50376
1973
238
d'ordre 290

50376
1973
238

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Annie JACQUIN - DUBREUIL

Pharmacien

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE

DES FLAVONOIDES CHEZ LA GAUDE (Reseda Luteola L.)

Membres du Jury :

R. BOURIQUET	*Président*
J. GUILLAUME	*Examinateur*
A. GORIS	*Examinateur*
R.R. PARIS	*Examinateur*
P. FRIGOT	*Examinateur*

17 Décembre 1973

SCD LILLE 1
D 030 217017 6

50 376
1973
238

50376
1973
238

Exclu du Prêt

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA GAUDE, RESEDA LUTEOLA L.

-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-

Annie JACQUIN - DUBREUIL

-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-

BIBLIOTHEQUE INTERUNIVERSITAIRE
SECTION DE SCIENCES
LILLE

Ce travail a été réalisé sous la direction du Professeur GORIS au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'AMIENS.

-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Matière Médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'AMIENS, dirigé par Monsieur le Professeur GORIS, qui a bien voulu me confier ce travail. Je suis très heureuse de pouvoir lui exprimer ma profonde reconnaissance pour l'intérêt attentif et constant avec lequel il a suivi mon travail, les avis expérimentés qu'il m'a prodigués et la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Je remercie Monsieur le Professeur BOURIQUET de m'avoir associée à son équipe de recherches. C'est un grand honneur pour moi qu'il ait accepté de présider mon Jury de Thèse. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur GUILLAUME m'a fait l'honneur de lire ce travail et de faire partie du Jury. Je lui en suis très reconnaissante.

Je prie Monsieur le Professeur PARIS de trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à mes travaux. Son autorité en matière de flavonoïdes le désignait tout naturellement pour siéger dans ce Jury. Je l'en remercie vivement.

Je suis heureuse de compter parmi mes juges Monsieur le Professeur FRIGOT qui n'a cessé, tout au long de ce travail de me prodiguer des conseils avisés et bienveillants. Je l'assure de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier également Mademoiselle le Professeur ORFILA et Monsieur le Professeur SMADJA pour l'excellent accueil qu'ils m'ont toujours réservé dans leurs laboratoires, où j'ai pu réaliser la partie de ce travail concernant la microscopie en lumière de Wood.

S O M M A I R E

****

Pages

INTRODUCTION..... 1

AVANT-PROPOS : Caractères botaniques et écologiques de la Gaude "Reseda luteola L"..... 3

CHAPITRE I : Les flavonoïdes de la Gaude. Leur distribution..... 6

1. - ISOLEMENT DES FLAVONOIDES DE LA PLANTE.... 6

1.1. Extraction des flavonoïdes (Extrait G) 6

1.2. Analyse du contenu flavonique de l'extrait G..... 7

1.3. Essais d'isolement de flavonoïdes purs. 8

2. - ETUDE DES FLAVONOIDES ISOLES..... 37

2.1. Techniques d'identification utilisées.. 37

2.2. Lutéolol..... 42

2.3. Lutéoloside..... 51

2.4. Glucolutéoloside..... 63

2.5. Produit Y..... 74

2.6. Produit X_1..... 82

3. - DISTRIBUTION DES FLAVONOIDES DANS LES DIFFERENTS ORGANES DE LA GAUDE..... 83

4. - LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES FLAVONOIDES. 86

CHAPITRE II : Dosage des principaux flavonoïdes de la Gaude..... 90

1. - DIVERSES METHODES DE DOSAGE DES FLAVONOIDES COURAMMENT EMPLOYEES..... 90

2. - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE.... 93

2.1. Dosage spectrophotométrique de flavonoïdes séparés par chromatographie suivie d'élution..... 93

2.2. Dosage densitométrique direct par reflexion des flavonoïdes séparés par chromatographie sur couche mince..... 101

2.2.1. Essais sur des solutions de flavonoïdes purs..... 101

2.2.2. Application de la technique mise au point au dosage des flavonoïdes dans la Gaude..... 110

2.3. Conclusion..... 112

3. - DOSAGE DES PRINCIPAUX FLAVONOIDES DE LA GAUDE..... 113

CHAPITRE III : Isolement d'une souche de tissu de Gaude et étude de la formation des flavonoïdes..... 114

1. - OBTENTION D'UNE SOUCHE DE TISSU DE GAUDE... 114

2. - RECHERCHE DE FLAVONOIDES DANS LE TISSU DE GAUDE CULTIVE "IN VITRO"..... 126

3. - ACTION DE PRECURSEURS DES FLAVONOIDES SUR LE TISSU DE GAUDE CULTIVE "IN VITRO"..... 127

CHAPITRE IV : Action des flavonoïdes de la Gaude sur le tissu de Carotte..... 133

1. - ACTION DES FLAVONOIDES DE LA GAUDE SUR LE DEVELOPPEMENT DU TISSU DE CAROTTE EN CULTURE "IN VITRO"..... 134

2. - RECHERCHE DES FLAVONOIDES DANS LE TISSU DE CAROTTE..... 139

CHAPITRE V : Etude du métabolisme des flavonoïdes chez la Gaude..... 142

1. - ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA BIOSYNTHESE FLAVONIQUE..... 142

2. - TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT L'ETUDE DU METABOLISME DES FLAVONOIDES CHEZ LA GAUDE. 146

CONCLUSIONS GENERALES..... 176

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

La biosynthèse des composés organiques, que l'on trouve chez les végétaux, pose aux physiologistes des problèmes très complexes, mais aussi très intéressants. Parmi eux, nous avons choisi de nous pencher sur celui de la formation des dérivés du groupe des flavonoïdes, pigments qui colorent en jaune certains organes végétaux, particulièrement les fleurs, et dont le rôle reste mal connu.

A la recherche d'un bon matériel d'étude, nous avons pensé à la Gaude, "RESEDA LUTEOLA", "déjà utilisée à la période néolithique, et qui semble la plus ancienne matière colorante connue en Europe. VIRGILE en a parlé, les Gaulois l'ont utilisée et Albert le Grand l'a mentionnée au XIIème siècle" (DILLEMANN - 1968). La Gaude fut d'ailleurs autrefois cultivée sous le nom de Waide, dans la vallée de l'Oise (GRAVES - 1857), pour la production d'un produit tinctorial jaune.

Aujourd'hui encore les artisans perses de la zone dite "CHAHAR-MAHAL" adoptent de préférence les couleurs végétales pour la teinture des laines qui serviront à la confection de tapis : le jaune soutenu est obtenu par le "RESEDA LUTEOLA", (HANGELDIAN - 1959).

L'existence de pigments flavoniques dans la Gaude était connue depuis longtemps : dès 1830, CHEVREUL y caractérisait le lutéolol, 5, 7, 3', 4'-tétrahydroxyflavone, et en 1955, PARIS mettait en évidence et identifiait le lutéoloside, lutéolol-7 β glucoside.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachée à vérifier la composition en dérivés flavoniques de la plante, et nous avons constaté, qu'à côté des flavonoïdes cités ci-dessus, il y avait d'autres substances du même groupe chimique. Nous avons isolé certaines d'entre elles pour en déterminer la structure. Naturellement nous avons été amenée à nous intéresser au problème de la localisation de chacun de ces pigments, d'abord dans les différents organes de la plante, puis dans les divers tissus qui constituent ceux-ci.

Afin d'essayer de suivre l'apparition et l'évolution des dérivés flavoniques au cours du cycle évolutif de la plante, nous avons établi une technique de dosage que nous avons appliquée aux principaux de ces composés.

Par ailleurs, nous avons pensé que la technique de culture des tissus "in vitro" pourrait être un instrument précieux pour la recherche des éléments précurseurs des flavonoïdes et l'étude de leurs modifications au sein des cellules. Au préalable, nous avons dû isoler, à partir de la Gaude, une souche de tissus, dont nous avons étudié sommairement les conditions de culture "in vitro".

Nous avons également étudié l'influence des flavonoïdes de la Gaude sur des cultures "in vitro" de tissu de Carotte.

Enfin, nous avons tenté de formuler les conclusions auxquelles nos résultats nous ont conduite quant à la physiologie des flavonoïdes chez la Gaude.

A V A N T - P R O P O S

LA GAUDE "RESEDA LUTEOLA L."

-:-:-:-

CARACTERES BOTANIQUES ET ECOLOGIQUES

La Gaude est une plante bisannuelle, herbacée de 50 cm à 1 m 30 de hauteur, à racine principale très développée et profondément enfoncée dans le sol.

Les feuilles alternes sont vertes, allongées, entières, sauf une petite dent à la base.

Les inflorescences apparaissent en Juin. Ce sont des grappes allongées de petites fleurs irrégulières d'un jaune verdâtre. Le calice possède 4 sépales, la corolle 3, 4 ou 5 pétales libres ; le pétale supérieur est concave, comme coupé au sommet et porte sur le dos une sorte d'appendice divisé en 5 à 7 lanières.

Le fruit est une capsule, formée de 3 carpelles presque séparés, qui s'ouvre par 3 dents. Les graines sont nombreuses, noires et lisses quand elles sont mûres.

Espèce pionnière, RESEDA LUTEOLA L. profite bien souvent des travaux de voirie et d'urbanisme qui impliquent toutes sortes de terrassement pour prospérer dans des sites anthropisés, à la flore le plus souvent assez banale.

Aussi n'est-il pas rare qu'aux abords des grandes villes fréquemment transformés par l'urbanisation, ou bien le long de routes nouvellement tracées se remarquent çà et là des populations homogènes et parfois importantes de RESEDA LUTEOLA ; une

telle expansion de la Gaude s'observe en particulier lorsque le sol est crayeux ou bien à la suite de terrassements assez profonds ayant ramené de la craie en surface.

A ce sujet indiquons que nous avons observé une population importante de RESEDA LUTEOLA aux abords de la ville d'ETAPLES (Pas-de-Calais), à l'emplacement précisément d'une ancienne tranchée creusée dans la craie et comblée depuis peu de mois. Le relevé de végétation suivant rend compte de la composition floristique de ce groupement végétal pionnier :

Septembre 1972 ; 100 m2 ; recouvrement = 40.

BU LILLE

Reseda luteola	3-2(*)	Reseda lutea.....	1-1
Carduus nutans	1-2		
Cirsium arvense	1-2	Echium vulgare.....	x-2
Fumaria parviflora....	x-2	Artemisia vulgaris.....	x
Pastinaca sativa.....	x-2	Eupatorium cannabinum..	x
Papaver Rhoeas.....	x-2	Polygonum aviculare....	x
Plantago lanceolata...	x-2	Silene inflata.....	x
Tussilago farfara.....	x-2	Linaria vulgaris.....	x
Melandrium album.....	x-2	Mercurialis annua.....	x
Sonchus arvensis	x-2	Urtica dioïca.....	x-2
Lolium perenne.....	x-2	Agrostis vulgaris.....	1-1
Bromus sterilis.....	x-2		
Trifolium repens.....	x-2	Ranunculus repens.....	1-2
Matricaria inodora....	x-2	Medicago lupulina.....	x-2
Arctium minus.....	x-2	Rubus sp.....	1-1
Prunus spinosa.....	x-2		

Soulignons simplement la présence auprès des Reseda de Carduus nutans, le chardon penché, dont la position phytosociologique est très comparable à celle de la Gaude.

L'essentiel des caractères écologiques de la Gaude, se résume ainsi : mauvaise herbe pionnière (ou messicole) recherchant des sols chauds et secs (ou récemment asséchés), riches en bases et en matières organiques (surtout calcaires) ; les sols argileux et pierreux à la texture grossière lui conviennent parfaitement.

(*) Le premier terme indique le "recouvrement", noté par x, o,.. 5, le 2ème la "sociabilité", notée de 1 à 5.

C H A P I T R E

I

LES FLAVONOIDES DE LA GAUDE - LEUR DISTRIBUTION

D'après OBERDORFER -1970- Reseda luteola se range du point de vue phytosociologique, de préférence dans l'alliance de l'ONOPORDION acanthii - BRAUN-BLANQUET -1926-, elle-même située dans l'ordre des ONOPORDETALLA - BRAUN-BLANQUET et Coll.-1943-, qui rassemble les associations rudérales de chardons et d'arbustes thermophiles. L'alliance et l'ordre font partie de la classe des CHENOPODIETEA - BRAUN-BLANQUET -1951-, où s'intégrent tous les groupements végétaux de mauvaises herbes rudérales.

1. ISOLEMENT DES FLAVONOÏDES DE LA PLANTE

1.1. EXTRACTION DES FLAVONOÏDES

Les échantillons de Gaude utilisés tout au long de ce travail ont été récoltés aux environs d'AMIENS (Somme), dans un champ en friche où la plante avait poussé spontanément.

Les divers organes de la plante : racine, tige, fleurs, fruits et axes d'inflorescences des fleurs et des fruits ont été séparés et mis à sécher sous abri et à l'obscurité.

Des essais, sur lesquels nous reviendrons plus loin (GORIS - DUBREUIL - MONIEZ - 1961), ont montré que la dessiccation n'entraînait pas de modifications sensibles du contenu flavonique de la plante.

Plusieurs essais d'épuisement des organes réduits en poudre, par l'éther de pétrole, le chloroforme, l'éther sulfurique, l'éther acétique ne nous ont donné que des résultats médiocres. Nous avons finalement procédé par épuisements successifs pendant une demi-heure de la poudre grossière de plante, par l'éthanol à 90^{c} bouillant, jusqu'à ce que nous obtenions une liqueur presque incolore. Les extraits alcooliques recueillis, brun verdâtre d'abord puis jaunâtres, abandonnent par refroidissement un précipité vert riche en chlorophylle, surtout lorsqu'ils proviennent du traitement des parties vertes de la plante : feuilles, fruits et tiges. Les solutions

alcooliques, privées de ce précipité, sont concentrées assez fortement par distillation. Par refroidissement, un nouveau précipité vert se dépose, que l'on réunit au premier.

Les précipités verts sont épuisés par le chloroforme chaud qui entraîne la chlorophylle, sans dommage pour les flavonoïdes.

L'extrait G ainsi obtenu se présente sous forme d'une poudre amorphe jaune d'or, légèrement verdâtre, riche en flavonoïdes divers.

1.2. ANALYSE DU CONTENU FLAVONIQUE DE L'EXTRAIT G

Nous avons analysé l'extrait G par chromatographie descendante sur papier, avec le solvant de PARTRIDGE : n-butanol-acide acétique-eau : 4-I-5 (v/v). Après séchage à l'air, le chromatogramme a été observé en lumière de WOOD, qui a fait apparaître des taches fluorescentes, violettes ou brunes. Après pulvérisation du chromatogramme par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 5 %, les taches repérées en lumière de WOOD sont colorées en jaune.

Nous avons d'abord utilisé le papier Arches 301, sur lequel nous avons observé, outre le lutéolol et le lutéoloside, deux autres substances : l'une formant une tache peu étendue mais très nette, de Rf = 0,22, que nous désignerons provisoirement par X, l'autre se traduisant par une tache assez diffuse de Rf = 0,60, que nous appelerons produit Y. Lorsque nous avons

employé le papier Arches 302, une troisième substance nouvelle apparut sous la forme d'une tache d'assez faible importance de Rf = 0,26. Nous nommerons désormais les dérivés de Rf = 0,22 et 0,26 respectivement glucolutéoloside (§) et produit X_1.

1.3. ESSAIS D'ISOLEMENT DE FLAVONOÏDES PURS

La séparation et la purification des divers flavonoïdes réunis dans G furent la source de grandes difficultés et nous avons dû successivement faire appel à la dissolution fractionnée et à différents types de techniques chromatographiques.

1.3.1. DISSOLUTION FRACTIONNEE

Des tentatives d'épuisement par différents solvants nous ont conduite à des résultats peu satisfaisants. Nous les rappelons brièvement :

1.3.1.1. EMPLOI DE L'ACETONE

L'acétone à l'ébullition a entraîné trop peu de produit pour que ce procédé puisse être retenu.

1.3.1.2. EMPLOI DE L'EAU DISTILLEE

L'eau distillée à froid a laissé, après évaporation à sec, un résidu important, riche en glucolutéoloside. Nous l'avons repris successivement par l'alcool éthylique à 96° à l'ébullition, puis par le méthanol chaud. Les solutions éthanoliques et méthanoliques concentrées par distillation abandonnèrent respectivement un précipité riche en glucolutéoloside et un mélange renfermant en proportions égales du glucolutéoloside

(§) Ce produit, que nous avions primitivement appelé X_2, a été identifié par nous à un glucoside du lutéoloside (DUBREUIL, MONIEZ, FRIGOT et GORIS - 1961).

et du lutéoloside, souillés de traces du produit Y et de lutéolol

1.3.1.3. EMPLOI DE L'ETHANOL A 96°

Le traitement de G directement à froid par l'éthanol à 96° a permis d'obtenir une solution qui, évaporée à sec, a laissé un résidu que nous avons repris par l'éthanol à 96° bouillant. Par refroidissement, un précipité brun enrichi en lutéoloside, en produit Y et en lutéolol s'est formé. La solution mère concentrée par distillation a abandonné, après refroidissement, un précipité jaune renfermant surtout du lutéoloside et du glucolutéoloside.

1.3.1.4. EMPLOI DE L'ETHANOL A 96° BOUILLANT

L'épuisement de G par l'éthanol à 96° bouillant a conduit à une solution qui, après séparation d'un dépôt noirâtre apparu lors du refroidissement, a été agitée avec un volume égal d'éther sulfurique et une quantité suffisante d'eau distillée pour que deux phases apparaissent. La liqueur éthérée, décantée puis évaporée à sec, abandonna un résidu bien jaune contenant du lutéolol, du lutéoloside et un peu de produit Y. La phase aqueuse a été lavée à plusieurs reprises avec chaque fois un volume égal d'éther sulfurique. Ce dernier décanté puis évaporé à sec a laissé un résidu renfermant surtout du lutéoloside.

Les procédés suivants nous ont conduite à de meilleurs résultats :

1.3.1.5. EMPLOI DU METHANOL SUIVI DE L'ETHANOL

23 g de produit brut ont été épuisés à six reprises par, chaque fois, 200 ml de solvant bouillant pendant une

heure. Après refroidissement un précipité vert gélatineux est apparu dans les liqueurs extractives. Il a été séparé par filtration sur papier. Les filtrats, bruns, puis jaunes, ont été concentrés progressivement et à chaque fois abandonnés à la température ambiante. Le lendemain un dépôt brun verdâtre dans les premières solutions, jaune dans les suivantes, s'était formé Ils furent recueillis sur des filtres en verre fritté, puis séchés dans le vide phosphorique.

La chromatographie sur papier nous a révélé que les premiers renfermaient tous les flavonoïdes, les suivants surtout du lutéoloside et du glucolutéoloside et les derniers une grosse proportion de lutéoloside accompagné seulement de traces de glucolutéoloside.

Une partie de G était restée insoluble dans l'alcool méthylique. Nous l'avons alors épuisée par l'éthanol à 96° bouillant à dix reprises. Les liqueurs obtenues, jaune doré, puis jaune clair, abandonnèrent après concentration, des précipités riches en lutéoloside souillé de traces de glucolutéoloside.

Ce traitement avait encore laissé un résidu qui s'est avéré soluble en totalité dans l'alcool éthylique à 60°. De ces liqueurs nous avons retiré un produit jaune cristallin renfermant du lutéoloside accompagné de très légères traces de glucolutéoloside.

Afin de séparer le glucolutéoloside et le lutéoloside, nous avons réuni les extraits qui renfermaient, à l'exclusion de tout autre, ces deux flavonoïdes soit en proportions égales, soit avec prédominance du lutéoloside. Nous en avons traité des fractions dans un appareil de Kumagawa, soit par l'éthanol à 96°, soit par l'acétate d'éthyle, soit encore par l'alcool isobutylique ou le N-Butanol. Dans ces conditions, nous avons recueilli des masses cristallisées qui se sont révélées, à l'analyse chromatographique, n'être que des mélanges seulement enrichis en lutéoloside par rapport au produit de départ.

Nous avons repris tous ces derniers extraits avec de l'alcool éthylique à 96°. Après une ébullition à reflux d'une heure environ, la solution a été filtrée chaude puis laissée à refroidir. Un premier précipité amorphe a été séparé. La liqueur alcoolique a été concentrée progressivement par distillation au bain-marie. Chaque fois après refroidissement nous avons pu isoler un précipité cristallisé s'enrichissant progressivement en lutéoloside aux dépens du glucolutéoloside.

Purification du lutéoloside

Tous les précipités à très forte teneur en lutéoloside ont été réunis et repris par de l'éthanol à 80° bouillant, à raison de 60 ml pour 1 g environ. La liqueur prit d'abord un aspect moiré qui disparut après complète dissolution. Nous l'avons filtrée chaude sur verre fritté et recueillie, lors d'un premier essai, dans une fiole qui était à la température ambiante un précipité gélatineux, jaune apparut immédiatement. Par la suite pour éviter cet inconvénient nous avons pris la précaution

de chauffer au préalable la fiole destinée à recueillir le filtrat, et de la porter, dès que la filtration était terminée, sur un bain-marie bouillant que nous venions d'éteindre. Après refroidissement, des aiguilles longues et fines apparurent dans la liqueur.

Nous avons redissous ces cristaux dans de l'alcool éthylique à 96° froid (0,10g dans 100 ml). La liqueur par évaporation à l'air libre abandonna de nouveau des aiguilles jaunes, longues et fines qui à l'analyse chromatographique sur papier, donnèrent uniquement une tache de lutéoloside.

1.3.1.6. VARIANTE DU PROCEDE PRECEDENT

Une variante du procédé précédent nous a donné des résultats différents, mais également intéressants. Après une dizaine d'extractions de G par le méthanol, celui-ci a été remplacé directement par l'éthanol à 60°. Le premier épuisement par ce deuxième solvant, après filtration et refroidissement, a abandonné un précipité gélatineux que nous avons séparé de la solution qui, laissée à la température ambiante, puis mise à + 4°C, donna naissance à un dépôt amorphe jaune clair. Recueilli par filtration sur verre fritté, puis séché dans le vide phosphorique nous l'avons analysé par chromatographie sur papier ; il ne renfermait que du glucolutéoloside. Les épuisements ultérieurs par l'éthanol à 60° se troublèrent par refroidissement et à + 4° C abandonnèrent des sphéro-cristaux jaunes, qui furent identifiés à du glucolutéoloside à l'exclusion de tout autre flavonoïde.

Purification du glucolutéoloside

Dans 200 ml d'éthanol à 70°, nous avons dissous au bain-marie 0,85 g de sphéro-cristaux. La liqueur filtrée chaude abandonna après refroidissement à la température ambiante, de nouveaux sphéro-cristaux, qui furent recueillis sur verre fritté, lavés à l'éthanol à 96° froid, séchés dans le vide phosphorique et pesés (0,50 g). Le filtrat après un séjour de quelques jours à + 4° C laissa encore se déposer 0,15 g de cristaux.

Rendement = 0,76 %.

La recristallisation du glucolutéoloside dans l'alcool éthylique à 80° donne, après amorce par un cristal du flavonoïde, un précipité floconneux, qui au microscope apparaît constitué d'aiguilles jaune pâle, longues et courbes tendant à s'associer en "oursin" (Photographie 1).

Photographie 1 - Glucolutéoloside cristallisé (x 90).

1.3.2. CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SILICE

1.3.2.1. SOLVANT = ETHANOL A 90°

Nous avons préparé avec le Kieselgel de chez Merck (0,05 - 0,20 mm) mis en suspension dans l'éthanol à 90° une colonne de 2,5 cm de diamètre sur 45 cm de hauteur, dans une allonge de verre munie à sa partie inférieure d'un robinet surmonté d'une plaque en verre fritté. A sa partie supérieure nous avons déposé 1 g de G. L'élution de la colonne a été réalisée à l'aide d'éthanol à 90°. Nous avons recueilli des fractions de 5 ml, limpides, d'abord jaune doré puis jaune de plus en plus clair. Rapidement l'écoulement est devenu si lent que nous avons dû interrompre l'essai.

Des chromatographies sur papier des différentes fractions nous ont permis de tirer la conclusion suivante : dans ces conditions le complexe flavonique G se trouve purifié, mais on ne parvient à aucune séparation des divers flavonoïdes qu'il renferme.

1.3.2.2. SOLVANT DE PARTRIDGE

Le solvant de Partridge nous donnait d'excellentes séparations en chromatographie sur papier. Espérant obtenir des résultats semblables, nous avons déposé l'extrait G au sommet d'une colonne de gel de silice préparée par suspension de Kieselgel dans la phase aqueuse du mélange de Partridge, puis nous avons pratiqué l'élution par la phase butanolique de ce même solvant.

Les premières fractions recueillies renfermaient tous les flavonoïdes à l'exception du glucolutéoloside. Rapidement ce dernier faisait son apparition tandis que peu à peu le lutéolol puis le produit Y disparaissaient de ces éluats. Dans les derniers, le glucolutéoloside n'était que très légèrement souillé de lutéoloside.

Ces résultats qui ne correspondaient pas à ce que nous avions espéré quant à la séparation des flavones ne nous ont pas encouragée à poursuivre notre effort dans cette voie.

1.3.3. FILTRATION SUR GEL

1.3.3.1. GENERALITES

1.3.3.1.1. THEORIE

Cette technique permet la séparation de molécules d'après leurs dimensions respectives.

Le Séphadex fabriqué par la firme "Pharmacia Fine Chemical" est un Dextran modifié ; les macromolécules qui le constituent sont réticulées et forment un réseau, à trois dimensions, de chaînes polysaccharides. Le Séphadex G_{25} que nous avons utilisé est celui dont le degré de réticulation est le plus élevé. Formé de très petites perles il a l'aspect d'une très fine poudre blanche, qui a la propriété de gonfler considérablement en présence d'eau : 1 g de Séphadex forme un gel poreux qui occupe un volume de 5 ml, si on le met en suspension dans environ 2,5 ml d'eau distillée.

Par filtration sur ce gel, seuls les corps d'un poids moléculaire inférieur à 5000 peuvent pénétrer dans les pores ou interstices de ce support où ils sont retenus. Les autres sont éliminés rapidement. Une élution convenable permet ensuite de récupérer les molécules les plus petites dans l'ordre de leur poids moléculaires croissants.

1.3.3.1.2. PREPARATION DU GEL

23 g de Séphadex G_{25} ont été versés en pluie fine dans 1200 ml d'eau distillée * mise en mouvement par un agitateur magnétique. Le contact a été maintenu, dans ces conditions, pendant 3 heures 30. Après un repos d'une demi-heure, l'eau surnageante contenant de très fines particules de Séphadex a été décantée. Deux lavages successifs, avec chaque fois un litre d'eau distillée, ont permis d'éliminer complètement les trop fines particules dont la présence risquait d'entraîner le colmatage de la colonne.

1.3.3.1.3. MATERIEL UTILISE

Nous disposions d'une colonne de 1,5 cm de diamètre sur 90 cm de haut, conçue par la firme "Pharmacia Fine Chemical", pour les séparations par filtration sur gel. Les deux extrémités sont munies de bouchons en polyéthylène, comportant chacun une tubulure d'entrée ou de sortie pour l'éluant. Un tamis en nylon est inclus dans le bouchon inférieur. Des tubes capillaires en tigon ** furent mis en place.

1.3.3.1.4. CONFECTION DE LA COLONNE

Après avoir vérifié la verticalité de la colonne, nous l'avons remplie, au tiers environ, d'eau distillée fraichement bouillie : nous avons versé la suspension aqueuse de Séphadex, sans cesser de l'agiter, à l'aide d'un grand entonnoir souple fixé de façon étanche à la partie supérieure de la colonne privée de son bouchon. Nous avons laissé le gel se déposer, en prenant soin de maintenir l'ouverture du tube de sortie de la colonne au niveau du liquide contenu dans l'entonnoir. Nous avons ensuite

* On utilise de l'eau distillée fraîchement bouillie et refroidie afin d'éviter le plus possible les contaminations extérieures. En effet le milieu aqueux dans lequel on travaille est favorable au développement de microorganismes : bactéries, algues en particulier.

** Chlorure de polyvinyle.

vidé lentement l'eau qui recouvrait le gel, à la surface duquel nous avons déposé un disque de papier filtre sans cendres afin de régulariser et de stabiliser le sommet de la colonne. Nous avons alors remis le bouchon supérieur en place et avons laissé traverser la colonne de haut en bas, pendant 24 heures, par de l'eau distillée fraichement bouillie. Le débit fut maintenu constant, grâce à une pompe refoulante, appliquée au tube capillaire d'entrée. Un léger tassement a pu être observé au cours de cette opération.

1.3.3.1.5. PREPARATION ET APPLICATION DE L'ECHANTILLON

Afin de ne pas surcharger la colonne en produits insolubles dans l'eau, 1 g de G, finement pulvérisé au mortier, a été épuisé par 30 ml d'eau distillée, à l'ébullition à reflux pendant une heure. Le lendemain, le résidu insoluble fut séparé par filtration sur verre fritté.

Afin de déterminer l'extrait sec correspondant au filtrat brun recueilli nous en avons prélevé 1 ml, que nous avons évaporé dans un petit cristallisoir taré, puis desséché dans le vide phosphorique, avant de le peser. L'opération répétée à quatre reprises nous a donné les résultats suivants : 0,0267 g, 0,0262 g, 0,0260 g, 0,0265 g, soit un poids sec moyen de 26,35 mg par ml d'échantillon.

Une chromatographie nous a permis de constater un net enrichissement de l'échantillon en produit X_1 et en glucolutéoloside, tandis que la teneur en lutéolol était plus faible.

L'eau distillée qui recouvrait la surface supérieure du gel fut aspirée et remplacée par 25 ml de la solution des flavonoïdes. Afin d'éviter de détériorer la surface du gel nous avons utilisé une pipette dont l'extrémité recourbée nous a permis de laisser couler lentement l'échantillon sur la paroi de verre de la colonne. Quand cette solution a été absorbée par le Séphadex, nous avons pratiqué l'élution de la colonne.

1.3.3.2. ESSAIS D'ELUTION

Nous avons réalisé sept essais successifs, apportant chaque fois des modifications dictées par les résultats précédemment obtenus.

1.3.3.2.1.

Lors d'une première expérience, nous avons utilisé l'eau distillée (vitesse d'écoulement 92 ml/heure).

Un anneau beige, suivi d'un anneau ocre se sont détachés rapidement du sommet de la colonne, qui est devenue jaune pâle, puis blanche.

Nous avons recueilli 219 fractions de 10 ml. Les deux premières étaient bistres et moussaient par agitation. La fraction 4 était jaune d'or, celles qui suivirent jaune de plus en plus pâle. L'addition d'une goutte d'ammoniaque concentré à chacune des fractions fit se développer, à partir du numéro 3, une coloration jaune intense, dénotant la présence de dérivés flavoniques.

Analyse des différents éluats

Les fractions 25 à 170 abandonnèrent assez rapidement un précipité jaune partiellement cristallisé. Ces fractions furent donc filtrées avant d'être, comme toutes les autres, fortement concentrées par évaporation sur le bain-marie.

L'étude de leur composition par chromatographie sur papier nous a permis de les grouper comme suit :

- Fractions 1 et 2 : Exemptes de flavonoïdes.
- Fraction 3 : Glucolutéoloside seul
- Fractions 4 à 23 : Glucolutéoloside, lutéoloside et produit Y, auxquels vient s'ajouter le produit X_1.
- Fractions 24 à 48 : Précipité :

  Lutéoloside souillé de traces de glucolutéoloside et de produit Y.

  Solution mère :

  Glucolutéoloside accompagné en plus d'une faible proportion de produit X_1, de lutéoloside et de lutéolol et de produit Y.
- Fractions 49 à 170 : Mélange complexe où aucun flavonoïde ne domine nettement.
- Fractions 171 à 219 : Lutéoloside et lutéolol, accompagnés de traces de produit Y.

Conclusion

Aucune séparation satisfaisante des dérivés flavoniques n'a été obtenue. Néanmoins une certaine purification du mélange semble pouvoir être réalisée par filtration sur gel, les tout premiers éluats ne renfermant que des substances non flavoniques.

1.3.3.2.2.

L'essai suivant a été réalisé avec une colonne plus haute (78 cm) et un débit beaucoup plus lent : 27 ml/heure.

L'élution, commencée avec deux litres d'eau distillée, a été poursuivie avec de l'éthanol à 20°, afin de nettoyer plus rapidement et plus efficacement le gel. 241 fractions de 10 ml ont été recueillies au total.

Analyse

Le volume de l'éluat brun, exempt de flavonoïdes, a été cette fois plus important : 50 ml. La fraction N° 6 ne renfermait que du glucolutéoloside, mais dans le 7ème tube apparaissaient aussi du lutéoloside et du produit Y. Dans les tubes suivants est venu s'ajouter à ces trois composés le produit X_1. Les 40 dernières fractions, obtenues par élution par l'éthanol à 20°, renfermaient un mélange de ces mêmes flavonoïdes et de lutéolol.

Conclusion

Le débit plus lent a permis une séparation plus nette de la fraction non flavonique de G. Quant à l'emploi de l'éthanol à 20° comme éluant, il s'avère peu intéressant.

1.3.3.2.3.

Afin de déterminer le meilleur solvant de G, nous avons préparé des solutions saturées de celui-ci dans des alcools éthyliques à 10°, 20°, 30° et 40° et dans des solutions aqueuses d'ammoniaque à 0,2 %, 0,5 % et 1 %. La solution aqueuse d'ammoniaque à 0,5 % a été retenue compte tenu de l'importance relative de l'extrait sec qu'elle fournit et des résultats de l'analyse par chromatographie sur papier.

Dans cette troisième expérience, la vitesse d'écoulement de l'éluant était de 12 ml/heure.

Après avoir fait passer 2100 ml d'eau distillée, nous avons versé sur la colonne 450 ml de solution aqueuse d'ammoniaque à 0,5 %. Le gel alors s'est coloré en jaune orangé puis a pâli peu à peu. Nous avons enfin lavé la colonne avec de l'eau distillée pure afin d'éliminer toute trace d'ammoniaque.

Conclusion

L'élution par la solution ammoniacale a débarrassé plus rapidement et plus complètement le gel des substances qui s'y étaient fixées. Par contre nous n'avons obtenu aucun résultat intéressant concernant la séparation des dérivés flavoniques.

1.3.3.2.4.

Afin d'augmenter les écarts entre les poids moléculaires des différents flavonoïdes que nous cherchions à séparer, nous avons tenté de les combiner avec un métal alcalin bivalent.

Nous avons choisi d'éluer une colonne de Séphadex garnie à son sommet de 25 ml de solution de flavonoïdes, par de l'eau de chaux espérant qu'un atome de calcium se combinerait à deux molécules de chaque dérivé flavonique.

Nous avons versé 350 ml d'eau de chaux. La colonne est devenue orangée. Nous avons poursuivi l'élution dans ces conditions jusqu'à ce que l'éluat devienne alcalin. Nous avons alors continué le lavage de la colonne avec 850 ml d'eau distillée.

Nous avons fractionné l'éluat en unités de 10 ml. Les 7 premières fractions coulèrent limpides et de couleur chamois. Elles ne renfermaient pas de flavonoïdes.

Les fractions 8 et 9, troubles et peu colorées, étaient riches en glucolutéoloside, accompagné de traces de lutéoloside. Les 20 suivantes, limpides et colorées en jaune clair, contenaient du glucolutéoloside et du lutéoloside en quantités sensiblement équivalentes, et des traces de produit Y.

A partir de la fraction 30 et jusqu'à la fraction 34, les liquides d'élution devinrent plus foncés. Nous avons pu y mettre en évidence du lutéoloside, du produit Y et des traces de glucolutéoloside et de produit X_1.

Toutes ces fractions étaient neutres au papier indicateur de pH. La fraction 35, se révélant alcaline, c'est alors que nous avons employé l'eau comme éluant.

•Les fractions suivantes, dans lesquelles apparut un précipité cristallin jaune, qui après séparation se révéla constitué de carbonate de calcium ayant adsorbé des traces de dérivés flavoniques, contenaient en solution le mélange des flavonoïdes.

Après avoir réuni les fractions identiques et les avoir concentrées, nous avons essayé d'éliminer le calcium par différents procédés notamment par l'addition d'acide sulfurique dilué. Aucun d'eux ne donna satisfaction, la combinaison calcium-dérivé flavonique apparaissant très stable. Les séparations obtenues restant, d'autre part, insuffisantes, l'idée ne fut pas retenue.

1.3.3.2.5.

Un gel nouveau, le Séphadex G_{10}, mis au point pour le fractionnement de substances de faibles poids moléculaires nous parut mieux répondre au problème de séparation qui se posait à nous.

20 g de Séphadex sec nous ont permis de réaliser une colonne de 31 cm de haut sur 1,5 cm de diamètre. L'échantillon a été préparé comme pour les essais précédents : 15 ml d'extrait aqueux de G ont été déposés au sommet du gel. L'élution réalisée par l'eau distillée - le débit ayant été initialement réglé à 22 ml à l'heure - se fit de plus en plus lentement par suite, sembla-t-il, d'un tassement du gel. L'expérience dut être interrompue avant que nous ayons pu passer 1000 ml d'éluant.

1.3.3.2.6.

Nous avons alors envisagé de faire circuler l'éluant à travers la colonne, de bas en haut. A cette fin nous avons réalisé un dispositif consistant à placer à la surface du gel,

un petit appareil étanche de notre conception **, que nous pouvions déplacer suivant les variations de volume du "Séphadex". Une colonne réalisée comme précédemment fut coiffée de ce petit appareil.

Par siphonnage nous avons introduit au bas de la colonne 25 ml de solution de flavonoïdes puis l'eau d'élution, le débit étant réglé à 15 ml à l'heure.

Nous avons recueilli des fractions de 5 ml. Un mélange de glucolutéoloside et de produit X_1 avec prédominance du glucolutéoloside, est apparu à la fraction 15. Les autres flavonoïdes n'ont été élués à côté des produits précédents qui persistaient, qu'à partir de la fraction 58.

Conclusion

Cette méthode semble assurer une séparation intéressante du mélange glucolutéoloside-produit X_1, malheureusement pour une part encore souillé d'impuretés brunes.

1.3.3.2.7.

Il nous a semblé intéressant de débarrasser l'échantillon de ces impuretés brunes, avant le fractionnement. C'est pourquoi nous l'avons filtré sur une petite colonne de Séphadex G_{25} de 2,5 cm de diamètre sur 8,5 cm de haut.

L'élution par l'eau distillée donna des fractions colorées en brun ne renfermant pas de flavonoïdes. Puis les éluats devinrent nettement jaunes et riches en dérivés flavoniques. Nous les avons concentrés à 25 ml sous vide au bain-marie. L'extrait sec calculé pour 1 ml était égal à 6,8 mg. 20 ml d'échantillon purifié, correspondant à 136 mg d'extrait sec, furent amenés, comme lors de l'essai ci-dessus, au bas d'une colonne de Séphadex G_{10}. L'opération fut conduite comme précédemment.

** Cet appareil comprend un corps cylindrique en polyéthylène percé d'un canal axial de 1mm de diamètre. A l'extérieur, une encoche circulaire permet de loger un anneau de caoutchouc assurant l'étanchéité. A sa partie supérieure se trouvent, vissé un cylindre creux également en polyéthylène d'un mètre de long, destiné à déplacer l'appareil dans la colonne de verre et, serti dans le canal axial, un tube en tigon permettant l'écoulement des éluats.

Conclusion

Une purification certaine de l'échantillon résulta de son passage sur Séphadex G_{25}. La filtration sur Séphadex G_{10} eut pour conséquence une séparation nette du glucolutéoloside et du produit X_1 des autres flavonoïdes. Hélas les conditions dans lesquelles nous avons utilisé cette technique ne nous ont pas permis de mettre en oeuvre suffisamment de produit pour envisager une séparation quantitativement rentable.

1.3.4. CHROMATOGRAPHIE SUR CELLULOSE

1.3.4.1. UTILISATION DU "COLLECTOCHROM"

1.3.4.1.1. GENERALITES

Cet appareil conçu par la Société "Pleuger" est basé sur le principe de la chromatographie descendante sur papier, où l'élution est prolongée assez longtemps pour que le solvant entraîne successivement hors du papier les substances, dans l'ordre dans lequel il les sépare.

Un dispositif ingénieux, que nous allons décrire, permet, grâce à une rotation lente et constante du papier, de déposer l'échantillon d'une façon continue et de recueillir les éluats dans une série de petites burettes.

Une feuille de papier de 56 cm de hauteur sur 60,5 cm de largeur, dentée sur 20 cm dans le bas, et découpée en languettes sur 14 cm dans le haut, est cousue bord à bord avec du fil de coton blanc afin d'obtenir un cylindre. On glisse ce dernier sur un squelette en verre, constitué d'un axe portant deux anneaux, et coiffé d'un réservoir, sur le bord duquel on replie les languettes de papier. Une plaque de verre déposée sur celles-ci au fond du réservoir, maintient le papier en place, l'axe vient se fixer dans un rodage au centre d'un socle qui renferme

deux moteurs synchrones : l'un entraîne l'axe et le cylindre de papier, l'autre actionne une micro-pompe munie d'une seringue chargée de déposer l'échantillon à séparer à la base des languettes. Le tout est enfermé dans une cuve de verre cylindrique étanche posée sur le socle.

Le papier est d'abord lavé avec l'éluant qui est placé dans une ampoule alimentant le réservoir, de telle sorte que dans celui-ci le niveau du liquide reste constant. Le solvant s'écoule au bas du cylindre, suivant les dents, dans 28 petites burettes en verre. Lorsque la cuve chromatographique est convenablement saturée par les vapeurs de solvant, l'échantillon est déposé à la partie supérieure du papier, à la base des languettes, par l'intermédiaire d'un capillaire fixé à la sortie d'une seringue de 5 ml, dont le piston est déplacé mécaniquement et régulièremen Le débit de dépôt est de 0,07 ml à l'heure.

Chaque composant de l'échantillon est entraîné par le solvant à une vitesse qui lui est propre, vers la partie inférieure du papier, semblant décrire une hélice plus ou moins dressée selon son Rf dans le solvant utilisé, et dont l'origine se confond avec le point d'application de l'échantillon.

Si la vitesse de rotation est convenablement choisie en fonction de la vitesse de migration des différentes substances à séparer, chaque hélice reste fixe dans l'espace, malgré la rotation du papier, et aboutit aux mêmes burettes, qui reçoivent donc un solvant ne contenant qu'un seul composant du mélange de départ.

1.3.4.1.2. DIFFERENTS ESSAIS

1.3.4.1.2.1. PREMIER ESSAI

Nous avons choisi le solvant de Partridge qui nous avait donné satisfaction lors des analyses chromatographiques des mélanges étudiés.

Préparation de l'échantillon

Il consiste en une solution saturée, obtenue par agitation à froid pendant plusieurs heures d'une quantité suffisante de poudre dans la phase butanolique du mélange de Partridge, suivie d'une filtration.

Protocole opératoire

Nous avons choisi la vitesse de rotation du papier la plus faible possible pour l'appareil : 10 mm/heure ; nous avons numéroté les burettes en donnant le N° 1 à la première qui avait reçu le solvant.

La présence de flavonoïdes fut recherchée dans toutes les fractions par addition d'une goutte d'ammoniaque à un petit volume de chacune d'entre elles. La coloration jaune caractéristique des dérivés flavoniques apparut dans les fractions 6 à 23 qui furent évaporées à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les résidus bruns obtenus furent difficiles à redissoudre.

Conclusion

Des chromatographies analytiques sur papier nous indiquèrent que toutes les fractions contenaient un mélange de flavonoïdes. Ce fait était dû, nous a-t-il semblé, à une trop grande vitesse de rotation du papier par rapport à la vitesse de migration des produits, de sorte que les hélices dessinées par ceux-ci ne restaient pas fixes et qu'ils se répartissaient dans un trop grand nombre de burettes successives. Les substances de faible Rf venaient ainsi s'écouler, dans les mêmes burettes qui avaient recueilli au tour précédent les dérivés de Rf élevé.

Ne pouvant diminuer la vitesse de rotation du papier, nous avons envisagé l'utilisation d'un autre solvant.

1.3.4.1.2.2. DEUXIEME ESSAI

Notre premier travail fut de déterminer la composition de ce nouveau solvant. A ces fins, des bandes de papier Arches 302 de 25 cm sur 3 cm furent préparées. Sur une ligne tracée à trois centimètres d'une des extrémités, nous avons fait deux taches, l'une avec quelques /ul de solutions éthanolique de G_2, l'autre avec une goutte de liqueur alcoolique contenant du lutéoloside et du glucolutéoloside pour servir d'étalon.

Des éprouvettes de 500 ml (5 cm de diamètre sur 34 cm de haut) munies de bouchons de caoutchouc tinrent lieu de cuves chromatographiques. Un agitateur, dont l'une des extrémités formait un petit crochet, traversait le bouchon et permettait de suspendre le papier pendant une heure environ, au-dessus du niveau du solvant placé dans l'éprouvette, afin de la saturer en vapeurs. L'agitateur était ensuite abaissé jusqu'à ce que l'extrémité inférieure du papier plonge dans le solvant sur une hauteur de 1 cm.

Pendant toute la durée de cette chromatographie ascendante les éprouvettes étaient maintenues à l'obscurité à une température égale à 21° C ± 1.

Une vingtaine de mélanges furent essayés dans ces conditions : les résultats furent peu satisfaisants : migration trop lente, mauvaise séparation de l'échantillon, Rf de certains composants trop faibles. Cependant trois d'entre eux : A, B et C* purent finalement être retenus pour faire, comparativement avec le solvant de Partridge, des essais en chromatographie descendante sur une longueur de 35 à 40 cm, avec le papier Schloecher et Schull utilisé dans le Collectochrom (TABLEAU 1).

* Solvant A : phase butanolique du mélange : n-butanol-acide formique-eau : 2-2-1 (v/v).

Solvant B : alcool isopropylique-hexane-acide formique-eau : 3-2-33-3 (v/v).

Solvant C : phase butanolique du mélange : méthyléthylcétone-n-butanol-eau : 3-5-3 (v/v).

SOLVANTS	LUTEOLOL	PRODUIT Y	LUTEOLOSIDE	GLUCOLUTEOLOSIDE	PRODUIT X_1
A	0,90	0,77	0,59	0,36	0,36
B	0,93	0,78	0,57	0,35	0,35
C	0,84	0,63	0,45	0,21	0,21

TABLEAU 1 : VALEURS DES Rf DES FLAVONOIDES DE LA GAUDE, DANS DIFFERENTS SOLVANTS, SUR PAPIER SCHLOECHER ET SCHULL

Le solvant C, qui migre plus rapidement que le mélange de Partridge, tout en permettant une aussi bonne séparation des flavonoïdes, fut finalement retenu.

Préparation de l'échantillon

1 g de G fut agité pendant plusieurs heures, dans 150 ml de solvant.

Le lendemain la solution fut décantée et le résidu repris dans les mêmes conditions par 50 nouveaux ml de solvant. Les liqueurs furent réunies. Nous avons évaporé 1 ml de cette solution, afin de nous assurer que la récupération des produits qu'elle renfermait se faisait dans de bonnes conditions. Contrairement à ce que nous avions observé avec le butanol acétique, nous avons obtenu un beau résidu jaune, soluble dans l'éthanol à 96° chaud.

L'extrait sec calculé pour 1 ml de la solution était de 7,5 mg.

Résultats

La vitesse de rotation du papier fut réglée cette fois à 20 mm à l'heure.

A partir du point d'application de l'échantillon les hélices qui se dessinèrent colorées en jaune étaient irrégulièrement ondulées. Cette anomalie dénotait une vitesse de migration inconstante, probablement due aux variations de la température ambiante.

Des flavonoïdes furent mis en évidence dans toutes les burettes (coloration jaune par l'ammoniaque).

L'analyse chromatographique indiqua que : les trois premières fractions renfermaient du lutéolol, du produit Y, du lutéoloside, du glucolutéoloside, les trois suivantes, du produit Y, du lutéoloside, du glucolutéoloside, les quatre suivantes, du lutéoloside et du glucolutéoloside, les dix huit dernières, du glucolutéoloside et des traces de lutéoloside.

Conclusion

Deux raisons pouvaient être envisagées pour expliquer ces résultats encore insatisfaisants : d'une part les fluctuations de la température ambiante, d'autre part la trop grande vitesse de rotation du papier, inconvénient que nous avions déjà rencontré précédemment.

1.3.4.1.2.3. TROISIEME ESSAI

Nous avons repris l'essai en faisant tourner le papier à la vitesse de 10 mm à l'heure, toutes les autres conditions restant identiques à celles de l'expérience précédente.

L'analyse du contenu des burettes nous révéla les compositions suivantes :

- 1 à 6 : mélange des flavonoïdes, excepté du glucolutéoloside.
- 7 à 13 : disparition du lutéolol, diminution du produit Y, apparition du glucolutéoloside
- 13 à 26 : enrichissement en glucolutéoloside, disparition du lutéoloside.
- 27 à 28 : produit X_1 et traces de glucolutéoloside.

Conclusion

Nous pouvons remarquer que les flavonoïdes de Rf élevé apparaissent les premiers faisant place peu à peu aux flavonoïdes de plus faible Rf.

Il est à noter que seul ce dernier essai nous a permis d'obtenir des fractions renfermant le produit X_1 pratiquement séparé des autres flavonoïdes.

En conclusion, cet appareil, dans les conditions où nous l'avons utilisé, ne nous a pas permis d'obtenir une séparation à proprement parler des flavonoïdes. Plusieurs raisons peuvent être avancées, en particulier les fluctuations de la température ambiante et la migration trop lente des flavonoïdes de faible Rf pour qu'ils se trouvent élués après un tour de révolution du papier, ce qui entraîne la formation d'un mélange dans les burettes.

Une mise au point trop longue pour des résultats incertains nous a conduite à envisager une autre technique.

1.3.4.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

1.3.4.2.1. CONFECTION DE LA COLONNE

Nous avons utilisé de la poudre de cellulose sans cendres Whatmann "Standard grade".

375 g furent imbibés de 750 g d'eau distillée. Après avoir obtenu un mélange aussi homogène que possible, nous l'avons introduit dans une allonge de 4 cm de diamètre et de 60 cm de haut, munie d'un filtre en verre fritté et d'un robinet à sa partie inférieure, en prenant soin de réaliser un tassement régulier sur toute sa longueur.

Au mortier nous avons imbibé 50 g de cellulose pulvérisée avec une solution concentrée de G. Le tout, desséché dans le vide phosphorique, fut pesé. Le poids total étant de 215 g, 165 g d'extrait de Gaude environ avaient donc été absorbés par la cellulose. Nous avons déposé ce mélange à la partie supérieure de la colonne.

1.3.4.2.2. ELUTION

- Nous avons d'abord élué par de l'éther saturé d'eau.

La vitesse d'écoulement fut réglée à XXV gouttes par minute. Nous avons recueilli 68 fractions de 500 ml. Après dessiccation sur du sulfate de sodium desséché, chacune d'elles, les premières jaune vif, les suivantes de plus en plus pâles, fut concentrée à 25 ml. Toutes ces fractions, qui renfermaient uniquement du lutéolol comme l'avait montré un contrôle chromatographique, furent réunies.

- Les dernières fractions recueillies entraînant très peu de produit, nous avons poursuivi l'élution par de l'acétate d'éthyle saturé d'eau.

Les éluats coulèrent alors jaune ambré très intense puis plus clair.

Sur les chromatographies sur papier des fractions ainsi obtenues, on vit apparaître deux taches : l'une correspondant au lutéoloside, dont l'importance grandit, au fur et à mesure que l'autre, due au produit Y, disparaissait peu à peu. Nous avons ainsi fait passer 65 litres d'acétate d'éthyle à travers la colonne.

- Nous avons alors utilisé un troisième éluant : l'éthanol à 90°.

L'éluat d'abord brun foncé, s'éclaircit et devint jaune. Les chromatographies sur papier nous indiquèrent que ces liqueurs alcooliques renfermaient du glucolutéoloside.

Après le passage de 10 litres d'alcool à 90°, la colonne était alors très décolorée, et l'élution fut arrêtée.

1.3.4.2.3. ISOLEMENT DES FLAVONOIDES DES DIFFERENTS ELUATS

Chacune des fractions : éthérée, acétate d'éthyle, alcoolique, fut alors traitée séparément, de façon à isoler les flavonoïdes qu'elles renfermaient.

- Fraction éther sulfurique (34 litres)

Les solutions, qui renfermaient pour tout flavonoïde du lutéolol, abandonnèrent après une assez forte concentration, un produit jaune verdâtre encore impur.

- Fraction acétate d'éthyle (65 litres) :

* 11 litres de tête :

Dans les premiers flacons un faible dépôt brunâtre fut séparé par décantation. Il était exempt de flavonoïdes.

