M.)	(77)	23
HÜGEL (M.F.)	(8)	2
HÜGEL (M.F.)	(12)	2
HUGHES (R.C.)	(105)	36, 61
INGLETT (G.E.)	(51)	13, 107
INGLETT (G.E.)	(52)	13, 107
JOHNSON (M.C.)	(58)	14
JURD (L.)	(79)	25
JURD (L.)	(76)	23, 25
JURD (L.)	(72)	22
JURD (L.)	(81)	25, 26, 88
JURD (L.)	(80)	25, 62
JURD (L.)	(75)	23, 25
KNIGHTS (B.A.)	(13)	2
KOEPPEN (B.H.)	(155)	71
KOTAKE (M.)	(55)	14, 107
KROLIKOVSKA (M.)	(159)	75
KUHN (R.)	(53)	14, 107
KUHN (R.)	(40)	12, 13, 105
KUHN (R.)	(154)	69, 70
KVANTA (E.)	(14)	2
LANGENBECK (W.)	(158)	75
LEPAGE (M.)	(25)	3
LINSKENS (H.F.)	(9)	2

LOUVEAUX (J.)	(63)	17
LUNDÉN (R.)	(6)	2
LUNDÉN (R.)	(7)	2
MANSFIELD (G.H.)	(73)	23
MARKHAM (K.R.)	(82)	28
MOEWUS (F.)	(41)	12, 13, 105
MONTREUIL (J.)	(110)	40
MONTREUIL (J.)	(101)	34, 35
MONTREUIL (J.)	(103)	34
MOORE (M.B.)	(50)	13, 14, 107
MOORE (J.A.)	(123)	44
MÜLLER (E.)	(126)	45
MUMFORD (F.E.)	(137)	55
NAITO (K.)	(143)	55
NAKAOKI (T.)	(171)	91
NELSON (N.)	(93)	31
NORDSTRÖM (C.G.)	(74)	23, 47
NOTT (P.E.)	(129)	46
NOVELLIE (L.)	(70)	22
NYSTROM (C.W.)	(144)	56
GELRICHS (P.)	(130)	47
OSHIMA (Y.)	(146)	56
OVEREND (W.G.)	(90)	30
PAKUDINA (Z.P.)	(160)	75
PALEG (L.G.)	(94)	31

PARIS (R.)	(173)	91
PARIS (R.)	(172)	91
PARTRIDGE (S.M.)	(71)	22
PERCHERON (F.)	(67)	19
PETEK (F.)	(69)	22
PETEK (F.)	(136)	52
PHEE (W.D. Mc)	(114)	44
POHL (F.)	(61)	16
RABATE (J.)	(174)	94, 109
RABATE (J.)	(162)	79
RAO (P.R.)	(132)	47
REDEMANN (C.E.)	(120)	44
REIMLINGER (H.)	(125)	45
REITER (R.)	(64)	17
RIDI (M.S. EL)	(45)	13, 107
ROBERTS (E.A.H.)	(150)	56
ROBERTS (E.A.H.)	(149)	56
ROSSETTI (V.)	(180)	107
RUNDEL (W.)	(127)	45
SAKAMOTO (Y.)	(57)	15, 105
SANDFORD (P.A.)	(135)	50
SCHLENK (H.)	(122)	44, 45
SEIKEL (M.K.)	(87)	87
SEMENOV (D.A.)	(116)	44, 45
SMITH (L.E.)	(97)	33
SOMOGYI (M.)	(92)	31

SOSA (A.)	(10)	2
SOSA-BOURDOUIL (C.)	(18)	3
SOSA-BOURDOUIL (C.)	(19)	3
SOSA-BOURDOUIL (C.)	(5)	2
SOSA-BOURDOUIL (C.)	(11)	2
SOSA-BOURDOUIL (C.)	(152)	59, 77
SPADA (A.)	(59)	15, 105
SPADA (A.)	(48)	15, 105
SPADA (A.)	(37)	11, 13, 105
STEVENS (F.A.)	(43)	12, 105
SUBBIAH (M.T.)	(128)	45
SWAIN (T.)	(84)	23
TAKINO (Y.)	(147)	56
TAKINO (Y.)	(148)	56
TANRET (C.)	(145)	56
TAPPI (G.)	(20)	3
TAPPI (G.)	(21)	3
TAPPI (G.)	(22)	3
TAPPI (G.)	(35)	11, 105
TAPPI (G.)	(56)	14, 56, 107
TAPPI (G.)	(38)	11, 105
TISSUT (M.)	(177)	94, 104
TODD (F.E.)	(62)	16
TOGASAWA (Y.)	(46)	13, 14, 107
TREVELYAN (W.E.)	(68)	22
TSUKIDA (K.)	(24)	3

VIVINO (A.E.)	(36)	11
WAGNER (H.)	(161)	75
WHISTLER (R.L.)	(95)	31
WIERMANN (R.)	(179)	100, 101
WONG (E.)	(29)	5
ZEMPLEM (G.)	(107)	39
ZETZSCHE (F.)	(2)	2
ZETZSCHE (F.)	(1)	2

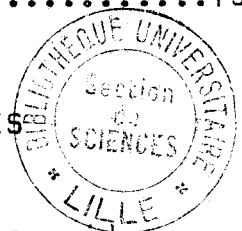
II. ISOLEMENT ET ETUDE D'UN FLAVONOL-TRIOSIDE DU
POLLEN DE POPULUS YUNNANENSIS DODE ET DE P.
LASIOCARPA OLIVER

INTRODUCTION : Les trisaccharides liés aux flavonols....55

- 1) Isolement et purifications à partir du pollen
de Populus yunnanensis Dode.....57
- 2) Propriétés physiques.....58
- 3) Hydrolyse acide quantitative du flavonoside....60
- 4) Emplacement de la liaison hétérosidique.....61
- 5) Emplacement des liaisons holosidiques.....65
- 6) Structure de l'hétéroside.....72
- 7) Le kempférol-3-O-2¹ rhamnosidolaminaribioside du
pollen de Populus lasiocarpa Oliver.....73

Spectres U.V. et I.R.....73(a,b,c)

III. LES SOPHROSIDES DE FLAVONOLS DE QUELQUES
POLLENS D'ARBRES



- 1) Isolement et étude du quercétol-3-sophoroside
d'Alnus cordata Desf.....75

Spectres U.V.....85(a)

- 2) Isolement, identification et répartition du
quercétol-3-sophoroside dans le pollen de
quelques Bétulacées, Juglandacées et Oléacées....86
- 3) Autres glycosides flavoniques des pollens.....94

DISCUSSION GENERALE.....100

REPARTITION SYSTEMATIQUE DES HETEROSIDES FLAVONOÏDIQUES
DANS LES POLLENS D'ANGIOSPERMES.....103

CONCLUSION ET RESUME.....108

BIBLIOGRAPHIE.....110