Dans les suivants, le dépôt était plus abondant et renfermait le produit Y souillé de traces de lutéoloside.

Les liqueurs furent concentrées au quart de leur volume par distillation au bain-marie. Un précipité, apparu après refroidissement, fut séparé par filtration. Le filtrat devenu brun, resta trouble. Concentré de nouveau, il s'éclaircit d'abord, puis un début de précipitation s'amorçant sur les bords du ballon, nous avons laissé la liqueur abandonner par refroidissement un deuxième précipité. Le surnageant, après une évaporation poussée, laissa un résidu brun foncé, d'aspect huileux à forte odeur d'acide acétique. Nous n'avons pas réussi à le dessécher, même après un séjour prolongé dans le vide phosphorique. Ni ces précipités ni l'extrait, pourtant très enrichis, ne nous ont permis d'isoler le produit Y pur, par cristallisation fractionnée dans l'éthanol à 90° ou à 60°.

* 7 litres suivants :

A plusieurs reprises nous avons concentré la liqueur par distillation au bain-marie, jusqu'à apparition d'un trouble. Chaque fois, par refroidissement un précipité se forma, que nous avons recueilli et réuni aux précédents. Le produit de concentration finale prit le même aspect que celui de la fraction précédente et fut éliminé.

Analysés par chromatographie sur papier, ces précipités se révélèrent renfermer du produit Y et du lutéoloside en quantités égales.

* 15 litres suivants :

Nous avons d'abord séparé, par décantation, un précipité jaune sale qui s'était formé spontanément au sein de la solution. La liqueur surnageante a été concentrée, par distillation au bain-marie, à deux reprises successives. Nous avons obtenu ainsi deux précipités. Le premier, jaune doré, le second, jaune clair ; ils furent réunis au dépôt initial, car tous renfermaient une grande proportion de lutéoloside souillé de produit Y.

* 42 derniers litres :

Cette fraction traitée de la même façon que les précédentes permit d'isoler des précipités jaunes très riches en lutéoloside, le produit Y ne s'y trouvant qu'à l'état de traces très légères.

- Fraction éthanol à 90° (10 litres)

Nous avons réuni les liqueurs alcooliques qui, d'après, les chromatographies sur papier, renfermaient seulement du glucolutéoloside et du produit X_1, le premier en très forte proportion. Nous les avons concentrées au 1/15ème de leur volume environ ce qui provoqua l'apparition d'un précipité jaune clair, constitué par du glucolutéoloside seul, tandis que les solutions mères retenaient la totalité du flavonoïde X_1 et une certaine proportion de glucolutéoloside.

Conclusion

Cette technique s'est avérée très longue et ne nous a pas d'emblée fourni d'échantillons très purs. Cependant elle nous a permis d'isoler du lutéolol et du glucolutéoloside et d'obtenir des mélanges très riches en certains composés flavoniques qui nous ont servi de matières premières pour une extraction par chromatographie sur papier.

1.3.4.3. CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE SUR PAPIER

1.3.4.3.1. TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE

Dans l'espoir d'obtenir un meilleur rendement qu'avec le papier Arches 302 utilisé jusqu'alors, nous avons essayé d'autres papiers plus épais, que nous pouvions charger davantage. Aucun d'entre eux n'a donné une séparation aussi satisfaisante que le papier Arches 302.

Nous avons donc utilisé des feuilles de papier Arches 302 de 55 cm de côté. A l'aide d'une pipette, nous avons déposé l'échantillon suivant une ligne tracée à 8 cm d'un des côtés, tout en respectant à chaque extrémité, une marge de 1,5 cm afin d'éviter les "effets de bord". L'échantillon fut constitué tantôt par les mélanges, enrichis en l'un ou l'autre flavonoïde, obtenus au terme des essais précédemment décrits, particulièrement bienvenus quand il s'agissait de dérivés peu abondants dans la plante tantôt par une solution saturée à froid de G dans l'eau ammoniacale à 5 % *. Le développement dans le solvant de Partridge durait 16 à 18 heures à 20° C ± 1.

* A titre d'exemple :

0,5 g de G, soit 9 ml de solution furent répartis sur 12 feuilles.

Les chromatogrammes séchés à l'air libre * étaient observés en lumière ultra-violette. A l'aide d'un crayon, nous délimitions les différentes "bandes", d'ailleurs plus ou moins ondulées, qui correspondaient aux divers flavonoïdes. A notre surprise six zones nettes, et non cinq, purent être mises en évidence. Elles étaient dues, dans l'ordre croissant des Rf, respectivement au glucolutéoloside, au produit X_1, au lutéoloside, au produit Y, au lutéolol, enfin à une substance dont nous n'avions pas soupçonné l'existence jusqu'alors, et que la répartition en "bandes" venait de mettre en relief. Nous l'avons désignée par la lettre Z. Des traces beaucoup plus diffuses de substances fluorescentes furent également distinguées entre le glucolutéoloside et le produit X_1.

Nous avons découpé ces "bandes", afin d'éluer séparément les substances dont elles étaient chargées.

1.3.4.3.2. ELUTIONS

Elles furent effectuées à chaud dans des appareils de Kumagwa, dans la capsule desquels nous placions 4 à 5 "bandes à éluer, enroulées sur elles-mêmes. Le lavage durait 24 heures, la non coloration du papier, séché, puis exposé aux vapeurs d'ammoniaque attestant la fin de l'opération. Différents solvant furent utilisés, en rapport avec les solubilités variées des flavonoïdes.

Produit Z, lutéolol, produit Y

L'alcool éthylique à 96° fut un excellent solvant pour les produits Z, Y et le lutéolol. Les liqueurs très fortement concentrées par distillation au bain-marie, abandonnèrent d'abor un faible dépôt noirâtre qui fut écarté. Une nouvelle concentration suivie d'une addition de quelques ml d'eau distillée à la liqueur refroidie entraîna la séparation d'une huile brune et l'apparition de précipités beiges à bruns, renfermant l'un des flavonoïdes soit seul soit légèrement souillé de celui de Rf voisin **.

* Un séchage à haute température entraînant une adsorption irréversible des composés, (TEOULE - 1960).

** La proximité des "bandes" rend en effet souvent impossible leur délimitation sans équivoque lors de la révélation.

Purification du lutéolol

Nous avons opéré par cristallisation fractionnée dans l'éthanol à 80° : 1,10 g furent repris par 100 ml d'éthanol à 80° à l'ébullition. Dans la liqueur, filtrée bouillante, un précipité abondant se forma rapidement. Recueilli le lendemain sur verre fritté, il apparut au microscope, sous forme de cristaux mêlés de quelques petites masses amorphes. Une deuxième opération, semblable à la première, nous permit d'obtenir une poudre jaune légèrement verdâtre composée de cristaux microscopiques transparents, en forme de triangles effilés : F. = 332° C.

Purification du produit Y

Nous avons précédemment (1-2-2-1) observé que G se trouvait nettement purifié après son passage à travers une colonne de gel de silice. Cette technique de purification fut de nouveau utilisée ici.

- Essais préliminaires sur couche mince de silice

Des plaques de verre de 20 cm sur 20 cm, enduites d'une couche de silicagel G selon Stahl de 0,25 mm d'épaisseur, activé par un séjour de 30 minutes dans une étuve à 110° C , furent employées.

Sur une ligne située à 3 cm du bord des plaques, nous avons déposé, tous les 3 centimètres, 10 µl d'une solution à 1 mg pour 100 de l'un des flavonoïdes suivants : glucolutéoloside lutéoloside, produit Y, lutéolol, produit Z, la dernière tache correspondant à un mélange de tous ces dérivés.

Nous avons essayé successivement les solvants de développement I, II, III et IV *, la migration se faisant toujours en atmosphère saturée.

Les chromatogrammes, séchés à l'air libre, furent examinés en lumière de Wood, avant et après pulvérisation d'une solution alcoolique de potasse à 5 %. Les taches des produits X et Z et du glucolutéoloside se colorent en jaune vif, celles du lutéoloside et du lutéolol en bistre, celles du produit Y enfin en jaune orangé.

* Solvant I : benzène-pyridine-acide formique : 180-45-25 (v/v)

Solvant II : n-butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v)

Solvant III : acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau : 5-3-1-1 (v/v)

Solvant IV : acétate d'éthyle-méthanol-eau : 80-15-15 (v/v)

Les mélanges que nous nous proposions de purifier renfermaient le produit Y souillé de traces de lutéolol et de produit Z.

Dans les trois premiers solvants les Rf du produit Y n'étaient pas suffisamment distincts de ceux du lutéoloside et du lutéolol. Les résultats observés après développement du chromatogramme dans le solvant IV, par contre, nous laissaient espérer qu'en traitant les extraits à purifier sur une colonne de gel de silice avec ce solvant, le produit Y pourrait être séparé.

Mode opératoire

Nous avons utilisé des petites colonnes de 1,5 cm de diamètre, munies à leur partie inférieure d'un filtre en verre fritté et d'un robinet. Elles ont été garnies d'une suspension, dans le solvant IV, de 12 g de gel de silice * préalablement chauffé pendant une demi-heure à 110° C et refroidi dans un dessiccateur. 200 mg du mélange à purifier porphyrisé furent déposés à la surface de chaque colonne. Lors de l'élution avec le solvant IV, la partie supérieure de chaque colonne s'est colorée en noirâtre, tandis que la partie inférieure a pris une teinte jaune orangé. Nous avons recueilli l'éluat en fractions de 5 ml. Les deux premières étaient fortement colorées en jaune doré. Les fractions 3 et 4 étaient d'un beau jaune intense ; de très petits cristaux y sont apparus au bout de 24 heures. Les fractions suivantes furent de moins en moins colorées. Lorsque nous avons eu recueilli 245 ml, nous avons remplacé le solvant IV par de l'alcool méthylique. Un anneau brun se détacha rapidement du sommet de la colonne et passa dans 1,5 ml de mélange solvant IV-méthanol. L'élution fut arrêtée lorsque 250 ml de méthanol eurent traversé la colonne. Un résidu brun noirâtre assez important est resté insoluble au sommet du gel de silice.

Les éluats furent analysés par chromatographie sur papier.

- Résultats

Les fractions 1, 2 et 3 renfermaient à la fois du produit Y, du lutéolol et du produit Z (certaines impuretés restèrent à l'endroit du dépôt, d'autres migrèrent avec le front du solvant), les fractions suivantes du produit Y seul. Elles furent réunies et abandonnées à l'air libre. Rapidement des précipités

* Kieselgel 0,05-0,20 mm de chez Merck.

- SCHEMA DES DIVERS PROCEDES D'EXTRACTION MIS EN OEUVRE -

DISSOLUTION FRACTIONNEE

- Eau distillée (à froid) ----------→ Méthanol ----------→ Extrait riche en glucolutéoloside
- Ethanol à 96° (à froid) ----------→ Extrait riche en lutéoloside, Y et lutéolol
- Ethanol à 96° (à l'ébullition) ---------→ Ether + Eau ----------→ Extrait riche en lutéolol et Y
- Méthanol (à l'ébullition) puis Ethanol à 96° (à l'ébullition) puis Ethanol à 60° (à l'ébullition) ----------→ Extrait enrichi en lutéoloside et glucolutéoloside
  ↓
  Ethanol à 96° (à l'ébullition)
  ↓
  Lutéoloside cristallisé dans éthanol à 80°
- Méthanol (à l'ébullition) ----------→ Extrait enrichi en lutéoloside et glucolutéoloside
  puis
  Ethanol à 60° (à l'ébullition) ----------→ Glucolutéoloside cristallisé dans éthanol à 70° ou 80°

BU LILLE

CHROMATOGRAPHIE

GEL DE SILICE

- Ethanol à 90° ----------→ Séparation des impuretés non flavoniques
- Mélange de Partridge ----------→ Aucune séparation

DEXTRAN SEPHADEX G_{25}

- Eau distillée ----------> Séparation des impuretés non flavoniques
- Ethanol à 20° ----------> Séparation des impuretés non flavoniques
- NH_4OH à 0,5 % ----------> Séparation des impuretés non flavoniques
- Eau de chaux ----------> Combinaisons flavonoïdes - calcium non dissociables

SEPHADEX G_{25} + Eau distillée -------> Séparation des impuretés non flavoniques

SEPHADEX G_{10} + Eau distillée -------> Séparation du glucolutéoloside et du produit X_1
(bas--> haut colonne)

CELLULOSE "COLLECTOCHROM" + Méthyléthylcétone, n-butanol, eau : 3-5-3 (v/v)
-------> Séparation de X_1 des autres flavonoïdes

SUR COLONNE + Ether saturé d'eau ---> Lutéolol recristallisé dans éthanol à 90°

+ Acétate d'éthyle saturé d'eau ---> lutéoloside + Y

+ Ethanol à 90° ----> X_1 + Glucolutéoloside cristallisé dans éthanol 70°-80°

SUR PAPIER + Mélange de Partridge

bandes éluées par éthanol à 96° ---> Lutéolol cristallisé dans éthanol à 90°

" " " ---> Y cristallisé dans éthanol à 50°

" " " ---> Lutéoloside cristallisé dans éthanol à 80°

" " 70° ---> Glucolutéoloside cristallisé dans éthanol à 70°-80°

BU LILLE

jaunes, cristallisés apparurent qui furent repris par de l'éthanol à 50° d'où Y précipita en aiguilles microcristallines jaune pâle. F = 247-248°C.

Lutéoloside

L'emploi d'éthanol à 96° pour l'élution du lutéoloside fournit d'excellents résultats. Une concentration poussée de la solution d'extraction suivie de plusieurs concentrations successives permit de recueillir une série de précipités d'un jaune plus ou moins beau. Ils furent recristallisés une première fois dans l'alcool éthylique à 96°, puis dans l'éthanol à 80°. F = 279-280° C.

Glucolutéoloside

L'épuisement même prolongé par l'alcool éthylique à 96° n'a pu permettre d'éluer qu'une faible proportion de ce flavonoïde trop peu soluble dans ce solvant. L'eau distillée, l'acétone n'ont pas donné de meilleurs résultats. Par l'éthanol à 96° additionné de 5 % d'ammoniaque, l'élution fut complète, mais la liqueur noircit rapidement, à la suite probablement d'une altération du produit. L'éthanol à 30° * fut finalement utilisé avec succès. La liqueur d'extraction, après plusieurs concentrations par distillation au bain-marie, abandonna des résidus jaune brun que nous avons fait recristalliser dans l'éthanol à 70°. F = 241° C.

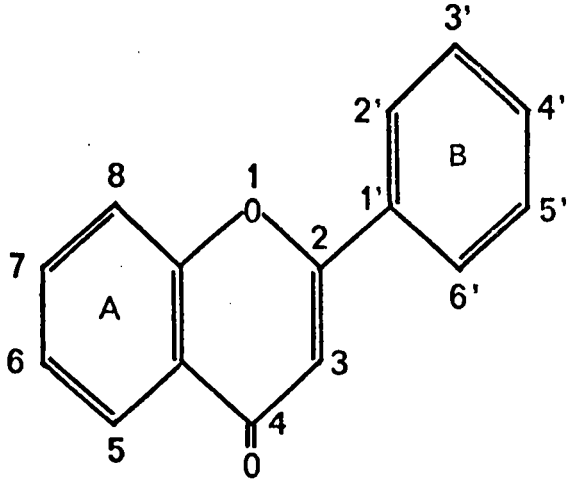
Produit X_1

L'élution par l'éthanol à 96° ammoniacal à 5 % suivie de la concentration de la liqueur n'a permis de recueillir qu'un résidu noir, très peu soluble dans l'alcool éthylique à 96°. Une purification fut possible par passage sur Séphadex 25, mais nous n'obtinrent qu'une quantité négligeable de ce composé.

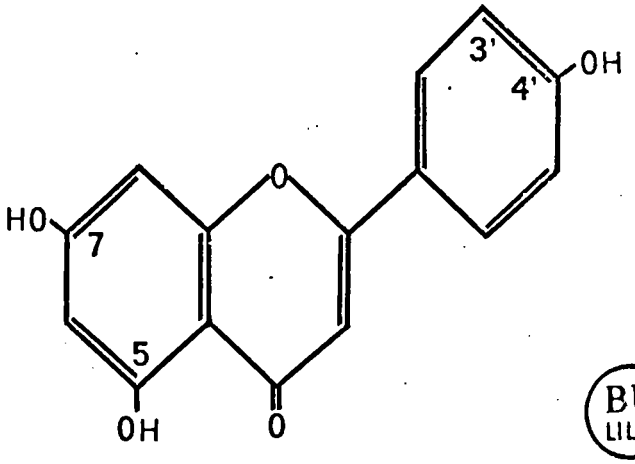
Conclusion

Cette méthode quoique longue, peu originale, et d'un rendement relativement faible (1,25 g d'extrait total fournit 0,35 g de lutéoloside pur, flavonoïde de loin le plus abondant dans la plante), fut la seule qui, combinée avec des procédés de purification particuliers à chaque produit, nous permit d'obtenir des substances pures en quantités appréciables.

* Il titrait en fait 70° lorsqu'il refluait dans la nacelle du Kumagawa.

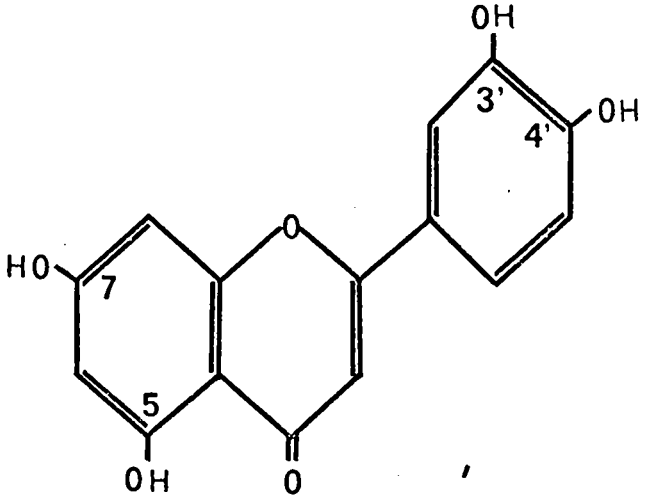


FLAVONE



BU LILLE

APIGENOL



LUTEOLOL

2. ETUDE DES FLAVONOIDES ISOLES

2.1. TECHNIQUES D'IDENTIFICATION UTILISEES

2.1.1. FLAVONOIDES

2.1.1.1. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons réalisé des chromatographies ascendantes et descendantes sur papier Arches 302, dans différents solvants, comparativement à des dépôts de substances témoins.

La mise en évidence des taches a été faite par examen des chromatogrammes en lumière de Wood, avant et après pulvérisation d'une solution éthanolique de potasse à 5 %.

2.1.1.2. REACTIONS COLOREES

2.1.1.2.1. REACTION DITE "DE LA CYANIDINE"

Nous avons utilisé la technique proposée par CORNILLEAU 1954 : à 5 ml de solution à 0,2 °/oo dans l'éthanol, on ajoute 1 ml d'acide chlorhydrique (d = 1,19) et aussitôt 75 mg de tournure de magnésium. Sous l'action de l'hydrogène naissant, une coloration orangée plus ou moins intense, caractéristique de la réduction des flavones en anthocyanes, se développe.

2.1.1.2.2. REACTION DE NOMURA MODIFIEE

En 1959, NOMURA a décrit une réaction caractéristique des composés qui possèdent deux groupements hydroxyles en position ortho. Nous l'avons adaptée aux composés flavoniques.

Principe :

La faible acidité de l'acide borique est exacerbée par les composés orthodihydroxylés. Il forme avec eux un complexe qui se colore en orangé en présence d'un réactif renfermant du sulfanilate de sodium, du nitrite de sodium et de l'α naphtylamin

Mode opératoire :

Quatre solutions sont préparées :

-1- 2,6 g d'acide sulfanilique neutralisés exactement par la lessive de soude, dans 15 ml d'eau distillé

-2- 0,7 g de nitrite de sodium dans 15 ml d'eau distillée

-3- 1,8 g d'α naphtylamine dans 40 ml d'éthanol.

Au moment de l'emploi, 1 ml de chacune des deux premières solutions sont mélangés à 2 ml de la troisième. Le réactif (R) obtenu est limpide.

-4- solution saturée d'acide borique dans l'eau.

Pendant une demi-heure on laisse en contact 1 à 3 mg de flavonoïde cristallisé dans III gouttes de la solution 4, puis on ajoute 0,5 ml de réactif (R) fraîchement préparé. Un témoin sans flavone est réalisé dans les mêmes conditions. Une coloration orangée apparaît au bout de 10 à 15 minutes, si le flavonoïde possède deux groupements hydroxyles libres en position ortho. Le témoin se teinte seulement de rose.

2.1.1.3. SPECTROPHOTOMETRIE EN LUMIERE ULTRA-VIOLETTE

Nous avons déterminé les spectres des flavonoïdes à l'aide d'un spectrographe, type Maroc, de chez Jobin-Yvon.

Les techniques d'analyse et l'interprétation des résultats sont inspirées des travaux de nombreux auteurs, en particulier : HARBORNE-1954, JURD-HOROWITZ-1957, JURD-1956-1962 et 1969, MABRY et Coll. -1970.

Les spectres des flavonoïdes à analyser ont d'abord été établis sur des solutions de ceux-ci dans l'éthanol à 96°.

Les absorptions maximales se situent entre 300-390 nm (bande I due au cycle B) et 240-280 nm (bande II due au cycle A) pour les flavones, et sont déplacées vers les grandes longueurs d'onde lorsque les molécules sont hydroxylées.

L'acétylation abolit l'effet bathochrome qu'exercent les groupements hydroxyles sur la position des maximums d'absorption de la molécule de flavone.

La bande I du spectre d'une hydroxy-flavone, dont les hydroxyles sont libres, subit un déplacement hypsochrome, lorsqu'une molécule de glucose ou un groupement méthyle est fixé en 3,5 ou 4' (Δ = 3 à 10 nm pour une substitution en 4'). La substitution d'hydroxyles situés ailleurs qu'en 3,5 ou 4' n'a aucun effet sur le spectre.

Certains réactifs provoquent des déplacements des bandes I et II, dont l'étude fournit des précisions utiles quant à la position des groupements hydroxyles et à leur degré de liberté :

- le chlorure d'aluminium forme avec les hydroxyles des flavones et flavonols en solution méthanolique, un complexe stable en présence d'acide,(la bande I subit un déplacement hypsochrome de 30 à 40 nm) s'ils sont placés en position 5 ou en position 3, un complexe labile en présence d'acide si les hydroxyles constituent un système ortho-dihydroxylé sur le cycle B.

- l'acétate de sodium fondu ionise les hydroxyles les plus fortement acides, ceux qui se trouvent en position 4' et 7, provoquant des effets bathochromes respectivement sur les bandes I et II.

- l'éthylate de sodium ionise tous les groupements hydroxyles, ce qui entraîne des déplacements bathochromes des bandes I et II. La stabilité du spectre n'est affectée que lorsque le dérivé possède deux groupements hydroxyles libres simultanément en positions 3 et 4'.

- l'acétate de sodium fondu, en présence d'acide borique,forme des chélates avec les composés qui possèdent deux groupements hydroxyles libres en positions 3' et 4'. Il s'ensuit un déplacement bathochrome de la bande I de 15 à 20 nm.

2.1.1.4. SPECTROPHOTOMETRIE EN LUMIERE INFRA-ROUGE

Les spectres d'absorption en lumière infra-rouge des flavonoïdes solides, pastillés dans le bromure de potassium, ont été déterminés par un appareil Infracord Perkin-Elmer. Nous nous sommes inspirée des travaux de BELLAMY-1958, LEBRETON-1962 et de LEBRETON et CHOPIN-1963, pour leur interprétation :

FREQUENCES D'ABSORPTION

Vers 3300^{cm-1}	: Bande des hydroxyles libres (sucres notamment et phényle latéral)
Vers 1650^{cm-1}	: Bande des carbonyles chélatés par un hydroxyle en 5, l'introduction d'un hydroxyle en 7 ne déplaçant pas la bande.
Vers 1600^{cm-1} et 1500^{cm-1}	: Bande des doubles liaisons aromatiques.
Vers 1365^{cm-1} et 1190^{cm-1}	: Bande des hydroxyles phénoliques des dihydroxy, 5-7 flavones.
Vers 1170^{cm-1}	: Bande de la métasubstitution (dihydroxy, 5-7)
Vers 1240^{cm-1}	: Bande du groupement éther-oxyde.
Inférieures à 1000^{cm-1}	: Bande des hydrogènes des cycles benzéniques.

BU LILLE

2.1.2. OSES

Nous avons réalisé des chromatographies descendantes sur papier.

- Papier Arches 302, durée de migration : 85 heures à 4° C ;
- Solvant : alcool isoamylique, pyridine, eau : 7-7-2 (v/v) ;
- Révélation : pulvérisation du réactif au phosphate d'aniline *, suivie de chauffage à 105° C pendant 5 minutes.

Des dépôts de glucose, fructose, galactose, rhamnose et xylose, ainsi qu'un mélange de ces cinq sucres ont servi de témoins.

BU LILLE

* Aniline récemment distillée	0,4	ml
Thymol	2	g
Acide orthophosphorique	2	ml
Ethanol à 96° .....q.s.p.	150	ml

2.2. LUTEOLOL

Le produit que nous avons isolé et que nous pensons être du lutéolol, recristallisé dans l'éthanol à 80°, a l'aspect d'une poudre jaune verdâtre constituée de fines aiguilles microscopiques. Nous le nommerons produit A, tant que son identité avec le lutéolol n'aura pas été vérifiée.

2.2.1. POINT DE FUSION

Au bloc Maquenne, son point de fusion instantané est de 332° C.

2.2.2. HYDROLYSE ACIDE

Nous avons chauffé à reflux pendant 4 heures le produit A, en solution aqueuse sulfurique à 3 %. On peut noter que la dissolution reste incomplète. Nous avons filtré la solution. Le précipité récueilli, recristallisé dans l'éthanol à 80° et séché, a un point de fusion identique à celui du produit A. Ce dernier est donc une aglycone, que l'on peut supposer être très probablement le lutéolol, pour laquelle la littérature cite des points de fusion peu différents : 329° C - 330° C (MOLDENHAUER-1856, PERKIN-1896, PARIS et BEAUQUESNE-1950), 334° C (HAAG-BERRURIER-1964).

2.2.3. SOLUBILITE

La solubilité du produit A, très faible dans l'eau et dans le chloroforme, est beaucoup plus élevée dans les solutions alcalines, l'éther sulfurique et le méthanol. Dans l'éthanol fort il se dissout très facilement à chaud. La pyridine est un excellent solvant, même à la température ordinaire.

2.2.4. DETERMINATION DES RF

Nous avons déterminé les Rf du produit A dans différents solvants en chromatographie ascendante sur papier Arches 302. Les taches de la substance, incolores en milieu neutre ou acide à la lumière du jour, sont révélées par leur fluorescence violette en lumière de Wood. Par exposition aux vapeurs d'ammoniac, elles se colorent en jaune vif et leur fluorescence vire également au jaune.

Le tableau 2 permet de comparer nos résultats à ceux obtenus par les différents auteurs, pour le lutéolol :

BU

SOLVANTS	PRODUIT A	LUTEOLOL
Eau	0	0'
Acide acétique à 15 % (solution aqueuse)	0, 04	0, 05'
Acide acétique à 30 % (solution aqueuse)	0, 17	
Acide acétique à 60 % (solution aqueuse)	0, 52	0, 50 -0, 51'
Solvant de "Forestal"	0, 63	0, 63'
n Butanol-acide acétique-eau (4-1-5)	0, 79-0, 80	0,81'-0,83'-0,84"
n Butanol-acide acétique-eau (6-1-2)	0, 82-0, 84	
n Butanol-méthyléthylcétone-eau (5-3-3)	0, 93	
Acétate d'éthyle saturé d'eau	0, 93	0, 94'-0, 93"

(') = HAAG-BERRURIER-1964
(") = PARIS-1962

TABLEAU 2 : VALEURS DES RF CALCULES POUR LE PRODUIT A ET LE LUTEOLOL EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ARCHES 302, AVEC DIFFERENTS SOLVANTS.

2.2.5. REACTIONS COLOREES

La réaction dite "de la Cyanidine" est positive : une coloration jaune orangé se développe sous l'action de l'hydrogène naissant, permettant d'attribuer au produit A la structure d'une flavone.

En milieu alcalin, le produit A se colore en jaune et développe une fluorescence jaune vif caractéristique de fonction phénoliques.

Avec le chlorure d'aluminium une coloration jaune fluorescente apparaît.

En présence de perchlorure de fer la solution se color en vert olive dénotant la présence dans la substance de deux groupements hydroxyles en position ortho.

Il réduit à froid le nitrate d'argent ammoniacal.

Enfin nous avons effectué la réaction de NOMURA modifiée : au bout de 10 à 15 minutes une coloration orangée apparaît. Un témoin sans flavonoïde dans les mêmes conditions, prend seulement une teinte très légèrement rose. Après une heure la coloration orangée des essais a viré au rouge, tandis que le témoin est devenu orangé.

Cette réaction apporte la preuve que le produit A possède, comme le lutéolol, des hydroxyles libres en position 3' et 4'.

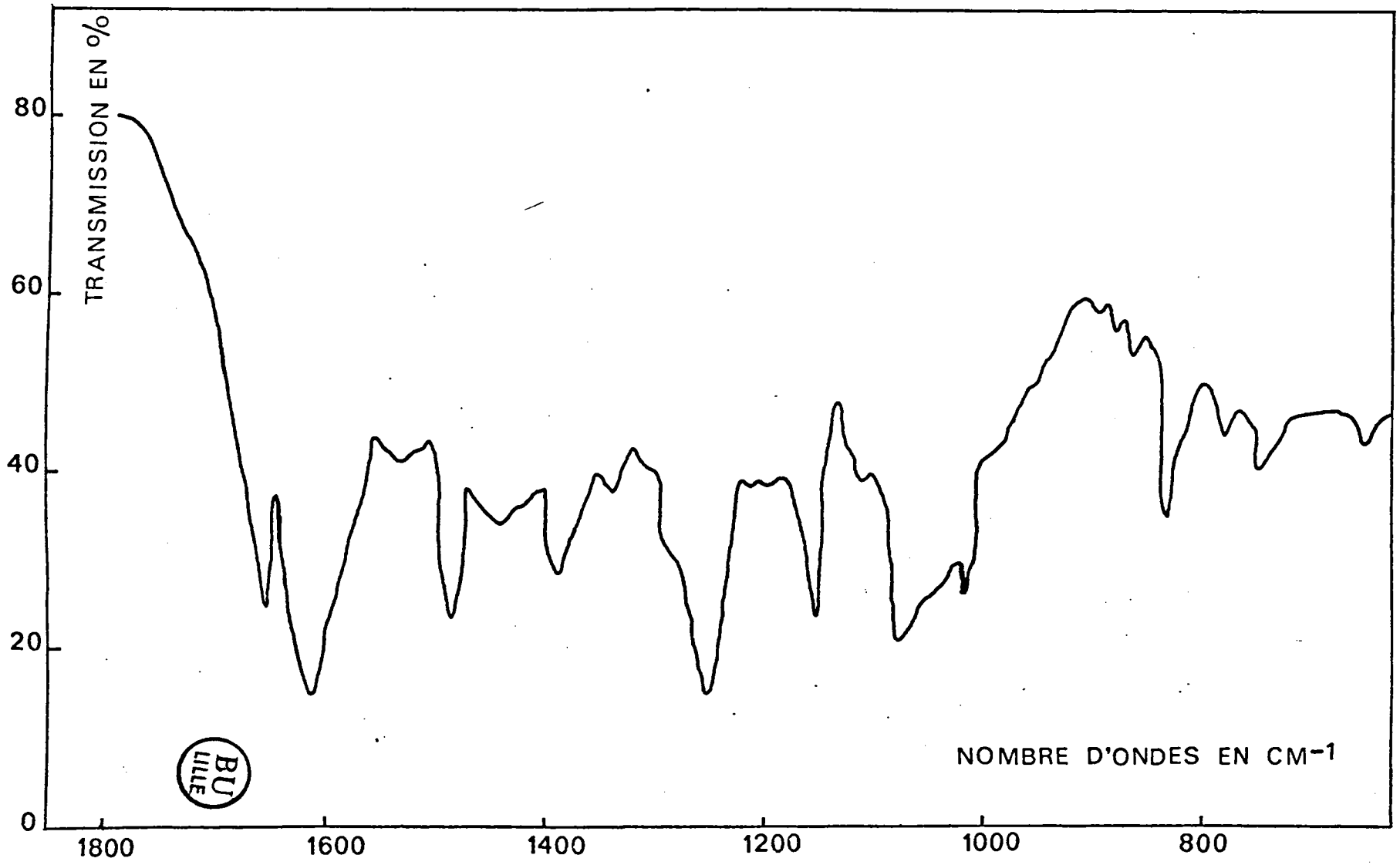
2.2.6. ANALYSE ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire centésimale du produit, desséché dans un appareil de Bouillot à la température d'ébullition du xylène (E = 140° C) pendant 4 heures et refroidi sous vide, donne les résultats suivants :

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
THEORIE CALCULEE POUR LE LUTEOLOL ($C_{15}H_{10}O_6$)		
- Anhydre	62,93	3,49
- + 1/2 H_2O	61,01	3,74
- + 1 H_2O	59,21	3,94
PRODUIT A DESSECHE	60,08	3,79
	60,87	3,66

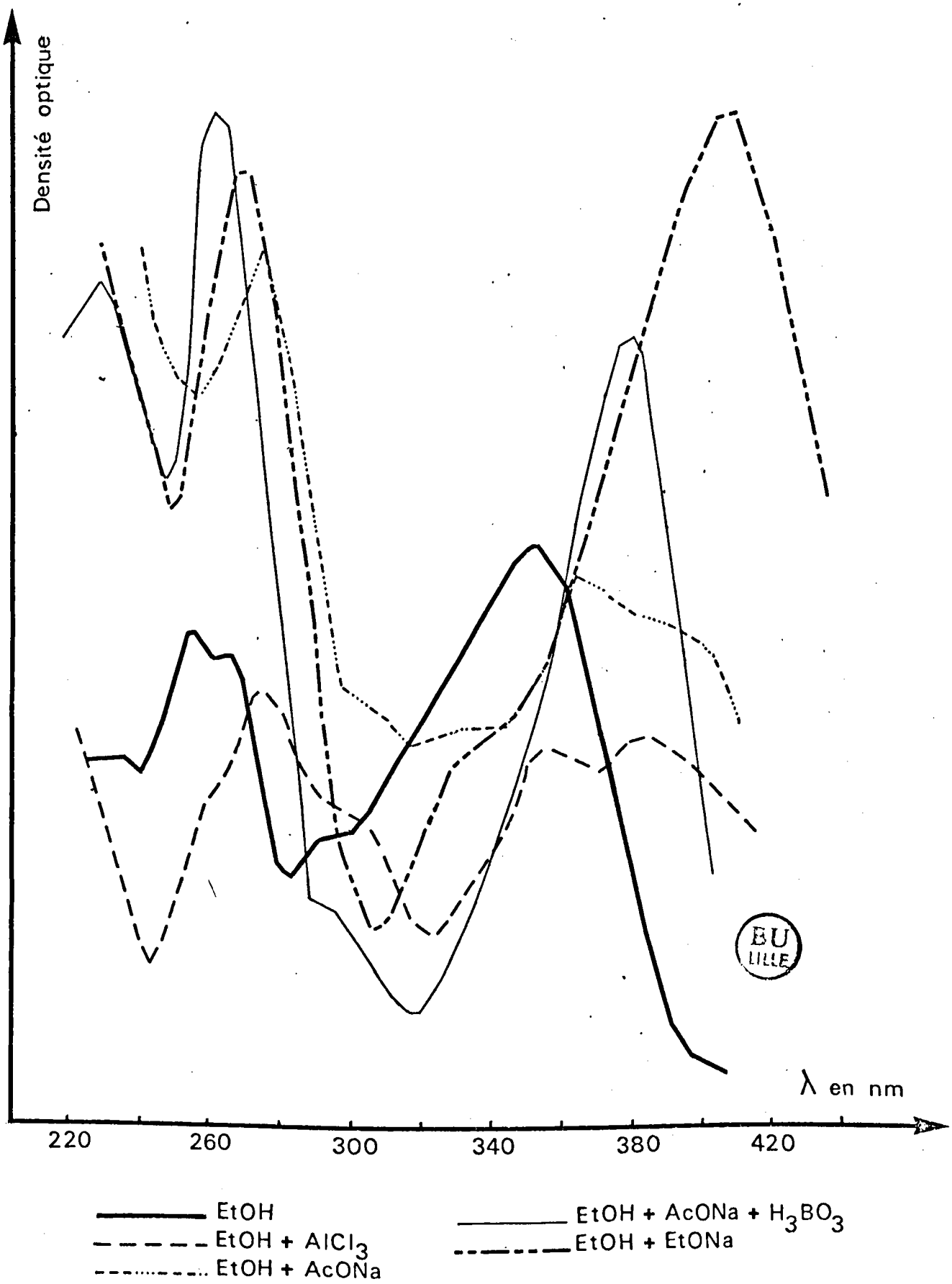
BU LILLE

L'identité du produit A et du lutéolol apparaît clairement, les différences que l'on peut noter entre les chiffres expérimentaux et les chiffres théoriques étant probablement dues à une déshydratation incomplète du produit A, lors de sa dessiccation.



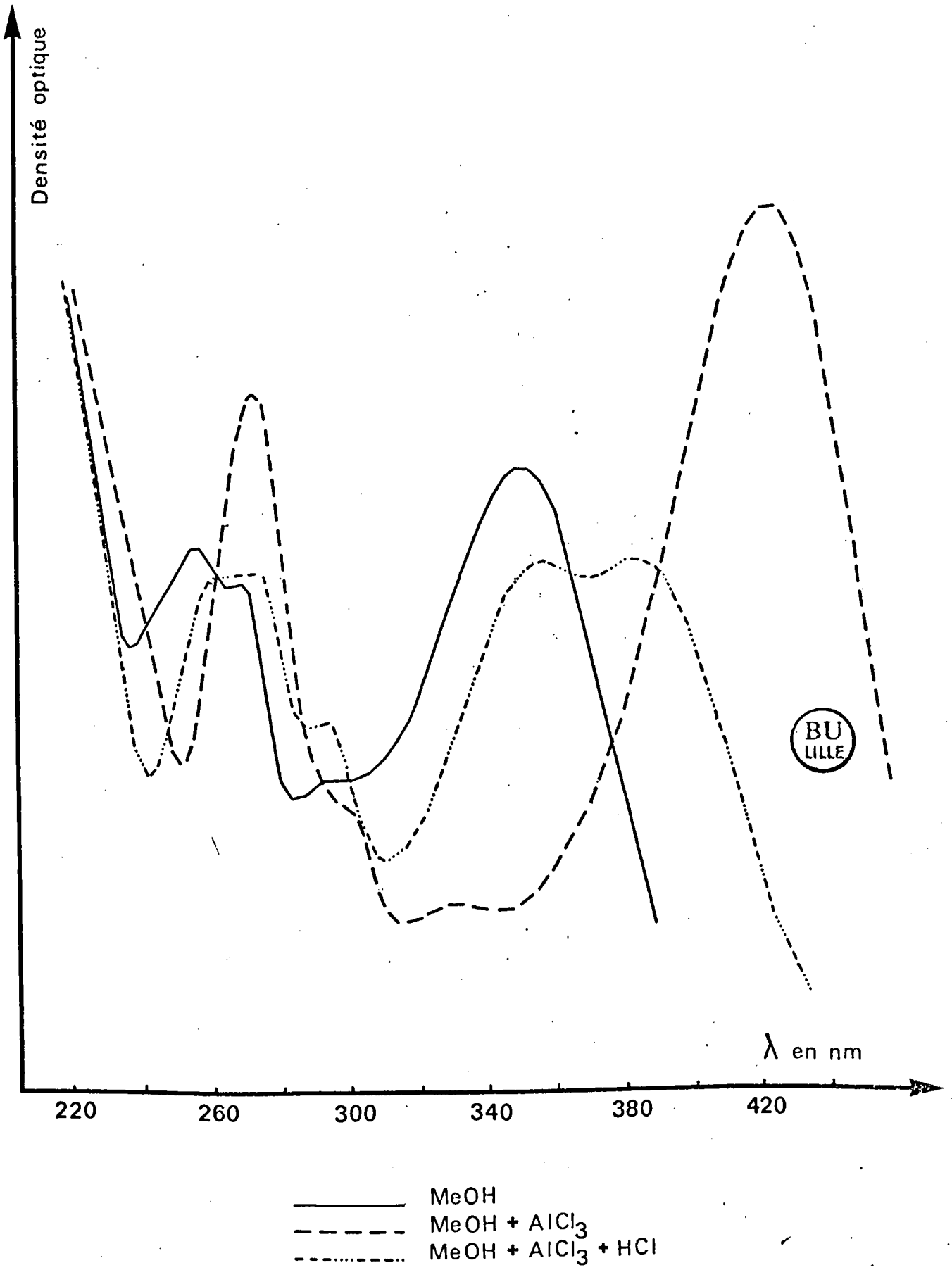
BU LILLE

Figure 1 - Spectre infra-rouge du Produit A (Lutéolol) - 1mg/100 mg de KBr -



BU LILLE

Figure 2 . Spectres ultra-violets du Produit A (Lutéolol), dans divers solvants.



BU LILLE

Figure 3 . Spectres ultra-violets du Produit A (Lutéolol), dans divers solvants.

2.2.7. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRA-ROUGE

Le spectre d'absorption en lumière infra-rouge du produit A est tout à fait comparable (Figure 1) à celui que rapporte Madame HAAG-BERRURIER-1964, à propos du lutéolol qu'elle a isolé de la Piloselle :

Bande à 3320^{cm-1}	: Hydroxyles libres du phényle latéral.
Bande à 1650^{cm-1}	: Carbonyle chélaté avec un hydroxyle en 5.
Bande à 1366^{cm-1}	: Hydroxyles en 5 et 7.
Bande à 1270^{cm-1}	: Groupement éther-oxyde.
Bandes à moins de 1000^{cm-1}	: Hydrogènes des cycles benzéniques.

2.2.8. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette a été déterminé sur une solution 2.10^{-5} M pour 1000 ml du produit A * dans l'éthanol à 96° (Figure 2) et dans le méthanol (Figure 3).

Divers réactifs modifient ces spectres :

- L'addition de chlorure d'aluminium se traduit par un dédoublement des deux bandes, ce qui indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

- En présence d'acétate de sodium fondu, les bandes I et II subissent un déplacement bathochrome (Δ = 47 et 20) indiquant l'existence de deux hydroxyles libres, respectivement en position 4' et 7.

* Nous prêtons au produit A la structure du lutéolol, dont la masse moléculaire est égale à 286.

SOLVANT	λ max, en nm			
	PRODUIT A		LUTEOLOL	
	BANDE I	BANDE II	BANDE I	BANDE II
Ethanol à 96°	353	267,5§ 255	350* 353**	267§ - 257,5* 268§ - 255**
Ethanol à 96° + Chlorure d'aluminium	387,5 - 355	277 265	392,5-362* 388,5-360** 390 -362***	276,5 - 265* 277 - 263***
Ethanol à 96° + Acétate de sodium	367,5 à 400	275	375*	269,5*-269,5***
Ethanol à 96° + Acétate de sodium + Acide borique	380	261	373,5****	261****
Ethanol à 96° + Ethylate de sodium	405	270	406***, ***	275*** 277****
Méthanol	350	290§, 270, 256	349*****	291§, 267, 253
Méthanol + Chlorure d'aluminium	424, 330	300§ - 274	426, 328*****	300§-274*****
Méthanol + Chlorure d'aluminium + Acide chlorhydrique	383, 355	294§, 272, 262	385, 355*****	294§,275,266****

§ : Inflexion ; * : HAAG-BERRURIER-1964 ; ** : HARBORNE-1954 ; *** : JURD-1962

**** : JURD-1956 ; ***** : MABRY-1970.

BU LILLE

TABLEAU 3 : LONGUEURS D'ONDE, en nm, AUXQUELLES SE SITUENT LES MAXIMUMS DU PRODUIT A ET DU LUTEOLOL, DANS DIVERS SOLVANTS.

- l'acétate de sodium en présence d'acide borique a pour effet un déplacement bathochrome de la bande I (Δ = 27).

- l'addition de chlorure d'aluminium à la solution méthanolique du produit provoque un déplacement bathochrome de 74 nm de la bande I. En milieu chlorhydrique, cette bande se dédouble et subit un effet hypsochrome insuffisant pour reprendre la position qu'elle occupait dans le méthanol seul (Δ = 33 nm) : la substance étudiée, possède donc deux hydroxyles libres en position 3' et 4'.

- Enfin la stabilité du spectre n'est pas affectée par l'éthylate de sodium ce qui exclut la présence simultanée d'un hydroxyle en 4' et d'un hydroxyle en 3 dans le produit A.

Le tableau 3 réunit nos résultats comparativement à ceux que d'autres auteurs ont obtenus, dans des conditions similaires, avec le lutéolol.

2.2.9. PREPARATION ET PROPRIETES DU DERIVE ACETYLE

2.2.9.1. PREPARATION

Deux techniques ont été utilisées :

La première consiste à chauffer à l'ébullition à reflux 1,50 g de produit A dans 5 g d'anhydride acétique, sur un bain de sable à 210 - 220° C, pendant 3/4 d'heure.

La deuxième est celle que rapporte HAAG-BERRURIER-1964 128,5 mg de produit A cristallisé sec, sont dissous dans 2 ml de pyridine anhydre à froid. Après avoir ajouté 1 ml d'anhydride acétique, on agite et on porte la fiole bouchée à l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

Dans les deux cas, le mélange devenu incolore est refroidi à + 4° C et additionné de 50 ml d'eau distillée glacée. Un précipité blanc floconneux se forme par agitation. Il est recueilli sur verre fritté, lavé à plusieurs reprises, chaque fois avec de petites quantités d'eau distillée glacée, séché sous vide phosphorique. Les 168, 5 mg (rendement = 82,8 %) de

la substance blanche soyeuse obtenue furent repris par 30 ml d'alcool à 96c bouillant. Dans la solution filtrée chaude, des aiguilles blanches apparurent par refroidissement. Elles furent séparées, séchées sous vide phosphorique et pesées : 86,65 mg, soit un rendement de 42,58 %.

2.2.9.2. PROPRIETES

Solubilité :

Le dérivé acétylé est très peu soluble dans l'eau distillée à + 4° C, très soluble à chaud dans l'éthanol fort, beaucoup moins à froid.

Point de fusion instantané :

228 - 229° C. (Tétracétate du lutéolol = 222 - 224° C, (PARIS-1965), 232 - 233° C, (HAAG-BERRURIER-1964).

L'analyse élémentaire :

Elle a été effectuée sur le dérivé desséché dans un appareil de Bouillot, pendant 3 heures à la température d'ébullition de l'eucalyptol (E = 170° C).

BU LILLE

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
DERIVE ACETYLE DU PRODUIT A	60,61 60,64 61,21	4,11 3,84 3,92
THEORIE CALCULEE POUR LE TETRACETATE DU LUTEOLOL ANHYDRE	60,79	3,96

Réactions colorées :

Le dérivé présente en lumière de Wood une fluorescence violette, qui vire au jaune en présence de vapeurs ammoniacales. Contrairement à ce qui se passe pour le produit A, la fluorescence du dérivé acétylé n'est pas modifiée par le chlorure d'aluminium, la fonction hydroxyle en position 5 se trouvant ici bloquée par un radical acétyl. L'addition d'acétate de lutéolol au perchlorure de fer n'entraîne d'ailleurs aucun changement de coloration de ce dernier.

Chromatographie sur papier :

Des chromatographies ascendantes sur papier Arches 302 ont été réalisées avec le dérivé acétylé du produit A, dans chacune des phases du solvant de Partridge. Dans les deux cas on observe une tache unique en lumière de Wood. Après développement dans la phase butanolique du solvant, le Rf du dérivé acétylé a été trouvé égal à 0,87. La migration dans la phase aqueuse de ce même solvant conduit à une tache très allongée dont l'extrémité migre jusqu'au front du solvant, ce qui rend difficile la détermination du Rf.

Nous n'avons observé aucune migration du dérivé après développement d'une chromatographie dans l'acide acétique à 15 %.

En chromatographie ascendante sur papier Arches 302, avec le solvant mis au point par Koch-1965 : benzène, acétate d'éthyle, méthanol : 50-49-1 (v/v), le dérivé acétylé donne une seule tache de Rf = 0,95.

Spectre d'absorption en lumière ultra-violette :

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette a été déterminé sur une solution contenant 45,4 mg du dérivé dans 50 ml d'éthanol à 96°.

	DERIVE ACETYLE DU PRODUIT A	TETRACETATE DU LUTEOLOL
λ maximum, en nm		
Bande I	304	298* ; 298** ; 300***
Bande II	257	261* ; 259** ; 258***
λ minimum, en nm	270	270,5* ; 270***

* HAAG-BERRURIER-1964 ; ** HOROWITZ & GENTILI-1960 ; *** JURD-1962

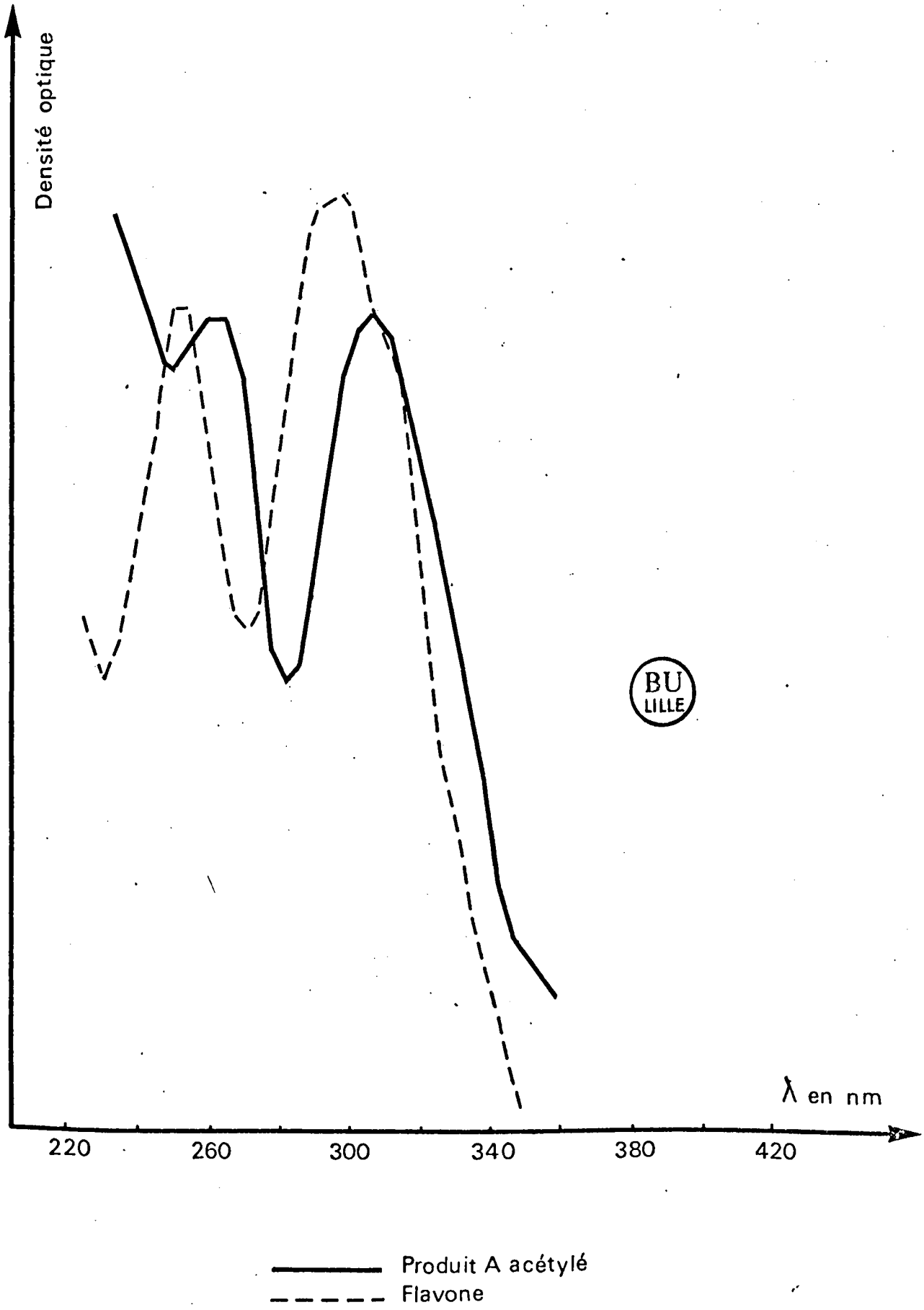
BU LILLE

Ce spectre (Figure 4) est identique à celui de la flavone non hydroxylée, dont les maximums d'absorption se situent à 307 nm et 250 nm.

Il apporte la preuve de l'acétylation de tous les hydroxyles du produit A.

CONCLUSION

Toutes ces déterminations nous permettent d'affirmer que le composé, que nous avons isolé de la Gaude, a été obtenu pur et qu'il s'identifie au lutéolol, 5-7-3'-4' tetrahydroxy-flavone.



BU LILLE

Figure 4 . Spectres ultra-violets du Produit A (Lutéolol) acétylé et de la Flavone, dans l'éthanol à 96°.

2.3. LUTEOLOSIDE

Le produit condidéré comme étant du lutéoloside cristallisé dans l'alcool à 80° sous forme d'aiguilles microscopiques courtes, qui, rassemblées, constituent une poudre jaune franc. Nous le désignerons par "produit B" tant que son identité n'aura pas été confirmée.

2.3.1. POINT DE FUSION

Lors de la détermination du point de fusion au bloc Maquenne, nous avons d'abord observé le phénomène suivant : vers 200° C, le produit semble se décomposer, puis se resolidifie et prend la forme d'une substance jaune plus foncé. La fusion instantanée n'a lieu qu'à 279-280° C.

Cette température est à rapprocher de celle que PARIS-1955 rapporte pour le lutéoloside (7-β monoglucoside de lutéolol) qu'il a isolé de la Gaude : 274-276° C. Madame HAAG indique 281,5° C pour celui qu'elle a obtenu à partir de la Piloselle.

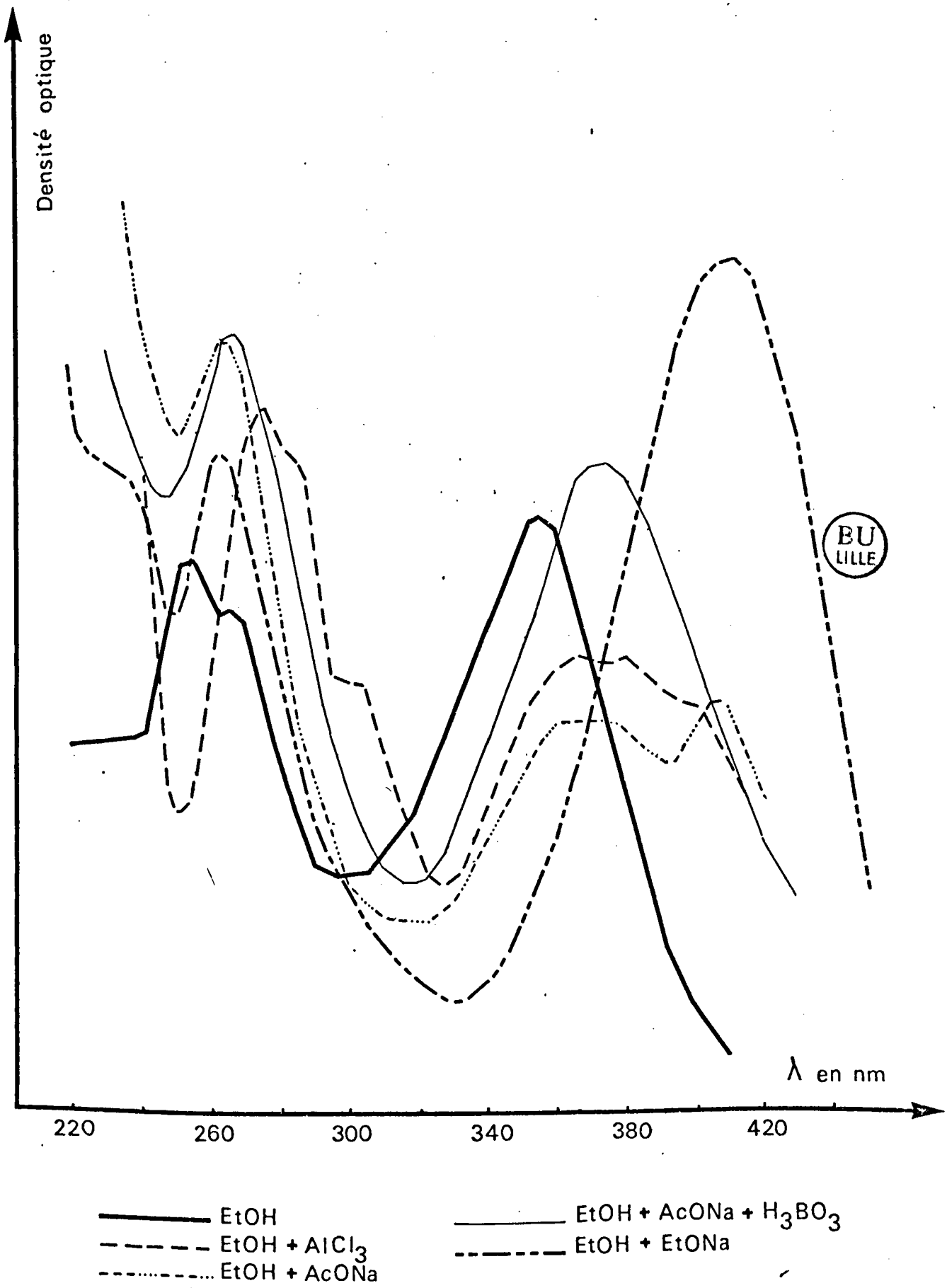
Il faut toutefois noter qu'un autre flavonoïde, le galutéoloside (5-monoglucoside de lutéolol) présente un point de fusion de 280° C (PARIS & BEAUQUESNE-1950).

2.3.2. ANALYSE ELEMENTAIRE

Les analyses centésimales du produit B cristallisé, d'une part non desséché, d'autre part séché pendant 4 heures à + 105° C, ont donné les résultats suivants :

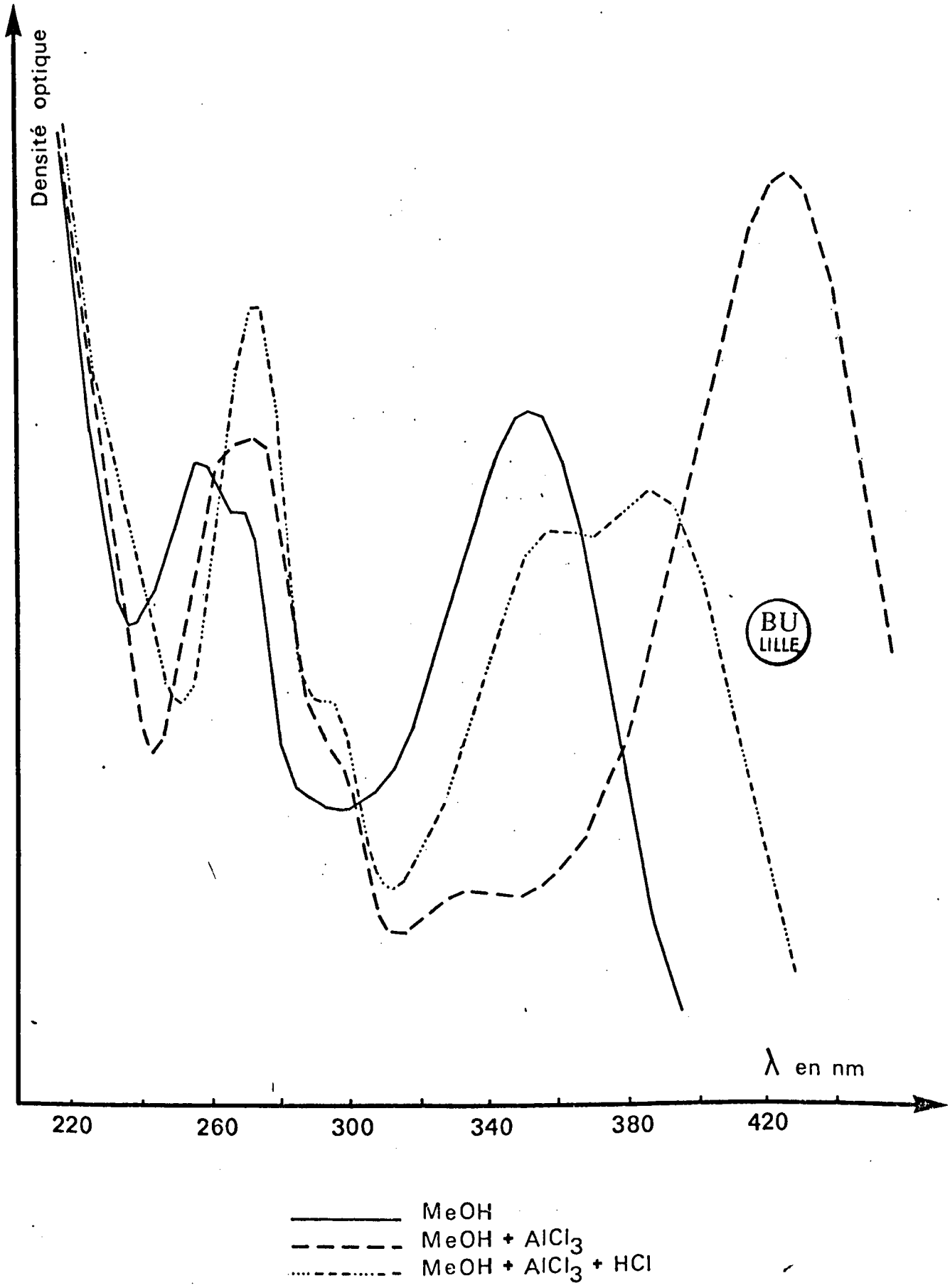
	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
PRODUIT B non desséché	51,92	5,11
	52,30	4,77
PRODUIT B séché à + 105° C	54,75	4,72
	54,82	4,62
	53,99	4,84
THEORIE CALCULEE POUR LE		
LUTEOLOSIDE ANHYDRE	56,25	4,46
LUTEOLOSIDE + 1 H_2O	54,07	4,72
LUTEOLOSIDE + 2 H_2O	52,06	4,95

BU LILLE



BU LILLE

Figure 5 - Spectres ultra-violets du Produit B (Lutéoloside), dans divers solvants.



BU LILLE

Figure 6 - Spectres ultra-violets du Produit B (Lutéoloside), dans divers solvants.

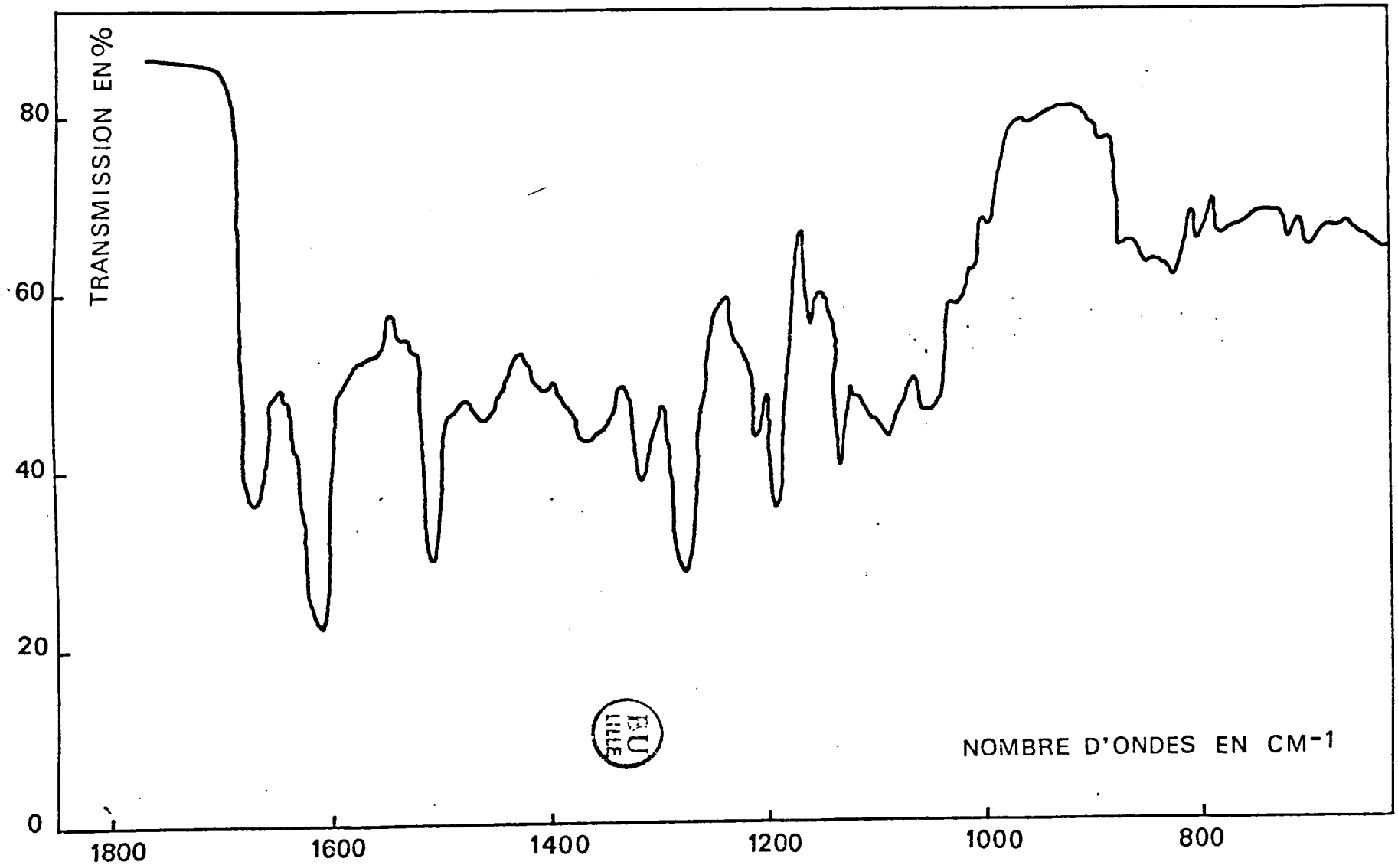


Figure 7 - Spectre infra-rouge du Produit B (Lutéoloside) - 1 mg/100 mg de KBr.

2.3.3. SOLUBILITES

Le produit B est très peu soluble dans l'éther sulfurique, l'eau froide, le chloroforme. Il est un peu plus soluble dans l'acétate d'éthyle et l'acétone. Dans le méthanol et l'éthanol à 96° bouillants, sa solubilité est nettement plus grande qu'à plus basse température (0,36 % dans l'alcool à 96° bouillant contre 0,10 % dans le même solvant à + 4° C). A + 23° C, il se dissout dans l'éthanol à 80° à raison de 0,86 % *. Enfin, il est très soluble dans les solutions alcalines et la pyridine.

2.3.4. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du produit B a été déterminé sur une solution renfermant 4,48 mg de substance dans 50 ml d'éthanol à 95° (Figure 5) . Il est très voisin de celui du lutéolol. Il présente 2 maximums à 257,5 nm (Bande II) et à 353 nm (Bande I), et un épaulement à 267,5 nm.

2.3.5. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRA-ROUGE

Le spectre d'absorption en lumière infra-rouge présente les caractéristiques suivantes (Figure 7) :

Bande à 3360^{cm-1}	: Hydroxyles libres (sucres - phényle latéral).
Bande à 1668^{cm-1}	: Carbonyle chélaté par un hydroxyle en 5, caractéristique des dihydroxy-5,7 flavones.
Bandes à 1595^{cm-1} et 1490^{cm-1}	: Doubles liaisons conjuguées, en particulier des noyaux aromatiques.

* La technique utilisée pour déterminer les solubilités du produit B dans différents solvants est la suivante : à un poids du composé exactement pesé on ajoute peu à peu de faibles volumes connus de solvant, jusqu'à dissolution complète. Il suffit alors de faire le rapport entre le poids de substance dissoute et le volume de solvant utilisé pour obtenir des valeurs approximatives des solubilités.

Bandes à - 1440 $^{cm-1}$ et 1350 $^{cm-1}$	: Hydroxyles phénoliques des dihydroxy 5,7 flavones.
Bande à - 1260 $^{cm-1}$	: Groupement éther-oxyde.
Bande à - 1180 $^{cm-1}$	: Métasubstitution en 5,7.
Bande à moins de 860 $^{cm-1}$	: Hydrogènes aromatiques isolés.

Il est comparable à ceux qu'ont rapportés BELLAMY-1958 et LEBRETON et CHOPIN-1963 pour le lutéoloside.

2.3.6. DETERMINATION DES RF

Le produit B s'est comporté en chromatographie sur papier comme un échantillon de lutéoloside *.

Le tableau 4 permet en outre de rapprocher nos résultats de ceux qui ont été observés par différents auteurs à propos du lutéoloside :

BU LILLE

SOLVANTS	VALEURS DES RF	
	PRODUIT B	LUTEOLOSIDE
Eau	0	0, 02*
Acide acétique à 15 % (solution aqueuse)	0, 10	0, 13*
Acide acétique à 30 % (solution aqueuse)	0, 33	0, 31*
Acide acétique à 60 % (solution aqueuse)	0, 59-0, 61	0, 58-0, 60*
Solvant de "Forestal"	0, 72	0, 79*
n-Butanol-acide acétique-eau (4-1-5)	0, 45	0,40-0,47* 0,47**
n-Butanol-acide acétique-eau (6-1-2)	0, 37-0, 39	
n-Butanol-méthyléthyl-cétone-eau (5-3-3)	0, 66	
Acétate d'éthyle saturé d'eau	0, 08	0, 08* 0, 09***

* HAAG-BERRURIER-1964 ; ** PARIS-1955 ; *** PARIS-1962

TABLEAU 4 : VALEURS DES RF CALCULES POUR LE PRODUIT B ET LE LUTEOLOSIDE EN CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ARCHES 302, DANS DIFFERENTS SOLVANTS.

* Nous remercions Monsieur le Professeur PARIS qui a eu l'amabilité de nous fournir cet échantillon.

2.3.7. REACTIONS COLOREES

Le produit B se dissout très facilement dans les solutions alcalines : soude, carbonate de sodium, potasse, ammoniaque, en donnant des liqueurs jaune doré.

L'addition de perchlorure de fer à sa solution aqueuse la colore en vert olive.

Le chlorure d'aluminium colore sa solution alcoolique en jaune vert fluorescent.

Il réduit à froid le nitrate d'argent ammoniacal et donne par la réaction dite de la cyanidine une coloration rose groseille intense.

Enfin, la réaction modifiée de NOMURA fait apparaître après 10 à 15 minutes une coloration orangée qui vire au rouge au bout d'une heure indiquant comme dans le cas du produit A la présence de 2 hydroxyles libres en position ortho.

2.3.8. HYDROLYSE

2.3.8.1. HYDROLYSE ACIDE

Le produit B, chauffé pendant 4 heures à l'ébullition en solution aqueuse à 3 % d'acide sulfurique, libère une génine insoluble dans l'eau et un sucre réducteur. L'hydrolyse totale est assez difficile : une petite quantité de produit non transformé peut encore être décelée en fin d'opération.

2.3.8.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le produit B est hydrolysé par l'émulsine à la température de 37° C. L'analyse chromatographique révèle une réaction incomplète.

Le produit B est donc bien un hétéroside flavonique.

2.3.9. ETUDE DE LA GENINE

165 mg de produit B mis dans 20 ml d'eau distillée additionnés de 3,5 ml d'acide sulfurique officinal sont placés au bain marie bouillant pendant six heures. Après refroidissement on recueille par filtration sur verre fritté 104,5 mg de précipité.

De la solution aqueuse, on extrait encore, par l'éther sulfurique, 2 mg d'aglycone (rendement total = 64,54 %).

On peut identifier cette aglycone au lutéolol, par chromatographie sur papier dans différents solvants, ainsi que par son point de fusion instantané (F = 330° C au bloc Maquenne) et son spectre ultra-violet.

2.3.10. ETUDE DES SUCRES

Le filtrat soigneusement neutralisé (§) réduit à chaud la liqueur de FEHLING. Le sucre réducteur a été identifié à du glucose par chromatographie.

2.3.11. DETERMINATION DU NOMBRE DE MOLECULES DE GLUCOSE

Sur le filtrat précédent, nous avons dosé les sucres réducteurs par la méthode de BERTRAND : 71,98 mg, exprimés en glucose (soit 43,62 %).

(§) par addition de carbonate de baryum et séparation du précipité de sulfate de baryum formé par filtration sur filtre sans cendres.

Le tableau ci-dessous donne la proportion théorique d'aglycone et de glucose dans des composés renfermant une ou deux molécules de ce sucre pour une de lutéolol :

Composition des glucosides	Sucres réducteurs % (glucose)	Lutéolol anhydre %
Produit B anhydre	43,62	64,54
Lutéolol + 1 glucose = Lutéoloside anhydre	40,2	63,84
Lutéolol + 2 glucoses	59,01	46,88

BU LILLE

Notre produit B est donc un monoglucoside du lutéolol.

2.3.12. DETERMINATION DE LA POSITION DU SUCRE

La grande similitude des spectres d'absorption en lumière ultra-violette du produit B et du lutéolol, nous a incitée à supposer que notre flavonoïde était un 7-monoglucoside de celui-ci.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le déplacement des bandes d'absorption du spectre ultra-violet de l'hétéroside dans l'éthanol à 96° et dans le méthanol sous l'influence de divers réactifs - (Figures 5 et 6).

- Chlorure d'aluminium : le dédoublement de la bande I en deux maximums à 355 nm et à 387,5 nm ainsi que son déplacement bathochrome de 34,5 nm indiquent la présence d'un hydroxyle libre en 5, écartant ainsi la possibilité d'identifier notre produit B au galutéoloside.

- Acétate de sodium fondu : l'effet bathochrome de 52 nm que présente la bande I, tandis que la position de la bande II ne change pas, traduit la présence d'un OH libre en 4', le OH en 7 étant bloqué.

- Acétate de sodium et acide borique : le déplacement bathochrome de 23 nm de la bande I est le fait de 2 groupements ortho-dihydroxylés libres qui sont ceux qui se trouvent en 3' et 4'.

- Le spectre du produit B dans le méthanol est modifié par l'addition de chlorure d'aluminium : déplacement bathochrome de la bande I de 75 nm. En milieu chlorhydrique, la bande I se dédouble et subit un déplacement hypsochrome, sans toutefois retrouver la position qu'elle occupait dans le méthanol (Δ = 34 nm) ce qui confirme la présence de deux groupements hydroxyles en position ortho sur le cycle B.

Les colorations obtenues avec le perchlorure de fer d'une part, et par la réaction de NOMURA modifiée, d'autre part, confirment cette assertion.

Le tableau 5 permet de rapprocher nos résultats de ceux obtenus par d'autres auteurs pour le lutéoloside.

SOLVANT	λ max. en nm			
	PRODUIT B		LUTEOLOSIDE	
	BANDE I	BANDE II	BANDE I	BANDE II
Ethanol à 96°	353	267,5§-257,5	353* 352** 353***	268,5§ 268§ 250* 256** 257***
Ethanol à 96° + chlorure d'aluminium	385 à 365	305 à 275	395 à 357** 390 à 355***	
Ethanol à 96° + acétate de sodium	405 à 362	262,5	413** 409***	
Ethanol à 96° + acétate de sodium + acide borique	376	260		378***
Ethanol à 96° + éthylate de sodium	412,5	262,5		
Méthanol	353	270§-257	348****	267§ 255****
Méthanol + chlorure d'aluminium	428 - 332	298§-274	432 - 329****	298§ 274****
Méthanol + chlorure d'aluminium + acide chlorhydrique	387 - 360	294§-274	387 - 358****	294§ 273****

§ : Inflexion : * HAAG-BERRURIER-1964 ; ** PARIS-1955 ; *** OUNG-BORAN-1965 ; **** MABRY et Coll.-1970

BU LILLE

TABLEAU 5 : LONGUEURS D'ONDE, en nm, AUXQUELLES SE SITUENT LES MAXIMUMS D'ABSORPTION DU PRODUIT B ET DU LUTEOLOSIDE, DANS DIVERS SOLVANTS.

Le produit B que nous avons isolé est donc bien du lutéoloside, 7- β monoglucoside du lutéolol.

2.3.13. PREPARATION ET PROPRIETES D'UN DERIVE ACETYLE

2.3.13.1. PREPARATION

Nous avons utilisé la technique indiquée par HAAG-BERRURIER-1964, comme nous l'avons indiqué à propos de l'acétylation du lutéolol (Chapitre I - 2.2.9.1). Partant de 145,75 mg de produit B, nous avons obtenu 217,5 mg de produit acétylé brut, soit un rendement de 90 %. Repris par 60 ml d'éthanol à 60^{c} bouillant, le produit cristallise en longues aiguilles microscopiques transparentes, groupées en "oursin". A l'oeil nu, il est très blanc et a un aspect soyeux.

2.3.13.2. PROPRIETES

Solubilité :

Le dérivé est très peu soluble dans l'eau distillée à + 4° C, très soluble à chaud dans l'éthanol fort, beaucoup moins à froid.

Point de fusion instantané au bloc Maquenne :

Il présente certaines particularités que l'on peut rapprocher de ce que nous avons observé à propos du produit B lui-même : vers 200° C, le dérivé acétylé se modifie, il se liquéfie et se colore, puis se resolidifie. Vers 242-245° C, il fond définitivement.

Se produit-il vers 200° C une solubilisation des échantillons dans leur eau de cristallisation ou de combinaison, suivie du départ rapide de celle-ci ?

Analyse élémentaire :

A la suite de la remarque précédente nous avons desséché dans un appareil de Bouillot pendant 5 heures, deux échantillons de l'acétate du produit B, préalablement séchés sous vide phosphorique : l'un à 144° C, pour lequel nous avons calculé une perte de poids de 5,04 %, l'autre à 220° C qui

accuse une perte de poids sensiblement égale et dans lequel nous avons vu apparaitre de petits points jaunes. Ces pourcentages sont très proches de celui que l'on peut établir théoriquement pour une molécule de lutéoloside qui aurait fixé 7 radicaux acétylés et qui cristalliserait avec 2 molécules d'eau : 4,6 %

L'anlyse centésimale de ces deux échantillons a donné les résultats suivants :

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
Produit B chauffé à 144° C	55,07 55,73 56,24	4,83 4,62 4,67
Produit B chauffé à 220° C	56,77	4,91
Théorie calculée pour le dérivé heptacétylé du lutéoloside	56,60	4,58

BU LILLE

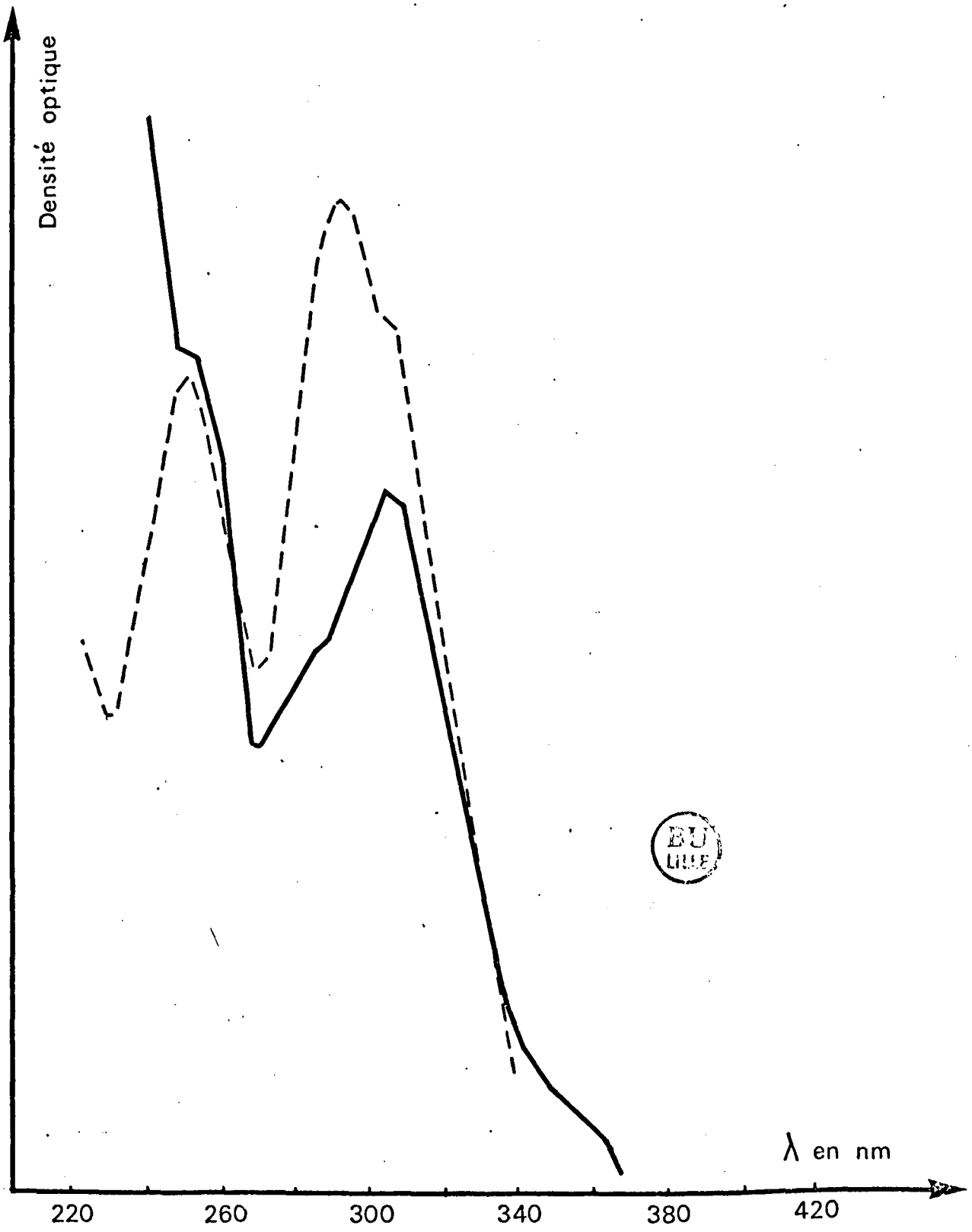
Le chauffage prolongé du dérivé acétylé du produit B à une température supérieure à 200° C, ne semble pas, malgré certaines apparences, modifier de façon importante sa composition

Réactions colorées :

Le dérivé acétylé donne lieu aux mêmes réactions de fluorescence et de coloration que le dérivé homologue du lutéolol (Chapitre I - 2.2.9.2).

Chromatographie sur papier :

Nous avons étudié son comportement chromatographique dans plusieurs solvants :



BU LILLE

Produit B (Lutéoloside) acétylé
Flavone

Figure 8 - Spectres ultra-violets du Produit B (Lutéoloside) acétylé et de la Flavone, dans l'éthanol à 96°.

- Phase butanolique du Solvant de Partridge : Rf = 0,91
- Phase aqueuse " " " : Rf = 0
- Acide acétique à 15 % (solution aqueuse) : Rf = 0
- Solvant de Koch : Rf = 0

Spectre d'absorption en lumière ultra-violette :

Nous avons établi, le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du produit en solution dans l'éthanol à 96°, à la concentration de 14 mg p. 1000 ml. Il présente un maximum à 304 nm, un minimum à 270 nm et un épaulement à 257 nm. Notons l'identité de ce spectre avec celui du dérivé acétylé du lutéolol et avec celui de la flavone (Figure 8) : le produit B a été totalement acétylé.

2.3.14. DERIVE METHYLE

2.3.14.1. PREPARATION

Nous avons suivi la technique utilisée par PACHECO-1958 pour la méthylation de la rutine.

A une suspension de 200 mg de produit B et de 1g de carbonate de potassium anhydre dans l'acétone pure, nous avons ajouté 0,25 ml de sulfate de méthyle fraichement distillé. Nous avons porté ce mélange hétérogène à l'ébullition pendant 30 heures. Après refroidissement, nous l'avons décanté, puis nous avons évaporé à sec le liquide surnageant coloré en jaune d'or. Le beau résidu de même couleur obtenu a été desséché sous vide phosphorique, puis repris par 30 ml d'alcool méthylique bouillant Par refroidissement lent, s'est séparé un produit cristallisé sous forme de courtes aiguilles microscopiques jaune orangé dont nous avons recueilli 30 mg.

2.3.14.2. PROPRIETES

L'analyse chromatographique ascendante sur papier Arches 302 du dérivé méthylé a été faite à l'aide de plusieurs solvants. Dans chaque cas une seule tache a été révélée par sa fluorescence violette à la lumière de Wood, coloration non modifiée par les vapeurs d'ammoniac, contrairement à ce que l'on peut observer pour le produit B. Les Rf correspondants sont les suivants :

- Solution aqueuse d'acide acétique à 60 %..... 0,78
- Solvant de Forestal..... 0,87
- Solvant de Partridge..... 0,48
- Solvant de Koch..... 0

CONCLUSION

Le produit B que nous avons obtenu cristallisé à partir de la Gaude est bien le lutéoloside ou 7-monoglucoside du lutéolol, déjà décrit dans la Gaude par PARIS-1955 et isolé également de la Piloselle par Madame HAAG-BERRURIER-1964.

2.4. GLUCOLUTEOLOSIDE

Le produit, que nous avons appelé glucolutéoloside, a l'aspect d'une poudre microcristalline jaune soufre, constituée de longues aiguilles, légèrement courbes, qui se groupent en des formations qui ressemblent à des "oursins". (Photo n°1). Nous le désignerons par produit C tant que sa structure n'aura pas été précisée.

2.4.1. POINT DE FUSION

Au bloc Maquenne, le produit C présente un point de fusion instantané de 241 °C.

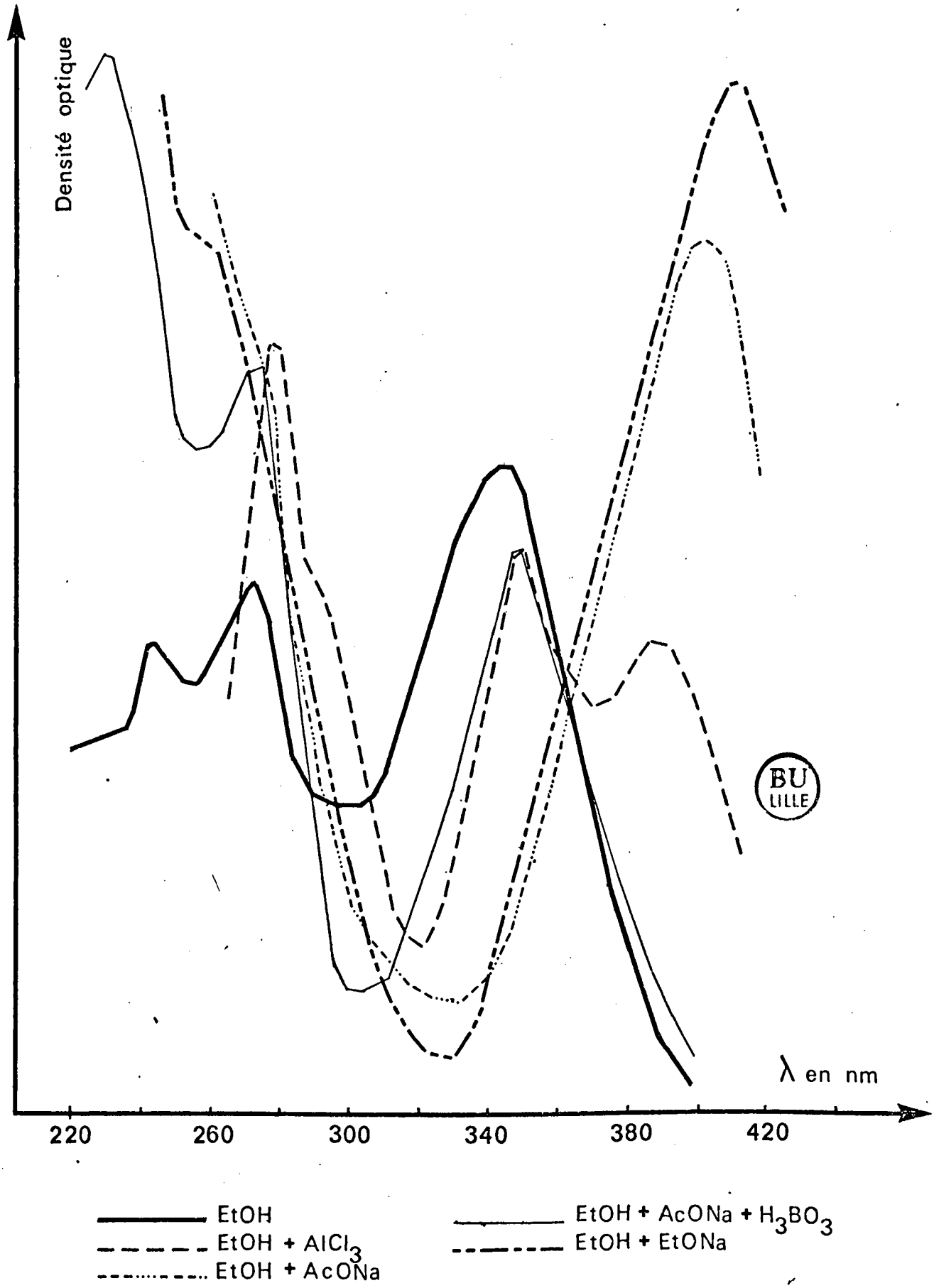
2.4.2. SOLUBILITES

Le produit C est insoluble dans l'alcool méthylique, l'éther-sulfurique, le chloroforme et l'acétone. Il est très peu soluble dans l'éthanol à 96°, sa solubilité augmente dans les alcools de titre plus faible (solubilité dans l'éthanol à 80°. à 25°C = 1 p. 1000). Il est assez soluble dans l'eau et très soluble dans les solutions alcalines.

2.4.3. REACTIONS COLOREES

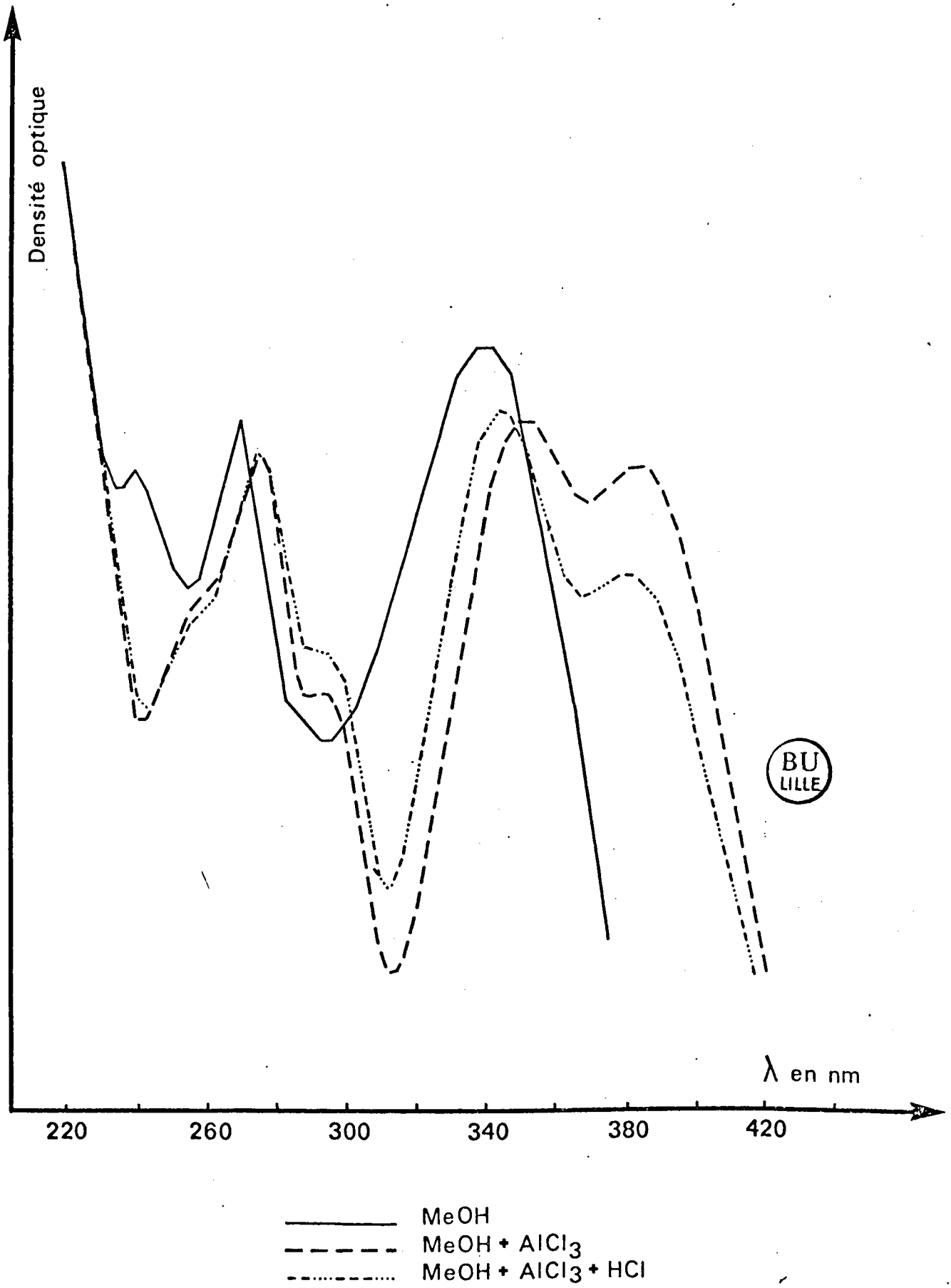
La solution aqueuse du produit C se colore en jaune vif par alcalinisation, en brun rouge par addition de perchlorure de fer dilué et en jaune vif par le chlorure d'aluminium. Elle réduit le nitrate d'argent ammoniacal et développe une coloration jaune orangé pâle lors de la réaction dite de la cyanidine.

La réaction de NOMURA modifiée, exécutée sur 3 mg, conduit à une coloration jaune pâle qui vire à l'orangé seulement après une heure. Aucune différence ne peut être observée avec le tube témoin qui ne contient pas de produit C.



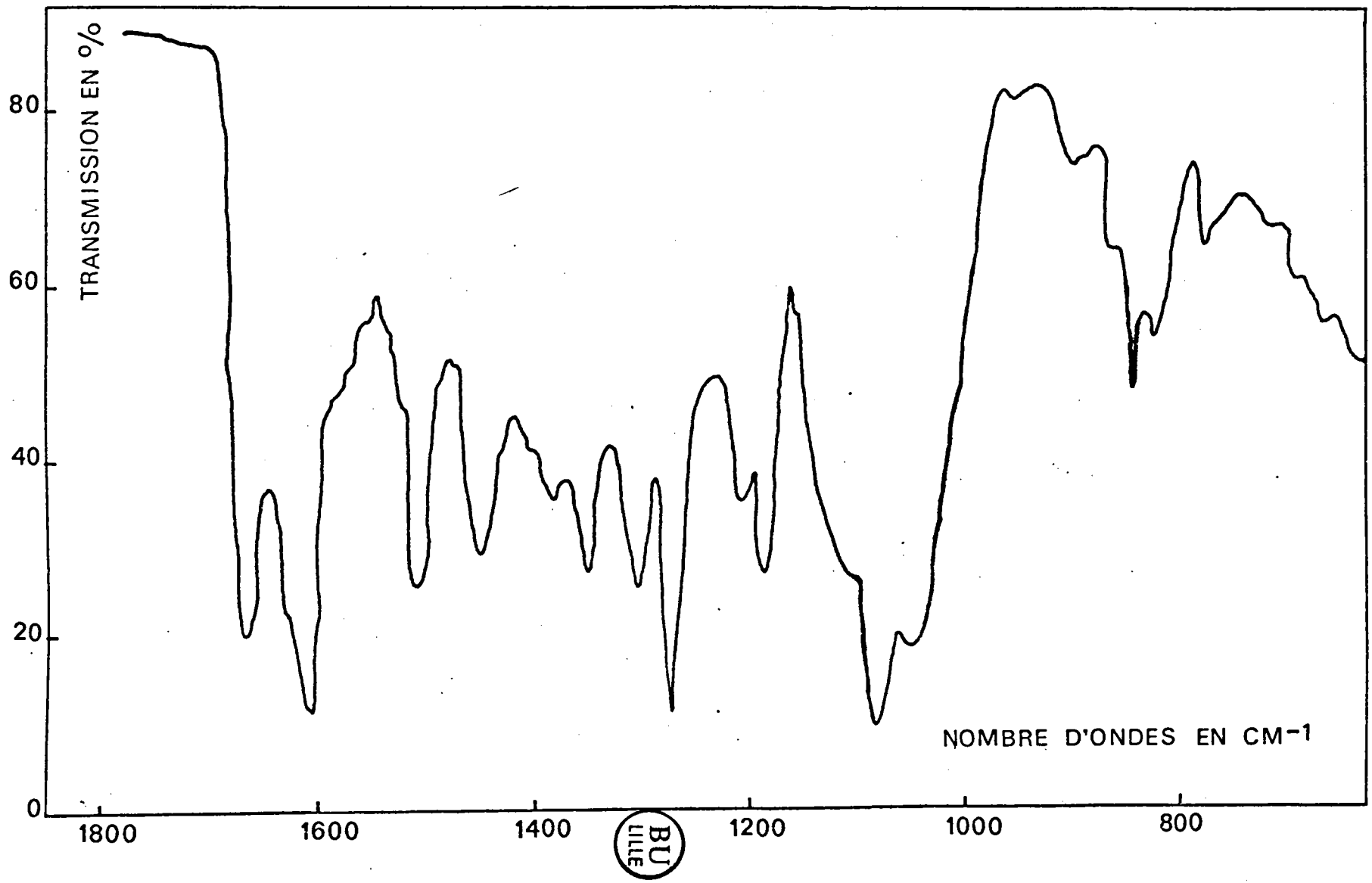
BU LILLE

Figure 9 . Spectres ultra-violets du Produit C (Glucolutéoloside), dans divers solvants.



BU LILLE

Figure 10 - Spectres ultra-violets du Produit C (Glucolutéoloside), dans divers solvants -



BU LILLE

Figure 11 - Spectre infra-rouge du Produit C (Glucolutéoloside) - 1,5 mg/100 mg de KBr.

Cette observation laisse, dès à présent, supposer que le produit C ne possède pas de groupements hydroxyles en position ortho, tels ceux que nous avons pu mettre en évidence, par le même procédé, dans le lutéolol et le lutéoloside.

2.4.4. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du produit C (§§) présente trois maximums (figure : 9) : à 345 nm (bande I), 272,5 nm et 242,5 nm (bande II) et trois minimums à 295 nm, 255 nm et 235 nm. Il est caractéristique d'une flavone.

D'ores et déjà, il est intéréssant de remarquer que les densités optiques correspondant aux pics d'absorption sont ici moins élevées que celles que nous avons observées pour une solution de lutéoloside, pourtant moins concentrée. L'absorption en lumière ultra-violette mesurée pour un dérivé flavonique étant due essentiellement au noyau benzo γ pyronique qu'il possède, on peut supposer que le produit C est un hétéroside, où l'aglycone entre pour une plus faible part que dans le lutéoloside.

2.4.5. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRA-ROUGE (Figure 11)

Le spectre d'absorption en lumière infra-rouge présente les caractéristiques suivantes :

(§§) En solution dans l'éthanol à 96°, à la concentration de 12,2 mg p. 1000 ml.

Bande à 3380^{cm-1}	: hydroxyles libres (sucres et phényle latéral)
Bande à 1668^{cm-1}	: carbonyle chélaté par un hydroxyle en 5, caractéristique des dihydroxy, 5-7 flavones
Bandes à 1595^{cm-1} et 1496^{cm-1}	: doubles liaisons conjuguées des noyaux aromatiques
Bandes à 1437^{cm-1}, 1370^{cm-1}, 1340^{cm-1} et 1270^{cm-1}	: hydroxyles phénoliques des dihydroxy, 5-7 flavones
Bande à 1260^{cm-1}	: groupement éther-oxyde
Bande à 1170^{cm-1}	: métasubstitution en 5-7
Bandes à 1090^{cm-1}, 1035^{cm-1}, 885^{cm-1}, 855^{cm-1}, 830^{cm-1}, 810^{cm-1}, 765^{cm-1}, 680^{cm-1} et 660^{cm-1}	: hydrogènes aromatiques isolés.

2.4.6. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Des chromatographies ascendantes, sur papier Arches 302, ont été effectuées dans différents solvants. Les valeurs des Rf calculées pour le produit C, consignées dans le tableau 6, sont en faveur d'une structure hétérosidique.

BU

SOLVANTS	VALEUR DES RF
Eau	0,04
Acide acétique à 15 %	0,10
Acide acétique à 30 %	0,22
Acide acétique à 60 %	0,51
Acide acétique-acide chlorhydrique-eau : 30-3-10 (v/v)	0,71
n-Butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v)	0,22
n-Butanol-acide acétique-eau : 6-1-2 (v/v)	0,18
n-Butanol-méthyléthylcétone-eau : 5-3-3 (v/v)	0,35
Acétate d'éthyle saturé d'eau	0

TABLEAU 6 : VALEURS DES RF CALCULES POUR LE PRODUIT C, APRES CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ARCHES 302, DANS DIFFERENTS SOLVANTS.

2.4.7. HYDROLYSE

2.4.7.1. HYDROLYSE ACIDE

380 mg de produit C porté à l'ébullition dans 50 ml de solution aqueuse à 3 % d'acide sulfurique pendant six heures, libère une aglycone insoluble dans l'eau, qui apparaît sous la forme d'un précipité jaune d'or foncé, et un sucre réducteur.

Aglycone :

Le précipité séparé, lavé à l'eau glacée jusqu'à élimination de l'acide, puis desséché à l'étuve à 110° C, a été pesé : 182 mg (soit 47,83 g pour 100 g de produit C).

Par chromatographie sur papier dans différents solvants et par son spectre d'absorption dans l'ultra-violet, cette aglycone a été identifiée au lutéolol.

Nous avons noté, par ailleurs, sur les chromatogrammes, la présence d'une tache de lutéoloside, fait sur lequel nous reviendrons (2-4-10-1).

Ose :

Le filtratneutralisé * réduit la liqueur de Fehling. Par chromatographie, nous avons identifié dans ce filtrat du glucose, qui a été dosé par la méthode de BERTRAND : 173,5 mg (soit 45,59 g pour 100 g de produit C).

* Par addition de carbonate de baryum et séparation du précipité de sulfate de baryum formé par filtration sur filtre sans cendres.

Le produit C est donc un glucoside du lutéolol. Si nous comparons les résultats de nos dosages d'aglycone et de glucose libérés par le produit C aux calculs théoriques établis pour des composés renfermant une, deux, trois molécules de glucose pour une de lutéolol, nous sommes amenée à lui attribuer la structure d'un diglucoside du lutéolol*:

	GLUCOSE %	LUTEOLOL %
PRODUIT C	45,59	47,83
LUTEOLOL + 1 Molécule de glucose (Lutéoloside)	40,18	63,84
LUTEOLOL + 2 Molécules de glucose	59,01	46,88
LUTEOLOL + 3 Molécules de glucose	69,94	37,04

BU LILLE

2.4.7.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Le produit C est hydrolysé par l'émulsine à 37° C. Il libère du glucose. Il a donc une structure β-glucidique.

* Les différences observées s'expliquent probablement par le caractère incomplet de l'hydrolyse du produit C.

2.4.8. ANALYSE ELEMENTAIRE

Les teneurs en carbone et en hydrogène du produit C, recristallisé puis séché à 105° C, confirment la structure de diglucoside du lutéolol que nous lui avons attribuée :

	CARBONE %	HYDROGENE %
PRODUIT C	50,25	5,19
	50,57	5,32
THEORIE POUR :		
LUTEOLOL + 2 glucose	53,11	4,91
LUTEOLOL + 2 glucose, 1 H_2O	51,59	5,09
LUTEOLOL + 2 glucose, 2 H_2O	50,15	5,26

BU LILLE

2.4.9 . DETERMINATION DE LA POSITION DES GLUCOSES

2.4.9 .1. HYDROLYSE ACIDE MENAGEE

PRINCIPE

Le produit C (50 mg) a été porté à l'ébullition en solution aqueuse d'acide sulfurique à 3 % (50 ml), pendant six heures. Des prélèvements (5 ml), échelonnés toutes les demi-heures pendant les trois premières heures, puis toutes les heures, ont permis de réaliser, après neutralisation, deux séries de chromatogrammes, afin d'identifier d'une part les flavonoïdes, d'autre part les oses au fur et à mesure de leur libération.

Résultats

Après une demi-heure d'hydrolyse, nous avons noté la présence de lutéoloside et d'une trace de lutéolol d'une part, de glucose d'autre part. La libération progressive du lutéoloside se poursuit, celles de lutéolol et de glucose s'intensifient. Après six heures, la solution renferme du lutéolol, souillé d'une petite quantité de lutéoloside, et du glucose.

Moins de deux heures après le début de l'hydrolyse, le produit C ne peut plus être caractérisé dans le milieu.

Conclusion

La libération de lutéoloside , lutéolol-7β glucoside, lors de l'hydrolyse du produit C, indique la présence en position 7 d'une molécule de glucose.

Deux hypothèses peuvent alors être retenues quant à la position de la deuxième molécule de glucose : elle peut se trouver soit combinée à un autre hydroxyle de l'aglycone (en position 5,3' ou 4'), soit fixée à la première par une liaison relativement plus labile que celle qui lie cette dernière à l'aglycone.

2.4.9.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Si les deux molécules de glucose du produit C sont fixées en position 7, il doit être possible, par hydrolyse enzymatique, de détacher et d'identifier un diglucoside.

Parmi les diglucosides mis en évidence dans les composés flavoniques, HARBORNE-1964 cite le gentiobiose (Glucose β 1-6 glucose) et le sophorose (Glucose β 1-2 glucose). Nous disposions de gentianose (trioside), sur lequel nous avons fait agir l'émulsine : il s'est dédoublé en fructose et en gentiobiose, qui lui-même a libéré progressivement du glucose. L'hydrolyse par l'émulsine du produit C, suivie périodiquement par chromatographie sur papier, a libéré du glucose. A aucun stade de la réaction, la moindre trace de gentiobiose n'a pu être mise en évidence.

Il semble donc peu probable que le produit C soit du lutéolol-7β glucose-glucose.

2.4. 9.3. SPECTRE D'ABSORPTION EN LUMIERE ULTRA-VIOLETTE

L'étude des modifications du spectre d'absorption en lumière ultra-violette sous l'influence de divers réactifs nous a donné de précieuses indications quant au degré de liberté des hydroxyles. Le tableau 7 et les figures 9 & 10 rapportent les positions des maximums d'absorption en fonction du solvant utilisé.

SOLVANT	PRODUIT C	
	BANDE II	BANDE I
Ethanol à 96°	242,5, 272,5	345
+ Chlorure d'aluminium	277,5, 297,5§	347,5, 385
+ Acétate de sodium	270	402,5
+ Acétate de sodium + Acide borique	230 270	345
+ Ethylate de sodium	255	408,5
Méthanol	238 267	338
+ Chlorure d'aluminium	262§, 275, 293§	351 385
+ Chlorure d'aluminium + Acide chlorhydrique	262§, 275, 293§	347 382

§ : Inflexion

BU LILLE

TABLEAU 7 : LONGUEURS D'ONDE, en nm, AUXQUELLES SE SITUENT LES MAXIMUMS D'ABSORPTION DU PRODUIT C, DANS DIVERS SOLVANTS.

- Le dédoublement accompagné d'un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta = 40$) en présence du chlorure d'aluminium indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

- En présence d'acétate de sodium, la bande II reste située à 270 nm ce qui dénote un hydroxyle combiné en position 7.

- La bande I, par contre, subit, comme sous l'action de l'éthylate de sodium, un déplacement bathochrome (Δ = 57,5), qui traduit la présence d'un hydroxyle libre en position 4'.

- Les actions conjuguées de l'acétate de sodium et de l'acide borique ne modifient pratiquement pas le spectre du produit C dans l'éthanol à 96°. Il ne possède donc pas d'hydroxyles libres en position ortho sur le cycle B.

- L'étude des modifications du spectre du produit C dans le méthanol, à la suite de l'addition de chlorure d'aluminium, puis d'acide chlorhydrique confirme l'absence d'hydroxyles libres en position ortho sur le cycle B : le spectre obtenu en présence à la fois de chlorure d'aluminium et d'acide chlorhydrique est pratiquement superposable à celui que l'on observe dans le méthanol pur (Figure 10).

L'hydroxyle en 3' du produit C n'est donc pas libre.

- La stabilité du spectre en présence d'éthylate de sodium dénote l'absence simultanée de deux hydroxyles libres en position 3 et 4'.

Il semble donc que le produit C, que nous avons proposé en 1961 d'appeler glucolutéoloside, serait un lutéolol - 7 β glucose - 3' β glucose.

2.4.10. DERIVE ACETYLE

2.4.10.1. PREPARATION

Nous avons utilisé la technique indiquée par Madame HAAG-1964, déjà employée pour la préparation du dérivé acétylé du lutéolol (chapitre I, 2.2. 9.1.).

143,5 mg de produit C ont conduit à 211,1 mg de dérivé acétylé (soit un rendement de 83,7 %), qui a été recristallisé dans l'éthanol à 60° et séché à 170° C.

2.4.10.2. PROPRIETES

- Point de fusion instantané : 218-219° C.

- Solubilité :

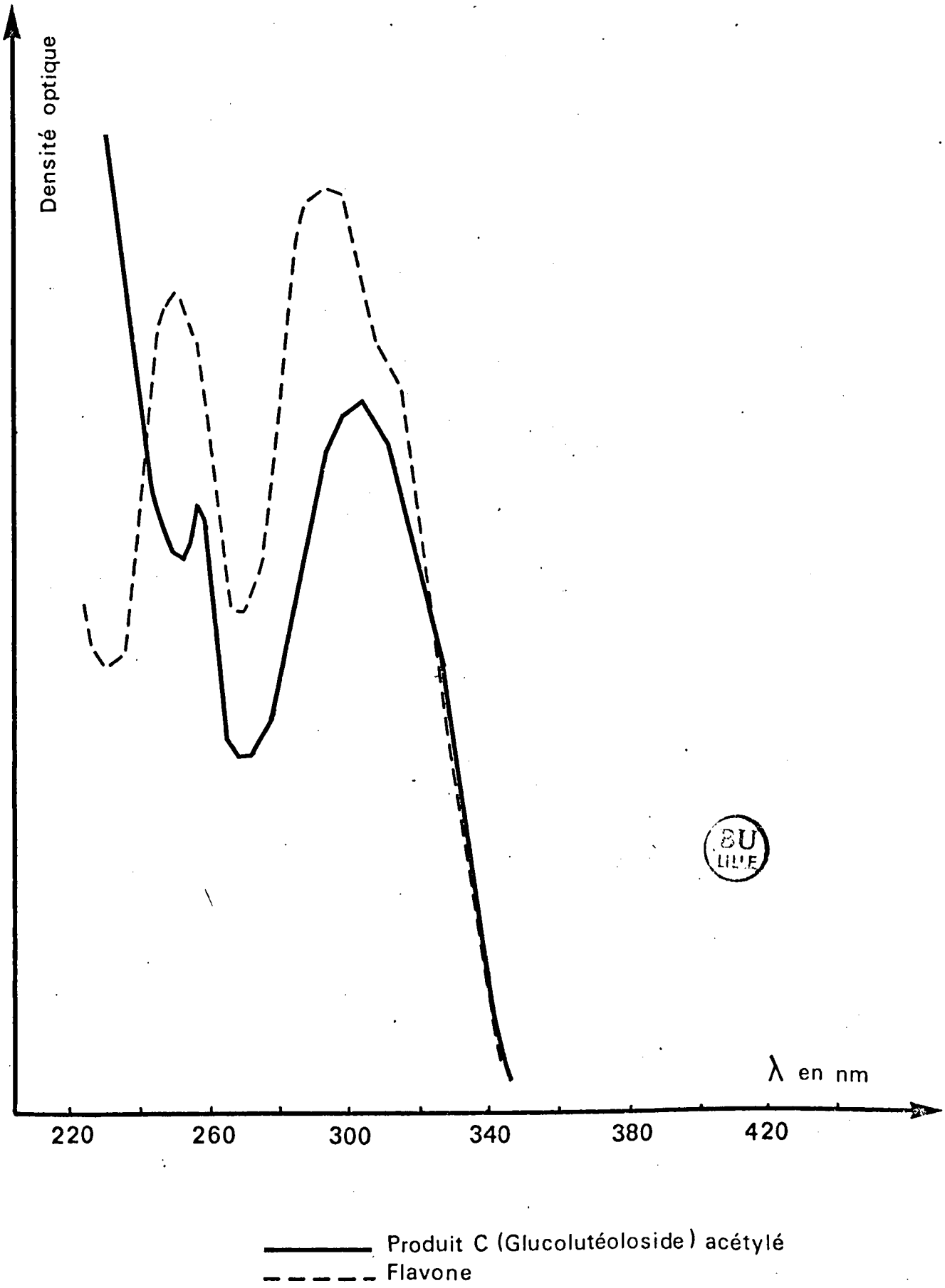
Le dérivé est peu soluble dans l'eau distillée à + 4° C ou l'éthanol fort, soluble dans l'éthanol à 60°, à chaud davantage qu'à froid.

- Réactions colorées :

Les observations faites à propos du dérivé acétylé du lutéolol sont vraies pour celui du glucolutéoloside (chapitre I, 2.2. 9.2.).

- Chromatographie sur papier :

Les Rf du dérivé acétylé dans le mélange de Partridge et dans l'acide acétique à 15 % sont respectivement de 0,87 et 0.



BU LILLE

Figure 12 - Spectres ultra-violets du Produit C (Glucolutéoloside) acétylé et de la Flavone, dans l'éthanol à 96°.

- Analyse élémentaire :

Les résultats de l'analyse élémentaire sont très proches des valeurs théoriques calculées pour le dérivé totalement acétylé du lutéolol - 7 glucose - 3' glucose :

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
PRODUIT C	54,63	4,86
THEORIE CALCULEE POUR LE DECACETATE DE LUTEOLOL - 7 glucose 3' glucose	54,75	4,85

BU Lille

Spectre d'absorption en lumière ultra-violette :

Dans l'éthanol à 96°, le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du dérivé acétylé du glucolutéoloside présente des maximums d'absorption aux mêmes longueurs d'onde = 304 nm et 257 nm que les dérivés acétylés de son aglycone, le lutéolol, du 7-monoglucoside de ce dernier, le lutéoloside, et que la flavone. Nous avons donc préparé le dérivé totalement acétylé du glucolutéoloside (Figure 12).

CONCLUSION

Nous avons isolé un nouvel hétéroside de flavonique, le glucolutéoloside, pour lequel nous proposons la structure suivante lutéolol 7 β glucose - 3' β glucose, structure non encore signalée à notre connaissance.

2.5. PRODUIT Y

Le produit Y cristallise en fines aiguilles jaune pâle.

2.5.1. POINT DE FUSION

Le point de fusion instantané du produit Y se situe à 247-248°C.

2.5.2. SOLUBILITES

Le produit Y est peu soluble dans l'eau à froid. A 100° C, il s'y dissout dans les proportions d'environ 0,035 %. Il est assez soluble dans l'éthanol de faible titre (éthanol à 50° : 0,6 % à froid, 2,2 % à l'ébullition) et très soluble dans l'éthanol à 96° et le méthanol tant à froid qu'à l'ébullition. Il est également très soluble dans la pyridine.

2.5.3. REACTIONS COLOREES

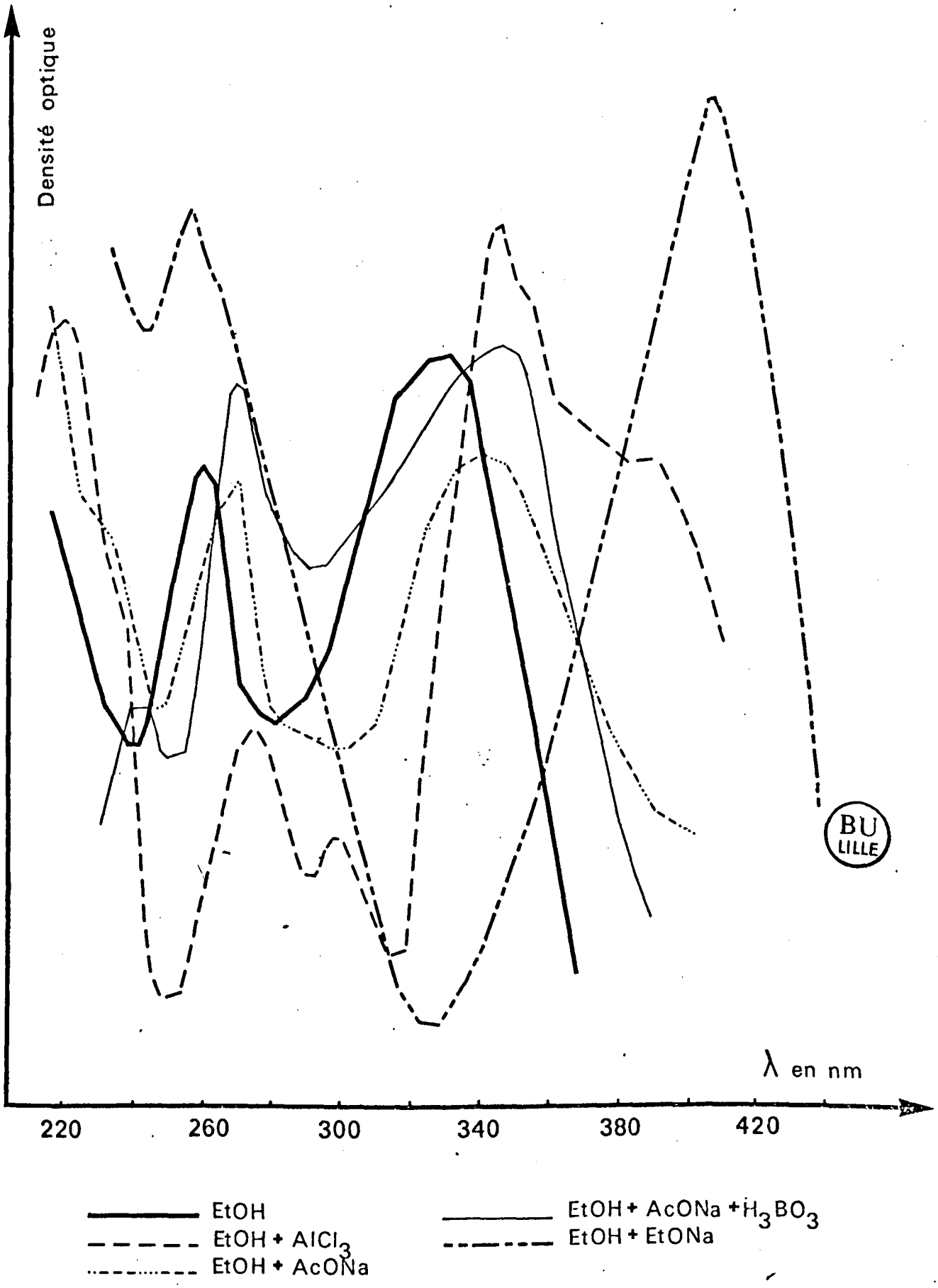
Une solution du produit Y se colore en jaune, par addition de soude, de potasse ou d'ammoniaque et en brun vert par addition de perchlorure de fer.

Le nitrate d'argent ammoniacal est réduit lentement à froid, rapidement à chaud.

La réaction "dite de la cyanidine" donne une coloration orangée, caractéristique des flavonoïdes.

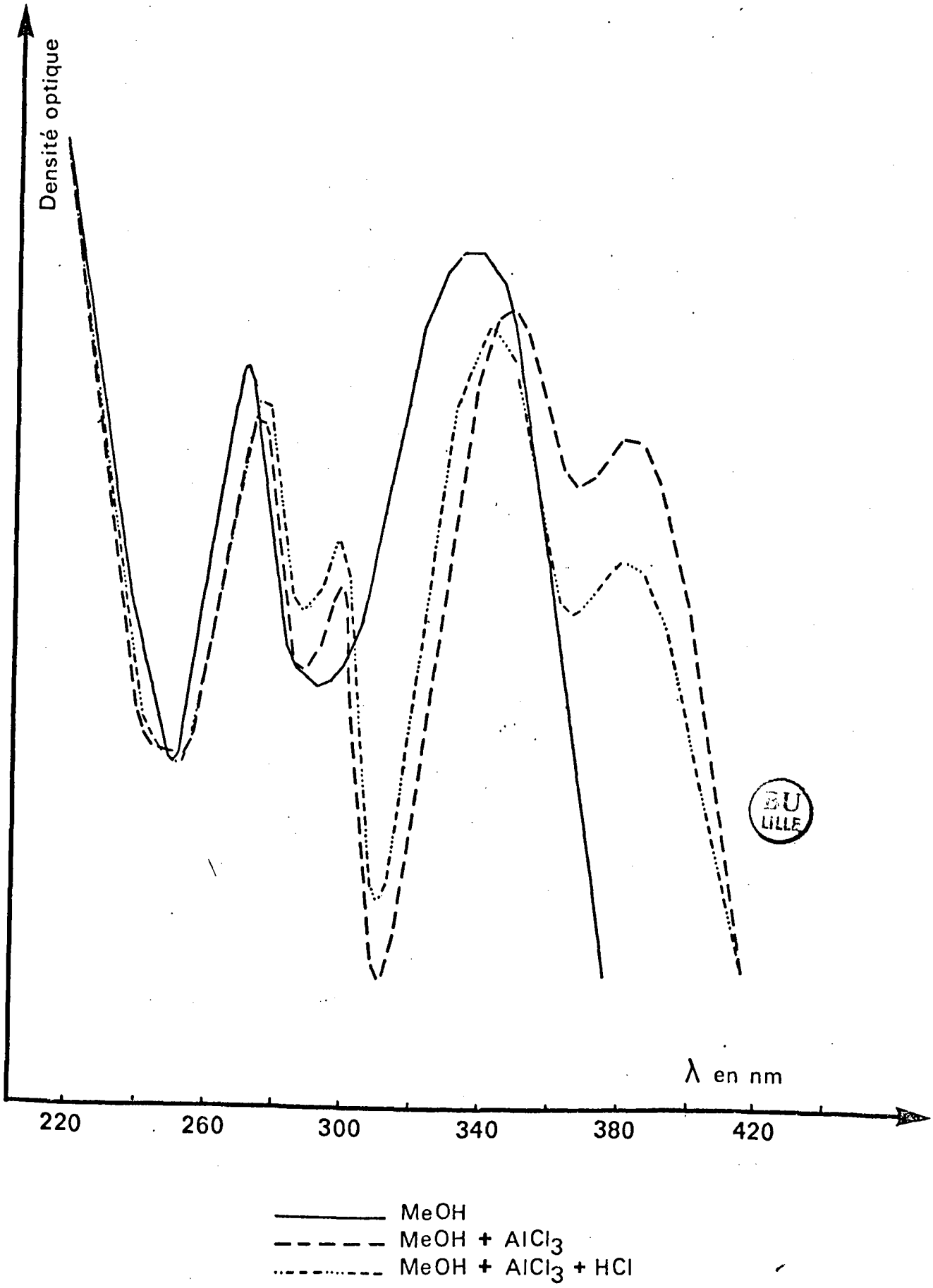
En lumière de Wood, le produit Y émet une fluorescence brun violet, qui vire au jaune brillant en présence de chlorure d'aluminium.

La réaction de NOMURA modifiée, appliquée à 2 mg du produit Y, a pour résultat une coloration jaune pâle du milieu, dans lequel apparaît un précipité blanchâtre. Après une heure, le milieu est devenu orangé. Un témoin sans dérivé Y se comporte de façon tout à fait comparable. Le produit Y paraît donc ne pas posséder de groupements hydroxyles en position ortho.



BU LILLE

Figure13 - Spectres ultra-violets du Produit Y (Apigénol,7-glucose), dans divers solvants.



BU LILLE

Figure 14 - Spectres ultra-violets du Produit Y (Apigénol, 7-glucose), dans divers solvants.

2.5.4- SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du produit Y * présente des maximums (bandes I et II) à des longueur d'onde caractéristiques du groupe des flavonoïdes (Figure 13). Il est comparable à celui de l'apigénol 5, 7, 4'-trihydroxyflavone :

	BANDE II (λ en nm)	BANDE I (λ en nm)
Produit Y	270	340
Apigénol	269 (JURD-1964)	336 -(JURD-1964)

2.5.5- CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons réalisé des chromatographies ascendantes sur papier Arches 302 dans différents solvants. Les valeurs des Rf, calculées pour le produit Y sont en faveur d'une structure hétérosidique (Tableau 8).

BU LILLE

SOLVANTS	VALEUR des Rf
Acide acétique à 5 %	0,06
Acide acétique à 15 %	0,15
Acide acétique à 60 %	0,72
Acide acétique-acide chlorhydrique-eau : 30-3-10 (v/v)	0,82
n-Butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v)	0,60
n-Butanol-acide acétique-eau : 6-2-1 (v/v)	0,59
n-Butanol-méthyléthylcétone-eau : 5-3-3 (v/v)	0,73
Benzène-acide acétique-eau : 125-72-3 (v/v)	0,79

TABLEAU 8 : VALEURS DES Rf CALCULES POUR LE PRODUIT Y EN CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE SUR PAPIER ARCHES 302, DANS DIFFERENTS SOLVANTS.

(*) En solution dans l'éthanol à 96°, à la concentration de 4,32 mg pour 1000 ml.

2.5.6. HYDROLYSE

2.5.6.1. HYDROLYSE ACIDE

Le produit Y, porté à l'ébullition en solution aqueuse à 3 % d'acide sulfurique pendant 4 heures, libère une aglycone (56,54 %), insoluble dans l'eau et un sucre réducteur (37,69 %).

Aglycone :

Son étude par chromatographie sur papier (Tableau 9) et par spectrophotométrie dans l'ultra-violet (Tableau 10- Figure 15) a fait apparaître son identité avec l'apigénol.

BU LILLE

SOLVANTS	VALEUR DES Rf	
	AGLYCONE DU PRODUIT Y	APIGENOL
Acide acétique à 60 %	0,63	0,63§
Acide acétique-acide chlorhydrique-eau : 30-1-3 (v/v)	0,73	0,72§ 0,83§§
n-Butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v)	0,88	0,85§ 0,89§§
n-Butanol-acide acétique-eau : 6-1-2 (v/v)	0,88	
n-Butanol-méthyléthylcétone-eau : 5-3-3 (v/v)	0,96	
Acétate d'éthyle saturé d'eau	0,94	
Benzène-acide acétique-eau : 125-72-3 (v/v)	0,33	0,33§§

§ TORCK-1970 ; §§ HARBORNE-1962

TABLEAU 9 : VALEURS DES RF, CALCULEES POUR L'AGLYCONE DU PRODUIT Y ET L'APIGENOL, APRES CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ARCHES 302, DANS DIFFERENTS SOLVANTS.

SOLVANT	AGLYCONE DU PRODUIT Y		APIGENOL	
	BANDE II	BANDE I	BANDE II	BANDE I
Ethanol à 96°	270	337,5	269* - 268***	336*, 334***, 338****
Ethanol à 96° + Chlorure d'aluminium	217,5-232,5§-277,5-300	345, 395	302 - 278****	381*, 382**, 382-342****
Ethanol à 96° + Acétate de sodium	277,5	305§-365	278* - 271****	350****
Ethanol à 96° + Acétate de sodium + Acide borique	240 - 271	341	269****	336* - 341****
Ethanol à 96° + Ethylate de sodium	230 - 279	335§-408	277****	397* - 404****

§ Inflexion : * HARBORNE-1967 ; *** JURD-1969 ;
** SKRZYPCZAKOWA-1968 ; **** TORCK-1970.

TABLEAU 10 : LONGUEURS D'ONDE, en nm, POUR LESQUELLES L'AGLYCONE DU PRODUIT Y PRESENTE DES MAXIMUMS D'ABSORPTION EN LUMIERE ULTRA-VIOLETTE, DANS DIVERS SOLVANTS.

Ose :

Dans le surnageant de l'hydrolysat, nous avons mis en évidence du glucose, par chromatographie sur papier.

2.5.6.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

10 mg de produit Y, sous l'action de l'émulsine, libère 5,40 mg d'aglycone et 3,6 mg de glucose. C'est donc un glucoside.

Les résultats des dosages des produits d'hydrolyse du produit Y (apigénol et glucose), lors de ces deux expériences, font apparaître ce dérivé comme un monoglucoside d'apigénol :

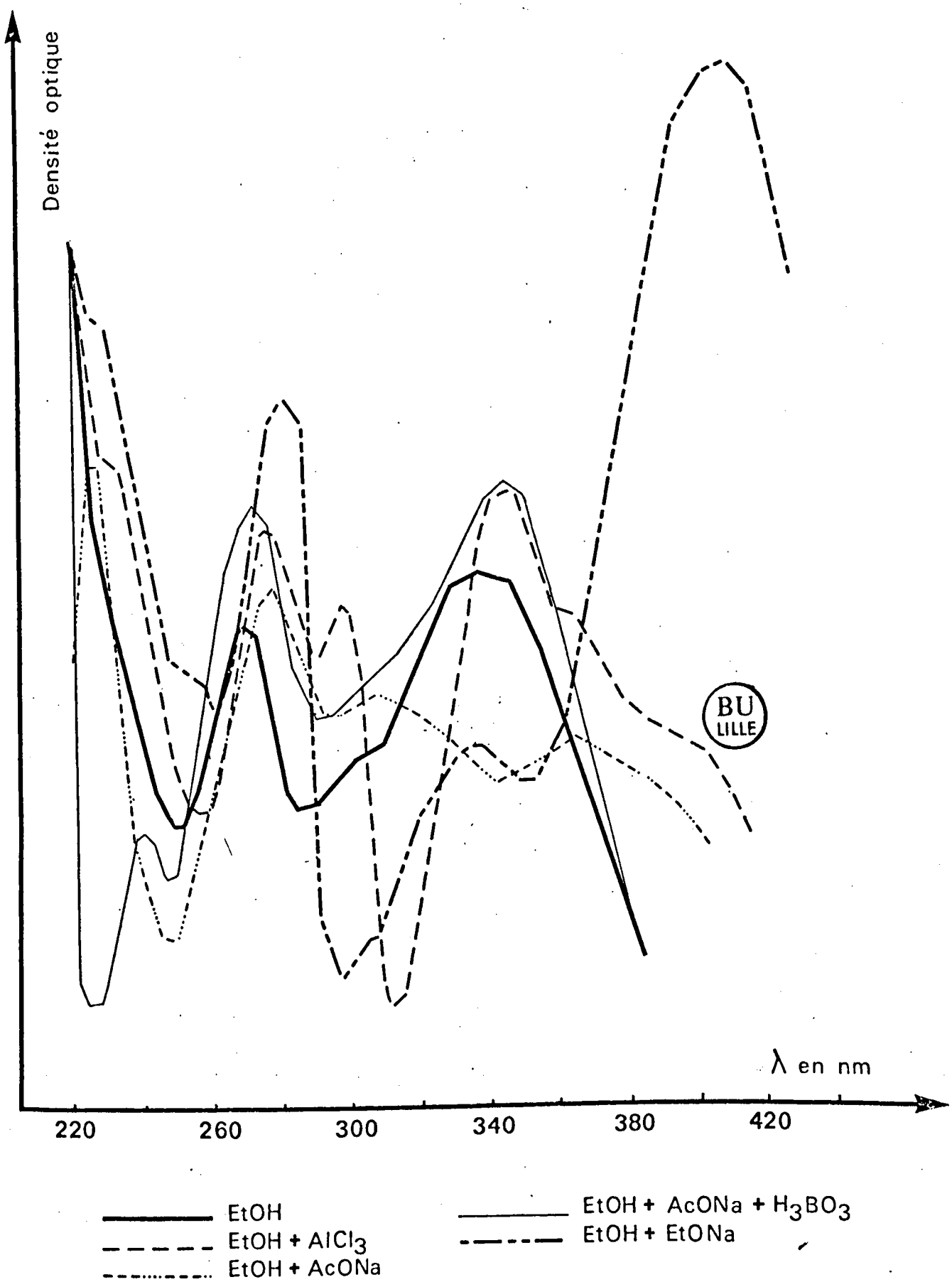
BU LILLE

	GLUCOSE %	APIGENOL %
PRODUIT Y	37,69 36	56,54 54
APIGENOL + 1 Molécule de glucose	41,66	62,5
APIGENOL + 2 Molécules de glucose	60,60	45,45

2.5.7. ANALYSE ELEMENTAIRE

Les teneurs en carbone et en hydrogène du produit Y, recristallisé puis séché à 105° C, confirment la structure de monoglucoside d'apigénol que nous lui avons attribuée.

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
PRODUIT Y	57,43 57,54	4,86 5,07
THEORIE CALCULEE POUR		
APIGENOL + 1 glucose	58,37	4,62
APIGENOL + 2 glucose	54,54	5,05



BU LILLE

Figure 15 - Spectres ultra-violets de l'aglycone du Produit Y (Apigénol), dans divers solvants.

2.5.8. DETERMINATION DE LA POSITION DU GLUCOSE

Les modifications du spectre d'absorption en lumière ultra-violette, sous l'influence de divers réactifs sont consignés dans le tableau 11. De leur examen (Figure 13), nous pouvons déduire que le produit Y possède :

- un hydroxyle libre en 5 : dédoublement et effet bathochrome, Δ = 50, de la bande I, sous l'action du chlorure d'aluminium,
- un hydroxyle libre en 4' : effet bathochrome sur la bande I, Δ = 10 et 69 , respectivement sous l'action de l'acétate et de l'éthylate de sodium,
- un hydroxyle combiné en 7 : la bande II ne change pas de position, sous l'effet de l'acétate de sodium,
- la stabilité du spectre en présence d'éthylate de sodium indique que le produit Y ne possède pas à la fois deux hydroxyles libres en 3 et 4',
- L'acétate de sodium et l'acide borique ne modifient en rien le spectre du produit Y dans l'éthanol à 96°,
- Le spectre du produit dans le méthanol ne se trouve pas sensiblement modifié par addition à la fois de chlorure d'aluminium et d'acide chlorhydrique (Figure 14).

Ces deux dernières observations traduisent l'absence de deux hydroxyles conjugués en position ortho sur le cycle B, fait non surprenant puisque l'apigénol est une 5-7-4' trihydroxy flavone.

Le produit Y se présente donc comme le 7-β monoglucoside de l'apigénol.

SOLVANT	PRODUIT Y	
	BANDE II	BANDE I
Ethanol à 96°	270	340
Ethanol à 96° + Chlorure d'aluminium	217,5 232,5 § 275 300	345 390
Ethanol à 96° + Acétate de sodium	272,5	350
Ethanol à 96° + Acétate de sodium + Acide borique	270	340
Ethanol à 96° + Ethylate de sodium	256 267 §	409
Méthanol	267	334
Méthanol + Chlorure d'aluminium	276, 298	346, 382
Méthanol + Chlorure d'aluminium + Acide chlorhydrique	276, 298	342, 382

§ : Inflexion

BU LILLE

TABLEAU 11 : LONGUEURS D'ONDE, en nm, POUR LESQUELLES LE PRODUIT Y PRESENTE DES MAXIMUMS D'ABSORPTION EN LUMIERE ULTRA-VIOLETTE, DANS DIVERS SOLVANTS.

2.5.9 - DERIVE ACETYLE

2.5.9.1- PREPARATION

Nous avons utilisé la technique indiquée par Madame HAAG-1964, déjà employée pour la préparation du dérivé acétylé du lutéolol (Chapitre I-2-2-9-1). 146,5 mg de produit Y ont conduit à 217,5 mg de dérivé acétylé, (soit un rendement de 93,46 %), qui a été recristallisé dans l'éthanol à 50°.

2.5.9.2- PROPRIETES

- Point de fusion instantané : 224-225° C.

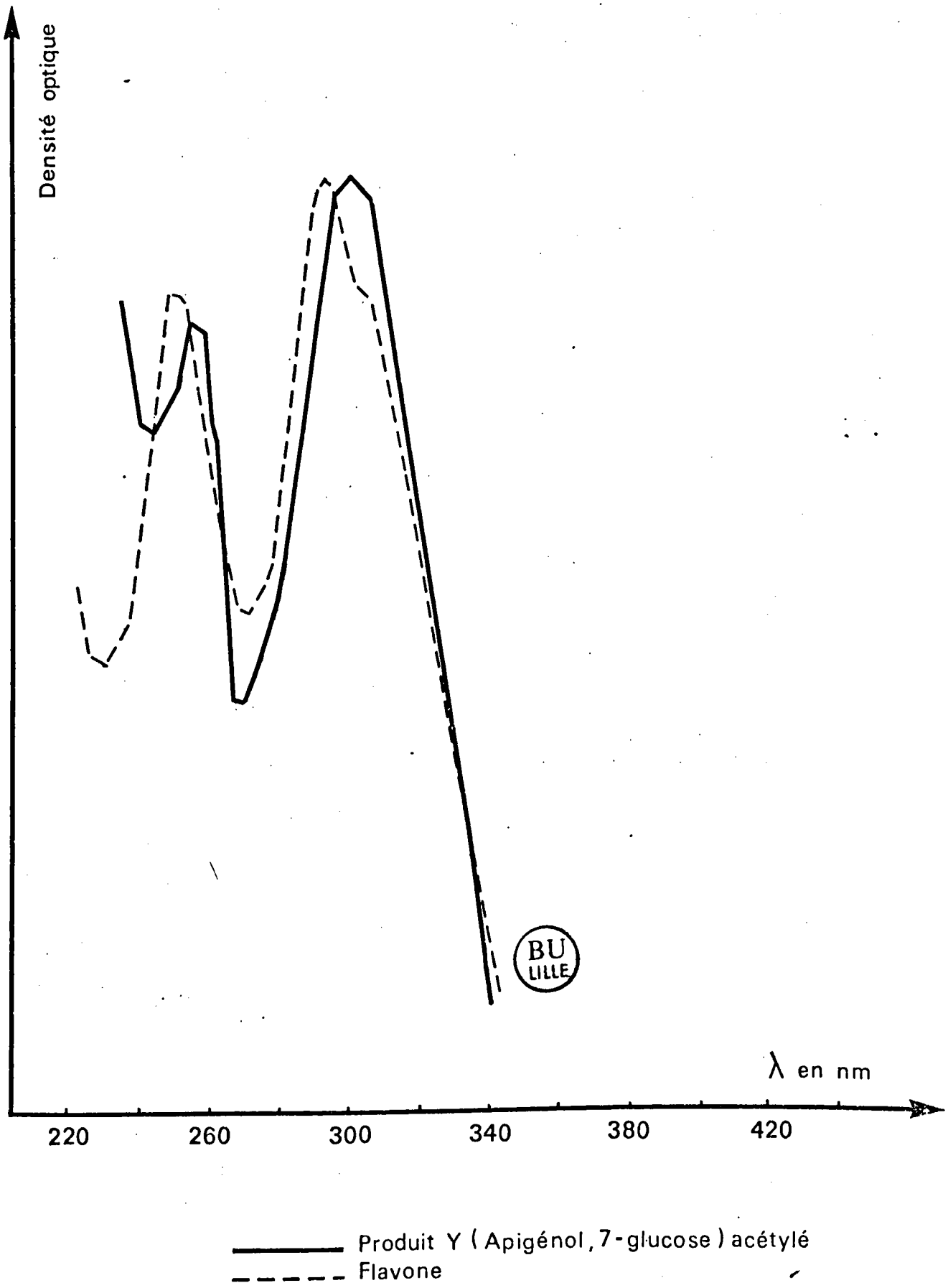
- Solubilités : le dérivé est peu soluble dans l'eau distillée à + 4° C ou l'éthanol fort, soluble dans l'éthanol à 50°, à chaud davantage qu'à froid.

- Réactions colorées : les observations faites à propos du dérivé acétylé du lutéolol (Chapitre I-2-2-9-2) sont vraies pour celui du produit Y.

- Analyse élémentaire : les résultats de l'analyse élémentaire sont très proches des valeurs théoriques calculées pour le dérivé totalement acétylé de l'apigénol -7 glucose :

BU

	TENEUR EN g POUR 100 g DE PRODUIT BRUT	
	CARBONE	HYDROGENE
Produit Y acétylé	57,43 57,54	4,86 5,07
Théorie calculée pour l'hexacétate d'apigénol	57,89	4,67



BU LILLE

Figure 16 - Spectres ultra-violets du Produit Y (Apigénol, 7-glucose) acétylé et de la Flavone, dans l'éthanol à 96°.

- Spectre d'absorption en lumière ultra-violette :

dans l'éthanol à 96°, le spectre d'absorption en lumière ultra-violette du dérivé acétylé du produit Y présente des maximums d'absorption aux mêmes longueurs d'onde : 304 nm et 257 nm, que la flavone (Figure : 16).

CONCLUSION

Le produit Y, que nous avons isolé de la Gaude, JACQUIN-DUBREUIL-1967- , est de l'apigénol-7 glucose. Les résultats que nous avons obtenus, comparés aux données de la littérature pour le cosmosiine, apigénol-7 glucose, (Tableau 12), isolée de Cosmos bipennatus par NAKAOKI en 1935, font apparaître l'identité de ces deux dérivés.

	PRODUIT Y	COSMOSIINE
Rf = acide acétique à 15 %	0,15	0,33-0,34 *** ; 0,28 *****
solvant de Partridge	0,60	0,54-0,56 *** ; 0,59 *****
n-butanol-acide acétique-eau : 6.1.2. (v/v)	0,59	0,60 *****
SPECTRE DANS L'ULTRA-VIOLET (λ max. en nm)		
Ethanol à 96°	270 ; 340	270;341** -269;340*** -268;333****
+ Chlorure d'aluminium	275,300;345,390	281,301 ; 347,386** - 277,298 ; 343,382*** 276,300 ; 348,386****
+ Acétate de sodium	272,5 ; 350	270;344** -270;343*** - 267;355;387****
+ Acétate de sodium + Acide borique	270 ; 340	268;340*** -267;340****
+ Ethylate de sodium	256,267 ; 409	270;403** -277;388*** -245,269,301 ; 386****

** CHALLICE et Coll.-1968- ; *** TORCK-1970- ; **** MABRY et Coll.-1970 ;
***** CHABANNES-1970-.

BU LILLE

TABLEAU 12 : TABLEAU COMPARATIF DES VALEURS OBTENUES POUR LE PRODUIT Y ET POUR LA COSMOSIINE.

2.6. PRODUIT X_1

Nous n'avons pas réussi à isoler le produit X_1 pur. Néanmoins, après hydrolyse d'un mélange de produit X_1 et de glucolutéoloside, en solution aqueuse à 3% dans l'acide sulfurique pendant cinq heures, nous avons caractérisé, par chromatographie, du lutéolol, provenant du glucolutéoloside, et de l'apigénol, qui ne peut dériver que du produit X_1.

D'autre part, l'analyse chromatographique des sucres du produit d'hydrolyse n'a permis de mettre en évidence que du glucose.

Le produit X_1 apparait donc comme un glucoside de l'apigénol. La valeur de son Rf dans le solvant de PARTRIDGE (0,26) laisse supposer qu'il s'agit d'un diglucoside.

3. DISTRIBUTION DES FLAVONOIDES DANS LES DIFFERENTS ORGANES DE LA GAUDE

3.1. Préparation du matériel végétal utilisé

La Gaude a été récoltée à deux époques de son développement : au moment de la floraison (début Juin) et lors de sa fructification (début Juillet), dans la population d'un même champ

Afin d'apprécier l'effet d'hydrolyse éventuel consécutif à la conservation de la plante par dessiccation, nous avons chaque fois réparti la récolte en deux lots ; l'un directement séché sous abri et à l'obscurité, l'autre soumis, dès la cueillette, à une "stabilisation" par la vapeur d'eau sous pression (huit minutes à 110° C), selon la technique de GORIS et ARNOULD -1907-, avant d'être séché.

Au terme de ces opérations, les divers organes : racines, tiges, fleurs, fruits et axes d'inflorescence des fleurs et des fruits des plantes constituant chaque lot ont été séparés et traités selon le procédé d'extraction rapporté ci-après.

3.2. Préparation des extraits

Un gramme de chacun des organes, préalablement pulvérisé, est épuisé à l'ébullition pendant une demi-heure par 25 ml d'éthanol à 60°. Après séparation de la colature par essorage, la poudre est traitée à nouveau dans les mêmes conditions : on obtient ainsi deux teintures que l'on ne mélange pas, la deuxième servant à vérifier que l'épuisement de la drogue a été réalisé totalement ou presque par le premier traitement.

3.3. Mise en évidence des flavonoïdes

Chaque extrait d'organe a été soumis aux tests des réactions colorées suivantes, plus ou moins spécifiques des dérivés flavoniques :

- coloration jaune intense de la teinture additionnée de quelques gouttes de soude, de potasse ou d'ammoniaque,
- coloration en brun rouge par addition de perchlorure de fer,
- réduction de la liqueur de Fehling,
- sur un papier filtre imprégné de liqueur et séché, formation d'un complexe jaune en présence de chlorure d'aluminium.

Afin d'apprécier comparativement la teneur en dérivés flavoniques des différents organes, nous avons effectué sur 5 ml de teinture la réaction dite de la cyanidine, suivant la technique rapportée ci-dessus (2.1.1.2.1.).

3.4. Analyse du contenu flavonique

A chaque extrait d'organe, nous avons appliqué la chromatographie descendante sur papier Arches 302 (§), à raison de

(§) Des essais comparatifs effectués avec les papiers Arches 301 et Arches 302 ont fait apparaître une meilleure séparation des dérivés flavoniques de la Gaude avec le deuxième.

20 µl de teinture par tache, comparativement au même volume de solution témoin à 1‰ de lutéolol ou de lutéoloside. La migration du solvant de Partridge = n-butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v) sur 43 cm dure de 16 à 18 heures pour des températures variant de 18 à 24° C.

Après séchage à l'air, les chromatogrammes sont révélés par la lumière de Wood, qui fait apparaître des fluorescences violettes ou brunes, virant au jaune brillant après pulvérisation d'une solution de chlorure d'aluminium à 5 % (p/v). En lumière visible, la pulvérisation d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium à 5 % (p/v) fait apparaître des taches jaunes.

3.5. Résultats

Les résultats consignés dans le tableau 13 entraînent les remarques suivantes :

- Tous les organes de la Gaude renferment des dérivés flavoniques : les fleurs sont les organes les plus riches. Les feuilles en contiennent également une quantité non négligeable, quoique un peu moindre. La teneur des fruits est inférieure à celle des feuilles, celle des tiges, relativement faible, quant aux racines, on n'en peut extraire que des traces.

	PLANTES EN FLEURS (début Juin)						PLANTES EN FRUITS (début Juillet)					
	Gluco-lutéo-loside	Lutéo-loside	Lutéolol	Produit Y	Produit X 1	Réaction de la cyanidine	Gluco-lutéo-loside	Lutéo-loside	Lutéolol	Produit Y	Produit X 1	Réaction de la cyanidine
Racines séchées	traces	±	0	traces	±	±	traces	±	0	traces	±	±
stabilisées	traces	±	0	traces	±	±	traces	±	0	traces	±	±
Tiges séchées	±	+ +	0	±	±	+ +	±	+ +	0	+	+	+ +
stabilisées	±	+ +	0	±	±	+ +	±	+ +		+	+	+ +
Feuilles séchées	+ +	+ + + +	+	+ + +	+ +	+ + + + +	+ ±	+ + + +	+	+ + ±	+ ±	+ + + + +
stabilisées	+ +	+ + + +	+	+ + +	+ +	+ + + + +	+ ±	+ + + +	+	+ + ±	+ ±	+ + + + +
Fleurs séchées	+ + +	+ + + + +	+ +	+ + +	+ +	+ + + + +	+ + + ◆	+ + + + + ◆	+ + + ◆	+ + + ◆	+ ± ◆	+ + + + + ◆
stabilisées	+ + +	+ + + + +	+	+ +	+ +	+ + + + +	+ + + ◆	+ + + + + ◆	+ + + ◆	+ + + ◆	+ ± ◆	+ + + + + ◆
Axes d'inflorescences en fleurs séchés	+	+ +	±	+	±	+ +	+ ◆	+ + ◆	± ◆	+ ◆	± ◆	+ + + ◆
stabilisés	+	+ +	±	+	±	+ +	+ ◆	+ + ◆	± ◆	+ ◆	± ◆	+ + ◆
Fruits séchés							+ +	+ + +	+ ±	+ + +	+ + +	+ + +
stabilisés							+ +	+ +	+ ±	+ + ±	+ +	+ + +
Axes d'inflorescences en fruits séchés							+	+ +	±	+	+	+ +
stabilisés							+	+	±	+	+	+ +

◆ Lors de la récolte du mois de Juillet, un certain nombre de plantes n'étaient pas complètement en fruits: l'extrémité de la grappe portait encore des fleurs ; nous avons séparé cette partie de l'inflorescence.

BU LILLE

Tableau 13 - Distribution des différents flavonoïdes de la Gaude, en fonction de ses organes.

- Quelque soit l'organe étudié, le lutéoloside constitue la majeure partie des dérivés flavoniques extraits.

Le lutéolol n'est caractérisé à l'état libre qu'en faibles proportions ; les racines et les tiges n'en renferment pas.

Le glucolutéoloside, les produits Y et X_1 représentent des quantités non négligeables de la masse flavonique totale extraite de chacun des organes de la Gaude, en particulier en ce qui concerne la substance Y.

-La dessiccation naturelle ne parait pas entraîner d'hydrolyse appréciable des hétérosides : les résultats obtenus pour les organes simplement séchés et pour ceux qui ont été préalablement stabilisés sont sensiblement identiques. (§).

4. LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES FLAVONOIDES

La présence de dérivés flavoniques dans tous les organes de la Gaude nous a incitée à tenter de préciser leur localisation histologique. Deux types de techniques peuvent être envisagées. Les unes consistent à séparer mécaniquement les tissus différents avant d'en faire les analyses chimiques TRONCHET-1967-TISSUT-1969-. Ces procédés requièrent un matériel végétal qui se prête, grâce à sa rigidité et à sa forme, au prélèvement des diverses fractions tissulaires, auxquelles néanmoins une faible épaisseur du tissu adjacent se trouve toujours mêlée.

A la suite de DELAVEAU-1968- et de GUERIN, DELAVEAU et PARIS-1971-, nous avons préféré faire appel à l'observation microscopique en lumière ultra-violette de coupes histologiques.

(§) Tout au moins dans les conditions dans lesquelles nous avons opéré, quelques heures ayant pu s'écouler entre la cueillette des plantes dans la campagne et leur"stabilisation"en laboratoire.

4.1. Coupes anatomiques

Les premières coupes que nous avons réalisées au microtome à congélation avaient pour épaisseur 30/u. Elles se sont avérées trop minces, les cellules apparaissant vidées de leur contenu. Nous avons choisi d'exécuter les coupes à main levée.

4.2. Coloration

La fluorescence brun violet propre aux dérivés flavoniques de la Gaude en lumière de Wood ne peut être décelée sur les coupes histologiques simplement montées dans du glycérol dilué.

Dans ces conditions, on observe seulement une fluorescence vert cru due aux parois cellulaires côtoyant une fluorescence rouge due à la chlorophylle présente dans les parenchymes corticaux et foliaires, ainsi que dans les rayons cibro-vasculaires.

Le chlorure d'aluminium fait virer au jaune brillant la fluorescence des dérivés flavoniques, les rendant plus facilement et plus sélectivement décelables.

Nos premiers essais avec une solution à 5 % dans l'éthanol à 90° ont mis en évidence une diffusion très rapide des produits colorés hors des cellules, rendant l'analyse des coupes extrêmement difficile. La grande solubilité des flavones dans l'alcool explique probablemement ce fait. Nous avons donc utilisé une solution aqueuse de chlorure d'aluminium à 5 %, dans laquelle les coupes sont plongées un court instant, avant d'être

rapidement montées dans du glycérol dilué dans l'eau. Nous avons en effet noté que la présence du glycérol rend la fluorescence beaucoup plus brillante que l'emploi de l'eau seule.

4.3. Observation microscopique

Microscope Leitz équipé pour la fluorescence.
Filtre d'excitation : B. G. 12.
Filtre d'arrêt : 530.
Grossissements : x 40, x 100, x 250.

4.4. Interprétations

Des coupes transversales et longitudinales ont été réalisées dans les différents organes de la Gaude, à des moments successifs de son développement : avant l'apparition des fleurs, pendant la floraison et pendant la fructification (Photos 2 à 6).

Nous avons observé que :

4.4.1- La fluorescence jaune vif caractéristique des dérivés flavoniques se situe au niveau du contenu cellulaire.

4.4.2- Les cellules qui présentent cette fluorescence appartiennent à des tissus bien précis

- épidermes des tiges, des feuilles, des pétales et du péricarpe
- endoderme des feuilles

Photographie 2 -(x100)

Photographie 3 -(x250)

Photographies 2 et 3 : Mise en évidence par fluorescence des flavonoïdes dans la moëlle de tige de Gaude.

En 2 : coupe transversale

En 3 : coupe longitudinale

BU LILLE

Photographie 5 -(x250)

Photographie 4 -(x40)

Photographies 4,5 et 6 : Mise en évidence par fluorescence de flavonoïdes dans l'épiderme (4 et 5) et l'endoderme (4 et 6) de la feuille de Gaude

Photographie 6 -(x100)

- zone externe du parenchyme médullaire des tiges (§).

4.4.3- La présence de dérivés flavoniques dans les tissus internes que sont l'endoderme de la feuille et le parenchyme médullaire de la tige de Gaude, fait constaté également chez d'autres plantes par GUERIN et Coll.-1971-, ne peut justifier le rôle d'écran sélectif qu'on leur attribue parfois. TRONCHET-1967-. Quel rôle jouent-ils donc ici ?

4.4.4- La teneur en flavonoïdes d'un même organe à différentes périodes du développement de la plante ne semble pas varier. En fait, elle est difficile à estimer avec précision : l'oeil ne mesure guère l'intensité de la fluorescence. De plus un nombre non contrôlé de cellules renfermant des dérivés flavoniques sont détruites lors de la confection des coupes.

Néanmoins, la localisation histochimique des dérivés flavoniques explique la richesse relative des feuilles et des fleurs, dont les épidermes représentent une proportion importante de l'ensemble des tissus.

(§) Les plages fluorescentes qui apparaissent au niveau des parenchymes sous épidermiques dans les feuilles semblent dues à une certaine diffusion à partir des cellules de l'épiderme.

L'absence de toute trace de fluorescence jaune vif sur les coupes de racine s'explique probablement par la faible teneur de ces organes en dérivés flavoniques.

C H A P I T R E

II

DOSAGE DES PRINCIPAUX FLAVONOIDES DE LA GAUDE.

La chromatographie sur papier nous a permis de mettre en évidence une très inégale répartition des composés flavoniques dans les divers organes de la Gaude (Tableau 13).

Aussi, avons-nous cherché à vérifier cette observation en la précisant par des données quantitatives, afin de suivre l'évolution respective de chacun des flavonoïdes dans les divers organes de la plante : racines, tiges, feuilles et inflorescences. Pour cela il était nécessaire de posséder une technique de dosage précise, suffisamment simple pour pouvoir s'appliquer en série aux extraits complexes que l'on peut facilement préparer par épuisement de la plante par un solvant convenablement choisi.

Nous exposerons dans ce chapitre, la mise au point de cette technique et les résultats obtenus.

1. DIVERSES METHODES DE DOSAGE DES FLAVONOIDES COURAMMENT EMPLOYEES

Les dérivés flavoniques sont dosés par des procédés très variés.

Les uns utilisent certaines propriétés physiques des flavonoïdes : fluorescence naturelle dans des techniques fluorométriques-SHOSTAKOVSKII et Coll.-1962-, absorption de la lumière à des longueurs d'onde caractéristiques dans des techniques spectrophotométriques-PORTER et Coll.-1947- .

La présence de fonctions phénoliques dans la structure des composés flavoniques permet d'autre part un certain nombre de réactions chimiques-DELAVEAU et Coll.-1966- qui conduisent à la formation de dérivés colorés se prêtant à des mesures colorimétriques. Les chélates obtenus avec des sels d'aluminium sont les plus fréquemment utilisés.

On a également recours aux propriétés réductrices des flavonoïdes vis-à-vis de solutions de phosphomolybdate et de tungstate de sodium-TANGUY et Coll.-1969- ou de ferricyanure ferrique-MICHAUD et Coll.-1966- . On mesure alors l'intensité des colorations bleues que communiquent aux solutions ces dérivés sous leurs formes réduites.

Tous ces procédés de dosage sont largement utilisés par les différents auteurs. Il faut remarquer néanmoins que, selon les conditions de leur emploi, les informations qu'ils apportent sont plus ou moins complètes : si on les applique à des extraits végétaux simplement purifiés, qui sont, à de rares exceptions près-MC CLURE et Coll.-1970-,des mélanges de flavonoïdes, on procède seulement à une évaluation globale du contenu flavonique du matériel étudié-DELAVEAU-1967,PARIS et Coll.-1968, TANGUY et Coll.-1969,TISSUT-1969,DURET et Coll.-1970, LIPFERT et Coll.1970. Dans le cas particulier où une aglycone et un de ses hétérosides sont les seuls composés flavoniques de la solution à doser, on peut indiquer leurs teneurs respectives en comparant les résultats obtenus avant et après hydrolyse-PISLARASU et Coll. -1969-.

Dans tous les autres cas, l'estimation singulière d'un ou de plusieurs flavonoïdes présents dans le matériel étudié doit

être précédée d'une séparation de ceux-ci. A ces fins les techniques chromatographiques, tant sur papier que sur couche mince ont été abondamment utilisées. Il s'agit ensuite d'appliquer aux différents composés isolés l'un des procédés de dosage rapportés ci-dessus.

On peut alors choisir entre deux types de techniques : la première consiste à d'abord séparer chaque substance isolée du support sur lequel elle est adsorbée-SWIFT-1967-, BOURZEIX et Coll.-1967-, MAKHSUDOVA et Coll.-1968, TYUKAVKINA-1969, LARSON -1969, HARPER et Coll.-1969, POETHKE-1969, MÜLLER et Coll.-1970. La deuxième se borne à évaluer directement sur les chromatogrammes la concentration de chaque tache séparée, sans élution préalable. Le procédé le plus simple est alors celui qui fait appel à l'appréciation visuelle des taches qui se dessinent sur les chromatogrammes-CLAIR et Coll.-1964-, PARIS et Coll.-1968-; le plus souvent on rapporte la surface mesurée pour la tache formée par la substance à doser à celles que l'on a calculées pour une gamme étalon, établie à l'aide d'une solution témoin. On obtient ainsi une première estimation de la concentration de la solution étudiée en ses différents constituants-BONDIVENNE et Coll.-1970-. La précision des résultats est limitée du fait que cette technique ne tient pas compte de l'intensité de la coloration ou de la fluorescence des taches. Un procédé plus précis utilise la photodensitométrie qui a l'avantage de permettre la mesure de l'intensité lumineuse réfléchie ou transmise par les taches du chromatogramme.

2. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE

Il nous est apparu que, quelle que soit la méthode choisie, la mise au point d'une technique de dosage des flavonoïdes de la Gaude devait comporter deux étapes :

- des essais sur des solutions connues de produits purs,
- l'application de la technique établie aux extraits de la plante.

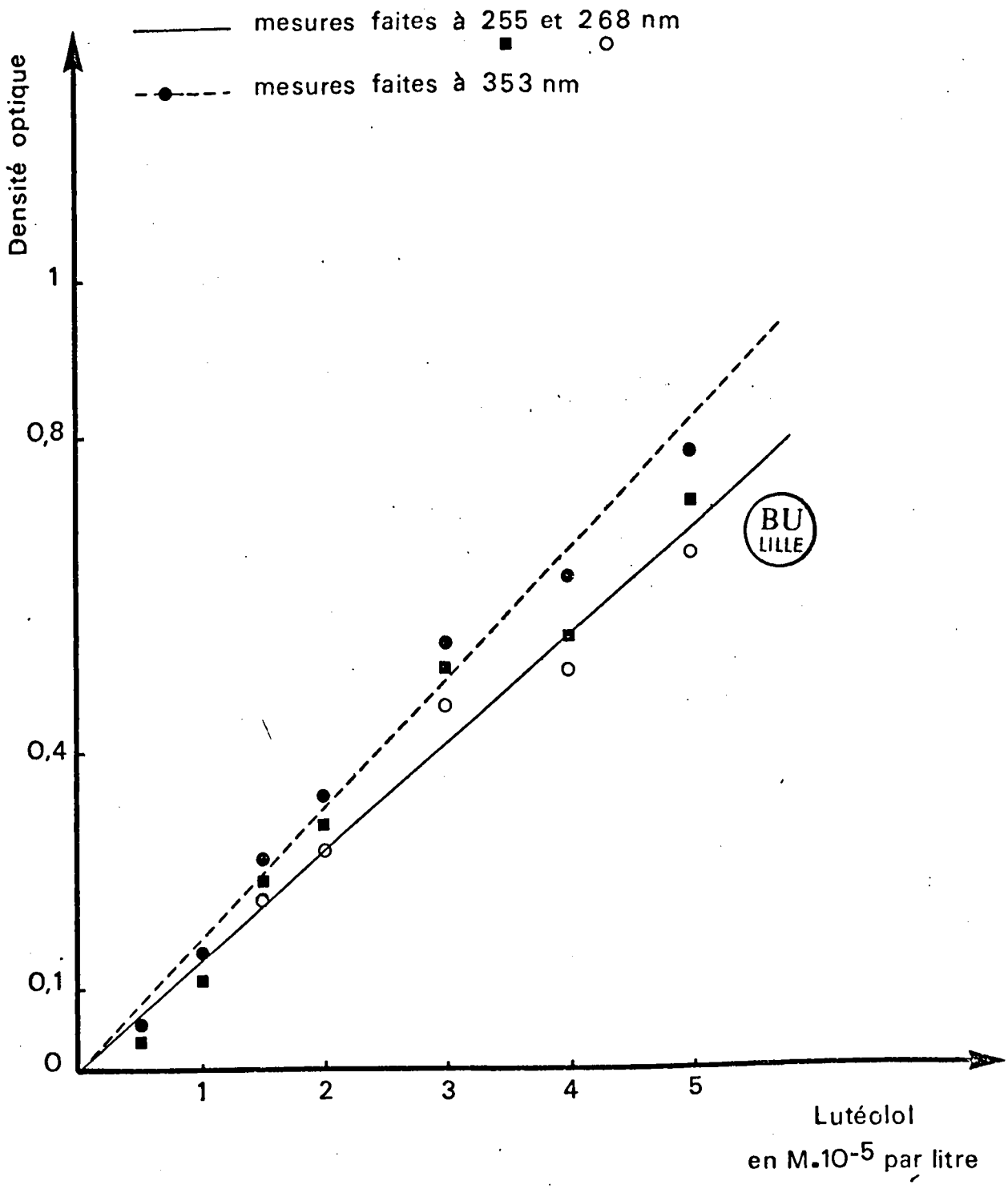
2.1. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE FLAVONOIDES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUIVIE D'ELUTION

Notre intention de doser chacun des flavonoïdes présents dans les extraits de Gaude rendant nécessaire leur séparation préalable, nous avons d'abord envisagé de faire appel à la chromatographie, suivie de l'élution des produits séparés, puis du dosage spectrophotométrique direct de chacun des éluats, le résultat étant rapporté à une courbe étalon établie à l'aide d'une solution de titre connu du flavonoïde correspondant.

Des solutions connues de chacun des flavonoïdes purs isolés de la Gaude ont été utilisées pour les essais de mise au point d'une telle technique de dosage.

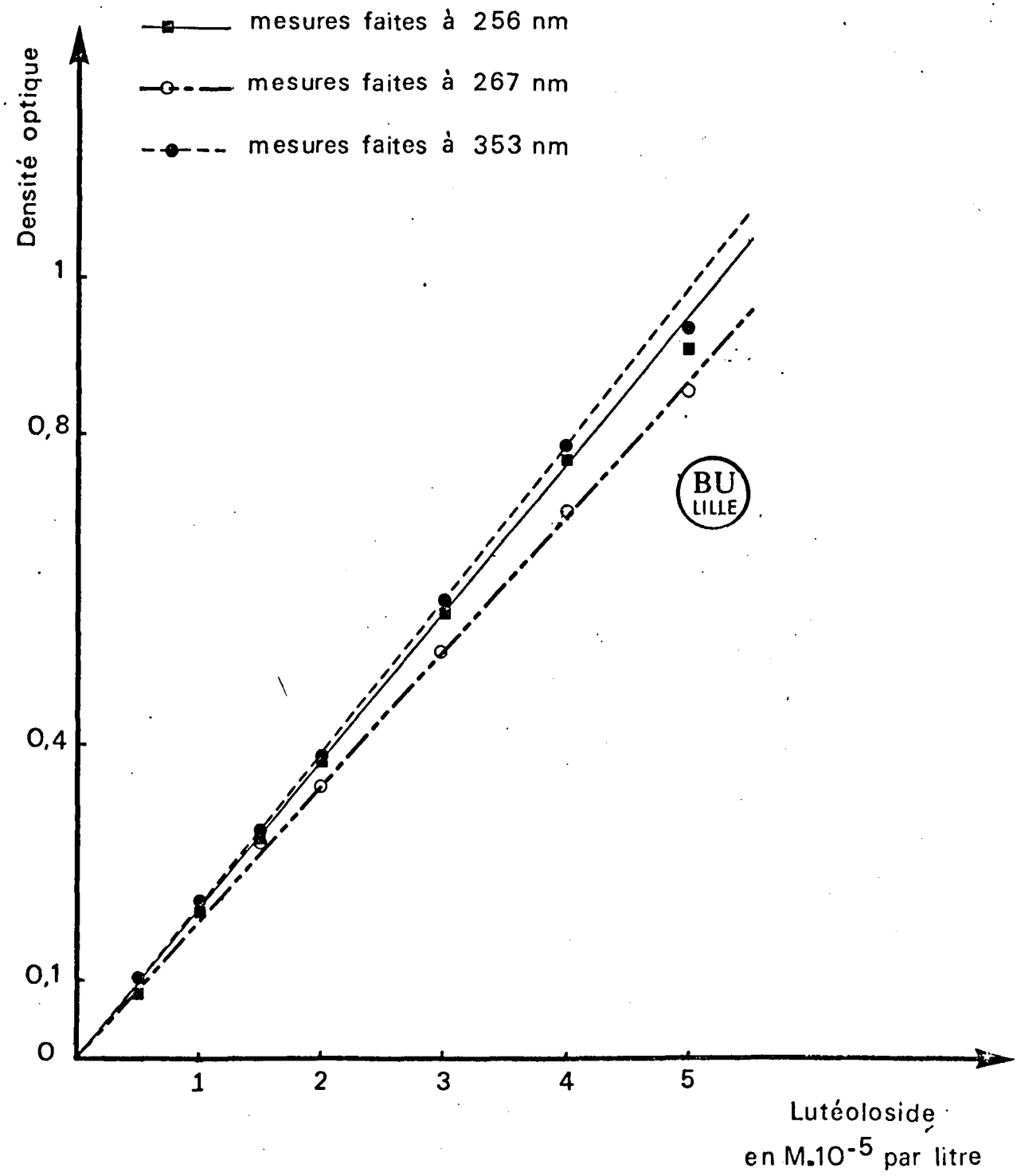
2.1.1- Préparation des solutions

Une solution-mère de chacun des flavonoïdes purs isolés de la Gaude a été faite dans l'éthanol à 96° à la concentration de 2 M 10^{-3} p. 1000ml, sauf pour le glucolutéoloside, dont la faible



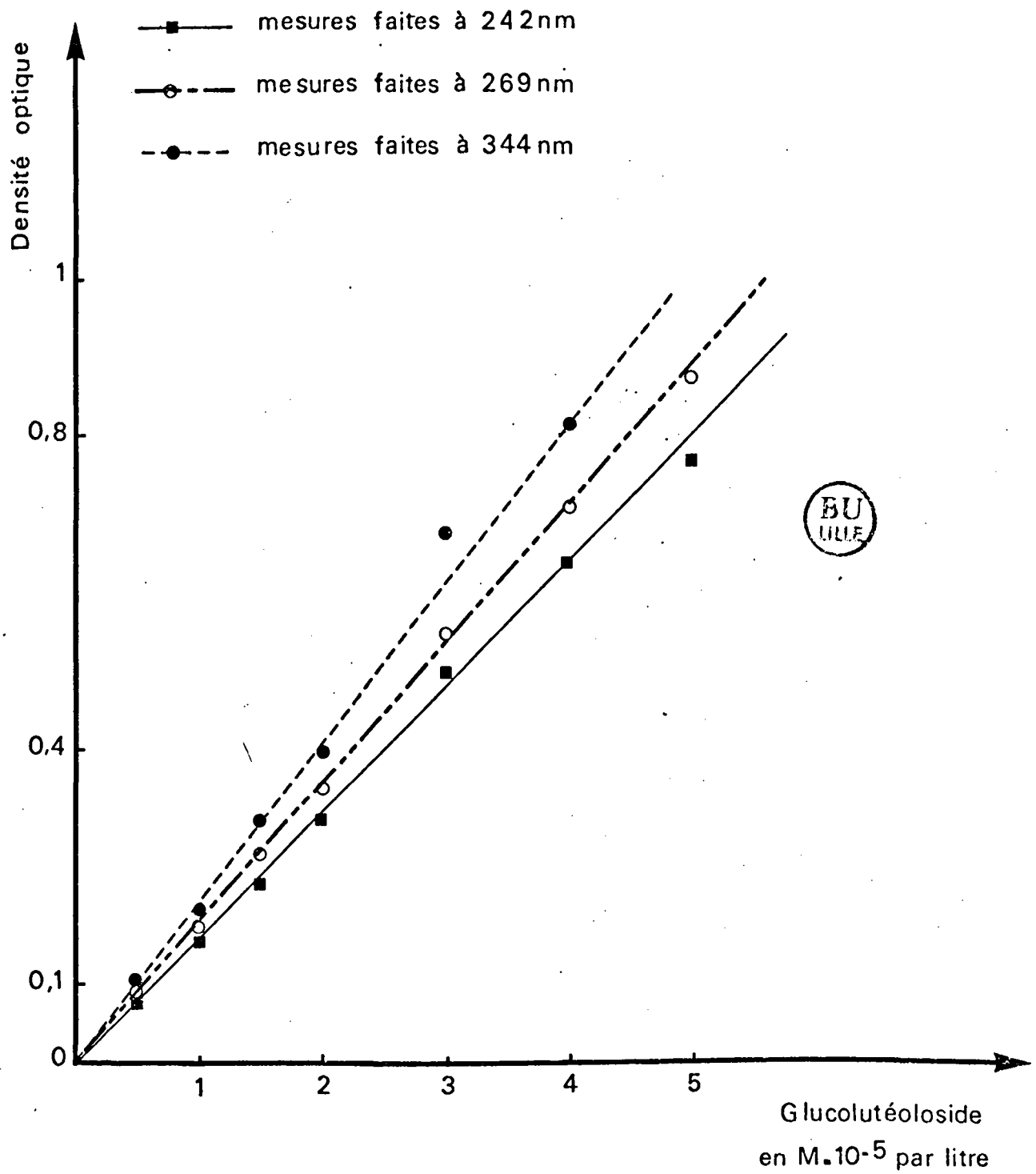
BU LILLE

Figure 17. Courbes d'étalonnage pour le Lutéolol.



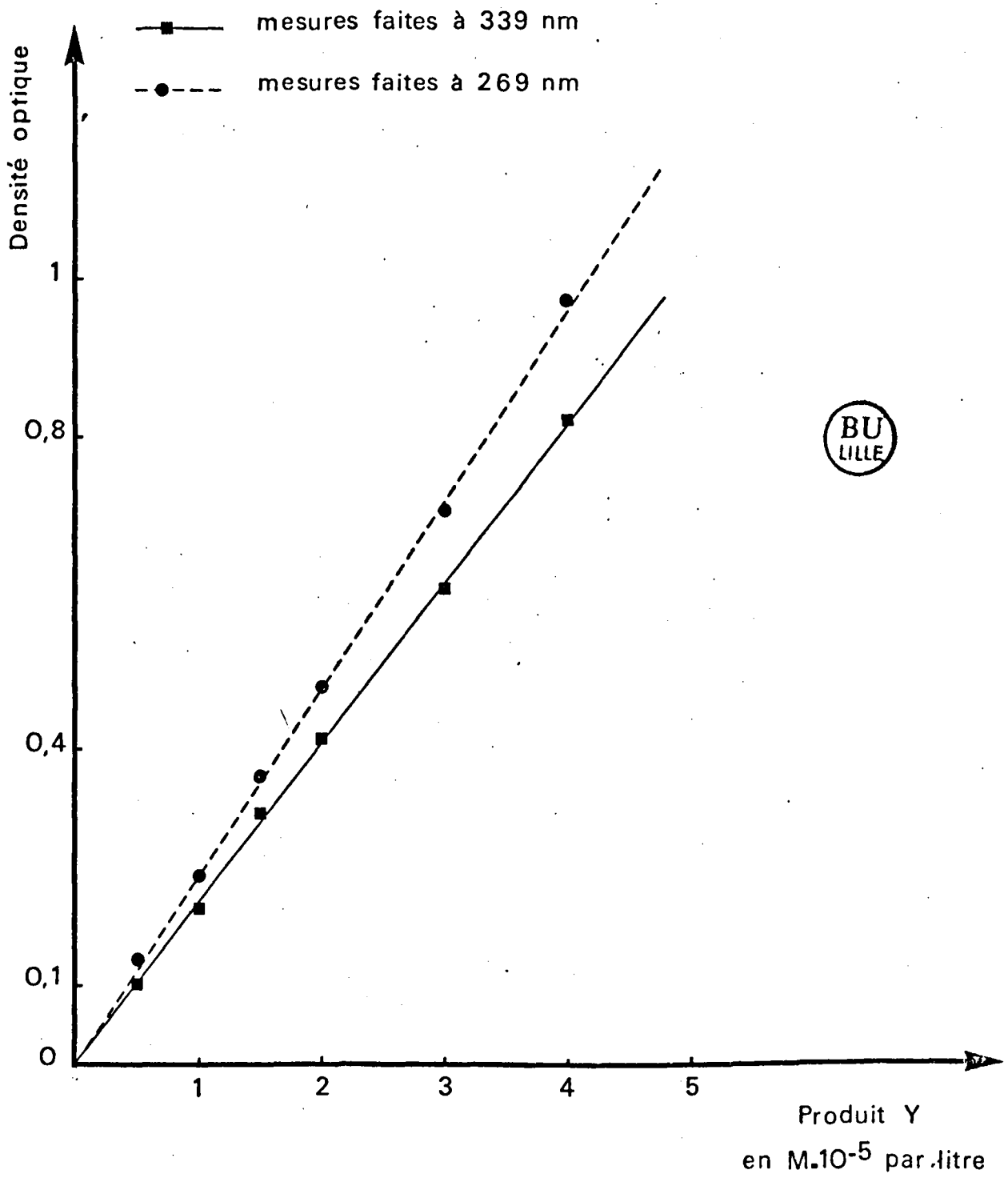
BU LILLE

Figure 18 . Courbes d'étalonnage pour le Lutéoloside.



BU LILLE

Figure 19 . Courbes d étalonnage pour le Glucolutéoloside.



BU LILLE

Figure 20. Courbes d'étalonnage pour le Produit Y.

solubilité dans les alcools forts n'autorise pas une concentration supérieure à $M.10^{-3}$ p.1000 ml.

Au moment de l'emploi, des dilutions dans l'éthanol à 96° ont été faites de telle sorte que leurs concentrations soient de 0,5-1-1,5-2-3-4 et 5 $M.10^{-5}$ p.1000 ml.

2.1.2- Mesures spectrophotométriques

Les mesures ont été faites directement sur les solutions fraîchement préparées, avec un spectrophotomètre JOBIN-YVON type MAROC, dans des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur, aux longueurs d'onde correspondant aux maximums d'absorption de chacun des flavonoïdes dosés : 255 nm, 268 nm et 353 nm pour le lutéolol, 256 nm, 267 nm et 353 nm pour le lutéoloside, 242 nm, 270 nm et 344 nm pour le glucolutéoloside et 269 nm et 339 nm pour le produit Y. L'éthanol à 96° a servi de solvant de référence.

2.1.3- Courbes-étalons

Pour chacun des flavonoïdes, plusieurs mesures, faites aux différentes longueurs d'onde choisies, sur des dilutions préparées successivement, ont permis de tracer des courbes d'étalonnage : en ordonnées, nous avons porté les densités optiques, en abcisses, les concentrations en flavonoïdes. (Figures 17 à 20).

2.1.4- Dosage de solutions connues de flavonoïdes purs, après chromatographie et élution.

Il était indispensable que les solutions de flavonoïdes purs, comme les extraits de Gaude pour lesquels elles devaient servir de référence, soient dosées après chromatographie puis élution, le résultat, rapporté à la courbe d'étalonnage, permettant d'ailleurs de mesurer le pourcentage de récupération du

flavonoïde.

2.1.4.1- Chromatographie sur papier

Séparation chromatographique : l'analyse chromatographique de l'extrait de Gaude, sur papier Arches 302 avec le solvant de PARTRIDGE, conduisait à des séparations satisfaisantes des divers flavonoïdes. Nous avons donc appliqué cette technique aux solutions de flavonoïdes purs: sur une ligne de départ située à 8 cm du bord d'une feuille de papier Arches 302, tous les 3 cm, nous avons fait à l'aide d'une micropipette de précision, une tache($\emptyset \leqslant 0,5$ cm) avec 25-50-75-100 (§)-150-200 ou 250 µl de la solution-mère de lutéolol, de lutéoloside ou de produit Y. La solution-mère de glucolutéoloside étant moitié moins concentrée, les dépôts avaient chaque fois un volume double. Un blanc était développé conjointement aux échantillons.

La migration descendante du solvant de PARTRIDGE était arrêtée lorsque celui-ci avait parcouru environ 45 cm.

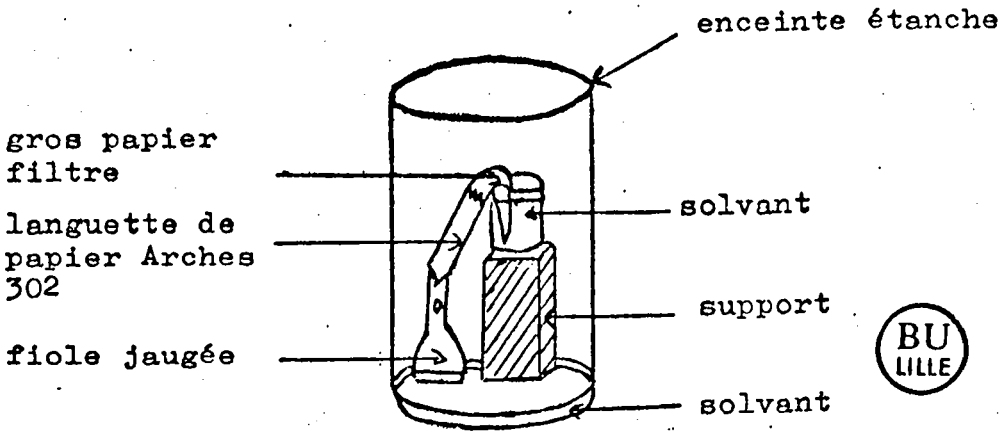
Les chromatogrammes étaient séchés sous vide phophorique, puis les taches de flavonoïdes repérées en lumière de WOOD.

Elution : nous avons d'abord agité les fragments de chaque tache découpée dans de l'alcool éthylique ou méthylique. Le volume de solvant nécessaire à une extraction complète des flavonoïdes était tel qu'il fallait le concentrer pour que la mesure spectrophotométrique soit possible.

Cherchant à réduire le volume de l'éluat, nous avons pensé à entraîner les flavonoïdes par un solvant approprié migrant par capillarité. Des languettes, de 3 cm de large sur 10 cm de long environ, taillées en pointe à l'une des extrémités furent ainsi découpées dans les chromatogrammes autour de chaque tache, de façon à la prélever intégralement.

(§) Nous avons fait deux dépôts de 100 µl dans un but de vérification supplémentaire.

Un dispositif décrit par la figure 21 permettait de recueillir l'éluat de chaque tache dans une fiole jaugée (§), de telle sorte que les concentrations des éluats restent dans les limites de bonne précision de la mesure spectrophotométrique.



BU LILLE

Figure : 21 = Dispositif utilisé pour l'élution des flavonoïdes après chromatographie sur papier.

Après des essais avec différents solvants, nous avons retenu l'éthanol à 96° pour l'élution du lutéolol et du produit y, l'éthanol à 80° pour celle du lutéoloside et l'éthanol à 60° pour celle du glucolutéoloside : moins de 10 ml (20 ml dans le cas des taches provenant des dépôts de 200 et 250 µl des solutions de concentration 2 M.10^{-5} p.1000) de solvant étaient suffisants pour une élution complète. L'emplacement de la tache, exposé aux vapeurs d'ammoniaque, restait alors blanc.

Une languette correspondant à chaque flavonoïde fut découpée entre deux taches au niveau de celles-ci et éluée comme ces dernières, afin de servir de témoin.

<u>Résultats</u> : les résultats des mesures d'absorption dans l'ultra-violet, aux longueurs d'onde choisies pour chaque flavonoïde, avec pour témoin l'éthanol de même titre que celui utilisé pour l'élution, furent rapportées aux courbes-étalons.

(§) Lors des premiers essais, nous faisions plonger directement la languette de papier Arches 302 dans le solvant. La migration était extrêmement lente. Sa vitesse fut très améliorée grâce à la fixation, par quelques points de fil de coton blanc, d'un triangle de gros papier filtre, à l'extrémité de la languette opposée à la pointe.

Il apparut que les éluats des différentes taches de flavonoïdes étaient beaucoup plus opaques que la théorie ne le laissait prévoir. Ceux des blancs absorbaient également fortement la lumière ultra-violette. Il était évident que le papier portait des substances non flavonoïdiques, qui se trouvaient entraînées lors de l'élution et qui absorbaient la lumière ultra-violette aux mêmes longueurs d'onde que les flavonoïdes.

Essais d'amélioration de la méthode : nous avons d'abord pensé à utiliser un autre papier à chromatographie. Les essais que nous avons faits avec les papiers MACHEREY et NAGEL : 2214 F, 2261 F et 263 F n'ont pas été satisfaisants : nous n'obtenions que deux taches après chromatographie de l'extrait G de Gaude.

Nous avons alors envisagé de débarrasser le papier Arches 302 des impuretés qu'il portait avant de l'utiliser. Nous avons en premier lieu employé l'eau distillée que nous avons laissé migrer le long d'une feuille pendant 24 heures. L'utilisation de ce papier ne nous donna pas entière satisfaction.

Le lavage par l'éthanol à 96° fut plus efficace, mais l'éthanol à 80° se montra être le meilleur solvant des impuretés gênantes pour le dosage des flavonoïdes.

Conclusion : malgré les précautions opératoires définies ci-dessus, les comparaisons répétées entre les mesures spectrophotométriques effectuées sur les éluats des taches obtenues après chromatographie de volumes connus de solutions-étalons des flavonoïdes purs de la Gaude, et celles faites directement sur les dilutions correspondantes de ces mêmes solutions-étalons ne nous ont pas encouragée à poursuivre nos recherches dans cette voie : l'irrégularité de l'absorption du blanc, après chromatographie et élution, était la preuve qu'un élément incontrôlable entachait d'erreurs nos résultats.

2.1.4.2- Chromatographie sur couche mince

Séparation chromatographique : grâce à la chromatographie sur couche mince, nous espérions à la fois mieux contrôler le support absorbant et simplifier la technique d'élution.

De nombreux essais d'analyse de solutions de composition connue en flavonoïdes sur différents supports, gel de silice polyamide acétylée, cellulose, associés à divers solvants, ont mis en évidence la nette supériorité de la cellulose, qui nous a seule permis d'obtenir des résultats satisfaisants, comparables d'ailleurs à ceux que donnait l'emploi du papier Arches 302, les taches ayant de plus l'avantage d'être moins allongées.

Le protocole opératoire suivant fut adopté:

- support : nous avons utilisé de la cellulose microcristalline des établissements MERCK, dont nous avons enduit des plaques de verre de 20 cm de côté, sur une épaisseur de 40 µ (§) à l'aide d'un étaleur.

- dépôt des échantillons : des dépôts ponctuels de quantités connues des flavonoïdes isolés de la Gaude ont été faits tous les 2 cm, sur une ligne située à 2 cm du bord de la plaque, à l'aide de micropipettes de précision. Le dernier emplacement fut réservé au prélèvement de la cellulose pour le blanc.

- solvant et développement : nous avons utilisé la phase butanolique du solvant : n-butanol-méthyléthylcétone-eau : 5-3-3 (v/v), dont la migration est plus rapide que celle du solvant de Partridge : 16,2 cm en 5 h contre 15,6 cm en 8 h 30.

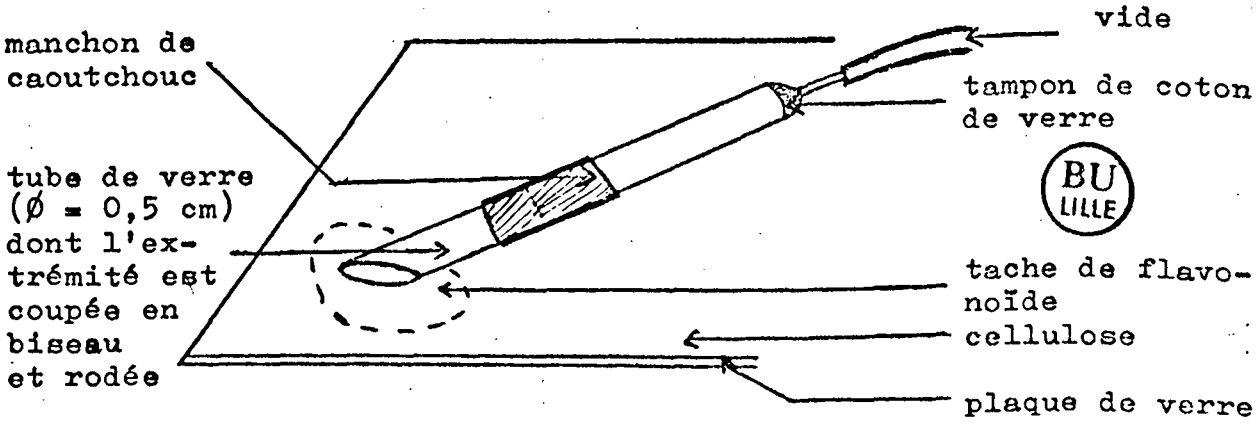
(§) Cette épaisseur était indispensable pour déposer une quantité de flavonoïdes suffisante pour pouvoir effectuer un dosage par spectrophotométrie après élution.

Le développement se fait à 20° C en migration ascendante. La saturation de la cuve demande approximativement une heure.

On laisse sécher les plaques à température ambiante, à l'air libre, mais à l'abri des vapeurs alcalines.

Les Rf des flavonoïdes de la Gaude, mis en évidence par la lumière de WOOD, sont les suivants : lutéolol = 0,86, lutéoloside = 0, 35, glucolutéoloside = 0,22, produit Y = 0,44, produit X_1 = 0,26.

-<u>élution</u> : chaque tache, éclairée en lumière de WOOD, fut délimitée à l'aide d'une aiguille fine. La cellulose correspondant à cette zone fut aspirée, à l'aide du dispositif représenté par la figure 22, dans un petit tube garni à l'une de ses extrémités effilée d'un tampon de coton de verre. Ce petit tube avait l'avantage de pouvoir servir de colonne pour effectuer l'élution.



BU LILLE

Figure : 22 = Schéma de l'appareil permettant le prélèvement de la cellulose à partir des couches minces.

- <u>résultats</u> : lors d'un premier essai, nous avons simplement fait migrer le solvant le long d'une plaque qui n'avait reçu aucun dépôt. Après séchage à l'air, la cellulose fut prélevée sur des zones correspondant au Rf de chacun des flavonoïdes, puis éluée avec l'éthanol à 80° ou à 50° selon les cas. La mesure spectrophotométrique des différents éluats mit en évidence une absorption anormalement élevée de ces blancs. La cellulose utilisée était donc, comme le papier Arches 302, mêlée d'impuretés entraînées au cours de l'élution.

Nous avons lavé la cellulose avec de l'éthanol à 80° avant de l'étaler sur les plaques. Un nouvel essai, similaire au premier, montra que l'absorption par les éluats était devenue beaucoup plus faible, mais qu'elle restait très variable selon la zone de prélèvement. (Tableau 14).

Nous avons donc pris soin d'homogénéiser très intimement (§) la bouillie cellulosique (15 g de cellulose microcristalline dans 90 ml d'eau distillée) avant de l'étaler sur les plaques de verre. Ce troisième essai conduisit alors à des résultats assez homogènes. (Tableau 14).

- conclusion : la répétition de mesures sur des volumes identiques des mêmes solutions étalons de flavonoïdes purs, faites directement et après chromatographie suivie d'élution, nous a montré que la précision et la reproductibilité des résultats étaient nettement améliorées par rapport à celles que permettait la chromatographie sur papier.

Cette méthode de dosage présentait, néanmoins, divers inconvénients :

- pour une même solution, les résultats différaient légèrement selon la longueur d'onde à laquelle était faite la mesure spectrophotométrique : par exemple, la concentration d'une solution de lutéoloside était de 1,35 $M.10^{-5}$ p.1000 à 256 nm, 1,47 $M.10^{-5}$ p.1000 à 267 nm et de 1,32 $M.10^{-5}$ p.1000 à 353 nm.

- la technique était longue et réclamait beaucoup de minutie; son application au dosage des flavonoïdes dans les divers organes de la Gaude, à des stades successifs de son développement, aurait obligé à répéter de nombreuses fois tout une série d'opérations pour le dosage d'un seul flavonoïde.

- enfin au cours des premières mesures que nous avons réalisées sur les extraits végétaux, nous avons remarqué une

(§) Nous avons utilisé à ces fins un homogénéiseur BIOREX, type H 451.

λ en nm	Densité optique (en 1/1000e d'unité)					
	Cellulose lavée à l'éthanol à 80° préparée au mortier			Cellulose lavée à l'éthanol à 80° homogénéisée		
	Blanc n°1	Blanc n°2	Blanc n°3	Blanc n°1	Blanc n°2	Blanc n°3
252	90	65	155	54	62	57
254	86	63	154	54	62	57
255	86	63	152	53	60	56
256	84	62	149	52	60	56
257	81	60	147	51	58	55
258	78	59	143	48	58	55
260	75	57	139	50	58	55
262	73	56	134	48	56	54
264	72	55	130	49	56	53
266	69	53	127	48	54	54
267	68	53	126	48	54	53
268	68	53	124	49	54	52
270	65	51	120	48	53	52
271	65	51	118	48	53	52
272	65	50	116	48	53	52
275	63	46	106	45	51	51
276	63	46	105	46	51	50
285	55	41	90	40	44	44
290	51	39	85	38	42	43
330	31	27	65	25	28	27
348	24	23	65	22	27	23
350	24	23	65	23	27	23
351	24	23	65	22	27	24
352	23	23	65	22	26	23
353	23	23	65	22	26	22
355	23	23	64	21	26	22
360	22	21	63	21	25	22

BU LILLE

Tableau : 14 = Absorption due à la cellulose, lavée à l'éthanol à 80°, après migration du solvant et élution par l'éthanol à 80° = influence du procédé de préparation.

évolution très sensible des solutions étalons des flavonoïdes purs, qui étaient, il ne faut pas l'oublier, de faibles concentrations. Ce fait était un grave handicap pour la méthode, étant donnée la rareté des produits purs, qui n'avaient pu être isolés de la Gaude qu'avec de grandes difficultés.

A la recherche d'une méthode plus facile à appliquer aux nombreux extraits de la Gaude que nous nous proposions de doser, nous avons envisagé d'évaluer les flavonoïdes séparés directement sur les chromatogrammes, grâce à l'utilisation de la photodensitométrie.

Plusieurs auteurs - MICHAUD-1966-, DELAVEAU-1967-, LEIBA-1967-, MICHAUD et Coll.-1968- ont utilisé cette technique après avoir pulvérisé sur les chromatogrammes un révélateur chimique tel le chlorure d'aluminium ou le ferricyanure ferrique. On doit cependant noter qu'il est très difficile dans ces conditions d'obtenir des colorations uniformes dans l'épaisseur de la couche absorbante.

Afin d'éviter cet inconvénient, nous avons choisi de mettre au point une méthode photodensitométrique basée sur la seule révélation par l'éclairage, en lumière de WOOD, des chromatogrammes réalisés sur couche mince de cellulose.- JACQUIN-DUBREUIL-1972.

2.2. DOSAGE DENSITOMETRIQUE DIRECT PAR REFLEXION DES FLAVONOIDES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

2.2.1- Essais sur des solutions de flavonoïdes purs

Les concentrations des solutions éthanoliques des flavonoïdes purs extraits de la Gaude, dont nous nous sommes

servi au cours de ce dosage, sont rapportées dans le tableau 15

Flavonoïde	Concentration molaire	Concentration en g. par litre
Lutéolol	$1,2 \times 10^{-3}$	0,343
Lutéoloside	$1,5 \times 10^{-3}$	0,672
Glucolutéoloside	$0,7 \times 10^{-3}$	0,427
Produit Y (Apigénol 7-glucose)	$1,4 \times 10^{-3}$	0,605

BU LILLE

Tableau : 15 = Concentration des solutions-étalons

2.2.1.1- Séparation chromatographique

2.2.1.1.1- Choix de la méthode

L'analyse de solutions de flavonoïdes par chromatographie descendante sur papier avec le solvant de Partridge (n-butanol, acide acétique, eau : 4-1-5 (v/v)) permet de mettre en évidence des taches isolées mais très allongées, ne se prêtant pas à une lecture facile au photodensimètre. Par contre, la chromatographie sur couche mince permet généralement d'observer des taches plus ramassées et aux contours bien définis, répondant mieux aux conditions de lecture par l'appareil.

De nombreux essais, associant divers types de couches minces et de solvants de développement, nous avaient permis lors de l'essai précédent (chapitre II-2-1-4-2) de sélectionner, d'une part la cellulose, d'autre part le mélange original que constitue la phase butanolique du mélange suivant :

n-butanol, méthyléthylcétone, eau distillée : 5-3-3 (v/v).

2.2.1.1.2- Choix des plaques

L'utilisation de plaques préparées au laboratoire a attiré notre attention sur l'importance de l'homogénéïté et de la régularité de l'épaisseur de la couche de cellulose, ce qui nous a amenée à employer des plaques "prêtes à l'emploi" commercialisées (§), de 20 cm x 20 cm, d'une épaisseur de 0,25 mm.

Ayant constaté des variations au cours de mesures densitométriques effectuées à blanc en divers points d'une même plaque ou sur des plaques différentes, nous avons pu les imputer à la présence d'impuretés solubles dans l'alcool. C'est pourquoi nous prenons la précaution de procéder, avant de les utiliser, à un lavage des couches minces par migration ascendante d'éthanol à 96°, qui a pour effet d'entraîner les impuretés avec le front du solvant dans une région de la plaque que nous maintiendrons ultérieurement en dehors de la surface de développement de la chromatographie des flavonoïdes.

2.2.1.1.3- Dépôt des échantillons sur les plaques

Des études systématiques ont montré que la plus grande attention doit être prêtée à cette opération, en raison de son incidence sur la précision et la reproductibilité de la méthode.

(§) Nous avons utilisé des "plaques finies de Cellulose pour C.C.M.", sans indicateur fluorescent, des Etablissements MERCK.

Les meilleurs résultats sont obtenus en procédant de la façon suivante : on dépose des volumes constants (5 µl) des différentes solutions à doser, à l'aide d'une micropipette calibrée, afin d'obtenir des dépôts de surface réduite et régulière. La diffusion du flavonoïde au cours de la migration est ainsi comparable d'une tache à l'autre.

Nous verrons plus loin que l'emploi de la même micropipette pour tous les dépôts de même volume ajoute à la précision de la méthode.

Les dépôts sont répartis sur une ligne située à 2 cm du bord de la plaque correspondant à la ligne de départ de l'éthanol de prélavage.

2.2.1.1.4- Développement et révélation

Nous avons procédé, comme dans la technique de dosage après élution des taches séparées par chromatographie sur couche mince (chapitre: II -2-1-1-4-2). Les taches formées par les différents flavonoïdes séparés sont mises en évidence par simple exposition à un faisceau de lumière de WOOD.

2.2.1.2- Analyse densitométrique

La plaque est entraînée sous un faisceau de lumière de WOOD de longueur d'onde proche de celle qui correspond à l'absorption maximale des substances à doser. On mesure la densité optique de la lumière réfléchie par la plaque, à l'aide d'un densitomètre à double faisceau qui permet l'enregistrement

automatique des courbes traduisant la variation de l'absorption lumineuse au niveau des taches (§). Un "blanc" développé conjointement aux échantillons à doser permet le réglage du zéro de l'appareil (ligne de base).

L'appareil peut intégrer automatiquement la surface de chaque pic en unités arbitraires, mais il est très difficile de faire coïncider le zéro de l'intégrateur et la ligne de base des pics, comme l'a d'ailleurs déjà observé HEATHCOTE et Coll.-1969-

A la mesure de la surface des pics, entachée d'erreurs dues à la séparation imparfaite des flavonoïdes sur les chromatogrammes, nous préférons la mesure de la hauteur maximale des pics.

Les meilleures conditions d'utilisation de l'appareil que nous avons déterminées sont les suivantes :

- Source lumineuse : lampe à hydrogène
- Filtre correspondant à une lumière de longueur d'onde égale à 3 400 Å
- Fente de lecture : 1 mm x 0,5 mm
- Sensibilité : came C.

(§) Nous avons utilisé un appareil Chromoscan, distribué par les Etablissements JOYCE-LOEBL France.

2.2.1.3- Définition des meilleures conditions de dosage et appréciation de la valeur de la méthode

Afin de définir les meilleures conditions opératoires, il était important d'essayer de mesurer les erreurs imputables aux diverses manipulations nécessaires au dosage.

Le calcul de la reproductibilité des mesures a permis d'apprécier la valeur de la méthode proposée, dans les divers cas étudiés.

2.2.1.3.1- Influence des micropipettes utilisées pour le dépôt des flavonoïdes

Lors d'une première série d'essais, deux plaques ont été préparées : sur l'une, trois volumes identiques d'une même dilution de lutéoloside ont été déposés en utilisant chaque fois une nouvelle micropipette (tableau 16) ; sur l'autre, la même micropipette a servi à réaliser les dépôts (tableau 17).

La mesure de la lumière réfléchie par chaque tache a été répétée quatre fois.

Les coefficients de variation, calculés sur les hauteurs des pics enregistrés, traduisent dans les deux essais réalisés une bonne reproductibilité de la mesure de chaque tache.

Le tableau 16 montre une plus grande dispersion des résultats que le tableau 17 (coefficient de variation : ± 8,3 % contre ± 2,25 %), ce qui nous a conduit à utiliser ultérieurement la même micropipette pour tous les dépôts.

Dépôts de 1,008 µg de lutéoloside, effectués avec des micropipettes différentes.

Dépôt n°	1	2	3	TOTAL	Moyenne arithmétique	Ecart-Type	Coefficient de variation %
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées	50 49 53 53	55 55 56 54	51 52 52 53	156 156 161 160	52,75	± 4,38	± 8,3
Total	205	220	208	633			
Moyenne arithmétique	51,2	55	52				
Ecart-Type	± 2,05	± 0,8	± 0,8				
Coefficient de variation %	± 4	± 1,45	± 1,45				

BU LILLE

Tableau : 16 = Influence de l'emploi de micropipettes différentes sur la reproductibilité des mesures.

Dépôts de 0,840 µg de lutéoloside, effectués avec la même micropipette

Dépôt n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	TOTAL	Moyenne arithmétique	Ecart-Type	Coefficient de variation %
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées	51 53 53 52,5	51 51 51,5 50	54 54 54 54	53 53 53 53	53 53 53 53	53 52 51 51,5	53 52 52 54	52, 52 51,5 53	51 51 51 51,5	516 516 515 518,5	52,31	± 1,17	± 2,25
Moyenne arithmétique	52,3	50,8	54	53	53	51,8	52,7	52,1	51,1				
Ecart-Type	± 0,9	± 0,6	± 0	± 0	± 0	± 0,8	± 0,9	± 1,8	± 0,2				
Coefficient de variation %	± 1,72	± 1,20	± 0	± 0	± 0	±1,51	± 1,70	±3,45	± 0,39				

CCI Lille

Tableau : 17 = Précision des résultats pour des dépôts de lutéoloside effectués avec la même micropipette.

2.2.1.3.2. Influence de la quantité de flavonoïde déposée

Deux plaques ont été préparées :

- sur l'une, des quantités croissantes de lutéoloside échelonnées de 0,168 à 1,680 µg (tableau 18),

- sur l'autre, des quantités croissantes de glucolutéoloside, échelonnées de 0,106 à 1,067 µg (tableau 19) ont été déposées.

Les résultats réunis dans les tableaux 18 et 19, traduisent une reproductibilité des mesures du même ordre que celle obtenue lors des essais précédents, quelle que soit la concentration de la tache, entre 0,168 et 1,680 µg pour le lutéoloside, et entre 0,20 et 1,00 µg pour le glucolutéoloside.

2.2.1.3.3- Influence du support

A partir de chacune des solutions éthanoliques des flavonoïdes de la Gaude dont nous disposions, nous avons préparé, à plusieurs reprises, des gammes de dix dilutions convenablement choisies, chacune donnant lieu à une série de dépôts de 5 µl chacun sur une plaque pour chromatographie.

Les résultats de lecture de ces chromatogrammes sont rapportés dans les tableaux 20 à 23.

Dépôts de lutéoloside, en µg	0,168	0,336	0,504	0,672	0,840	1,008	1,176	1,344	1,512	1,680
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées	8	20	26	43	46	56	60	69	70	70
	8	20	26	43	46	54	60	65	70	70
	8	19	27	42	46	53	61	68	71	70
	8	21,5	28	41	45	53	61	66	72	73
Moyenne arithmétique	8	20,1	26,75	42,25	45,75	54	60,5	67	70,75	70,75
Ecart-Type	± 0	± 1	±0,9	± 0,9	±0,5	± 1,4	± 0,5	± 1,8	±0,9	± 1,5
Coefficient de variation %	± 0	± 5	±3,3	± 2,1	±1	± 2,5	± 0,8	± 2,6	±1,2	± 2,1

Tableau : 18= Effet sur le dosage de la quantité de lutéoloside déposée.

BU LILLE

Dépôts de glucolutéoloside en µg	0,107	0,213	0,320	0,427	0,534	0,640	0,747	0,854	0,961	1,067
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées	6	10	14	18	20	29	28	32	34	42
	5	10	15	18	22	28	29	32	34	41
	3	9	14	18	22,5	28	29	31	32	42
	5	8	15	18	23	28	30	32	32	41
Moyenne arithmétique	4,75	9,25	14,5	18	21,8	28,25	29	31,75	33	41,5
Ecart-Type	±1,2	± 0,9	± 0,5	± 0	± 1,3	±0,6	± 0,8	±0,5	± 1,1	± 0,5
Coefficient de variation %	±25	± 9,7	± 3,4	± 0	± 5,9	±2,1	± 2,7	±1,5	± 3,3	± 1,2

Tableau : 19= Effet sur le dosage de la quantité de glucolutéoloside déposée.

Dépôts de lutéoloside, en µg	0,168	0,336	0,504	0,672	0,840	1,008	1,176	1,344	1,512	1,680
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées										
Plaque N° 1	8	20	26	43	46	56	60	65	70	70
	8	20	26	43	46	54	60	66	70	70
	8	19	27	42	46	53	61	68	71	70
	8	21,5	28	41	45	53	61	69	72	73
Plaque N° 2		18		37		50		60		63
		18		36,5		49		60		64
		18		37		53		61		65
		18		39		51		59		63
Plaque N° 3		17		38		53		58		62
		20		37		52		57		63
		18		35		52		61		65
		19		35		53		59		66
Plaque N° 4		19		37		55		79		78
		19		38		55		78		78
		20		39		56		68		78
		20		40		54		70		79
Moyenne arithmétique	8	19	26,75	38,5	45,75	53	60,5	64,8	70,75	69
Ecart-Type	± 0	± 1,1	± 1	± 2,5	± 0,5	± 1,9	± 0,5	± 6,8	± 0,9	± 6,2
Coefficient de variation %	± 0	± 5,7	± 3,3	± 6,4	± 2,1	± 3,5	± 0,8	± 10,4	± 1,2	± 9

Tableau : 20= Influences conjuguées de la concentration des dépôts et de la plaque utilisée sur le dosage du lutéoloside.

Dépôts de glucolutéoloside, en µg	0,107	0,213	0,320	0,427	0,534	0,640	0,747	0,854	0,961	1,067
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées										
Plaque N° 1	6	10	14	18	20	28	28	32	34	42
	5	10	15	18	22	28	29	32	34	41
	3	9	14	18	22,5	29	29	31	32	42
	5	8	15	18	23	28	30	32	32	41
Plaque N° 2	4	10	16	17	21	29	29	31	33	43
	5	8,5	14	18	21	27	28,5	31,5	32	41
	4	9	15	18	22	28	29,5	32	33	40
	6	9,5	13	19	23	29	29	32,5	34	42
Moyenne arithmétique	4,75	9,25	14,5	18	21,8	28,25	29	31,75	33	41,5
Ecart-Type	± 1,07	±0,57	±0,85	±0,71	±1,14	±0,5	± 0,8	±0,3	±0,85	± 0,9
Coefficient de variation %	±22,5	±6,1	±5,8	±3,9	±4,1	±1,7	± 2,7	± 1	±2,5	± 2,1

Tableau : 21 = Influences conjuguées de la concentration des dépôts et de la plaque utilisée sur le dosage du glucolutéoloside.

Dépôts de lutéolol, en µg	0,171	0,257	0,353	0,429	0,515	0,601	0,686	0,772	0,858
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées									
Plaque N° 1	15	22	28	34	43	53	56	70	80
	15	23	29	32	44	52	54	69	81
	13	24	32	33	43	49	56	73	82
	14	23	31	32	43	51	57	73	81,5
Plaque N° 2	16	22	31	32,5	45	52	56	71	78
	15	25	29	33	42	50	55	73	78
	13	25,5	30,5	34	43	51	54	70	77,5
	15	23,5	30	33	43,5	54	57	69	77
Moyenne arithmétique	14,5	23,5	30	32,9	43,3	51,5	55,6	71	79;3
Ecart-Type	± 1,14	± 1,64	± 1,75	± 0,60	± 0,78	± 2,57	± 1,40	± 3,14	± 3,91
Coefficient de variation %	± 7,8	± 6,9	± 5,8	± 1,8	± 1,8	± 5	± 2,5	± 5,6	± 4,9

Tableau : 22 = Influences conjuguées de la concentration des dépôts et de la plaque utilisée sur le dosage du lutéolol.

BU LILLE

Dépôts de Produit Y, (Apigénol-7glucose) en µg	0,151	0,302	0,454	0,605	0,756	0,907	1,058	1,210	1,360	1,512
Hauteurs en mm des pics enregistrés au cours de lectures répétées.										
Plaque N° 1	6,5	15	23	34	36	41	48,5	55	63	68
	5	14,5	23,5	33	35	42	49	54	64	69
	5,5	15,5	23	32	36	42,5	50	56	62	68
	5	15	22,5	33	35,5	43	49	55	63	70
Plaque N° 2	5	15,5	23	33	36	44	47	55	62	60
	5,5	14,5	22	32	36,5	42,5	48	57	61	59
	5,5	14,5	23	32	37	43	47	54	62	61
	6	15,5	24	31	36	42	47,5	54	63	61
Moyenne arithmétique	5,5	15	23	32,5	36	42,5	48,5	55	62,5	64,5
Ecart-Type	± 0,65	± 0,46	± 0,6	± 0,92	± 0,6	± 0,78	± 1,06	± 1,13	± 0,92	± 4,06
Coefficient de variation %	±11,8	± 3	± 2,7	± 2,8	± 1,6	± 0,88	± 2,1	± 2	± 1,4	± 6,2

BCU LILLE

Tableau : 23 = Influences conjuguées de la concentration des dépôts et de la plaque utilisée pour le dosage du produit Y (Apigénol-7 glucose).

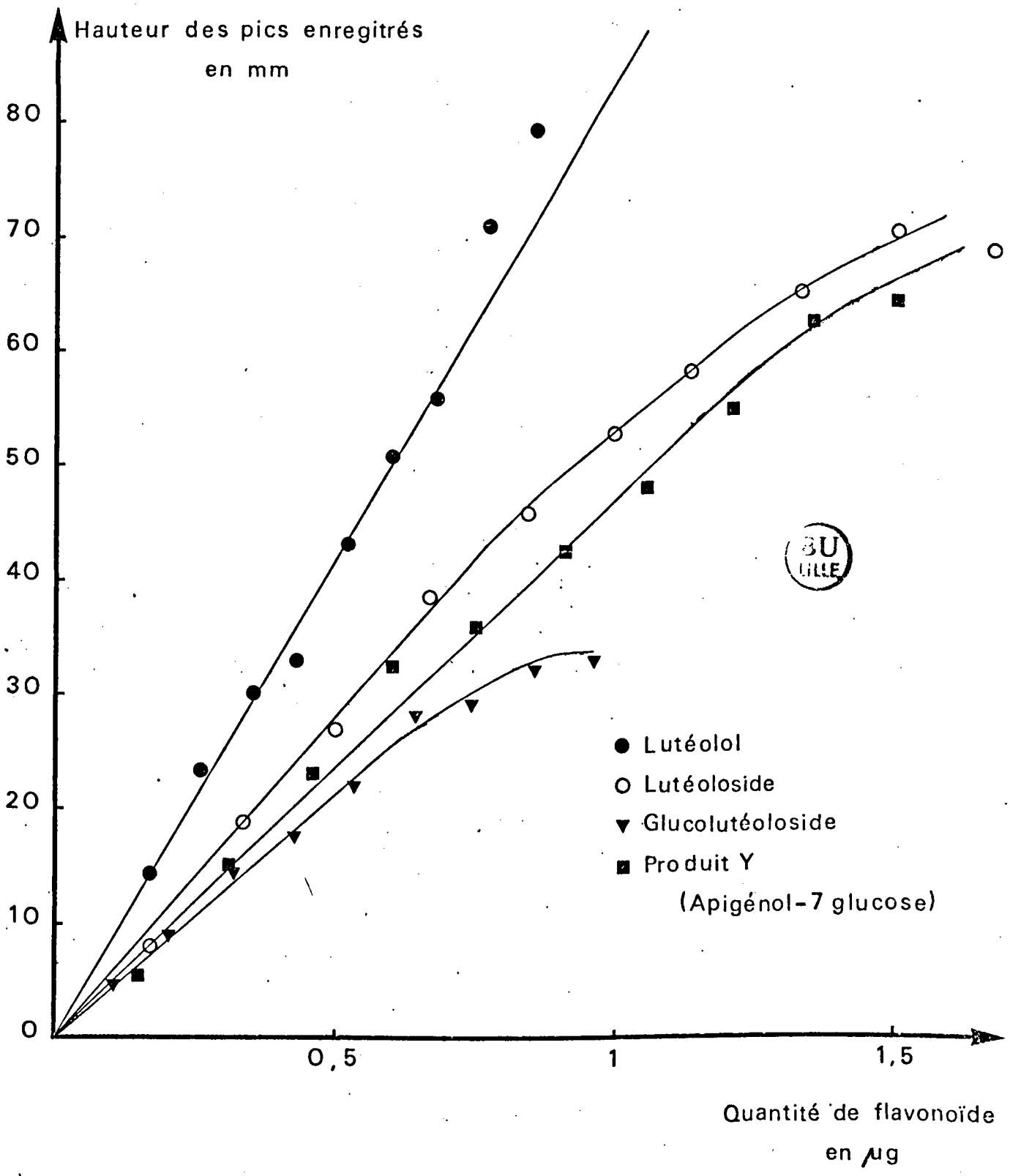
Les coefficients de variation sont ici parfois supérieurs à ceux calculés lors des précédents essais ; ils représentent la somme des erreurs qui peuvent être introduites par les diverses opérations du dosage : préparation des dilutions à partir d'une solution mère de concentration connue, dépôts, migration, lecture, ainsi que les variations inhérentes à la couche mince d'une plaque à l'autre. Néanmoins, la précision des résultats obtenus par la méthode reste satisfaisante.

On peut noter que la limite de détection de l'appareil n'autorise pas les mesures pour des dépôts inférieurs à 0,171 µg de lutéolol et 0,20 µg de glucolutéoloside.

2.2.1.4- Etablissement des courbes d'étalonnage

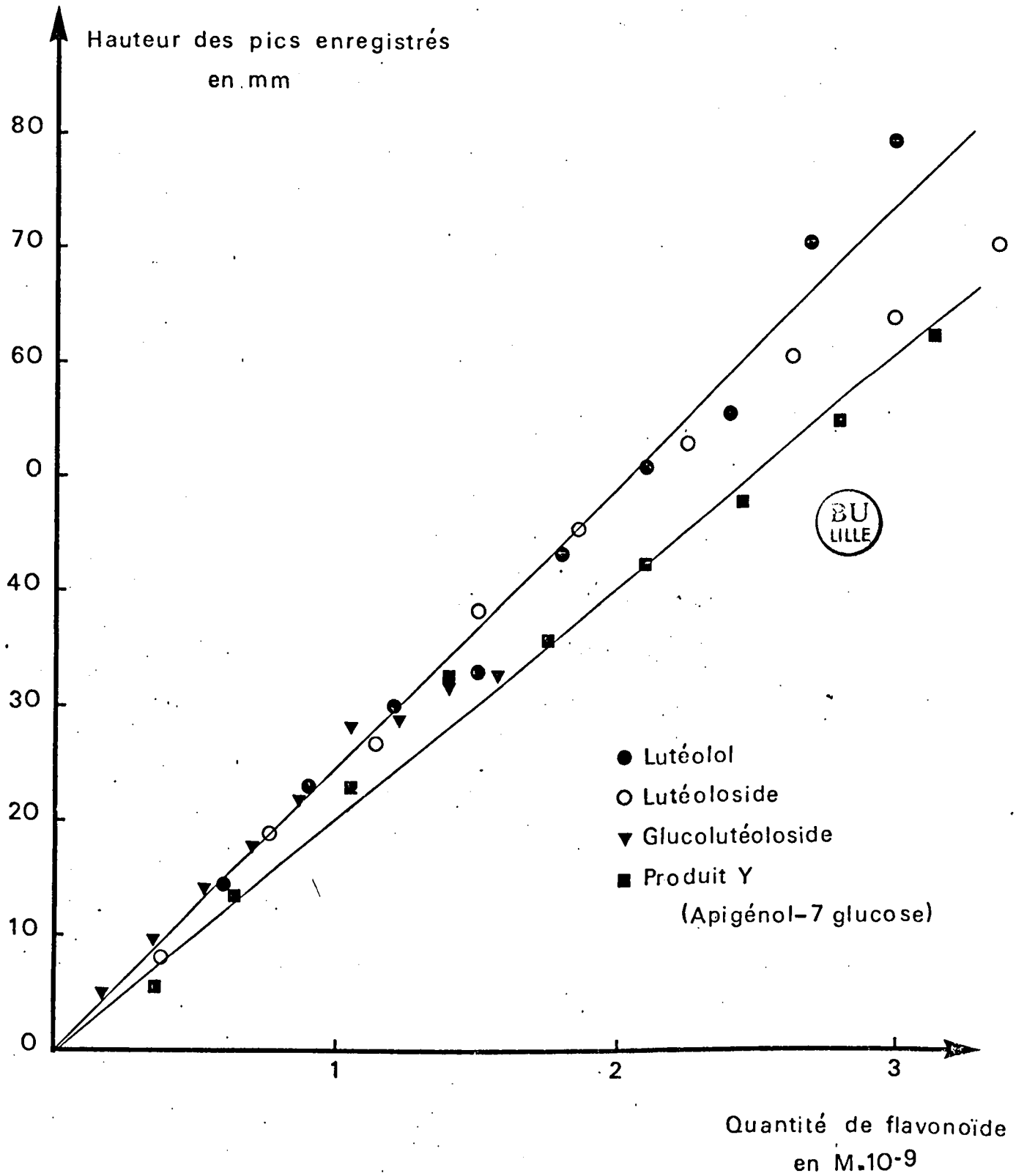
A l'aide des résultats consignés dans les tableaux précédents, quatre courbes d'étalonnage ont pu être tracées en portant en abscisses les hauteurs des pics enregistrés et en ordonnées les quantités de flavonoïdes déposées, exprimées soit en poids (figure 23), soit en concentrations molaires (figure 24). On peut assimiler chacune des courbes à une succession de segment de droites dont on a calculé l'équation par la méthode des moindres carrés.

On obtient les relations suivantes entre la hauteur du pic d'absorption enregistré, mesurée en mm, et la teneur en flavone exprimée en µg:



BU LILLE

Figure 23. Courbes d'étalonnage des principaux flavonoïdes de la Gaude exprimés en µg.



BU LILLE

Figure24_Courbes d'étalonnage des principaux flavonoïdes de la Gaude exprimés en Moles.10^{-9}_

Lutéoloside	: pour h $\leqslant$ 45,7 mm	c = h x 0,01756 + 0,01863
	pour h $\geqslant$ 45,7 mm	c = h x 0,02692 - 0,4122
Glucolutéoloside	: pour h $\leqslant$ 29 mm	c = h x 0,02496 - 0,02074
Lutéolol	: pour h $\leqslant$ 55 mm	c = h x 0,0120 - 0,0009
Produit Y (Apigénol-7 glucose)	: pour h $\leqslant$ 55 mm	c = h x 0,02187 - 0,01189

BU LILLE

Le tracé des courbes d'étalonnage appelle les remarques suivantes :

- La sensibilité optimale de la mesure correspond à des dépôts de flavonoïdes allant de 0,20 à 0,70 µg. Dans cette zone, les courbes d'étalonnage peuvent en effet être confondues avec des droites passant par l'origine des coordonnées.

La courbe d'étalonnage du lutéoloside, par contre, peut être assimilée à deux portions de droite.

- Si l'on exprime les quantités de flavonoïdes déposées en moles, les courbes d'étalonnage du lutéolol et de ses deux hétérosides sont confondues en une seule droite passant par l'origine des coordonnées, pour des dépôts de quantités inférieures à $1,5 \times 10^{-9}$ M.

Une droite différente, par contre, se dessine pour le produit Y (Apigénol-7 glucose).

Cette constatation expérimentale doit être rapprochée du fait qu'une génine différente caractérise les deux groupes de dérivés étudiés, génine qui est à l'origine du phénomène d'absorption.

Le dosage par spectrophotométrie directe des solutions étalons (chapitre II-2-1-1-3.) a d'ailleurs conduit aux mêmes conclusions.

Cette coïncidence des courbes d'étalonnage des dérivés d'une même génine exprimés en moles permet d'envisager le dosage de substances identifiées, mais non isolées, à l'aide de la courbe d'étalonnage de la "série" correspondante.

2.2.2- Application de la technique mise au point au dosage des flavonoïdes dans la Gaude

Le dosage des flavonoïdes dans la Gaude, tel que nous le proposons, comporte trois temps :

2.2.2.1- Préparation des extraits à partir des divers organes de la plante,

2.2.2.2- Séparation des pigments flavoniques par chromatographie sur couche mince,

2.2.2.3- Analyse densitométrique des taches dues à chacun des flavonoïdes et détermination quantitative à l'aide des courbes d'étalonnage.

2.2.2.1- Préparation des extraits

Nous avons choisi d'épuiser les organes secs par l'éthanol à 90° bouillant dans lequel tous les flavonoïdes sont solubles de façon satisfaisante.

Les divers organes de la plante, séchés à l'air libre, sont réduits en poudres grossières ; celles-ci additionnées de 4 à 5 fois leur poids d'éthanol à 90° sont chauffées jusqu'à ébullition du solvant que l'on maintient pendant une heure environ, temps au bout duquel on filtre le liquide chaud. La poudre est alors traitée à nouveau de la même façon avec une

nouvelle quantité d'éthanol et ce à plusieurs reprises, jusqu'à extraction complète des pigments flavoniques : l'addition de quelques gouttes d'ammoniaque à quelques millilitres de la dernière colature ne doit être suivie d'aucune coloration.

Les différentes solutions alcooliques obtenues à partir d'un organe donné sont réunies et amenées à un volume connu en relation avec le poids de poudre sèche traitée.

2.2.2.2- Séparation chromatographique

Dans un premier temps, on évalue approximativement la teneur en chacun des flavonoïdes des extraits à doser en comparant à l'oeil nu les taches qu'ils donnent par chromatographie ascendante sur papier (Arches 302, Solvant de Partridge), avec celles obtenues dans les mêmes conditions à partir de solutions témoins de concentrations connues.

On calcule ensuite, si nécessaire, la dilution qu'il faut faire subir à l'extrait pour pouvoir effectuer le dosage dans la zone de sensibilité optimale de chacun des flavonoïdes. Les concentrations respectives du lutéolol et de ses deux hétérosides dans un même extrait sont le plus souvent trop différentes pour que la même dilution permette un dosage correct de chacun d'eux. On prépare donc trois dilutions appropriées, dont on dépose ponctuellement 5 µl, côte à côte, sur une même plaque de cellulose, du type dont nous avons précédemment justifié le choix, préalablement lavée à l'éthanol.

Le développement est conduit dans les conditions précisées antérieurement.

2.2.2.3- Dosage proprement dit

La plaque, développée et séchée à l'air libre à l'abri des vapeurs alcalines, sur laquelle apparaissent cinq taches correspondant au lutéolol, au lutéoloside, au glucolutéoloside, au produit Y et au produit X_1, est alors soumise à la lecture par le photodensitomètre dans les conditions optimales, que nous avons indiquées plus haut.

On relève, pour chaque flavonoïde, la hauteur du pic obtenu avec la dilution qui lui correspond. Cette valeur reportée sur les courbes d'étalonnage permet de connaître la concentration

en poids ou en moles du flavonoïde dans la dilution en question. Il suffit alors de ramener par le calcul à l'extrait, puis au poids d'organe sec ayant servi à préparer celui-ci.

Dans le cas du produit X_1 (Apigénol-glucose-glucose), flavonoïde dont nous n'avons pas réussi à isoler une quantité suffisante, pour la préparation d'une solution témoin, nous avons utilisé la propriété de coïncidence des courbes d'étalonnage des dérivés d'une même aglycone lorsque les concentrations sont exprimées en moles : nous avons rapporté les valeurs obtenues pour ce flavonoïde sur la courbe établie pour le produit Y (Apigénol-7 glucose).

2.2.2.4- Appréciation de la valeur du dosage

Pour mettre en évidence les qualités du dosage, nous avons effectué les calculs d'erreurs se rapportant à deux extrait obtenus, l'un à partir de racines, organes de la Gaude les moins riches en flavonoïdes, l'autre à partir d'inflorescences encore en fleurs, organes les plus riches en flavonoïdes. A ces fins, nous avons procédé à trois reprises différentes au dosage de ces extraits dans les conditions décrites ci-dessous. Les résultats sont réunis dans le tableau 24 . Il apparaît que la technique de dosage que nous avons mise au point peut être appliquée à des extraits d'organes de Gaude, quelle que soit leur teneur en flavonoïdes.

2.3. CONCLUSION

Réalisée dans les conditions que nous avons définies, la mesure photodensitométrique directe dans l'ultra-violet des taches obtenues après chromatographie sur couche mince de cellulose des extraits alcooliques des divers organes de la Gaude permet de connaître avec une précision supérieure à ± 12 % dans la plupart des cas, la teneur de ces organes en chacun des principaux flavonoïdes.

RACINES	Lutéolol (mg/100 g d'organe sec)	Lutéoloside (mg/100 g d'organe sec)	Glucolutéoloside (mg/100 g d'organe sec)	Produit Y Apigénol-glucose (mg/100 g d'organe sec)	Produit X_1 (Apigénol-Glucose -Glucose) (mg/100 g d'organe sec)
Dosage N° 1	0	170,7	56	54,44	106
Dosage N° 2	0	176,8	67,8	64,10	98
Dosage N° 3	0	182,5	70,7	67,32	115
Moyenne	0	176,6	64,8	61,95	106,3
Ecart-Type	0	± 6	± 7,8	± 6,7	± 8,5
Coefficient de variation %	0	± 3,4	±12	±10,8	± 8
INFLORESCENCES ENCORE EN FLEUR					
Dosage N° 1	1 835	6 227	2 900	1 981	952,5
Dosage N° 2	1 735	6 000	2 480	1 843	1 028
Dosage N° 3	1 885	7 009	3 320	2 074	777,5
Moyenne	1 818	6 412	2 900	1 966	919,3
Ecart-Type	± 76,5	± 222	± 132	± 116	± 128,5
Coefficient de variation %	± 4,2	± 3,5	± 4,5	± 5,9	± 13,9

Tableau : 24 = Dosage des flavonoïdes dans un extrait de racines et un extrait d'inflorescences en fleur de la Gaude.

3. DOSAGE DES PRINCIPAUX FLAVONOIDES DE LA GAUDE

Dans le but d'étudier les variations physiologiques des flavonoïdes de la Gaude au cours de sa végétation, nous avons appliqué la technique de dosage exposée ci-dessus aux divers organes de la plante, cueillie à différentes époques de la deuxième année de son développement, depuis celle où les feuilles sont encore "en rosette" jusqu'à celle où les graines sont mûres (stades A à J). Nous avons chaque fois traité séparément les racines, les moitiés inférieures et supérieures des tiges, les feuilles de la moitié basale et celles de la moitié apicale des tiges, les inflorescences en fleurs et en fruits.

Le tableau 25 rapporte les teneurs en chacun des principaux flavonoïdes et les teneurs globales des divers organes à chaque stade considéré.

STADES		A	B	C	D	E	F	G	H	J
Racines	l	0	0	0		0	0	0	0	0
	L	171,5	83,4	276		257	176	173	109,5	100
	GL	43,5	18,7	94		52,5	64	95,5	25,3	22
	Ga	61	23	55		106,5	64	38	40,2	22
	GGa	125	55	274		152,5	104	122	42,7	55
TOTAL		401	180,1	699		568,5	408	428,5	217,7	199
Moitiés inférieures des tiges	l		0	0	0	0	0	0	0	0
	L		88	1472	960	1323	485	690	1185	2050
	GL		373,7	1150	500	348	338	450	412	745
	Ga		332,5	259	204	218	92	153	312	302
	GGa		348	567	232	152	146	293	293	560
TOTAL			1142,2	3448	1896	2041	1061	1586	2202	3657
Moitiés supérieures des tiges	l				0	0	0	0	0	0
	L				1300	1800	1390	1235	1400	2030
	GL				677	750	940	825	545	865
	Ga				380	410	247	300	313	374
	GGa				256	390	360	480	270	490
TOTAL					2613	3350	2937	2840	2528	3759

BU LILLE

.../...

STADES		A	B	C	D	E	F	G	H	J
Feuilles portées par les moitiés inférieures des tiges	l	297	-	-	traces	traces	287	334	traces	traces
	L	6740	10790	16320	6138	3717	4320	5880	8115	7945
	GL	3260	5538	8784	4277	1420	2340	2775	3230	3655
	Ga	2270	2300	3275	1100	576	985	2760	1710	1145
	GGa	2490	3418	4030	1556	575	950	2560	1590	2160
TOTAL		15057	22046	32409	13071	6288	8882	14309	14645	14905
Feuilles portées par les moitiés supérieures des tiges	l				195	330	500	traces	570	550
	L				10906	9630	5510	6185	6730	6155
	GL				6151	3790	3330	3525	4155	2740
	Ga				2585	2157	950	1095	1050	1045
	GGa				1970	1872	1210	1660	1140	1340
TOTAL					21807	17779	11500	12465	13645	11830
Inflorescences en fruits	l						290	1360	650	510
	L						1120	4620	3530	2700
	GL						706	3320	1540	1000
	Ga						595	2100	1115	635
	GGa						245	1450	1200	735
TOTAL							2966	12850	8035	5580

BU Lille

.../...

STADES		A	B	C	D	E	F	G	H	J
Inflorescences en fleurs	l				431	587	1846	3795		
	L				14500	16540	6330	10390		
	GL				6410	4600	2565	4950		
	Ga				3515	5040	1980	3550		
	GGa				2255	2260	840	2340		
TOTAL					27111	29027	13560	25025		

Stade A = plantes "en rosette" ; Stade B = plantes possédant une courte tige ;
Stade C = plantes possédant une tige bien formée ; Stade D = plantes commençant à fleurir ;
Stade E = plantes en fleurs ; Stade F = plantes en début de fructification ;
Stade G = plantes dont les inflorescences sont aux 3/4 en fruits ;
Stade H = plantes entièrement en fruits, plantes dont les graines sont mûres.

TABLEAU 25 = Teneur en flavonoïdes (en mg pour 100 g de poids sec) des divers organes de la Gaude, au cours de sa végétation - (l = lutéolol ; L = lutéoloside ; GL = glucolutéoloside ; Ga = apigénol -7 glucose ; GGa = apigénol-glucose-glucose).

BU LILLE

C H A P I T R E

III

ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE TISSU DE GAUDE ET ETUDE DE LA FORMATION DES FLAVONOIDES.

Parallèlement à l'étude dynamique des flavonoïdes dans la Gaude, il nous a semblé intéressant d'aborder le problème de la genèse de ces composés grâce à la culture"in vitro"des tissus végétaux, technique qui s'est révélée riche en enseignements concernant nombre de constituants cellulaires : protides, glucide alcaloïdes, etc...

C'est ainsi que, dans un premier temps, nous nous sommes attachée à obtenir une souche de tissu à partir de fragments de tige de Gaude. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de mettre en évidence, dans ces tissus, la présence de dérivés flavoniques. Enfin, nous avons étudié l'influence de certains précurseurs sur l'élaboration de ces dérivés par nos cultures.

1. OBTENTION D'UNE SOUCHE DE TISSU DE GAUDE

1.1. CHOIX ET PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL

Les plantes sont récoltées entières dans la nature et traitées aussi rapidement que possible après leur cueillette. Les fragments mis en culture sont prélevés à partir des tiges. Or celles-ci sont creuses, ce qui a été, pensons-nous, à l'origine de l'infection quasi générale de nos premières cultures. Nous avons pu surmonter cet inconvénient grâce au mode opératoire suivant :

- Tremper les plantes entières dans l'éthanol à 95°, avant de détacher racine et feuilles des tiges, qui sont ensuite sectionnées en fragments de 20 à 30 cm.

- Laisser séjourner ces derniers 1/2 heure dans une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium.

- Rincer trois fois à l'eau stérile.

1.2. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS D'ENSEMENCEMENT

Nous avons respecté, tout au long de ce travail, les conditions opératoires décrites par GAUTHERET-1942-.

1.3. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

Deux objectifs ont successivement guidé nos recherches

- obtenir une culture primaire de tissu de Gaude,
- conserver la souche obtenue.

1.3.1- Obtention d'une souche de Gaude

Des fragments, de 3 cm environ, de tiges de Gaude préalablement stérilisée selon le processus exposé ci-dessus ont été simultanément ensemencés la partie apicale plongeant dans le milieu, par séries de 12 sur 5 milieux différents : α, β, γ, δ et ε dont les compositions sont rapportées dans le tableau 25, le milieu ε étant un mélange des milieux α, β et γ dans les proportions de 1/4, 1/4 et 1/2.

BU LILLE

TABLEAU 25

	Milieu α	Milieu β	Milieu γ	Milieu δ
Solution saline oligodynamique de BERTHELOT-1934	XGttes	XGttes	XGttes	XGttes
Glucose	30 g	30 g	30 g	30 g
Chlorhydrate de thiamine	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Chlorhydrate de cystéine	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Gélose	13 g	13 g	13 g	13 g
Lait de Coco	100 ml			
Suc de xylème de racine de Carotte (S.X.C.)°		100 ml		
Protéolysat de caséine			20 mg	20 mg
Cytokinine (6-furfurylaminopurine)			1 mg	1 mg
Acide naphtalène-acétique			0,01mg	0,01mg
Lutéoloside				1 mg
Solution macromoléculaire minérale de HELLER-1953	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml

Les cultures sont maintenues à la lumière du jour et à la température du laboratoire (18-22° C).

° S.X.C. : suc obtenu par simple expression du xylème prélevé sur la racine de Carotte, filtré sur papier et conservé en petits flacons stérilisés à 110° C.
Des propriétés excitoformatrices ont été mises en évidence dans ce suc - GORIS et Coll.-1971-.

Une quinzaine de jours plus tard, de petits cals étaient apparus sur un certain nombre de fragments de tige, dans chacune des séries d'expérience. Mais la plupart d'entre eux ne survivront pas.

55 jours après l'ensemencement primaire, toutes les excroissances qui avaient pris naissance sur les milieux α, δ et ε étaient mortes.

Sur les milieux β et γ, quelques fragments de tige paraissent encore vivants. Deux seulement, dans chaque série, portent une petite excroissance verte. Les tubes de ces deux séries sont décapuchonnés de façon à favoriser les échanges gazeux avec l'atmosphère ambiante.

En conclusion :

- Contrairement à nos espérances, le lait de Coco n'a pas favorisé la prolifération des tissus de tiges de Gaude.

- L'addition de lutéoloside au milieu (milieu γ) s'est révélée, tout au moins à la concentration employée, néfaste pour la survie même des explantats.

- Le milieu contenant 10 % de S.X.C. (milieu β) semble celui qui donne les meilleurs résultats.

109 jours après l'ensemencement primaire, les deux explantats sur milieu β sont encore vivants. L'excroissance présentée par l'un deux s'est nettement développée depuis l'observation précédente et se trouve maintenant au contact du milieu.

L'excroissance qui a pris naissance sur l'autre explantat est sensiblement moins grosse (Photographie 7).

L'une des deux cultures sur milieu X montre, à côté de la prolifération verte déjà observée au 55ème jour de culture et qui ne semble d'ailleurs pas avoir grossi depuis cette date, une excroissance de tissu blanc au contact du milieu. L'autre ne présente qu'une excroissance blanche au contact du milieu.

Toutes les excroissances sont détachées des fragments de tiges sur lesquels elles ont pris naissance et repiquées sur des milieux correspondants. Les tubes de culture sont capuchonnés d'étain.

67 jours plus tard il est remarquable que seules les excroissances tissulaires chlorophylliennes qui se sont formées aux dépens des assises cambiales, aient survécu, bien que leur développement soit extrêmement lent.

Les autres d'aspect blanchâtre sont mortes.

110 jours après le repiquage, les milieux sur lesquels se trouvent les excroissances (Photographie 8) commençant à se concentrer fortement, nous transférons les colonies sur des milieux de compositions identiques auxquels nous ajoutons de l'acid indolyl-acétique dans la proportion de 1 mg par litre, dans l'espoir d'accélérer le développement.

Après 120 jours de culture, l'excroissance tissulaire (Photographie 9), qui provient de l'explantat cultivé sur le milieu β renfermant 10 % de S.X.C., a maintenant atteint un volume suffisant pour pouvoir être repiquée. Son développement a été extrêmement lent : il a fallu six mois pour obtenir cette masse tissulaire. Afin de tenter de stimuler la croissance, nous inspirant des travaux de MURASHIGE et SKOOG-1962- sur la culture des tissus de Tabac, nous repiquons les cinq fragments que nous avons pu obtenir, sur le milieu I suivant :

Solution saline oligodynamique de BERTHELOT		X gouttes
Glucose		30 g
Chlorhydrate de thiamine		1 mg
Chlorhydrate de cystéine		10 mg
Acide indolyl-acétique		0,05 mg
Protéolysat de caséine		1 g
Glycocolle		2 mg
Cytokinine (6-furfurylaminopurine)		0,05 mg
Mésoinositol		1 g
Acide nicotinique		0,5 mg
Pyridoxine		0,5 mg
S.X.C.		100 ml
Gélose pour solidifier		13 g
Solution macromoléculaire minérale de HELLER	q.s.p.	1000 ml

BU LILLE

L'excroissance tissulaire qui s'était développée sur l'explantat cultivé sur le milieu γ , ne renfermant pas de S.X.C., trop peu développée pour faire l'objet d'une division, est transférée sur le milieu I. 20 jours plus tard elle est morte.

WALLACE (J.W. Jr.) -1967- Investigations of flavone biosynthesis in the Lemnaceae.
Thèse Univ. Texas, Univ. Microfilms. A Xerox Company. Ann Arbor, Michigan, U.S.A..

WEISSENBÖCK (G.), TEVINI (M.) & REZNIK (H.) -1971- Über das Vorkommen von Flavonoiden in Chloroplasten von Impatiens balsamina L..
Z. Pflanzenphysiol., 64, 274.

WONG (E.) & FRANCIS (C.) -1968- Flavonoids in genotypes of Trifolium subterraneum.Mutants of the Geraldton variety.
Phytochem., 7, 2131.

WONG (E.) & GRISEBACH (H.) -1969- Further studies on the role of chalcone and flavanone in biosynthesis of flavonoids.
Phytochem., 8, 1419.

WONG (E.) & TAYLOR (A.) -1962- The chromatography of flavonoid aglycones in the solvant system benzene-acetic acid-water.
J. Chromatogr., 9, 449.

ZAPROMETOV (M.) -1962- The mechanism of catechol biosynthesis.
Biokhimiya, 27, 366 ; C.A. 57, 2601f.

ZAPROMETOV (M.) & KOLONKOVA (S.) -1966- (Pub. 1968) Chloroplasts as the location of the synthesis of water-soluble phenolic compounds in plant cells.
Fenol'nye Soedin. Ikh Biol. Funkts., Mater. Vses. Simp., 175
C.A. 71, 10342.

ZAPROMETOV (M.), MINAEVA (V.) & KISELEVA (A.) -1972- Biosynthesis of flavonols glycosides in the plants of Bupleurum (thorowax)
Fiziol. Rast., 19, 724 ; C.A. 77, 137424.

ZENK (M.) -1967- Occurence of the "NIH shift" during "in vivo" hydroxylation of cinnamic acid in higher plants.
Z. Pflanzenphysiol., 57, 477.

Après 73 jours de culture sur le milieu I, à l'exception de l'une d'entre elles qui est morte, les colonies issues de l'explantat cultivé sur le milieu β renfermant du S.X.C., se sont suffisamment développées (Photographie 10).pour pouvoir être repiquées. Elles se présentent sous la forme de masses hémisphériques blanchâtres, parfois légèrement rosées, à surface régulière. Les tissus de trois d'entre elles sont homogènes et compacts. La quatrième colonie par contre, est hétérogène, formée en partie de tissu compact, en partie de tissu d'aspect plus lâche, translucide (Photographie 11).

Toutes les colonies sont repiquées sur le milieu I. La fraction de tissu d'aspect lâche ne se développera pas.

52 jours plus tard, certaines colonies occupent toute la surface du milieu. Nous procédons à un troisième repiquage.

53 jours plus tard, les colonies sont bien développées et ont extérieurement un aspect sain, cependant si le tissu qui les constitue est blanc et ferme à la périphérie sur 1 à 1,5 mm il se teinte très faiblement de brun vers le centre, et la zone qui est en contact avec le milieu est nettement brune et friable.

Au cours du quatrième repiquage auquel nous procédons alors, nous observons, dans un certain nombre de colonies, des lames de tissu brun qui divisent de façon très irrégulière l'ensemble de la masse tissulaire, semblant indiquer qu'en réalité les cultures étaient moins florissantes qu'elles ne le paraissaient extérieurement.

Photographie 7 - Culture primaire de tissu de Gaude âgée de 109 jours.

BU LILLE

Photographie 8 - Tissu de Gaude âgé de 110 jours. A gauche, sur milieu β renfermant du S.X.C., à droite sur milieu γ sans S.X.C.

Photographie 9 - Tissu de Gaude âgé de 230 jours. A gauche, sur milieu β renfermant du S.X.C., à droite sur milieu γ sans S.X.C.

Photographie 10

Photographie 11

Photographies 10 et 11 - Colonies de tissu de Gaude provenant de l'explantat obtenu sur milieu β renfermant du S.X.C., cultivées depuis 73 jours sur milieu I. En 11, à droite : colonie homogène, à gauche : colonie hétérogène portant du tissu translucide à sa partie supérieure.

Nous sommes alors en possession d'une souche de tissu de Gaude (RESEDA LUTEOLA L.) et d'un milieu, le milieu I, sur lequel elle prolifère de façon correcte. Mais celui-ci se révèle à la longue assez toxique pour que se pose à nous la question du choix d'un milieu d'entretien.

1.3.2-Conservation de la souche

Il s'agit de sélectionner le milieu le moins complexe possible, qui assure la pérennité de la souche isolée, dans les meilleures conditions quant à sa vitesse de croissance et à la qualité de ses tissus.

1.3.2.1-Principe de la mise au point

Des explantats calibrés de tissu de Gaude isolé sur le milieu I sont ensemencés sur des milieux de composition variable, le milieu I servant de référence.

Après une période déterminée par la vitesse de croissance des colonies, celles-ci sont pesées à l'état frais et repiquées sur leurs milieux respectifs. L'étude de la variance des poids frais par le test F de SNEDECOR permet de dégager les différences significatives qui peuvent apparaître en fonction des conditions de culture.

1.3.2.2.Composition des milieux de culture essayés

Les variations dans la composition des milieux qui ont été employés portaient, d'une part sur la nature des substances organiques introduites, d'autre part sur la présence ou non de

S.X.C.. Le tableau 26 permet de comparer la composition des milieux I, A, B, C et D.

TABLEAU 26

	Milieu I	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D
Solution saline oligodynamique de BERTHELOT	XGttes	XGttes	XGttes	XGttes	XGttes
Glucose	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Chlorhydrate de thiamine	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Chlorhydrate de cystéine	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Acide indolyl-acétique	0,05 mg	0,05 mg	0,05 mg	0,05 mg	0,05 mg
Protéolysat de caséine	1 g				
Glycocolle	2 mg				
Cytokinine (6-furfurylaminopurine)	0,05 mg	0,05 mg	0,05 mg		
Mésoinositol	1 g	1 g	1 g		
Acide nicotinique	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg		
Pyridoxine	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg		
S.X.C.	100 ml	100 ml		100 ml	
Gélose pour solidifier	13 g	13 g	13 g	13 g	13 g
Solution macromoléculaire minérale de HELLER	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml	q.s.p. 1000 ml

BU LILLE

1.3.2.3- Résultats

Au 38ème jour de culture, l'observation des colonies permet déjà de faire deux remarques :

- Le S.X.C. semble exercer une action favorable sur la croissance du tissu de Gaude "in vitro" : les colonies placées sur les milieux I, A et C, qui renferment 10 % de S.X.C., se sont mieux développées que celles placées sur les milieux B et D qui en sont privés.

- Les facteurs de croissance que sont la cytokinine, le mésoinositol, l'acide nicotinique et la pyridoxine ne semblent pas indispensables au développement du tissu de Gaude "in vitro": aucune différence ne peut être relevée entre les colonies poussant sur les milieux A et B, qui se distinguent uniquement par la présence ou non de ces composés.

Après 65 jours de culture, les colonies se sont bien développées sur les milieux I, A et C qui renferment du S.X.C. (photographies 12, 13 et 14). Elles sont blanches ou un peu rosées, légèrement brunâtres au contact du milieu, surtout au niveau de l'explantat initial, dont la base est généralement nécrosée, cette action toxique étant d'ailleurs plus sensible dans les cas des milieux A et I, que dans celui de C.

Sur les milieux B et D, les colonies ont bien proliféré Elles sont blanches à peine brunâtres au niveau de l'explantat initial, mais leur croissance bien que régulière est nettement plus faible que sur les milieux précédents (Photographies 15, 16).

Les colonies sont pesées à l'état frais, avant d'être repiquées sur le milieu sur lequel elles se sont précédemment développées. La confrontation des résultats obtenus selon les milieux de culture appelle de nouvelles remarques :

1) Comparaison entre les cultures faites sur les milieux renfermant 10 % de S.X.C. (Milieux I, A et C)

La présence dans le milieu de culture des acides aminés que sont le protéolysat de caséine et le glycocolle, et des facteurs de croissance que sont la cytokinine, le mésoinositol, l'acide nicotinique et la pyridoxine entraîne une croissance de tissu de Gaude plus rapide que sur un milieu qui en est privé (test de SNEDECOR entre les milieux I et C significatif à 99 % - Tableau 27).

Pourtant si l'on prive le milieu uniquement des acides aminés cités plus haut, la vitesse de croissance reste pratiquement inchangée (test de SNEDECOR entre les milieux I et A non significatif-Tabl. 28), ce qui inclinerait à considérer comme très faible le rôle joué par les acides aminés en présence de

Photographie 12 Photographie 13

BU LILLE

Photographie 14

Photographies 12, 13, 14- Colonies de tissu de Gaude âgées de 65 jours, cultivées respectivement sur les milieux I, A et C renfermant du S.X.C.

Photographie 15 Photographie 16

Photographies 15 et 16 - Colonies de tissu de Gaude âgées de 65 jours, cultivées respectivement sur les milieux B et D sans S.X.C.

Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effet
Milieu I Milieu C	Traitement Erreur Totale	802 143 1 582 831 2 384 974	1 17 18	802 143 93 108	Fe = 8,60 Fo,o5= 4,45 Fo,o1= 8,40	99 %
Milieu I Milieu A	Traitement Erreur Totale	328 778 2 243 525 2 572 303	1 17 18	328 778 131 972	Fe = 2,5 Fo,o5= 4,45 Fo,o1= 8,40	nulle
Milieu A Milieu C	Traitement Erreur Totale	98 641 1 660 021 1 758 662	1 16 17	98 641 103 751	Fe = 0,95 Fo,o5= 4,49 Fo,o1= 8,53	nulle

Tableau 27= Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude cultivées sur des milieux différents A, I et C, renfermant tous 10 % de S.X.C.

BU LILLE

Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effet
Milieu B Milieu D	Traitement Erreur Totale	526 881 52 208 579 089	1 22 23	526 881 2 373	Fe = 222 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 7,94	99 %

Tableau 28= Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude cultivées sur les milieux B et D, qui renferment 10 % de S.X.C.

S.X.C. .

D'autre part, entre un milieu privé de protéolysat de caséine et de glycocolle, mais renfermant les facteurs de croissance cités plus haut, et un milieu ne renfermant aucun de ces éléments, on n'observe aucune différence, (test de SNEDECOR entre les milieux A et C non significatif-Tabl. 27), ce qui laisse croire que ces facteurs de croissance restent sans action sur la vitesse de développement des tissus en présence de S.X.C..

Parmi les milieux étudiés renfermant 10 % de S.X.C., le milieu I riche à la fois en acides aminés et en facteurs de croissance se révèle être le plus stimulant.

2) Comparaison entre les cultures réalisées sur des milieux privés de S.X.C. (Milieux B et D)

Contrairement à ce que nous avons observé avec les milieux qui renfermaient du S.X.C., les facteurs de croissance que sont la cytokinine , le mésoinositol, l'acide nicotinique et la pyridoxine exercent, même en l'absence de protéolysat de caséine et de glycocolle, une action stimulante notable sur la croissance du tissu de Gaude (test de SNEDECOR entre les milieux B et D significatif à 99 %- Tableau 28).

3) Comparaison entre les cultures effectuées sur des milieux différant par la présence ou non de S.X.C.

La comparaison deux à deux des cultures réalisées sur les milieux I, A et C, qui renfermaient 10 % de S.X.C. d'une part, avec celles qui se sont développées sur les milieux B et D qui en étaient privés, d'autre part, fait ressortir l'importance

de celui-ci pour la croissance du tissu de Gaude "in vitro" - (Tableau 29).

Test de	SNEDECOR	entre les milieux	B et I	significatif à	99 %
"	"	"	B et A	"	"
"	"	"	B et C	"	"
"	"	"	D et I	"	"
"	"	"	D et A	"	"
"	"	"	D et C	"	"

On peut noter d'ailleurs que le S.X.C. exerce une action stimulante sur la croissance du tissu de Gaude "in vitro" supérieure à celle que peuvent avoir les facteurs de croissance que sont la cytokinine, le mésoinositol, l'acide nicotinique et la pyridoxine réunis, même associés à du protéolysat de caséine et à du glycocolle.

Sans préjuger de la nature de la substance excitoformatrice, il est permis cependant d'affirmer que l'action exercée par le S.X.C. ne résulte pas d'un apport supplèmentaire en sucre cet apport, variable avec les sucs, étant de l'ordre de 2 g par litre de milieu.

Ultérieurement à nos travaux, THOMAS -1971- a montré que l'effet stimulant exercé par le S.X.C. sur la croissance du tissu de Gaude n'était pas dû non plus à l'apport, pourtant non négligeable, en potassium.

Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effet
Milieu I Milieu B	Traitement Erreur Totale	4 323 621 1 045 979 5 369 600	1 20 21	4 323 621 52 299.	Fe = 82,6 Fo,o5= 4,35 Fo,o1= 8,10	99 %
Milieu A Milieu B	Traitement Erreur Totale	2 020 910 1 123 169 3 144 079	1 19 20	2 020 910 59 114	Fe = 34 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu B Milieu C	Traitement Erreur Totale	1 179 024 462 475 1 641 499	1 19 20	1 179 024 24 341	Fe = 48,4 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu I Milieu D	Traitement Erreur Totale	9 658 491 1 172 563 10 831 054	1 22 23	9 658 491 53 298	Fe = 18,1 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 7,94	99 %
Milieu A Milieu D	Traitement Erreur Totale	4 383 195 1 249 753 5 632 948	1 19 20	4 383 195 65 776	Fe = 66,6 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu C Milieu D	Traitement Erreur Totale	3 045 103 589 059 3 634 162	1 19 20	3 045 103 31 003	Fe = 98 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %

BU LILLE

Tableau 29= Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude cultivées sue des milieux différents, renfermant ou non du S.X.C.

Après 64 jours de culture, nous avons de nouveau examiné les colonies avant de les repiquer sur leurs milieux respectifs (Tableau 30).

- Sur les milieux I, A et C, les colonies ont bien proliféré. Elles sont un peu plus grosses sur le premier, plus régulières sur le dernier.

- Sur les milieux B et D, privés de S.X.C., par contre, les colonies sont nettement plus petites, très irrégulières en outre sur le milieu B.

L'étude de la variance des poids frais par le test F de SNEDECOR (Tabl.31), permet de confirmer les conclusions formulées 64 jours plus tôt en particulier en ce qui concerne l'importance du rôle joué par le S.X.C. dans la croissance du tissu de Gaude.

Considérant l'évolution des poids frais des colonies cultivées pendant trois périodes successives et égales sur un même milieu (§) (Figure25), notre choix d'un milieu d'entretien de la souche de Gaude s'est porté sur le milieu C, un peu moins favorable que le milieu I à la croissance des tissus, mais de façon non significative (Tabl.32), et présentant le double avantage d'être moins toxique et moins complexe que lui.

L'observation au microscope de coupes pratiquées dans des colonies développées sur ce milieu révèle une structure anatomique comportant un parenchyme fondamental sans organisation apparente, présentant çà et là, en plus ou moins grande abondance selon les régions, des cellules différenciées en courtes trachéides, isolées ou associés par petis groupes (Photographie17).

(§) Nous n'avons constaté aucune variation significative des poids frais entre deux passages successifs sur un même milieu (Tableau 30).

Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effet
ilieu I er passage ilieu I e passage	Traitement Erreur Totale	6 378 2 597 378 2 603 756	1 19 20	6 378 136 704	Fe = 0,04 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	nulle
ilieu A r passage ilieu A e passage	Traitement Erreur Totale	102 398 2 210 785 2 313 183	1 18 19	102 398 122 821	Fe = 0,80 Fo,o5= 4,41 Fo,o1= 8,28	nulle
Milieu B r passage ilieu B e passage	Traitement Erreur Totale	11 242 251 011 262 253	1 18 19	11 242 13 945	Fe = 0,80 Fo,o5= 4,41 Fo,01= 8,28	nulle
ilieu C r passage ilieu C e passage	Traitement Erreur Totale	108 980 1 688 209 1 797 189	1 19 20	108 980 88 853	Fe = 1,20 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	nulle
ilieu D r passage ilieu D e passage	Traitement Erreur Totale	113 575 202 310 315 885	1 22 23	113 575 9 195	Fe = 12,30 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 7,94	99 %

BU Lille

Tableau 30 = Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude, cultivées deux fois de suite sur le même milieu.

Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effe
Milieu I Milieu C	Traitement Erreur Totale	519 477 2 702 757 3 222 234	1 21 22	519 477 128 702	Fe= 4 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	nulle
Milieu I Milieu A	Traitement Erreur Totale	131 355 2 564 639 2 695 994	1 20 21	131 355 128 232	Fe = 1 Fo,o5= 4,35 Fo,o1= 8,10	nulle
Milieu A Milieu C	Traitement Erreur Totale	122 863 2 238 974 2 361 837	1 21 22	122 863 106 618	Fe = 1 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	nulle
Milieu B Milieu D	Traitement Erreur Totale	158 454 401 113 559 567	1 18 19	158 454 22 284	Fe = 7 Fo,o5= 4,41 Fo,o1= 8,28	95 %
Milieu I Milieu B	Traitement Erreur Totale	4 390 527 1 802 410 6 192 937	1 17 18	4 390 527 106 024	Fe = 41 Fo,o5= 4,45 Fo,o1= 8,40	99 %
Milieu A Milieu B	Traitement Erreur Totale	3 107 329 1 338 627 4 445 956	1 17 18	3 107 329 78 742	Fe = 39,5 Fo,o5= 4,45 Fo,o1= 8,40	99 %
Milieu B Milieu C	Traitement Erreur Totale	2 172 579 1 476 745 3 649 324	1 18 19	2 172 579 82 041	Fe = 26 Fo,o5= 4,41 Fo,o1= 8,28	99 %
Milieu I Milieu D	Traitement Erreur Totale	6 743 602 1 627 125 8 370 727	1 21 22	6 743 603 77 482	Fe = 87 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	99 %
Milieu A Milieu D	Traitement Erreur Totale	4 957 791 1 163 342 6 121 133	1 21 22	4 957 791 50 635	Fe = 98 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	99 %

BU LILLE

Milieu C Milieu D	Traitement Erreur Totale	3 679 708 1 301 460 4 981 168	1 22 23	3 679 708 59 157	Fe = 62 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 7,94	99 %

BU LILLE

Tableau 31= Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude, 2ème passage, sur différents milieux renfermant ou non du S.X.C.

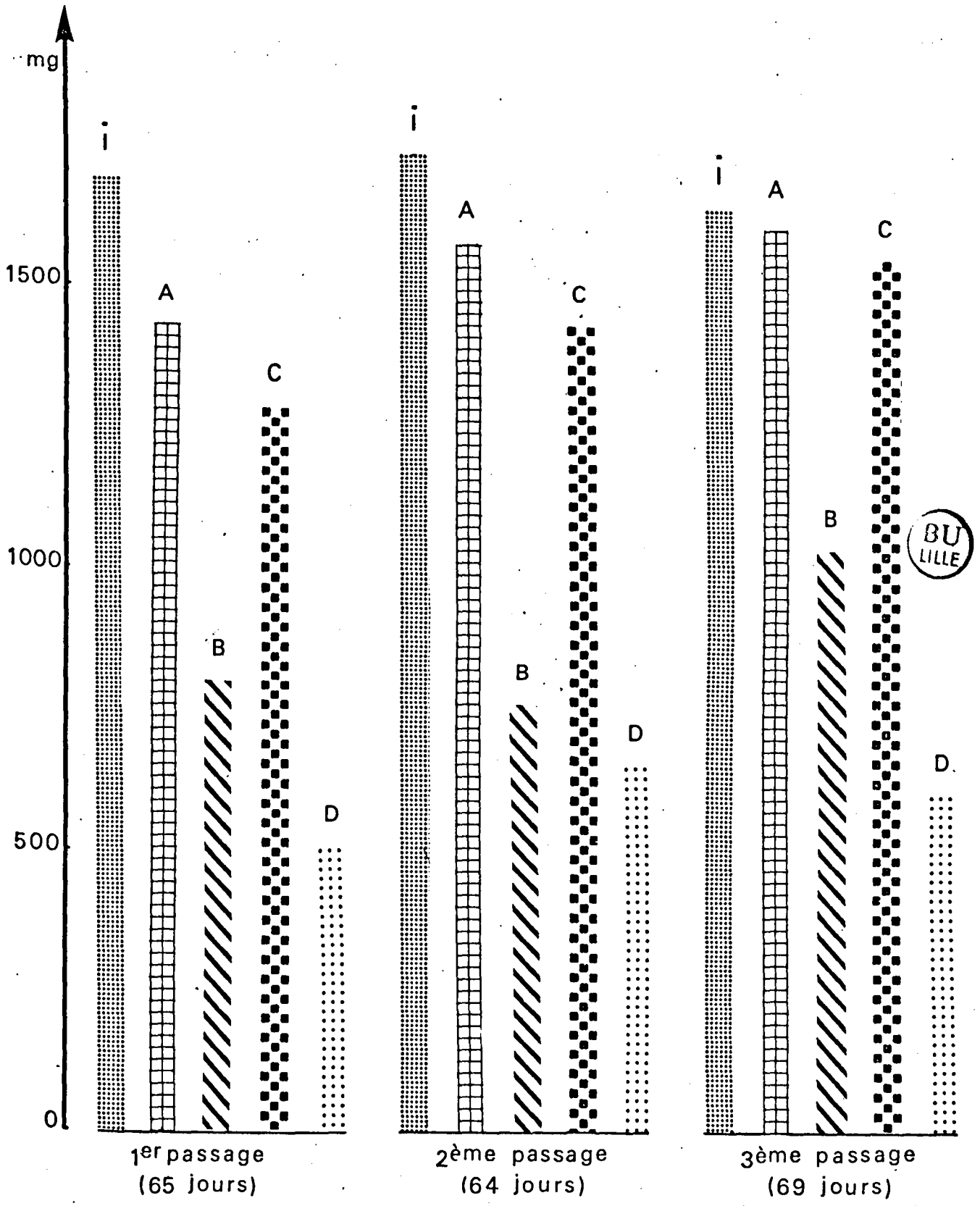
Cultures	Origine de la variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Variance	F de SNEDECOR	Probabilité d'effet
Milieu I Milieu C	Traitement Erreur Totale	1 978 1 772 129 1 774 107	1 19 20	1 978 93 269	Fe = 0,20 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	nulle
Milieu I Milieu A	Traitement Erreur Totale	38 918 1 939 151 1 978 069	1 21 22	38 918 92 340	Fe = 0,40 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	nulle
Milieu A Milieu C	Traitement Erreur Totale	19 483 886 373 905 856	1 18 19	19 483 49 242	Fe = 0,40 Fo,o5= 4,41 Fo,o1= 8,28	nulle
Milieu B Milieu D	Traitement Erreur Totale	928 140 359 082 1 287 222	1 19 20	928 140 1 889	Fe = 4,91 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu I Milieu B	Traitement Erreur Totale	2 181 352 1 716 044 3 897 396	1 22 23	2 181 352 78 002	Fe = 28 Fo,o5= 4,30 Fo,o1= 7,94	99 %
Milieu A Milieu B	Traitement Erreur Totale	1 750 083 663 267 2 413 350	1 19 20	1 750 083 34 908	Fe = 50 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu B Milieu C	Traitement Erreur Totale	1 555 502 830 289 2 385 791	1 21 22	1 555 502 39 537	Fe = 39 Fo,o5= 4,32 Fo,o1= 8,02	99 %
Milieu I Milieu D	Traitement Erreur Totale	5 432 539 1 467 944 6 900 483	1 19 20	5 432 539 77 260	Fe = 70 Fo,o5= 4,38 Fo,o1= 8,18	99 %
Milieu A Milieu D	Traitement Erreur Totale	4 573 800 415 167 4 988 967	1 16 17	4 573 800 25 947	Fe = 176 Fo,o5= 4,49 Fo,o1= 8,53	99 %

BU LILLE

lieu C lieu D	Traitement Erreur Totale	4 424 490 582 188 5 006 678	1 18 19	4 424 490 32 343	Fe = 136 Fo,o5= 4,41 Fo,o1= 8,28	99 %

BU LILLE

Tableau 32= Analyse de la variance, par le test de SNEDECOR, pour des colonies de tissu de Gaude, 3ème passage sur différents milieux, renfermant ou non du S.X.C.



BU LILLE

Figure 25. Poids frais moyen d'une colonie en fonction du milieu de culture.

Photographie 17 - Coupe de tissu de Gaude montrant des trachéides et du tissu indifférencié. (x 100).

Photographie 18 - Coupe de tissu de Gaude présentant des nodules. (x 250).

Par places, on peut voir aussi des nodules plus ou moins sphériques comportant un centre formé d'amas de trachéides disposées sans orientation précise, entouré de cellules parenchymateuses, allongées tangentiellement, mais non organisées, semble-t-il, en zone génératrice (Photographie 18).

2. RECHERCHE DE FLAVONOIDES DANS LE TISSU DE GAUDE CULTIVE "IN VITRO"

Bien naturellement s'est posée à nous la question de la présence de flavonoïdes dans le tissu de Gaude cultivé "in vitro". Aussi au cours des différents essais de cultures que nous venons d'exposer, les avons-nous recherchés, lors de chaque repiquage, dans un certain nombre de colonies non utilisées pour le prélèvement des explantats.

2.1. EXTRACTION DES FLAVONOIDES

Les tissus de Gaude cultivés "in vitro", préalablement pesés, sont épuisés par un volume suffisant d'éthanol à 90° porté à l'ébullition. Après filtration, l'extrait alcoolique est concentré à sec par distillation et le résidu repris par de l'éthanol ammoniacal (§) dans la proportion de 0,5 ml par gramme de tissu.

2.2. ESSAIS D'IDENTIFICATION DES FLAVONOIDES

La solution précédemment obtenue est partagée en deux parts :

- sur l'une nous effectuons la réaction dite"de la cyanidine" (chapitre I-2-1-1-2-1).

- sur l'autre nous réalisons des essais chromatographiques, plus sensibles que la réaction chimique.

(§) Ethanol à 60° additionné de XI gouttes d'ammoniaque pure pour 100 ml.

Deux techniques utilisant des solutions témoins préparées avec les flavonoïdes isolés de la Gaude sont appliquées. L'une est une chromatographie descendante sur papier Arches 302 avec le mélange de Partridge (n-butanol-acide acétique-eau : 4-1-5 (v/v))comme solvant de développement.
L'autre est une chromatographie ascendante sur le même papier avec une solution aqueuse à 60 % (v/v) d'acide acétique. Après séchage, les chromatogrammes sont observés en lumière de Wood, puis révélés par pulvérisation d'une solution alcoolique de potasse à 5 % (v/v).

Quelle qu'ait été la technique d'identification utilisée, jamais nous n'avons pu mettre en évidence, dans l'un ou l'autre des divers tissus analysés, de dérivés flavoniques identiques ou non à ceux de la Gaude.

L'hypothèse selon laquelle le tissu de Gaude en culture "in vitro" est probablement incapable de synthétiser, à partir des seules substances présentes dans le milieu de culture mis à sa disposition, les constituants de base nécessaires à l'élaboration des flavonoïdes, nous a conduite à penser qu'en les lui fournissant cela deviendrait possible.

3. ACTION DE PRECURSEURS DES FLAVONOIDES SUR LE TISSU DE GAUDE CULTIVE "IN VITRO"

3.1. PARTIE EXPERIMENTALE

Divers travaux ont montré que, parmi les précurseurs probables des flavonoïdes, se rangeaient l'acide acétique (GRISEBACH-1957, HUTCHINSON et Coll. -1959) capable de servir à la synthèse du noyau phényl A de la chromone, ainsi que la L. phénylalanine (UNDERHILL et Coll.-1957, GRISEBACH-1958) l'acide shikimique (UNDERHILL et Coll.-1957, ZAPROMETOV -1962) et l'acide cinnamique (UNDERHILL et Coll. - 1957) qui participeraient à la synthèse du noyau B et de l'élément central à trois atomes

de carbone.

Nous inspirant de ces données, nous avons procédé à 4 séries d'expériences en enrichissant le milieu sélectionné pour l'entretien de la souche de Gaude en l'un des composés suivants, à la concentration de $\frac{M}{100}$ par litre : acide acétique§ L.phénylalanine, acide shikimique§§ et acide cinnamique§§. Dans un 5ème essai, nous avons employé le milieu enrichi à la fois en acide acétique§ et en L.phénylalanine, chacun à la même concentration de $\frac{M}{100}$ par litre.

Sur chacun des milieux ainsi obtenus, de même que sur le milieu d'entretien, qui sert de référence, nous avons repiqué 10 explantats de tissu de Gaude. Les cultures, maintenues à la lumière du nycthémère, se sont développées depuis la fin octobre jusqu'au dernier jour de décembre (63 jours), date à laquelle nous les avons prélevées pour y rechercher, selon la technique déjà indiquée, la présence de flavonoïdes : aucun des tissus formés n'a produit de flavonoïdes.

Notons que les explantats sur acide cinnamique ne se sont pas développés, ce qui indique une forte toxicité de ce composé. Sur l'acide shikimique, la croissance était normale, tandis que l'acide acétique et la L.phénylalanine se sont montrés légèrement toxiques pour les tissus, toxicité plus marquée d'ailleurs lorsque ces deux substances sont associées.

§. sous forme d'acétate de sodium.
§§ le milieu a été ramené à pH=6 par quelques gouttes de soude.

Nous avons donc repris l'expérience sur ces deux derniers précurseurs avec des doses dix fois plus faibles. Après 91 jours de culture, les colonies bien développées présentaient, en outre, des plages chlorophylliennes, plus nettes peut-être sur L. phénylalanine. Il est possible qu'un éclairement plus intense soit à l'origine de cette formation de chlorophylle.

Les réactions d'identification des flavonoïdes ont été, cette fois encore, négatives.

3.2. INTERPRETATIONS DES RESULTATS.

L'absence de flavonoïdes dans les tissus de Gaude cultivés "in vitro", même lorsque les milieux leur apportent les précurseurs supposés, ne doit pas être considérée pour autant comme une négation catégorique des données actuellement admises sur la génèse de ces dérivés. Soulignons pourtant que DELAVEAU-1967-, lui non plus, n'a pu observer leur formation dans des feuilles de Grande Capucine (Tropaeolum majus L.) maintenues sur une solution d'acétate de sodium marqué au Carbone 14.

Nous pensons en effet que différents facteurs peuvent être intervenus, de façon défavorable, dans notre expérience, à savoir l'intensité et la durée de l'éclairement journalier et la nature du tissu cultivé.

La lumière est un facteur dont le rôle sur la genèse et le métabolisme des flavonoïdes semble "à priori" considérable. En fait les résultats expérimentaux sont nuancés : NICK-1953- montre qu'en présence de sucres les feuilles étiolées de Polygonum bistorta L. ne synthétisent ces composés qu'à la lumière. BASSLER-1957- observe que la teneur en flavonoïdes des feuilles de Fagopyrum sagitatum Gilib et de F. tataricum L. est plus

élevée chez les plantes éclairées naturellement que chez celles qui sont maintenues à l'ombre. Mais d'après cet auteur, la lumière ne serait pas un facteur indispensable à leur apparition elle n'agirait que sur leur taux par son intensité et sa durée d'action. Pour AHLGRIMM-1956, ainsi que pour GRISEBACH et BOPP-1959, la lumière n'est pas un facteur essentiel à la genèse des flavonoïdes chez le Sarrasin. Par contre, d'après STAFFORD-1965 elle le serait chez de très jeunes plantules de Sorghum vulgare Pers. DELAVEAU-1967, quant à lui, indique qu'à une grande différence de niveau d'éclairement correspond chez les plantes assez évoluées de Grande Capucine une variation marquée de la teneur en flavonoïdes, tandis que chez les jeunes plantes cette variation reste faible. Il montre d'autre part que des feuilles excisées de plantules étiolées placées pendant trois jours à l'obscurité sur des solutions aqueuses à 5 % de glucose ou de saccharose ne forment aucun dérivé flavonique, alors qu'un très faible stimulus lumineux y déclanche leur apparition.

La lumière semble donc indispensable au déclenchement de la synthèse des flavonoïdes, mais il suffit d'une intensité faible et de courte durée.

Sans doute, dans le cas des plantes vertes, l'influence favorable observée résulterait-elle en fait d'une production accrue des précurseurs par suite de la stimulation de la photosynthèse.

Ce ne serait donc pas à un manque de lumière qu'il faudrait attribuer l'absence de dérivés flavoniques dans les tissus de Gaude cultivés "in vitro". Ce facteur était en effet suffisant dans nos expériences pour déclancher leur formation en quantité telle que l'analyse chromatographique les révèle, si tous les éléments nécessaires avaient été réunis.

Le défaut de formation de dérivés flavoniques n'est-il pas dû, en réalité, à la nature même des cellules de la souche de Gaude qui a servi à nos expériences ?

En effet, il faut noter que pour des cellules qui ne sont plus placées sous l'influence directe ou indirecte des autres parties de la plante, il y a, comme l'écrit PETIARD-1970, "rupture des phénomènes de corrélation".De plus, les conditions, particulières de nutrition qui sont imposées aux cellules, l'addition, en particulier, d'hormones végétales aux milieux de culture, peuvent être à l'origine d'une"dérégulation cellulaire". Il n'est pas impossible que ces deux "chocs" se traduisent entre autres par l'arrêt de certains phénomènes de synthèse.

D'autre part, si l'on peut détecter des flavonoïdes dans des organes végétaux profonds, racines, rhizomes, tubercules, graines, ils sont essentiellement localisés dans les tissus superficiels d'organes aériens : grains de pollen, pétales de fleurs, fruits, feuilles, tiges chlorophylliennes. Ainsi HEIN-1959 caractérise les flavonoïdes dans les pétioles et les jeunes tiges de Verbascum phlomoïdes L., au niveau de l'épiderme des poils et du parenchyme cortical, phloème, xylème et cambium n'en renfermant pas. Madame TRONCHET-1968 constate également que les flavonols mis en évidence dans le limbe des feuilles de Bryophyllum crenatum Back sont strictement localisés dans les épidermes, à l'exclusion du mésophylle. TISSUT-1969 arrive à des conclusions similaires lors de l'étude de la feuille de Hêtre et par des techniques histo-chimiques appliquées à des coupes d'organes de diverses plantes, GUERIN et Coll.-1971 ont mis des dérivés flavoniques en évidence principalement dans les épidermes et l'assise palissadique des feuilles et à la périphérie des tiges. Rappelons que nous-mêmes (Chapitre I - 4.4) appliquant les mêmes techniques aux organes de

la Gaude, avons observé des flavonoïdes dans les cellules épidermiques et endodermiques des feuilles et dans l'épiderme, l'endoderme et le parenchyme médullaire des tiges. Nous n'avons pu les mettre en évidence dans les racines, mais nous savons que ces organes en renferment très peu.

Il est remarquable que jamais encore à ce jour on n'a pu détecter de flavonoïdes dans le tissu cambial, dont le tissu de notre souche, rappelons-le est issu.

En ce qui concerne les cultures de tissu proprement dites, signalons que KOZJEK-1968 n'a pu révéler aucune trace de flavonoïdes, bien que leur teneur en acides phénoliques ait augmenté, dans des tissus cultivés "in vitro" obtenus à partir de tige de Vincetoxicum officinale L., qui contient normalement des flavonols et des flavonolosides. Ces dérivés n'ont pas pu être davantage identifiés dans des tissus issus de la zone cambiale de la nervure principale d'une feuille de cette plante par NETIEN et Coll.-1968. Ces auteurs ont également noté l'absence de flavonoïdes dans des tissus de tige de Thé les catéchines les plus simples à l'exclusion de plus complexes, attribuant cette incapacité d'élaboration au processus de vacuolisation cellulaire.

Faut-il déduire de tout cela que les cellules issues du tissu cambial, cellules d'origine secondaire, ne possèdent pas, quelle que soit l'espèce, l'équipement enzymatique L.phénylalanine ammoniac-lyase, acide trans-cinnamique 4 hydroxylase en particulier nécessaire à la synthèse flavonique, ou à celle du phytochrome, qui activé par la lumière, stimule la formation ou l'activité des précédents enzymes ? BOTTOMLEY et Coll.-1966, HARPER et Coll.-1969.

La question reste posée de savoir s'il serait possible que ce tissu acquiert, sous l'influence de facteurs convenables, cette faculté de synthèse particulière, que d'autres cellules de la même plante possèdent, mais qui leur manque.

C H A P I T R E

IV

ACTION DES FLAVONOIDES DE LA GAUDE SUR LE TISSU DE CAROTTE

L'étude des facteurs qui favorisent la croissance des tissus végétaux en culture "in vitro" a suscité des travaux de toutes sortes. Notre attention fut attirée particulièrement par ceux de KOVOOR-1954- et de NITSCH et NITSCH-1959- qui ont mis en évidence, pour le premier, l'action stimulante du jus d'Orange sur la croissance des tissus de Topinambour, de Carotte et de crown-gall de Scorsonère, pour le second, celle du jus de Tomate sur les tissus de tubercule de Topinambour. La présence de flavonoïdes dans ces extraits végétaux a conduit NITSCH et Coll. à utiliser le test de la croissance du tissu de tubercule de Topinambour pour étudier l'effet de dérivés flavoniques connus à des concentrations diverses. NITSCH et NITSCH-1960-, NITSCH et PARIS-1962-. Les résultats obtenus en présence d'acide indolyl-acétique avec certains d'entre eux nous ont incitée à mesurer l'action des flavonoïdes de la Gaude sur la croissance du tissu de Carotte en culture "in vitro" (§) (§§).

Nous avons tenu d'autre part, au terme de chaque expérience, à vérifier la nature des dérivés flavoniques présents dans chaque milieu, et à rechercher et identifier, s'il y avait lieu, ceux que renfermaient les tissus formés.

(§) Il ne nous a pas semblé opportun d'employer, pour cette étude, le tissu de Gaude, sur lequel le lutéoloside s'était montré toxique, lors d'expériences précédentes. (Chapitre III - 1-3-1).

(§§) Nous avons utilisé la souche de Carotte isolée par GAUTHERET

1. ACTION DES FLAVONOIDES DE LA GAUDE SUR LE DEVELOPPEMENT DU TISSU DE CAROTTE (§§) EN CULTURE "IN VITRO"

1.1. PREMIERE EXPERIENCE

1.1.1- Milieu de culture

La composition du milieu de base était la suivante :

Solution saline oligodynamique de BERTHELOT..... X gouttes.
Glucose..... 30 g
Chlorhydrate de cystéine..... 10 mg
Chlorhydrate de thiamine..... 1 mg
Acide indolyl-acétique..... 0,05 mg
Gélose pour solidifier..... 13 g
Solution macromoléculaire minérale de HELLER.....q.s.p.1000 ml

Nous avons préparé huit autres milieux en ajoutant à ce milieu de base, aux concentrations de 10^{-3} et de 10^{-6} mole par litre, pour chacun des flavonoïdes isolés de la Gaude : lutéoloside (7-monoglucoside du lutéolol), glucolutéoloside (diglucoside du lutéolol) et 7-monoglucoside de l'apigénol, dissous dans des alcools de titres convenables. Le pH des milieu a toujours été ajusté à 5, avant stérilisation à l'autoclave à 110° C pendant vingt minutes (§).

Douze fragments calibrés (cubes de 5 mm d'arête) de tissu de Carotte ont été ensemencés sur chacun des milieux, les cultures sur milieu de base devant servir de témoins.

Après 69 jours de culture à 20° C environ et à la lumière du jour, les cultures ont été pesées. (Tableau 33).

(§§) Nous avons utilisé la souche de Carotte isolée par GAUTHERET.

(§) Nous avons chaque fois vérifié que les glucosides ne subissaient pas d'hydrolyse sous l'action de la chaleur.

Concentration du flavonoïde en mole par litre	Témoins			Lutéolol			Lutéoloside			7-monoglucoside de l'apigénol			Gluco-lutéoloside		
	P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg
10^{-3}	769,5	52,35	27,70	122,5	11,10	6,60	103,5	7,55	4,6	103	7,40	4,25	856	58,65	28,65
10^{-6}	831,5	58,60	31,20	896,5	63,20	33,20	917,5	60,10	32,10	808,5	58,40	31,15	761	55,95	26,25

Tableau 33 = Influence de la nature et de la concentration des flavonoïdes sur la croissance du tissu de Carotte.

P. F. = Poids frais moyen d'une colonie

P. S. = Poids sec moyen d'une colonie

P. = Poids moyen de pulpe pour une colonie

BU LILLE

1.1.2. Résultats

Sur tous les milieux renfermant les flavonoïdes à la concentration de 10^{-6} mole par litre, des excroissances se sont développées de façon comparable à la série témoin.

Sur les milieux contenant du lutéolol, du lutéoloside ou du 7-monoglucoside de l'apigénol à la concentration de 10^{-3} mole par litre, aucun des fragments de tissu mis en culture n'a proliféré. Ils ont pris une teinte brun-verdâtre, noire même au contact du milieu.

Sur le milieu qui renfermait du diglucoside de lutéolol à la même concentration, des cals sont apparus et se sont bien développés. Leur tissu avait une belle couleur vert clair, se teintant superficiellement de noir seulement au contact du milieu

1.1.3. Conclusions

Introduits dans le milieu de culture à la concentration de 10^{-6} mole par litre, chacun des flavonoïdes employés laisse le tissu de Carotte se développer de façon tout à fait comparable au lot témoin.

A la concentration de 10^{-3} mole par litre de milieu, par contre, l'aglycone et les deux monoglucosides flavoniques isolés de la Gaude se montrent toxiques pour le tissu de Carotte en culture "in vitro". Seul le diglucoside du lutéolol semble n'avoir aucun effet.

Cette différence de toxicité qui se manifeste, pour une même dose, entre l'aglycone et les monoglucosides employés d'une part, et le diglucoside d'autre part, a retenu notre attention.

Nous l'avons rapprochée de l'hypothèse soutenue par GORIS-1964 selon laquelle la combinaison des aglycones, le plus souvent phénoliques, donc toxiques pour la cellule, avec un ose serait un mécanisme de détoxication. Les travaux de GORIS-1965 sur la toxicité comparée de la vanilline et du vanilloside vis à vis des cultures "in vitro" de tissu de Carotte sont d'ailleurs en faveur de cette hypothèse.

Nous nous sommes donc posé la question de savoir s'il existait une dose à laquelle le monoglucoside du lutéolol, ajouté au milieu de culture, se montrait moins toxique pour le tissu de Carotte que le lutéolol lui-même. C'est pour tenter d'y répondre que nous avons fait les essais suivants.

1.2. DEUXIEME EXPERIENCE

1.2.1- Milieux de culture

Douze fragments calibrés de tissu de Carotte furent ensemencés concurremment sur le milieu de base et sur des milieux enrichis soit en monoglucoside du lutéolol, soit en lutéolol, aux concentrations de 10^{-5}, 5.10^{-5}, 10^{-4}, 5.10^{-4} mole par litre.

1.2.2- Résultats

Après 69 jours de culture à la lumière du jour et à 22° C environ, les fragments mis en culture n'avaient proliféré sur aucun des milieux renfermant soit du lutéolol, soit du monoglucoside de celui-ci aux concentrations de 5.10^{-4} et 10^{-4} mole par litre.

A la concentration de 5.10^{-5} mole par litre de milieu, le lutéolol, comme le lutéoloside, n'ont permis que la formation de cals très petits.

Seule la concentration de 10^{-5} mole par litre de milieu de culture en l'un ou l'autre de ces flavonoïdes a permis aux explantats de se développer, et ce dans des proportions inférieures au lot témoin, mais comparables entre elles, contrairemen à notre attente (Tableau 34).

Témoin			Lutéolol 10^{-5} mole par litre			Lutéoloside 10^{-5} mole par litre		
P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg	P. F. mg	P. S. mg	P. mg
1184	84,05	47,35	757	58,3	32,55	752,5	61,35	33,85

Tableau 34 = Influence du lutéolol et du lutéoloside, à la concentration 10^{-5} mole par litre de milieu, sur la croissance du tissu de Carotte.

P. F. = Poids frais moyen d'une colonie

P. S. = Poids sec moyen d'une colonie

P. = Poids moyen de pulpe pour une colonie.

1.2.3- Conclusions

1) L'action toxique du lutéolol et du lutéoloside vis à vis du tissu de Carotte se confirme.

2) L'hypothèse selon laquelle un héréroside serait

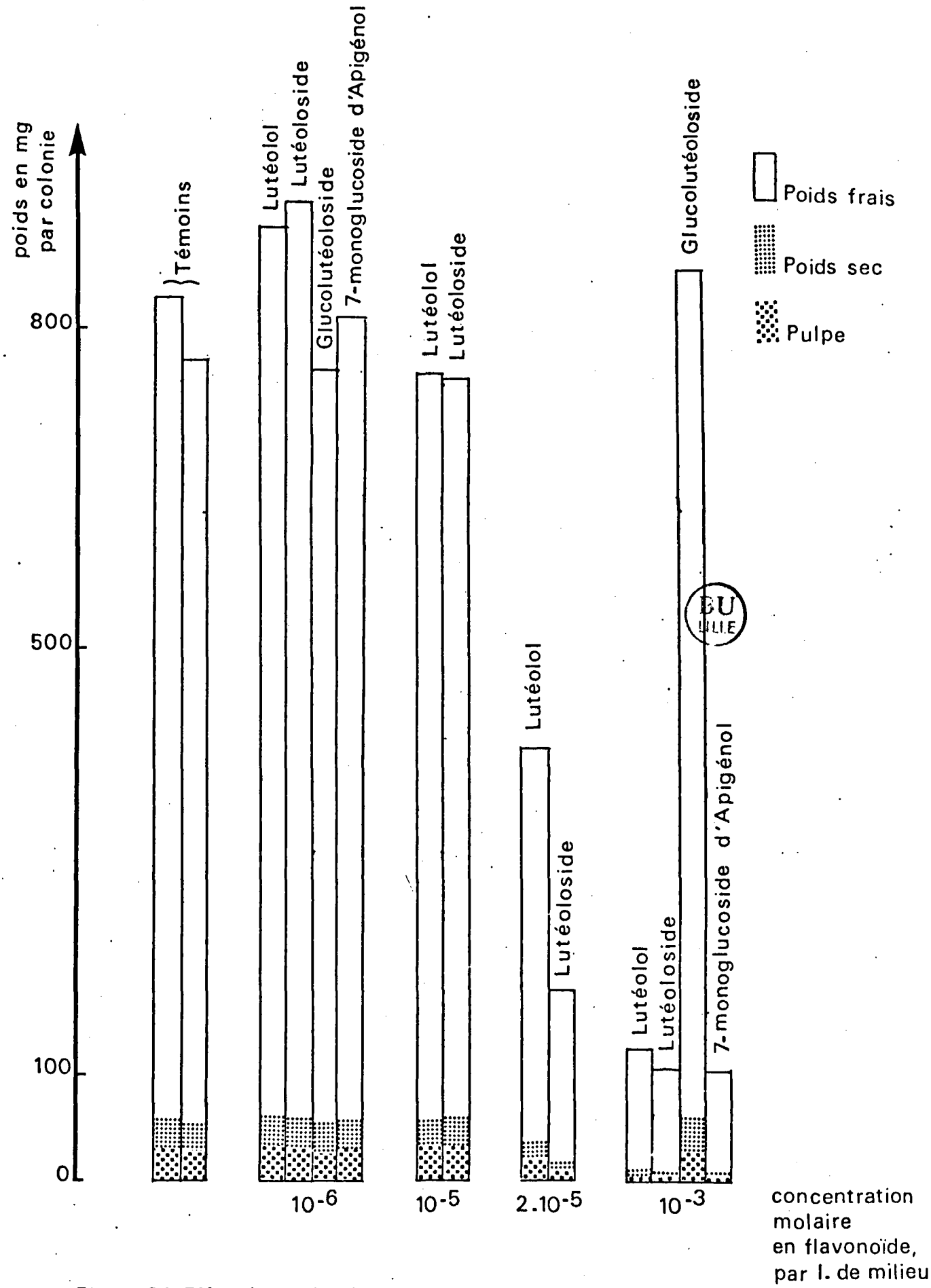


Figure 26. Effet du lutéolol, du lutéoloside, du glucolutéoloside et du 7-monoglucoside d'apigénol sur la croissance du tissu de Carotte.

moins toxique pour la cellule que son aglycone, ne se trouve pas confirmée dans le cas du lutéolol et de son monoglucoside, le lutéoloside.

1.3. CONCLUSION GENERALE

La croissance du tissu de Carotte n'est pas sensiblement influencée par la présence de glucolutéoloside, diglucoside du lutéolol, dans le milieu de culture à des doses inférieures ou égales à 10^{-3} mole par litre.

Le lutéolol et son monoglucoside, le lutéoloside, ainsi que le monoglucoside d'apigénol exercent une action inhibitrice très nette sur la croissance du tissu de Carotte. A des doses supérieures ou égales à 10^{-4} mole par litre de milieu de culture, ils empêchent même tout développement du tissu, (Figure 26).

Remarquons que NAEF-1971- a observé l'action stimulante sur le tissu de Carotte de dérivés du rutoside.

Nous pouvons rapprocher nos résultats, des études faite "in vitro" par MUMFORD et Coll. en 1961, puis par FURUYA et Coll. en 1962, sur l'effet produit par certains dérivés flavoniques sur l'acide indolyl-acétique oxydase. Il ressortait de ces travaux que si la quercétine, même à doses faibles, et le kaempférol pour des doses supérieures à 5.10^{-6} mole, agissaient comme des inhibiteurs de l'enzyme, le même kaempférol, pour des doses inférieures à 5.10^{-6} mole, la naringénine et le 7-monoglucoside de l'apigénol se révélaient en être les cofacteurs.

Cette hypothèse selon laquelle les dérivés flavoniques agiraient comme des régulateurs de croissance à travers leur effet sur l'acide indolyl-acétique oxydase trouve sa confirmation lorsque l'on rapproche les travaux de MUMFORD et Coll.-1961 et de FURUYA et Coll.-1962 de ceux de NITSCH et PARIS-1962 selon lesquels la quercétine et ses dérivés ont un léger effet stimulant sur la croissance du tissu de Topinambour, la naringénine au contraire l'inhibant. Nous-mêmes avons constaté l'effet inhibiteur du 7-monoglucoside de l'apigénol sur la croissance du tissu de Carotte. Il serait intéressant de vérifier l'effet du lutéolol, du lutéoloside et du glucolutéoloside sur l'acide indolyl-acétique oxydase, nos résultats laissant supposer que les deux premiers agiraient comme des cofacteurs à certaines doses, alors que le glucolutéoloside serait plutôt inhibiteur.

2. RECHERCHE DES FLAVONOIDES

2.1. TECHNIQUES UTILISEES

2.1.2- Milieux de culture

10 ml de milieu liquéfié au bain-marie sont versés en agitant dans 50 ml d'éthanol à 95°. Après filtration, le jaunissement du filtrat à la suite de l'addition de quelques gouttes d'ammoniaque pure indique la présence de flavonoïdes.

La nature du ou des flavonoïdes est déterminée par chromatographie descendante sur papier Arches 302, en présence du mélange de Partridge, appliquée au filtrat concentré par distillation, comparativement à des témoins.

2.1.3- Tissus cultivés "in vitro"

Les colonies sont"stabilisées"par ébullition pendant 1/2 heure dans cinq fois leur poids d'éthanol à 95° bouillant.

Elles sont ensuite, après avoir été hachées, épuisées à chaud par l'éthanol (§). Les alcools de stabilisation et d'extraction sont réunis puis distillés sous vide. Le résidu sec est repris par un faible volume d'éthanol à 95° puis par quelques gouttes d'eau distillée, le tout étant réuni dans un petit flacon placé au réfrigérateur. Après 24 à 48 heures deux sortes de cristaux se sont formés en faible quantité : des petits cubes au fond du flacon (sucres), des cristaux "en espalier" sur les parois (sels minéraux). Le liquide est décanté puis évaporé à sec. Le résidu est repris par un volume d'éthanol à 95°, tel que en ml il soit égal au quart du poids du tissu frais traité. La partie insoluble est dissoute dans très peu d'eau additionnée d'une trace d'ammoniaque.

Sur ces solutions alcooliques et aqueuses, la détermination des flavonoïdes est faite par chromatographie, comme il est rapporté ci-dessus à propos des milieux de culture.

2.2- Résultats

Dans chaque milieu nous avons retrouvé la flavone introduite au début de l'expérience et elle seule : elle n'a subi aucune dégradation.

Dans les tissus de Carotte, nous avons identifié la flavone introduite dans le milieu, seule quand il s'agissait du lutéolol, à côté de traces de leurs produits d'hydrolyse dans la cas des glucosides.

2.3- Conclusions

1) Les flavonoïdes pénètrent dans les tissus cultivés sur des milieux qui les renferment.

(§) Ethanol à 95° pour les colonies cultivées sur milieu de base et en présence de lutéolol, de lutéoloside ou de 7-monoglucoside d'apigénol.

Ethanol à 70° pour les colonies provenant des milieux renfermant du glucolutéoloside.

2) Ils y subissent une hydrolyse libérant notamment l'aglycone, qui pourrait être l'élément toxique.

Dans le cas du glucolutéoloside, cette décomposition conduit surtout à la formation de lutéoloside, des traces seulement de lutéolol étant observées. Ceci pourrait expliquer la non toxicité du diglucoside sur la croissanceetissulaire.

C H A P I T R E

V

ETUDE DU METABOLISME DES FLAVONOIDES CHEZ LA GAUDE.

1. ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA BIOSYNTHESE FLAVONIQUE

La biosynthèse des flavonoïdes a fait l'objet de nombreux travaux au cours de ces dernières années et l'on peut considérer que ses principales étapes paraissent maintenant bien établies.

1.1. ORIGINE DU SQUELETTE DES FLAVONOIDES

Le noyau A des composés flavoniques prend naissance par condensation "tête à queue" de trois molécules acétiques, activées sous forme d'acétyl-coenzyme A. Il réagit avec une unité cinnamique C_6-C_3 (acide p-coumarique), elle aussi activée par la coenzyme A, unité qui est ainsi à l'origine du cycle B et des carbones du noyau C. GRISEBACH-1957 - 1962 ; BIRCH et Coll. -1953- ; BIRCH-1962- ; UNDERHILL et Coll.-1957.

Une chalcone intermédiaire se forme, précurseur immédiat des flavones. GRISEBACH-1962 - 1967 ; WONG et GRISEBACH -1969.

Les glucides sont à l'origine de l'unité cinnamique, DAVIS-1955, l'acide shikimique et la phénylalanine figurant parmi les intermédiaires reconnus de cette biogénèse, selon le processus schématisé par la figure 27-28.

1.2. HYDROXYLATION

Dans la famille des flavonoïdes, on distingue plusieurs groupes parmi lesquels on peut citer les flavones, les flavonols, les flavanones, les anthocyanes. A l'intérieur de chacun de ces groupes les dérivés se différencient par le nombre et la position des hydroxyles sur le noyau flavonique.

Il y a lieu d'envisager séparément le cas des hydroxyles fixés sur le cycle A et celui des substitutions sur le cycle B.

1.2.1- Cycle A

Il semble admis que le modèle d'hydroxylation du cycle A soit fixé dès les premiers stades de la synthèse flavonique, GRISEBACH-1965, la suppression d'un hydroxyle en 5 intervenant, quand elle a lieu, avant la formation de la chalcone, WONG et FRANCIS-1968.

1.2.2- Cycle B

En ce qui concerne le cycle B, il faut envisager des modalités différentes selon la position des hydroxyles.

Il est communément admis que l'introduction d'un hydroxyle en 4' a lieu avant la formation de la molécule en C_{15} des flavonoïdes, HESS-1964, GRISEBACH-1965. Les travaux de ZENK-1967, ceux de SUTTER et GRISEBACH-1969, utilisant des molécules marquées ont précisé que l'hydroxylation en 4' du cycle B prenait place au stade de l'acide cinnamique, le transformant en acide p-coumarique

L'introduction d'un hydroxyle en 3', par contre, est située, selon les auteurs, à des stades différents de la synthèse flavonique. HARBORNE-1962, MOHR-1964, STAFFORD-1965, BOTTOMLEY et Coll.-1966, HESS-1968, la situaient avant la formation de la molécule en C_{15}.

Cependant des travaux ultérieurs apportent des arguments en faveur d'une hydroxylation plus tardive : PAHLICH-1969 identifie d'abord de l'apigénine 7-monoglucoside dans les cotylédons de graines de Silybum marianum Gaertn. commençant à germer, un dérivé du lutéolol n'apparaissant que cinq jours plus tard.

TRONCHET-1968, constatant la grande richesse de l'épiderme de nombreuses plantes en dérivés ortho-diphénoliques, l'interprète comme le résultat de la transformation, sous l'effet de la lumière, des hétérosides monophénoliques présents dans les tissus plus profonds.

HARPER et Coll.-1970, étudiant l'effet de la lumière sur l'incorporation de phénylalanine marquée au Carbone 14 dans les flavonoïdes de Pisum sativum L., notent une radioactivité plus basse dans les dérivés du quercétol (2 OH) que dans ceux du kaempférol (1 OH), ce qui suggère que les premiers nommés sont synthétisés après les seconds.

TRONCHET-1971 observe dans l'épiderme d'une même feuille d'Allium porum L., l'existence d'un gradient flavonique, le rapport quercétol/kaempférol augmentant de la base au sommet, ce qui laisse présager que la formation du kaempférol précède celle du quercétol.

WONG et FRANCIS-1968-1971- précisent, à la suite d'études sur des mutants de Trifolium subterraneum L., que la fixation d'un hydroxyle en 3' a lieu après la formation de la chalcone.

Enfin, certains auteurs utilisant des précurseurs marqués au Carbone 14, voient se former des flavonoïdes ortho-dihydroxylés à partir de composés monophénoliques. RIBEREAU-GAYON-1968 observe que l'acide p-coumarique (1 OH) est un meilleur précurseur du quercétol que l'acide caféique (2 OH). WALLACE-1967 isole du 7-monoglucoside de lutéolol à partir de pieds de Spirodela polyrhiza Schleiden, auxquels il a fourni de l'apigénol.

L'hydroxylation en 3' du cycle B semble donc avoir lieu après la formation de la molécule en C_{15}, sur la chalcone intermédiaire ou même sur un glucoside.

Des enzymes contrôlant l'hydroxylation de l'acide p-coumarique (1 OH) en acide caféique (2 OH) ont d'ailleurs été extraites de cultures de suspensions cellulaires de

Petroselinum hortense Hoffm.-HAHLBROCK et Coll.-1971, et des feuilles de Beta vulgaris L.-VAUGHAN et Coll.-1969. Ces derniers auteurs ont par ailleurs obtenu "in vitro" la fixation d'un hydroxyle en 3' sur des molécules en C_{15} possédant déjà un hydroxyle en 4', telles celles du kaempférol, du naringénol et du dihydrokaempférol, en présence de l'enzyme isolée de la Betterave Mais il reste à prouver que ces enzymes jouent naturellement un rôle dans la biosynthèse des flavonoïdes.

Ainsi, s'il ne fait pas de doute que la fixation d'un hydroxyle en 4' intervient précocement au cours de la synthèse des flavonoïdes, les avis sont plus partagés en ce qui concerne le stade où s'effectue l'hydroxylation en 3' : si nombre d'expériences incitent à penser qu'il se situe après la formation de la chalcone, ou même des glucosides, il reste cependant à apporter la preuve irréfutable qui écarterait l'hypothèse inverse.

1.3. GLYCOSYLATION

Les composés flavoniques identifiés dans les végétaux sont le plus souvent des hétérosides, aussi la question de savoir à quel stade de la biogénèse a lieu la fixation des oses vient-elle tout naturellement à l'esprit.

Les travaux de VILLE et PACHECO-1967 sur les hétérosides flavoniques de Prunus mahaleb L. laissaient penser que la synthèse des glucosides précédait l'apparition des aglycones libres.

Madame TRONCHET-1970, étudiant les flavonols des pétioles et des limbes de Paeonia corallina Retz. au cours du développement des feuilles, note l'apparition initiale de diglucosides, des monoglucosides ne pouvant être mis en évidence que bien après, des triglucosides plus tard encore.

Pourtant des systèmes enzymatiques, capables "in vitro" de former des hétérosides à partir des aglycones, ont été isolés des plantes, MARSH-1960, CONN-1964, BARBER-1962, BARBER et Coll.-1968, LARSON-1971, HAHLBROCK et Coll.-1971, SUTTER et Coll. 1972.

Les résultats d'expériences utilisant des précurseurs marqués par le Carbone 14 semblent indiquer que la glycosylation des flavonoïdes est une étape tardive de leur biogénèse, postérieure à la formation des aglycones, HARBORNE-1967, WALLACE-1967, WONG et Coll.-1969, ZAPROMETOV et Coll.-1972.

2. TRAVAUX PERSONNELS CONCERNANT L'ETUDE DU METABOLISME DES FLAVONOIDES CHEZ LA GAUDE

Nous avons suivi, tout au long de la deuxième année du cycle végétatif de la Gaude, la teneur en flavonoïdes des divers organes de la plante : racine, moitiés inférieure et supérieure des tiges, axe d'inflorescence, feuilles de la moitié basale et de la moitié apicale de la tige, fleurs, fruits. Nous avons ainsi distingué, depuis l'époque où les feuilles sont encore en "rosette" jusqu'à celle où les graines sont mûres, neuf stades définis comme suit :

Stade A : plantes en "rosette"

Stade B : plantes possédant une courte tige (hauteur = 18 à 28 cm).

Stade C : plantes possédant une tige bien formée, sans fleurs (hauteur = 40 à 45 cm).

Stade D : plantes commençant à fleurir

Stade E : plantes en fleurs

Stade F : plantes en début de fructification

Stade G : plantes dont les inflorescences sont aux trois quarts en fruits.

Stade H : plantes entièrement en fruits

Stade J : plantes dont les graines sont mûres.

Les résultats du dosage ont été rapportés au chapitre II-3. Pour la discussion de leur signification quant au métabolisme des dérivés flavoniques chez la Gaude, nous les exprimerons tantôt en poids, tantôt en nombre de molécules-grammes, rapporté soit à 100 g d'organe sec, soit à la plante entière au stade considéré.

2.1. REPARTITION DES FLAVONOIDES SELON LES ORGANES DE LA PLANTE

Une première observation intéressante, que nous avons déjà précédemment indiquée (Chapitre I-3.5) est qu'il existe des dérivés flavoniques dans tous les organes de la Gaude.

En effet, si de nombreuses plantes renferment des flavonoïdes dans leurs organes aériens, les graines et les organes souterrains, racines et rhizomes de certaines d'entre elles, en sont généralement exempts. Citons notamment les graines et racines de Sinapis alba L. CLAIR et Coll.-1964, les graines, racines et fruits verts de Tropaeolum majus L. DELAVEAU-1965-1967-, les graines de Colchicum autumnale L.-SKRZYPCZAKOWA-1968, les graines et racines de Bryonia dioïca Jacq.-LEIBA et Coll.-1968, les racines de Cassia mimosoïdes L.-SUBRAMANIAN et Coll.-1970, les racines des pousses de Fagopyrum esculentum Moench.-STAFFORD-1969

Il est donc remarquable que la Gaude toute entière renferme des flavonoïdes. Toutefois ce n'est quand même pas là un fait unique car il se retrouve dans Cochlearia armoracia L.-CLAIR et Coll.-1963, Ruscus racemosus L.-DELAVEAU et Coll.-1969, Euphorbia amygdaloïdes L.- MÜLLER et POHL-1970, et dans un Polygonum non spécifié KUKENOV-1970.

2.2. NATURE DU CONTENU FLAVONIQUE DES DIVERS ORGANES

L'analyse qualitative du contenu flavonique des divers organes de la Gaude a donné des résultats constants, quelque soit le stade de développement sur lequel aient porté les essais : du lutéolol et ses deux glucosides : le lutéoloside et le glucolutéoloside, de l'apigénol, son 7-monoglucoside et un composé qui est probablement un diglucoside de cet apigénol, flavonoïdes appartenant tous au groupe des flavones, ont toujours pu être mis en évidence à côté de traces de dérivés non identifiés.

Les graines, seules, ont montré un contenu flavonique original. Nous y avons trouvé à la fois une plus grande proportion et une plus grande variété d'aglycones, un certain nombre de substances non identifiées y apparaissent en effet à côté du lutéolol et de l'apigénol.

La disparité observée entre les dérivés décelés dans les graines et ceux des autres organes de la Gaude semble, en dépit du petit nombre d'études qui ont été faites sur des graines, être un fait général. C'est ainsi que PARIS et Coll.-1971, ont mis en évidence dans les graines de Sarothamnus scoparius Koch la présence d'aglycones libres du groupe des flavonols : quercétol et kaempférol, alors que les gousses et les organes végétatifs sont riches en flavones et isoflavones. TRONCHET-1972, pour sa part, lors d'une étude portant sur les dérivés flavoniques des fruits de 70 espèces diverses a observé une grande disparité, qui était même totale pour certains d'entre eux, entre le contenu des graines et celui de l'épicarpe. Ces plantes, dont les graines présentent un contenu flavonique différent de celui des autres organes, phénomène que l'on n'observe pas chez tous les végétaux, pourront peut-être constituer une catégorie originale.

Si l'on compare les résultats que nous avons obtenus pour les organes de la Gaude autres que les graines à ceux qui sont rapportés à propos de diverses plantes, on constate un certain nombre de divergences.

MELIN-1964 a reconnu la présence d'une plus grande variété de flavonoïdes dans les feuilles de Periploca graeca L. que dans les tiges, certains d'entre eux "ne passent pas", d'après lui, dans ces dernières.

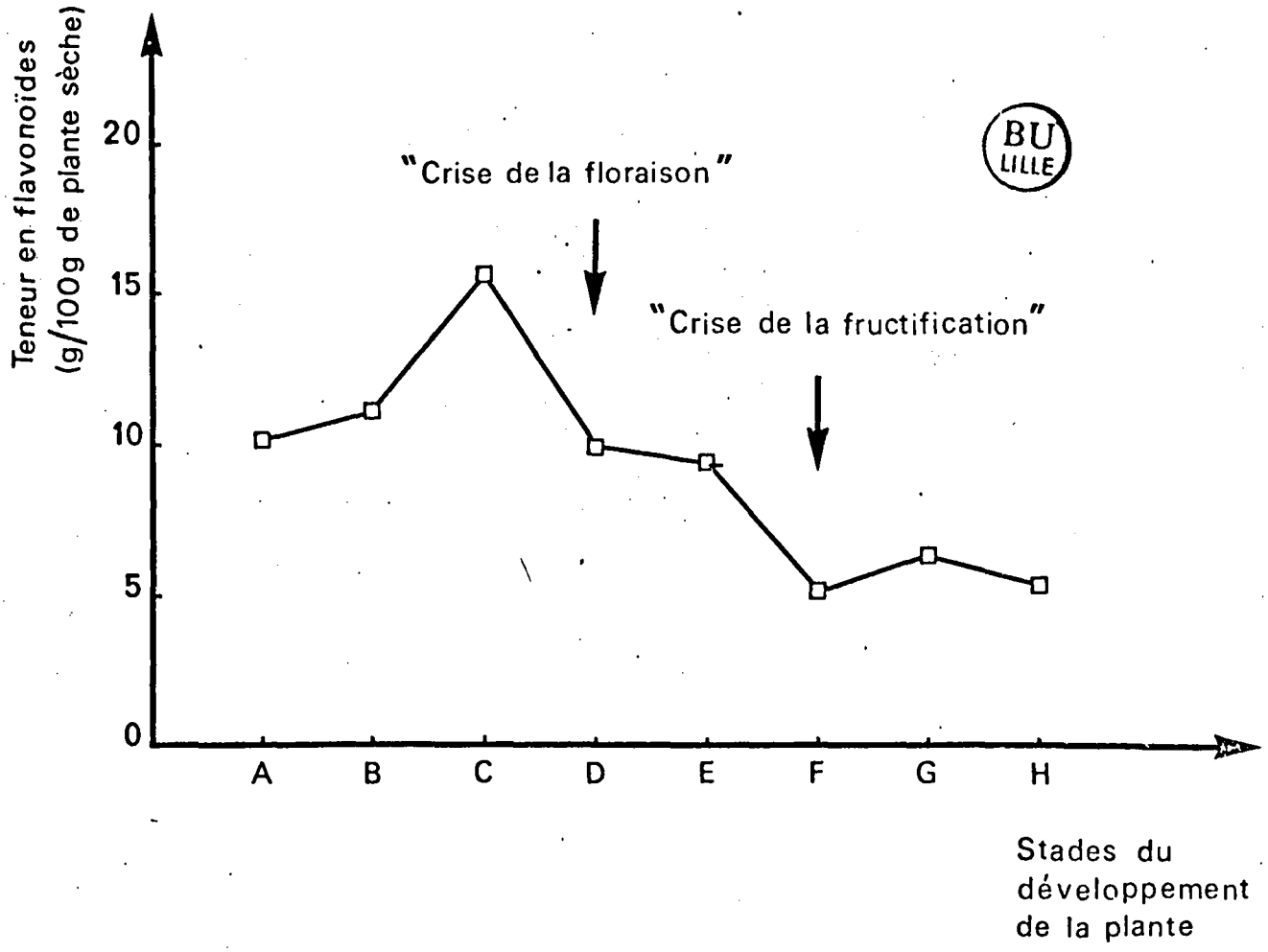
L'attention de divers auteurs a été retenue par l'apparition dans les fleurs ou les fruits, d'une ou plusieurs substances n'existant pas dans les organes végétatifs : CLAIR et Coll.-1964 chez Sinapis alba L., DELAVEAU-1965 chez Tropaeolum majus L., MURGU et Coll.-1970 chez Spirea crenata L.. Anemone hepatica L. renferme des hétérosides flavoniques dont l'hydrolyse libère des aglycones différentes selon qu'ils proviennent des feuilles ou des fleurs RAYNAUD et Coll.-1970. Chez Hypericum perforatum L. le nombre de flavonoïdes passe de 4 à 10 de la germination à la floraison-ALYUKINA et Coll.-1966, puis diminue pendant la maturation des fruits-ALYUKINA-1971. TISSUT-1967, de son côté, observe un changement de glycosylation des flavonols de la feuille de Fagus silvatica L. selon les époques de l'année.

Ultérieurement, TISSUT et Coll.-1972 ont noté que chez Quercus Corylus et Tilia, les glycosides des feuilles jeunes et ceux des feuilles âgées différaient.

Ainsi, contrairement à ce que nous observons chez la Gaude, des variations qualitatives du contenu flavonique, liées soit à la nature de l'organe, soit à l'âge du végétal, ont été observées dans un certain nombre de plantes.

Stades	A	B	C	D	E	F	G	H
Teneur en flavonoïdes	10,4	12,3	16,4	10	9,2	5,5	7,8	5,8

Tableau 35 - Teneur de la Gaude en flavonoïdes, aux divers stades de son développement, en g/100g de plante sèche.



BU LILLE

Figure 29 - Evolution de la teneur de la Gaude en flavonoïdes, au cours de sa végétation.

Néanmoins, VALUTSKAYA et Coll.-1970 et PARIS et Coll. -1971 ont noté, chez Bupleurum multinerve L. pour les premiers, chez Sarothamus scoparius Koch pour les seconds, une stabilité de la composition en flavonoïdes à rapprocher de celle que nous observons chez la Gaude. TRONCHET-1972 a également remarqué, chez 24 espèces végétales que l'équipement flavonique superficiel était le même dans tous les organes aériens : tiges, feuilles, sépales, fruits.

Si l'on doit considérer le comportement de la composition en flavonoïdes d'une plante comme le signe sensible de leur rôle dans le métabolisme végétal, on peut alors se demander si les diverses tendances décelées dans les observations que nous venons de rappeler ne traduisent pas en fait une certaine complexité de leur signification physiologique.

2.3. VARIATIONS QUANTITATIVES DU CONTENU FLAVONIQUE

Si tout au long de la croissance de la Gaude nous observons la présence des mêmes flavonoïdes dans tous les organes il faut noter cependant des variations dans leurs concentrations et dans leurs rapports.

2.3.1- "Flavonoïdes totaux"

Nous envisagerons d'abord le comportement dans la plante des flavonoïdes pris dans leur ensemble.

2.3.1.1- Plante entière au cours du développement

Si nous étudions les résultats exprimés en poids pour 100 g de plante entière sèche (Figure 29- Tableau 35), nous observons une forte augmentation continue de la teneur en flavonoïdes au cours des premiers stades de la croissance. Ce taux

s'abaisse brutalement une première fois au moment de la formation des fleurs, plus légèrement une deuxième fois au début de la fructification. La formation des graines s'accompagne d'une faible remontée de la concentration bientôt compensée par une nouvelle baisse.

Dans la littérature, rares sont les données relatives à la teneur en flavonoïdes d'une plante entière, néanmoins nos résultats vont dans le sens de ceux de MASCRE et Coll.-1936 et de SPRECHER-1936, qui ont constaté une diminution de la teneur en flavonoïdes de la Rue au moment de la floraison. ALYUKINA et Coll.-1966 et PARIS et Coll.-1971, ont fait des observations comparables respectivement chez Hypericum perforatum L. et chez Sarothamnus scoparius Koch.

DELAVEAU-1967, par contre, note une élévation constante de la teneur en flavonoïdes de Tropaeolum majus L. avec l'augmentation de la masse de la plante, de sorte que ce que l'on peut appeler la "crise de la floraison" n'apparait pas nettement dans ce cas.

Ces chutes du taux des flavonoïdes qui ne peuvent s'expliquer par un accroissement sensible et brusque de la masse tissulaire, pourraient donc correspondre à une utilisation métabolique liée surtout à la floraison et, à un degré moindre, à la fructification.

2.3.1.2- Répartition dans les divers organes selon le stade de développement

Selon le stade de la végétation des modifications sensibles apparaissent dans la teneur en flavonoïdes des divers organes de la Gaude (Tableau 36).

	A	B	C	D	E	F	G	H	J
Racines	0,4	0,2	0,7		0,5	0,4	0,4	0,2	0,2
Tiges moitié inférieure	15	1,1	3,4	2,1 {1,9	2,6 {2	1,7 {1	2,1 {1,6	2,3 {2,2	3,6 {3,6
Tiges moitié supérieure				2,6	3,3	2,9	2,8	2,5	3,7
Feuilles portées par la moitié inf^re de la tige		22	32,4	16,9 {13	11,9 {6,3	10 {8,9	13,2 {14,3	14 {14,6	13,4 {14,9
Feuilles portées par la moitié sup^re de la tige				21,8	17,8	11,5	12,5	13,5	11,8
Inflorescences fruits						2,95	12,8	8	5,6
Inflorescences fleurs				27,1	29	13,6	25		

Tableau 36= Teneur en flavonoïdes des divers organes de la Gaude, en g pour 100 g d'organe sec, au cours de la végétation = Stades : A. B. C. D. E. F. G. H. J.

Les racines restent toujours très pauvres en flavonoïdes en regard des autres organes de la plante. C'est d'ailleurs un fait généralement reconnu que les parties souterraines renferment peu de flavonoïdes, citons notamment les travaux de PISLARASU et Coll.-1969, de MÜLLER et Coll.-1970 et ceux de KUKENOV-1970. Deux exceptions sont cependant signalées de racines relativement riches en dérivés flavoniques : celles du Ruscus racemosus L. et du Sophora pachycarpa Schrenk, étudiées respectivement par DELAVEAU et Coll.-1969 et par RADZHABOV et Coll. -1971.

Les organes aériens sont nettement plus riches. L'éclairement dont ils jouissent en est probablement la principale cause. Il est établi en effet que les premiers stades, tout au moins, de la biosynthèse des flavonoïdes sont contrôlés par la lumière, FURUYA et Coll.-1964, MUMFORD et Coll.-1964, BOTTOMLEY et Coll.-1966, SMITH et HARPER-1970. La photoactivation du phytochrome provoque une augmentation du taux, ou pour le moins de l'activité de la phénylalanine-ammoniac-lyase, enzyme qui catalyse la conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique (Figure28), selon les conclusions de ATTRIDGE et Coll.-1967, HARPER et Coll.-1969-1970, SMITH et ATTRIDGE-1970, HAHLBROCK et Coll.-1970.

Il faut souligner d'ailleurs que la répartition des flavonoïdes dans les divers organes aériens de la Gaude est loin d'être uniforme.

Les feuilles sont toujours beaucoup plus riches que les tiges, observation qui concorde avec ce qui a été observé sur de nombreuses plantes : Tropaeolum majus L.-DELAVEAU-1965,

Sophora prodanii Anders-PISLARASU et Coll.-1969, Polygonum sp. - KUKENOV-1970, Bupleurum aureum Fisch.-KISELEVA et Coll.-1971, Hypericum perforatum L.-RAZINSKAITE-1971, Sophora pachycarpa Schrenk RADZHABOV et Coll.-1971.

Aux stades où la Gaude porte des fleurs, ce sont ces dernières qui sont les organes les plus riches. PISLARASU et Coll.-1969 sont arrivés à une conclusion identique à propos de Shophora prodanii Anders., ainsi que KUKENOV-1970 pour le Polygonum qu'il étudiait. Au contraire RADZHABOV et Coll.-1971 chez Sophora pachycarpa Schrenk et RAZINSKAITE-1971 chez Hypericum perforatum L. ont trouvé que les fleurs renfermaient moins de flavonoïdes que les feuilles. Quant à PARIS et Coll.-1971, ils n'ont pour leur part noté que peu de différence entre feuilles et fleurs du Sarothamnus scoparius Koch.. Faut-il considérer cette différence dans le comportement des diverses espèces comme le signe d'une certaine disparité dans les sites de formation des flavonoïdes ou dans leur utilisation métabolique ?

Les fruits de la Gaude, quant à eux, renferment une proportion plus faible de dérivés flavoniques que les fleurs* et même que les feuilles, fait noté également chez Sophora prodanii Anders par PISLARASU et Coll.-1969 et par RETEZEANU et Coll.-1972 chez Rosa rugosa Trunb., mais ils restent plus riches que les tiges.

La comparaison entre-elles des teneurs en flavonoïdes des moitiés inférieures et supérieures des tiges d'une part, de celles des feuilles de la base au sommet d'autre part, montre que les organes situés vers le bas de la plante sont toujours moins riches que ceux du sommet, exception faite pour les feuilles des plantes en pleine fructification ou porteuses de graines mûres (Tableau 36).

* La concentration plus faible chez les fruits que celle observée chez les fleurs dont ils proviennent peut s'expliquer en partie par le chute des pétales qui sont très riches en flavonoïdes.

Ce sont donc les organes supérieurs, les mieux exposés à la lumière, qui sont les plus riches en flavonoïdes. Ces observations confirment celles de DELAVEAU et Coll.-1961, CLAIR et Coll.-1964, DELAVEAU-1967, TRONCHET-1966, LEIBA et Coll.-1968.

Il est intéressant de signaler à ce propos l'hypothèse émise par DELAVEAU et Coll.-1968 qui, constatant la teneur élevée en dérivés flavoniques des organes assurant la photosynthèse, avaient envisagé l'existence d'une relation entre les synthèses chlorophyllienne et flavonique. Dès 1966, ZAPROMETOV et Coll. faisaient d'ailleurs des chloroplastes le lieu du stade primaire de la formation des dérivés flavoniques et SATO en 1966 et 1967 y localisait l'hydroxylation de ces composés. Cette conception pourrait trouver sa justification dans le fait que MONTIES en 1969 et WEISSENBOECK et Coll. en 1971 mettaient en évidence la présence de flavonoïdes dans les chloroplastes de diverses Angiospermes.

Quant à l'inversion dans les rapports de teneurs en flavonoïdes entre les feuilles du sommet et celles de la base de la tige qui apparait lors de la fructification et de la formation des graines, elle suggère l'hypothèse d'une migration de ces dérivés, des organes chlorophylliens vers les fruits et les graines, qui se ferait surtout aux dépens des feuilles les plus proches de ces organes en formation.

2.3.1.3- Variation du taux dans chaque organe au cours de la végétation

Si nous considérons maintenant l'évolution de la teneur en flavonoïdes de chacun des organes de la Gaude tout au long de la végétation (Tableau 36) nous pouvons faire les remarques suivantes:

Au cours de la période qui précède la floraison (stades A,B,C), la teneur en dérivés flavoniques des organes aériens de la plante : tiges et feuilles, ne cesse de croître de façon très sensible. Ce fait peut être interprété comme un effet de l'activité synthétique de ces organes chlorophylliens, à la fois jeunes et bien éclairés, qui, nous venons de le voir, sont généralement tenus pour les sites de la formation de ces composés, les feuilles occupant dans cette synthèse une place privilégiée sans doute du fait de leur surface proportionnellement plus grande.

Au moment de la floraison (stades D,E,F) nous assistons à une baisse de teneur en flavonoïdes dans les organes végétatifs aériens, surtout dans les feuilles, où elle passe de 32 g à 10 g pour 100 g de poids sec ; dans les tiges la baisse est moins marquée : 3,4 g à 1,7 g.

Cette"crise de la floraison" n'est pas un fait particulier à la Gaude. Elle a été observée dans nombre d'espèces : Sinapis alba L. - CLAIR et Coll.-1964 , Saxifraga cuneifolia L. et S. aïzoïdes L.-COMBIER-1968, Bupleurum sp.-MINAEVA et Coll. -1968, Sarothamnus scoparius Koch-PARIS et Coll.-1971, Rhus coriaria L. et Cotinus coggyria Scop.-BUZIASHVILI et Coll.-1972.

Comment expliquer cette brusque diminution de la richesse en flavonoïdes des feuilles ? Il est peu probable qu'elle soit due à un ralentissement notable de l'activité synthétique de ces organes. Il semble plus vraisemblable qu'il s'agit d'une "fuite" de ces dérivés vers les fleurs dont la teneur est particulièrement élevée aux stades D et E.

Toutefois, il faut noter que pour d'autres espèces les organes végétatifs présentent une teneur maximale en flavonoïdes au moment de la floraison Corchorius olitorius L.-GHEDOV-1969, Delphinium consolida L. et Consolida regalis Gray-MEL'NICHUCK-1971, Artemisia cina Berg.-BALTABAEVA-1971, Hypericum perforatum L.-RAZINSKAITE-1971, diverses Polygonacées KUKENOV et Coll.-1971, Bupleurum aureum Fisch.-KISELEVA et Coll. -1972.

On peut se demander si cette disparité des faits ne traduit pas celle du rôle joué par les flavonoïdes dans la cellule végétale ?

Chez la Gaude donc, la baisse de la teneur en flavonoïdes dans les organes chlorophylliens correspond à l'apparition d'un taux élevé dans les inflorescences fleuries. Cette coïncidence résulte-t-elle, comme nous l'avons suggéré ci-dessus du passage de ces substances des feuilles dans les fleurs ? Cette possibilité de migration semble encore contestée. Si COMBIER-1968 envisage que ces dérivés circulent dans les plantes notamment entre feuilles et fleurs, et si MURGU et Coll.-1970 concluent, mais sans preuve formelle, que "pendant la période de floraison, une partie des flavonoïdes qui existe dans les feuilles migre vers les fleurs" chez Spirea crenata L., des expériences de greffes d'une plante capable de synthétiser certains flavonoïdes sur une autre formant des dérivés différents de ce même groupe, n'ont pas permis de conclure au transport de tels composés de sujets à greffons, DELAVEAU-1964, SCHULTZ-1969. Néanmoins SCHULTZ-1969 a observé un transport "in vitro".

Il se pourrait également que les inflorescences fleuries soient le lieu de synthèse des dérivés flavoniques qu'elles contiennent. Notons que pour HESS-1963 le bouton floral est le lieu de la synthèse des anthocyanes, composés voisins des flavones, qui exercent ainsi vis-à-vis des organes végétatifs une certaine concurrence quant à l'utilisation des matières premières indispensables à ces synthèses, telles les sucres.

La réalité se situe peut-être à la fois dans ces deux hypothèses, le pouvoir de synthèse des fleurs n'excluant pas la possibilité d'une migration entre les feuilles et les fleurs.

Dans le cas de la Gaude, où nous notons que le taux des flavonoïdes diminue à cette époque dans les tiges, l'hypothèse n'est pas apparamment en faveur d'une circulation accrue dans la plante, cependant l'examen du tableau 36, révèle que la baisse observée porte sur l'ensemble de la tige, mais qu'elle n'est pas constante tout au long de celle-ci. La teneur reste élevée dans la moitié supérieure pour diminuer considérablement dans les parties basses. La chute est d'autant plus apparente sur l'ensemble que la masse des tiges atteint alors son maximum, la part la plus grande revenant incontestablement à la moitié inférieure de la tige, ce qui pourrait d'ailleurs expliquer dans une certaine mesure la "dilution" du contenu flavonique de cette région. L'hypothèse émise précédemment d'une migration des flavonoïdes se faisant principalement aux dépens des feuilles du sommet de la plante ne se trouve donc pas réfutée.

Juste au début de la fructification (Stade F), prend place un phénomène comparable à celui observé au moment de la floraison : la teneur en flavonoïdes des inflorescences fleuries

baisse brusquement (Tableau 30), ce qui parait assez difficile à comprendre, d'autant plus que dans les dernières fleurs qui se forment on retrouve un taux assez voisin de ce qu'il était avant que n'apparaissent les fruits. Un arrêt progressif de la synthèse dans les feuilles et de la migration à partir de celles-ci vers les fleurs, puis les fruits, pourrait tenir lieu en partie d'explication. D'autre part on peut penser avec KUKENOV-1970, que les flavonoïdes sont utilisés au début de la formation des fruits, peut-être même selon nous dans le mécanisme de la fécondation (°).

Lorsque les fruits se forment (Stade G), la concentration en flavonoïdes augmente dans les feuilles, ce qui confirmerait l'hypothèse que nous venons d'émettre d'un arrêt de leur migration vers les inflorescences. Nous retrouvons dans les fleurs qui persistent encore, un taux voisin de ce qu'il était avant la chute observée au Stade F, nous remarquons également que la teneur des fruits en ces pigments s'est considérablement élevée bien qu'elle n'atteigne pas la valeur qu'elle prend dans les fleurs. Dans l'hypothèse d'un ralentissement de l'apport des feuilles cela laisse supposer, selon une opinion déjà émise par TRONCHET-1972, que les fleurs et les fruits seraient comme les feuilles

(°) S'il est facile de séparer sur une inflorescence, la partie inférieure portant des fruits déjà apparents, il est impossible de faire une distinction entre les fleurs déjà fécondées et celles qui ne le sont pas encore. Il est donc possible qu'à ce stade F nous ayons eu, dans ce que nous considérons comme "inflorescence fleurie", une certaine quantité de fleurs non fécondées riches en flavonoïdes et le reste formé de fleurs fécondées très pauvres en ces éléments, comme semble le prouver la teneur très faible des premiers fruits (2,95 %), ce qui entrainait pour l'ensemble un maigre taux moyen. Ce pourrait être là la véritable explication de cette baisse spectaculaire des flavonoïdes que nous observons à ce stade.

des lieux de synthèse des dérivés flavoniques, ce qui ne saurait étonner si l'on admet l'intervention des tissus chlorophylliens présents tant dans certains organes floraux que dans le péricarpe des jeunes fruits.

Au cours de leur maturation (Stades H et J) les fruits voient baisser rapidement leur teneur en flavonoïdes, ce qui peut être la conséquence d'un arrêt de la synthèse conjugué avec le développement de la masse tissulaire, ou plus simplement d'un destruction liée à la sclérification et la mort des cellules. Dans le même temps, on peut constater un plafonnement du taux de ces pigments dans les feuilles , signe de vieillissement ?, l'augmentation qui pourrait être due à l'arrêt de la migration vers les inflorescences étant annulée par un ralentissement notable ou même la suppression de la synthèse.

Les racines restent, tout au long de la végétation de la Gaude, très pauvres en flavonoïdes, la teneur étant toujours bien inférieure à 1 %. Il paraît évident que ces organes ne synthétisent pas ces composés et que ceux qu'on y décèle proviennent des organes aériens par le canal de la tige.

Enfin, il convient de remarquer (Tableau 36) que, jusqu'à la maturation des fruits (Stade H), la moitié supérieure des tiges est toujours plus riche en dérivés flavoniques que la moitié inférieure, l'explication pouvant être trouvée dans le fait que les cellules de la partie supérieure sont plus jeunes et mieux éclairées que les autres ; le vieillissement, surtout sensible, à partir de la formation des graines, entraînerait finalement l'uniformité de composition constatée alors tout au long de l'organe. Mais ce qui paraît plus difficile à comprendre

si l'on tient compte de l'interruption de leur synthèse, c'est l'augmentation du taux des flavonoïdes observée, dès ce stade, à la base des tiges et qui gagne ensuite le sommet. La cause en est peut-être, par suite du vieillissement, une perte de matière sèche proportionnellement plus importante pour d'autres constituants cellulaires que pour les pigments flavoniques.

Un phénomène analogue, mais plus précoce puisqu'il apparaît au cours de la formation des fruits (Stade G), se manifeste au niveau des feuilles. Jusqu'alors les feuilles de la moitié supérieure des tiges, plus jeunes et mieux éclairées, avaient une teneur plus élevée en flavonoïdes que celles insérées vers la base; cela n'est plus: tandis que le taux demeure sensiblement identique dans les feuilles supérieures, il s'élève dans les feuilles inférieures jusqu'à une valeur qui dépasse celle observée dans les feuilles du sommet. Il semble que nous devions ici encore invoquer le vieillissement, plus accentué à la base de la plante, qui provoque la destruction d'une importante quantité de constituants cellulaires tout en respectant les dérivés flavoniques.

Il semble donc que l'on puisse conclure que tous les organes aériens, principalement les feuilles et sans doute aussi les fleurs, sont des sites de formation des flavonoïdes, les organes jeunes étant les plus actifs. On peut concevoir aussi le transfert d'une certaine quantité de flavonoïdes des feuilles vers les fleurs au moment de la floraison. Il apparaitrait par ailleurs que ces substances pourraient jouer un rôle dans le phénomène de la fructification et qu'elles résisteraient mieux que bien d'autres à la destruction qui s'instaurerait lors du vieillissement. Quant à la présence de ces pigments décelés en

en faibles proportions dans la racine elle résulte très probablement d'une migration réduite à partir des organes aériens.

2.3.1.4- Variation des quantités totales dans chacun des organes au cours du développement

Nous avons pensé que l'on pourrait mettre en évidence de façon plus nette la circulation supposée des flavonoïdes et leur utilisation envisagée lors de la floraison et de la fructification, en suivant, non plus les variations de taux par organe, mais les quantités absolues présentes dans ceux-ci à chaque stade du développement.

Il est évidemment impossible de suivre de telles variations sur un même individu, aussi avons nous établi, pour chacune des époques, un "individu moyen" en prélevant, dans les lots utilisés pour le dosage des flavonoïdes, une dizaine de plantes de taille variable sur lesquelles nous avons déterminé la moyenne des poids secs des divers organes. Ceci nous a amenée d'ailleurs, en dehors des déductions sur le comportement des dérivés flavoniques, à faire certaines remarques sur la croissance des organes végétatifs de la Gaude (Tableaux 37 et 38).

Le poids sec de la racine croît régulièrement jusqu'à la floraison (stades A, B, C) ce qui paraît être en relation avec le développement général de la plante. Il se stabilise pendant toute la période de floraison (stades C, D, E), ce qui pourrait indiquer que l'anabolisme végétal est alors accaparé par un phénomène déterminé qui pourrait être précisément la floraison. Passée ce stade la racine s'alourdit considérablement, ce qui ne peut guère s'expliquer que par une accumulation de substances

STADES	A	B	C	D	E	F	G	H
Racines	0,16	0,21	0,4	0,37	0,40	1,35	3,4	5
Tiges		0,34	1	1,7	1,85	5,8	12,8	16,1
Feuilles	0,35	0,65	1,2	1,3	1,3	3,95	5,8	7
Inflorescences en fruits						0,75	8,5	13,5
Inflorescences en fleurs				0,48	0,6	1,65	1,5	
Plante entière	0,5	1,2	2,6	3,9	4,1	13,5	32	41,6

BU LILLE

Tableau 37 = Poids sec en g d'un "individu moyen" de Gaude et de chacun de ses organes, aux stades successifs de son développement.

STADES	A	B	C	D	E	F	G	H
Racines	0,64	0,4	2,8		2,2	5,4	13,7	11
Tiges		3,8	34,5	36	48	98,4	268	370
Feuilles	52,7	143,3	389	221	153	395	766	980
Inflorescences en fruits						22	1090	1080
Inflorescences en fleurs				130	174,2	223,7	375,3	
Plante entière	53	147,5	426	387	377,4	744	2513	2441

Tableau 38 = Poids en mg des flavonoïdes extraits d"un "individu moyen" de Gaude et de ses divers organes, aux stades successifs de son développement.

BU LILLE

qu'elle mettrait en réserve sans qu'on puisse déceler quel en est l'intérêt pour la plante qui évolue vers la mort (Tableau 37)

Les quantités de flavonoïdes présents dans la racine sont toujours extrêmement faibles de sorte que les variations observées ne sont sans doute guère significatives, sauf peut-être la baisse qui accompagne le début de la formation de la tige et qui pourrait faire penser à une utilisation dans ce processus. L'augmentation qui se manifeste vers la fin de la végétation ne paraît découler que du phénomène général d'accumulation de substances que nous venons de signaler (Tableau 38).

La tige n'a d'existence véritable qu'à partir du stade B, et, malgré une croissance en hauteur importante, son poids sec qui augmente d'abord régulièrement, n'atteint qu'une valeur relativement faible au moment de la pleine floraison (stade E), pour s'accroître ensuite considérablement dès que les fruits commencent à se former, majoration qui ne peut se justifier que par une accumulation de substances. En effet, ce n'est ni l'allongement pourtant encore sensible de cet organe durant toute la période de fructification, ni même la croissance diamétrale, bien que notable, qui peuvent suffire à justifier ce phénomène. Cette constatation infirme l'hypothèse émise précédemment d'un vieillissement générateur d'une perte de matière sèche (Tableau 37).

La quantité de flavonoïdes d'abord faible s'accroît avec le développement de la tige, pour se stabiliser sensiblement lorsque commence la floraison, ce qui peut être le signe d'une utilisation dans l'établissement de ce processus. Elle augmente ensuite, assez lentement d'abord jusqu'au début de la fructification, pour croître enfin de façon intense tout au long de cette période (Tableau 38).

Le poids sec des feuilles augmente de façon continue jusqu'au stade qui précède l'apparition des fleurs (stade C). Sans pour autant nous attacher à la valeur absolue des chiffres étant donné l'imprécision liée à la technique même, nous devons constater que leur masse évolue peu jusqu'au début de la fructification, pour ensuite, durant cette période, s'accroître intensément. Il ne semble pas que l'on puisse attribuer un tel accroissement de poids sec à une multiplication du nombre des feuilles, ni à une augmentation de leur taille, mais qu'il faut envisager une accumulation de substances en leur sein. Processus qui, à nouveau, vient infirmer toute idée de vieillissement cellulaire entrainant une perte de matière sèche. Notons d'autre part que si dans les premiers stades du développement de la plante, le poids sec des feuilles l'emporte sur celui des tiges, ultérieurement le rapport s'inverse bien que le port de la plante fasse paraître son feuillage plus important que sa tige.

La quantité de flavonoïdes présents dans les feuilles augmente beaucoup pendant la croissance de la tige. Au moment de la floraison (stades D et E), elle baisse fortement.

Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'intervention des flavonoïdes dans l'élaboration de l'inflorescence, plus précisément peut être lors de la formation des gamètes et de la fécondation. Le besoin serait particulièrement important, de telle sorte que la synthèse de ces composés, pourtant probablement toujours très intense, ne suffirait pas, ce qui entraînerait le recours aux quantités préalablement formées. Les chiffres (tableau 38) semblent indiquer qu'à ce moment (stade D) il est fait appel non seulement aux dérivés existant dans les feuilles mais aussi à ceux des tiges.

Avec l'épanouissement des fleurs (stade E), leur utilité se ferait moins sentir et si elle se traduit encore par l'appauvrissement des feuilles, la tige peut de nouveau s'enrichir. Ces fluctuations entraînent la nécessité d'un transfert des flavonoïdes, donc d'une circulation des feuilles vers l'inflorescence au travers de la tige.

Pour la formation des fruits et des graines, il apparaît que l'intervention des flavonoïdes deviendrait, sinon inutile, tout au moins extrêmement réduite de sorte que leur synthèse couvrirait non seulement les besoins, mais permettrait leur accumulation aussi bien dans les feuilles que dans la tige, comme nous l'avons déjà vu.

Notons que les feuilles sont toujours beaucoup plus riches que la tige en dérivés flavoniques, ce qui est en faveur du rôle prépondérant qu'on leur reconnait dans la synthèse de ces composés.

L'inflorescence, qui est une grappe d'abord serrée, s'allonge fortement au cours de la floraison qui s'étale de juin à septembre, les fleurs se transformant progressivement en fruits de la base au sommet, aussi s'il est normal de voir le poids sec de cette inflorescence croître du début à la pleine floraison (stades D et E du tableau 37), il est plus surprenant de constate que celui de la partie fleurie, qui pourtant ne semble pas avoir beaucoup grandi, augmente encore intensément au début de la fructification (stade F), et surtout qu'il ne baisse que faiblement lorsque l'inflorescence porte des fruits sur les trois quarts de sa longueur (stade G). Il est possible que ce fait résulte de la technique utilisée pour séparer la partie de l'inflorescence encore en fleurs de celle qui est déjà en fruits, l'oeil auquel

elle fait appel ne permettant pas de distinguer les fleurs non fécondées de celles qui, bien qu'apparemment semblables, ont déjà commencé leur transformation en fruits, organes beaucoup plus lourds.

La quantité des flavonoïdes est d'emblée très élevée dans les fleurs (stade D) et s'accroît continuellement même lorsqu'elles n'occupent plus qu'une minime portion de l'inflorescence. La masse importante de flavonoïdes qui apparaît ainsi rapidement dans l'inflorescence dès sa formation, liée à la perte concomitante de ces substances subie par les feuilles, semble en faveur d'un transfert plutôt que d'une synthèse locale importante. Cependant les quantités disparues des feuilles sont plus grandes que celles apparues dans les fleurs, ce qui peut confirmer l'hypothèse de leur utilisation métabolique dans le phénomène de floraison, d'autant plus qu'à ces quantités apparemment disparues il faut ajouter celles certainement élaborées dans le même temps par les feuilles et qui n'ont pu être mises en évidence du fait même de leur emploi immédiat. Quant aux dernières fleurs (stade G) elles profiteraient de l'arrêt du phénomène consommateur en dérivés flavoniques pour les accumuler à l'instar des tiges et des feuilles.

Les fruits sont des organes proportionnellement très lourds et surtout très peu hydratés puisque pour un volume apparemment assez faible ils donnent un poids de tissu sec supérieur à celui des feuilles, et presque égal à celui des tiges pourtant plus volumineuses.

Les premiers fruits formés (stade F) renferment d'abord peu de flavonoïdes, beaucoup moins que les fleurs dont ils proviennent. La chute des pétales floraux très riches en dérivés

flavoniques pourraient être la cause de ce phénomène. Les flavonoïdes s'accumulent ensuite très fortement dans les fruits en sorte qu'ils se trouvent rapidement en quantité supérieure à celle des feuilles (stades G et F). Sont-ils le résultat d'une synthèse locale ou proviennent-ils plutôt des feuilles dans lesquelles, il faut le remarquer, la masse croît également à ce moment ? Cette accumulation dans les fruits rend peu probable en tout cas que les flavonoïdes aient un rôle métabolique dans le développement du fruit.

Ainsi l'analyse de la variation des quantités absolues de flavonoïdes présentes dans les divers organes de la Gaude au cours de la deuxième année de son développement nous amène à des conclusions dont certaines renforcent des hypothèses précédemment envisagées et d'autres s'opposent à quelques unes de nos suggestions.

S'il apparaît comme certain que la synthèse des flavonoïdes s'effectue principalement au niveau des feuilles et probablement aussi des tiges, il semble plus difficile d'émettre une opinion tranchée au sujet des fleurs et des fruits. Bien que l'on ne puisse affirmer qu'ils soient dénués de tout pouvoir de synthèse de ces composés, la masse principale des flavonoïdes que l'on peut y mettre en évidence proviendrait plutôt essentiellement des feuilles, le mécanisme du transfert restant inconnu.

Il paraît évident que les flavonoïdes ont un rôle métabolique intense dans le mécanisme physiologique de la fleur, non seulement par leur accumulation visible dans les pétales, mais surtout, sans qu'on puisse le préciser, dans l'un ou plusieurs des phénomènes dont cet organe est le siège : formation des gamètes, fécondation. Leur intervention dans le développement des

fruits, par contre, ne semble pas devoir être retenue.

Il faut enfin rejeter l'idée d'un "vieillissement" de la plante, cause d'une destruction de certaines substances et non des flavonoïdes au cours de la maturation des fruits, et reconnaître au contraire le maintien d'une forte activité anabolique entrainant, par suite de l'arrêt de leur utilisation majeure, une forte accumulation générale de ces dérivés.

2.3.2- Flavonoïdes isolés

Nous avons dosé séparément les principaux flavonoïdes que renferme la Gaude dans ses divers organes, aux différents stades de sa végétation précédemment définis.

Nous avons pensé que dans ce cas il était préférable d'exprimer les résultats en "milli molécules d'aglycone" plutôt qu'en poids, afin "d'effacer" la place occupée dans les glucosides par la partie osidique, et de tenter de serrer de plus près le métabolisme du squelette flavonique.

Observons d'abord comment se répartissent les principaux flavonoïdes dans les divers organes de la Gaude pour chacun des stades évolutifs envisagés (Tableau39).

Le lutéolol n'a pu être décelé ni dans les racines, ni dans les tiges si l'on en croit l'opinion selon laquelle la synthèse de l'aglycone précèderait la formation des glucosides, on peut admettre que l'activité synthétique de ces organes est très faible et que la petite quantité d'aglycone formée est immédiatement transformée en glucosides. Néanmoins il est plus vraisemblable que la synthèse du noyau flavonique y est nulle et que les glucosides présents proviennent d'autres organes, ce qui est conforme à l'hypothèse que nous avons émise plus haut d'une circu-

STADES		A	B	C	D	E	F	G	H	J
Racines	l	0	0	0		0	0	0	0	0
	L	0,38	0,18	0,6		0,5	0,4	0,4	0,25	0,22
	GL	0,07	0,04	0,15		0,08	0,1	0,15	0,04	0,03
	Ga	0,01	0,05	0,13		0,25	0,15	0,09	0,09	0,05
	GGa	0,20	0,09	0,45		0,25	0,17	0,2	0,07	0,09
Tiges	l				0	0	0	0	0	0
	L		0,2	3,3	2,3	3,3	1,7	2	2,8	4,5
	GL		0,6	1,9	0,82	0,75	0,85	0,9	0,7	1,3
	Ga		0,8	0,6	0,55	0,66	0,33	0,46	0,7	0,7
	GGa		0,6	0,9	0,36	0,40	0,33	0,6	0,47	0,8
Feuilles	l	1,04*			0,26	0,55	1,3	0,53	1	0,95
	L	1,5	24	36,5	18	14,8	6	8,2	16,4	15,7
	GL	5,3	9	14,4	8,3	4,18	2,6	5,2	6	5,2
	Ga	5,25	5,3	7,5	4	3,1	1,1	4,2	7	2,5
	GGa	4,08	5,6	6,6	2,8	2	1,7	3,3	2,2	2,9
Fruits	l						1	4,8	2,3	1,8
	L						2,7	10,3	7,9	6
	GL						1,2	5,5	2,5	1,6
	Ga						1,4	4,8	2,6	1,5
	GGa						0,4	2,4	2	1,2

BIBLIOTHEQUE

.../...

STADES		A	B	C	D	E	F	G	H	J
Fleurs	l				1,5	22	6,5	13,3		
	L				32,5	37	14,2	23,1		
	GL				10,5	7,5	4,2	8,1		
	Ga				8,1	11,6	4,6	8,2		
	GGa				3,7	3,7	1,4	3,8		

* Au stade de la plante "en rosette" il est pratiquement impossible de séparer la tige des feuilles

Tableau 39 = Teneur des organes de la Gaude en les principaux flavonoïdes isolés en "millimolécules d'aglycone" pour 100 g d'organe sec, au cours de la végétation.

Stade A = plantes "en rosette" ; Stade B = plantes possédant une courte tige ;
Stade C = plantes possédant une tige bien formée ; Stade D = plante commençant à fleurir ;
Stade E = plantes en fleurs ; Stade F = plantes en début de fructification ;
Stade G = plantes dont les inflorescences sont aux 3/4 en fruits ;
Stade H = plantes entièrement en fruits, plantes dont les graines sont mûres.

(l = lutéolol ; L = lutéoloside ; GL = glucolutéoloside ; Ga = apigénol-7 glucose ; GGa = apigénol-glucose-glucose).

BU LILLE

lation de ces composés à travers la plante. L'absence de lutéolol ne contredit pas d'ailleurs cette possibilité, car la faible solubilité des aglycones dans les milieux aqueux exclut une circulation sensible de leur part.

Le lutéolol existe dans les feuilles, les fleurs et les fruits. Les variations irrégulières et somme toute minimes de sa teneur dans les feuilles ne se prêtent pas à des conclusions précises quant à son rôle dans ces organes; par contre le fait que cette teneur reste toujours faible en regard de celle des glucosides, même quand ceux-ci s'amenuisent, peut faire songer à une glucosidification intervenant aussitôt après la synthèse du noyau flavonique.

La teneur en lutéolol des fleurs est beaucoup plus élevée que celle des feuilles, et ne cesse de croître de façon de plus en plus intense depuis le début jusqu'à la fin de la floraison (stades D à G). On peut admettre, dans une première hypothèse, que les fleurs effectueraient la synthèse du noyau flavonique et sa glucosidification, mais que cette dernière réaction se trouverait peu à peu limitée par manque de sucre disponible, par suite de l'utilisation de celui-ci à d'autres fins, la formation des fruits peut-être ? Les faits précédemment exposés nous conduisent à pencher de préférence pour un apport, à partir des feuilles, des flavonoïdes sous forme de glucosides et leur dédoublement <u>in situ</u>, glucose et flavone libérés étant utilisés séparément dans des métabolismes différents : mécanisme que nous tenterons d'expliquer un peu plus loin.

Les fruits, eux aussi, ont une teneur non négligeable en lutéolol, qui passe par un maximum, mais sans atteindre cependant la valeur la plus élevée observée dans les fleurs. Ce maximum, qui correspond à la fin de la floraison (stade G), se situe à l'époque même où le taux est le plus grand dans les fleurs qui

existent encore, aussi est-il permis de penser qu'il y a entre ces deux faits une certaine corrélation. La baisse continue de teneur qui affecte les fruits aux stades de développement suivants peut simplement résulter de leur croissance qui augmente leur masse sans modification de celle du lutéolol.

Pour ce qui est des glucosides, qui constituent la plus grosse part des flavonoïdes, nous retrouvons les variations observées pour ces derniers dans les différents organes selon les époques de la végétation, ce qui conduit aux conclusions générales que nous avons précédemment retenues.

Parmi les glucosides, nous pouvons distinguer, d'une part les dérivés du lutéolol (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone) et ceux de l'apigénol (trihydroxy-5,7,4' flavone), d'autre part les monoglucosides et les diglucosides de l'une et l'autre génine.

Notons d'abord que, quelque soit l'organe considéré, le lutéoloside, monoglucoside du lutéolol, est le flavonoïde le plus abondant tout au long de la vie de la Gaude.

Il est à remarquer, par ailleurs, que dans un organe donné les concentrations des monoglucosides d'une part, celles des diglucosides d'autre part, varient généralement dans le même sens, et que les dérivés du lutéolol sont toujours plus abondants que leurs homologues de l'apigénol à deux exceptions près : dans la racine le taux du diglucoside du lutéolol reste constamment inférieur à celui du diglucoside de l'apigénol, dans la tige qui commence à se développer (stade B) le glucoapigénol est relativement plus important que le lutéoloside tandis que les diglucosides s'y trouvent en quantités égales. A part ces deux cas, auxquels il ne semble pas qu'il faille attacher une signification

biologique trop importante (°), ces observations pourraient s'accorder avec l'hypothèse selon laquelle les flavonoïdes diphénoliques périphériques (°°) se formeraient à partir des dérivés monophénoliques correspondants : les principes du groupe de l'apigénol sans cesse transformés en ceux du lutéolol apparaîtraient moins abondants que ces derniers. Quant à savoir si l'hydroxylation se fait essentiellement sur la génine libre ou à la fois sur celle-ci et sur ses glucosides, celà paraît difficile à préciser. Cependant si l'on prend en considération, d'une part le fait que sur les chromatogrammes obtenus avec les flavonoïdes extraits des feuilles, lieux privilégiés de leur synthèse, l'apigénol n'apparaît jamais autrement qu'à l'état de traces, d'autre part que la teneur de cette génine sous forme de glucosides est toujours beaucoup plus importante que celle du lutéolol libre quelque soit l'organe envisagé, on peut déduire que l'hydroxylation de l'apigénol s'effectuerait moins rapidement que sa glucosidification et que, par suite, les glucosides du lutéolol proviendraient surtout de l'hydroxylation de leurs homologues de l'apigénol.

Revenons plus précisèment sur le comportement, au cours de la végétation, des principes du groupe du lutéolol dans les feuilles, les fleurs et les fruits.

(°) S'il existe, comme il est vraisemblable, une faible migration des flavonoïdes des feuilles vers la racine au travers de la tige, il est possible que, du fait de leur plus grande solubilité dans l'eau, les glucosides de l'apigénol aient une mobilité supérieure à ceux du lutéolol et par suite puissent proportionnellement s'accumuler davantage.

(°°) C'est-à-dire orho-dihydroxylés sur le cycle B.

Dans les feuilles, nous observons un accroissement continu de la teneur en glucosides pendant toute la période de développement de la tige en l'absence de fleurs (stades A,B et C) mais dès l'apparition de celles-ci se produit une chute brutale de la concentration de ces dérivés tandis que leur teneur dans les fleurs est d'emblée très élevée (stade D), constatation qui nous a déjà conduite à admettre l'existence d'un transfert des flavonoïdes des feuilles vers les fleurs et à envisager leur intervention dans le phénomène de floraison.

Au stade E, plein épanouissement des fleurs, le taux des glucosides baisse encore dans les feuilles, mais de façon moins intense, tandis qu'il reste constant dans les fleurs avec cependant une augmentation du lutéoloside aux dépens du glucolutéoloside, ce qui pourrait traduire un début de dédoublement de ce dernier en vue de l'utilisation du glucose libéré.

Quand les premiers fruits commencent à se former et qu'il y a encore beaucoup de fleurs (stade F), la baisse de concentration des glucosides dans les feuilles se poursuit ; dans les fleurs, un phénomène nouveau apparaît se traduisant par une chute importante du taux des glucosides qui porte surtout sur le lutéoloside, et par l'apparition d'une quantité relativement importante de lutéolol dont l'origine semble mieux s'accorder avec une hydrolyse des glucosides qu'avec une exaltation de la synthèse locale. Contrastant avec ce qui s'est produit pour les fleurs, les jeunes fruits ne contiennent qu'un taux relativement faible de glucosides et de lutéolol, ce qui pourrait s'expliquer par la chute des pétales, organes fort riches.

Au fur et à mesure de la formation des fruits, on assiste dans les feuilles à une remontée de la teneur en glucosides d'abord faible (stade G), puis très nette (stade H), comme s'il

se produisait un ralentissement de plus en plus marqué du transfert de ces composés vers les organes reproducteurs. Malgré tout, ce transfert paraît encore conséquent au stade G puisqu'on voit les fleurs qui demeurent retrouver un taux de glucosides élevé et que les fruits eux-mêmes s'en enrichissent fortement. Mais le fait le plus remarquable à ce moment est l'accroissement considérable, déjà amorcé antérieurement, de la teneur en lutéolol des fleurs, qui s'accompagne aussi d'une augmentation du taux de cett flavone dans les fruits. Ce lutéolol qui apparaît ainsi dans une proportion jamais atteinte dans aucun autre organe de la Gaude à quelque période de son développement doit certainement provenir, comme nous venons de le dire ci-dessus, d'une hydrolyse des glucosides dont la cause pourrait être l'utilisation du glucose dans la formation des fruits.

Avec la maturation des fruits et la formation des graines (stades H et J), le taux des glucosides dans les feuilles se stabilise à un niveau qui est celui qu'elles avaient dans la plante "en rosette" et qui correspond probablement à un métabolisme "d'entretien". La baisse continue de la teneur des fruits en ces dérivés peut être rapportée, comme nous l'avons déjà supposé pour le lutéolol, à une augmentation générale de la masse de matière sèche sans accroissement de celle des flavonoïdes.

De l'ensemble des faits que nous venons de rapporter découle, semble-t-il, la confirmation de certaines hypothèses actuellement émises sur la génèse et le métabolisme des flavonoïdes chez les végétaux.

Il apparaît ainsi :

- que les flavonoïdes doivent prendre naissance dans le organes chlorophylliens, et, à ce point de vue, si on ne peut refuser un rôle aux tiges, fleurs et fruits, il est bien évident qu c'estpresque essentiellement dans les feuilles, organes qui repré

sentent la plus grande surface verte de la plante qu'a lieu cette synthèse,

- que la formation des aglycones précèderait, mais de très peu, la formation des glucosides, les dérivés mono se formant sans doute avant les diglucosides, dont la proportion reste toujours plus faible,

- que les dérivés diphénoliques périphériques se formeraient à partir des dérivés monophénoliques correspondants,

- que l'hydroxylation sur le cycle B de l'apigénol pour conduire au lutéolol s'effectuerait plus lentement que la fixation du glucose sur la première de ces deux génines.

En ce qui concerne plus particulièrement la Gaude, il paraît évident qu'il existe au travers de la plante une circulation des flavonoïdes, qui n'intéresse pratiquement que les glucosides, assurant à partir des feuilles un transfert de ces composés en quantité infime vers la racine d'une part, en masse vers les inflorescences d'autre part.

BU LILLE

Il semble enfin qu'on puisse admettre qu'au niveau des organes reproducteurs : fleurs et fruits, les glucosides flavoniques jouent un double rôle métabolique, intervenant, après hydrolyse, tour à tour par chacun des groupes chimiques qui les constituent : glucose et flavones.

C'est ainsi que dans un premier temps, lors des phénomènes de la floraison, d'une part une quantité notable de flavonoïdes s'accumulerait dans certains organes floraux, comme les pétales qui leur doivent leur belle coloration jaune, en ne subissant qu'un faible dédoublement, ce qui justifierait la forte teneur en glucosides flavoniques que possèdent d'emblée les fleurs, et la petite quantité de lutéolol qui s'y trouve et qui ne peut venir des feuilles sous cette forme puisqu'il n'y en a pas dans la tige; d'autre part une certaine quantité de glucosi-

des subirait l'hydrolyse, le glucose s'accumulant (°) tandis que la flavone libérée interviendrait comme métabolite par un mécanisme inconnu dans l'un ou l'autre des nombreux phénomènes dont la fleur est le siège : formation des gamètes, fécondation ? ce qui pourrait expliquer qu'on ne retrouve pas dans l'inflorescence en fleurs (stades D et E) la quantité de flavonoïdes disparue des feuilles.

Dans un deuxième temps, correspondant à la formation des fruits, ce serait alors le glucose qui serait utilisé en quantité telle que son apport sous forme libre ne suffirait pas et que la plante serait alors obligée de faire appel, non seulement au glucose précédemment libéré des flavonoïdes et localement accumulé comme nous l'avons admis, mais aussi à celui combiné dans les glucosides présents, le dédoublement portant d'abord partiellement sur les diglucosides puis s'étendant aux dérivés monoglucosés. Cette interprétation permettrait d'expliquer certains de nos résultats, ainsi notamment la baisse du glucolutéoloside au moment de la pleine floraison (stade E) car des fruits ont déjà dû commencer à se former alors, sans que cela ne soit vraiment apparent. On comprend aussi pourquoi, un peu plus tard (stade F), on assiste à une baisse plus poussée de ce même glucolutéoloside et surtout à celle, beaucoup plus importante, du lutéoloside, tandis que le taux du lutéolol s'élève brusquement dans les fleurs (°°), indiquant, à n'en pas douter, que cette

(°) Il s'agit là d'une hypothèse, dont nous n'avons malheureusement pas pu vérifier le bien fondé car nous n'avions pas prévu dans notre programme de recherche de suivre le comportement des sucres.

(°°) On peut également noter, à cette époque, une augmentation du taux de lutéolol dans les feuilles, qui peut être interprétée comme un ralentissement de la transformation en glucosides par manque de glucose.

flavone libérée des glucosides "in situ" voit son rôle s'amenuiser, la presque totalité des fleurs, qui seront en fin de compte portées par la plante, étant déjà formée à ce stade de développement. Cette conception de la fin de l'intervention métabolique du noyau flavonique trouve une confirmation dans le fait qu'au moment (stade G) où l'inflorescence porte ses dernières fleurs, leur teneur en lutéolol s'est encore considérablement augmentée. A ce stade, il apparaît aussi que la formation des fruits, qui est très avancée, ne requiert plus une aussi grande quantité de glucose, ce qui ralentit l'hydrolyse des glucosides flavoniques et leur permet d'atteindre de nouveau dans les fleurs restantes une teneur élevée. Les fruits, dont beaucoup sont encore à cette époque au début de leur développement, profitent également du taux élevé en flavonoïdes : lutéolol et lutéoloside surtout, qu'ont pu leur transmettre en partie les fleurs d'où ils proviennent. Ultérieurement (stades H et J), la maturation et la formation des graines qui augmentent la masse des fruits se conjuguent pour entraîner dans ces derniers cette baisse du taux des flavonoïdes dont nous avons déjà donné précédemment l'explication.

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

Les flavonoïdes de la Gaude ont été pour nous l'objet d'un travail au terme duquel nous pouvons dresser le bilan suivant :

- La Gaude était connue pour renfermer deux aglycones : le lutéolol et l'apigénol, et un hétéroside : le lutéoloside, 7-monoglucoside du lutéolol. Outre ces dérivés, nous avons isolé et caractérisé deux autres glucosides : le 3', 7-diglucoside du lutéolol, auquel nous avons donné le nom de glucolutéoloside, et le 7-monoglucoside de l'apigénol ou cosmosioside. Un diglucoside de l'apigénol a été mis en évidence, mais n'a pu être isolé en quantité suffisante pour que son étude complète soit menée à bien.

- Une technique densitométrique que nous avons mise au point nous a permis de doser à ± 12% près chacun des principaux flavonoïdes dans les divers organes de la Gaude, aux stades successifs de son développement.

- Nous avons isolé une souche de tissu cambial de tige de Gaude chez lequel nous avons tenté, sans succès dans les conditions dans lesquelles nous avons opéré, de provoquer la synthèse de dérivés flavoniques.

- Nous avons, grâce à l'utilisation d'une souche de Carotte, cherché à cerner le rôle des flavonoïdes sur la croissance tissulaire.

Ces différents moyens d'approche par lesquels nous avons tenté d'aborder, à propos de la Gaude, les questions que posent les flavonoïdes chez les plantes, nous ont conduite à quelques conclusions :

- Les flavonoïdes que nous avons mis en évidence dans la Gaude appartiennent tous au groupe des flavones.

- Des flavonoïdes sont présents à tous moments, dans tous les organes de la Gaude. Toutefois, il est remarquable que

les graines présentent un contenu flavonique original par rapport aux autres parties de la plante. Ce fait, noté également chez d'autres végétaux, pourrait caractériser une catégorie de plantes dans laquelle la Gaude entrerait.

- Nous avons pu observer des flavonoïdes plus précisement dans les tissus épidermique, endodermique et médullaire des organes aériens.

- Les aglycones libres n'ont été mises en évidence que dans les feuilles, fleurs et fruits ; les premières peuvent être considérées comme les lieux essentiels de la synthèse flavonique, tandis que dans les fleurs et les fruits les aglycones proviendraient surtout de l'hydrolyse des glucosides.

En ce qui concerne la synthèse des flavonoïdes, nos résultats viennent confirmer un certain nombre d'hypothèses déjà émises, à savoir :

- que la formation des aglycones précèderait, tout au moins dans cette catégorie de plantes, celle des hétérosides,

- que les dérivés monophénoliques périphériques (*) seraient secondairement transformés en dérivés diphénoliques (**)

- que certains tissus, dont il faut assurément exclure le tissu cambial, seraient seuls capables d'effectuer la synthèse flavonique,

- que les dérivés flavoniques agiraient sur la croissance tissulaire,

- que les dérivés flavoniques interviendraient dans les phénomènes de floraison par leurs génines, et de fructification peut être par leurs oses.

(*) monohydroxylés, sur le cycle B.
(**) ortho-dihydroxylés, sur le cycle B.

Néanmoins notre travail est loin d'être exhaustif. Des flavonoïdes non identifiés apparaissent, bien qu'en faibles quantités, sur les chromatogrammes obtenus à partir des extraits de Gaude. Leur isolement, leur caractérisation, qui feront peut-être apparaître deux séries strictement homologues de composés dérivant, l'une de l'apigénol, l'autre du lutéolol, et leur dosage seraient sans doute la source de précieux renseignements.

La technique de culture tissulaire devrait d'autre part autoriser la mise en oeuvre de nouvelles expériences.

Il est permis de croire que des recherches similaires entreprises sur d'autres plantes permettraient de mieux cerner les problèmes que pose encore la biogénèse des flavonoïdes chez les végétaux.

B I B L I O G R A P H I E

AHLGRIMM (E.) -1956- Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Stoff wecksel produkte dargestellt an Mentha piperita und an Fagopyrumarten.
Planta, 47, 255.

ALYUKINA (L.) -1971- Dynamics of the accumulation of flavonoids in Hypericum perforatum and Hypericum scabrum.
Tr. Inst. Bot., Akad. Nauk Kaz. S.S.R., 29, 110 ; C.A., 76, 56660.

ALYUKINA (L.) & KLYSHEV (L.) -1966- Changes in amount and qualitative composition of flavonoids in St John's Wort.
Fenol'nye Soedin Ikh Biol. Funkts, Mater. Vses. Semp. 1 st 1966 (Publ.1968), 243 ; C.A., 71, 757.

ATTRIDGE (T.) & SMITH (H.) -1967- A phytochrome-mediated increase in the level of phenylalanine ammonia-lyase activity in the terminal buds of Pisum sativum.
Biochim. Biophys. Acta, 148,805.

BALTABAEVA (G.) -1971- Dynamics of the accumulation of a flavonoid fraction in darmin (Artemisia cina).
Tr. Inst. Bot., Akad, Nauk Kaz. S.S.R., 29, 148 ; C.A., 76, 56609.

BARBER (G.) -1962- Enzymic glycosylation of quercetin to rutin.
Biochem., 1,463.

BARBER (G.) & CHANG (M.) -1968- The enzymic glycosylation of quercetin to quercitrin.
Phytochem., 7,35.

BASSLER (R.) -1957- Der Einfluss ökologischer und ontogenetischer Faktoren auf die Flavone von Fagopyrum sagittatum Gilib., Pharm., 12,758.

BELLAMY (L.) -1958- The infra-red spectra of complex molecules- Methuen, London.

BERTHELOT (A.) -1934- Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques.
Bull. Soc. Chim. biol., 16,1553.

BIRCH (A.) -1962- Dans the Chemistry of Flavonoid Compounds.
GEISSMAN (T.A.) Ed. Pergmon Press.

BIRCH (A.) & DONOVAN (F.) -1953- Some possible routes to derivation of orcinol and phloroglucinol.
Austr. J. Chem., 6,360.

BU LILLE

BONDIVENNE (R.), BUSH (N.), SIMOND (J.) & MONTEIL (A.) -1970- De la possibilité de dosage sans élution de produits séparés par chromatographie sur couches minces.
J. Chromatogr., 50, 274.

BOTTOMLEY (W.), SMITH (H.) & GALSTON (A.) -1966- Flavonoid complexes in Pisum sativum III-The effect of light on the synthesis of kaempferol and quercetin complexes.
Phytochem., 5, 117.

BOURZEIX (M.) & HEREDIA (N.) -1967- Dosage des flavonols dans le vin et dans les extraits de raisin.
Ann. Technol. Agr., 16, 349.

BUZIASHVILI (I.), KOMISSARENKO (N.) & KOLESNIKOV (D.) -1972- Level of polyphenolic compounds in Rhus coriaria and Cotinus coggyria leaves.
Rast. Resur., 8, 237 ; C.A., 77, 39094.

CHABANNES (B.) -1970- Etude de la biogénèse des flavones et des acides cinnamiques à l'aide de molécules marquées au carbone 14.
Thèse Doct. Sc. Physiques Lyon.

CHALLICE (J.) & WILLIAMS (A.) -1968- Phenolic compounds of the genus Pyrus. The occurence of flavones and phenolic acid derivatives of 3, 4 - dihydroxybenzyl alcohol 4-glucoside in Pyrus calleryana.
Phytochem., 7, 119.

CHEVREUL (E.) -1830- Rapport de la séance du 13 février de la Société philomatique.
J. Chim. méd., 6, 157.

CLAIR (G.), DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1963- Recherches sur la répartition des pigments flavoniques chez les Crucifères.
Bull. Soc. bot. Fr., 110, 1.

CLAIR (G.), DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1964- Sur le métabolisme des pigments flavoniques. Répartition chez le Sinapis alba L. et influence de la lumière.
Bull. Soc. bot. Fr., 111, 215.

COMBIER (H.) -1968- Recherches chimiques, taxinomiques et physiologiques sur les flavonoïdes des Crassulacées.
Thèse Ing. Doct. Lyon.

CONN (E.) -1964- Dans Biochemistry of Phenolic Compounds.
HARBORNE J.B. Ed., Academic Press, New-York.

CORNILLEAU (J.) -1954- De la caractérisation et du dosage des dérivés flavoniques.
Thèse Doct. Univ. Paris.

DAVIS (B.) -1955- Intermediates in amino acid biosynthesis.
Advances in Enzymology, 16,247.

DELAVEAU (P.) -1964- Essai de localisation de la biogénèse des flavonoïdes dans le genre Tropaeolum. Isolement de rutoside de T. peregrinum L.
C.R. Acad. Sc., Paris, Série D, 258, 318.

DELAVEAU (P.) -1965- Sur la répartition des pigments flavoniques chez la Grande Capucine (Tropaeolum majus L.).
C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 260, 1469.

DELAVEAU (P.) -1965- Variations de la teneur en pigments flavoniques au cours du développement chez le Tropaeolum majus L.
C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 260, 4815.

DELAVEAU (P.) -1966- Dosage des pigments flavoniques chez les végétaux.
Prod. Probl. Pharm., 21, 164.

DELAVEAU (P.) -1967- Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes de la Grande Capucine (Tropaeolum majus L.).
Thèse Doct. Sc. Nat. Paris.

DELAVEAU (P.) -1968- Essai de localisation histochimique des flavonoïdes par observation en lumière ultra-violette.
C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 267, 726.

DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1961- Importance des composés polyphénoliques et en particulier des flavonoïdes.
Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 7, 24.

DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1968- Répartition des pigments flavoniques, dans les feuilles panachées.
C.R. Acad. Sc. Paris, Série D, 267, 317.

DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1969- Répartition anatomique et histologique des flavonoïdes chez le Ruscus racemosus L. (Liliacées).
C.R. Acad. Sc., Paris, Série D, 269, 1074.

DILLEMANN (G.) -1968- Les colorants naturels.
Prod. Prob. Pharm., 23, 395.

DUBREUIL (A.), MONIEZ (R.), FRIGOT (P.) & GORIS (A.) -1961- Contribution à l'étude de la Gaude, Reseda luteola L.. Isolement d'un nouvel hétéroside du lutéolol.
Ann. Pharm. fr., 19, 655.

DURET (S.) & PARIS (R.) -1970- Sur les flavonoïdes et les acides phénols de quelques espèces de Rauwolfia.
Plant. Méd. Phytother., 4, 158.

FRANCIS (C.) & WONG (E.) -1971- Flavonoïds in genotypes of Trifolium Subterraneum. Inheritance patterns of flavonoïd mutants of Trifolium Subterraneum.
Phytochem., 10, 1983.

FORREST (G.) -1969- Studies on the polyphenol metabolism of Tissue cultures derived from the Tea plant (Camellia sinensis L.). Biochem. J., 113, 765.

FURUYA (M.), GALSTON (A.) & STOWE (B.) -1962- Isolation from Peas of co-factors and inhibitors of indolyl-3-acetic acid oxydase. Nature, 193, 456.

GAUTHERET (R.) -1942- Manuel technique de culture des tissus végétaux.
Masson Ed. Paris.

GORIS (A.) -1964- Action comparée de la vanilline et du vanilloside sur le développement du tissu de Carotte cultivé "in vitro". Ann. Pharm. fr., 22, 217.

GORIS (A.) -1965- Toxicité comparée de la vanilline et du vanilloside sur les cultures "in vitro" de tissu de Carotte. Ann. Pharm. fr., 23, 275.

GORIS (A.) & ARNOULD (L.) -1907- Conservation et stérilisation des noix de Kola fraîches.
Bull. Sci. pharmacol., 14, 159.

GORIS (A.), DUBREUIL (A.) & MONIEZ (R.) -1961- Contribution à l'étude de la Gaude, Reseda luteola L. Répartition des dérivés flavoniques dans les organes de la plante.
Ann. Pharm. fr., 19, 651.

GORIS (A.), BOURIQUET (R.) & THOMAS (J.C.) -1971- Sur les propriétés excitoformatrices du suc de xylème de Carotte.
96ème Congr. nation. Soc. sav. Toulouse (à paraître).

GRAVES -1857- Flore de l'Oise.

GRISEBACH (H.) -1957- Zur Biogenese des Cyanidins.
Z. Naturforsch., 12b, 227.

GRISEBACH (H.) -1958- The biogenesis of cyanidin. The source of the B. ring.
Z. Naturforsch., 136, 335.

GRISEBACH (H.) & BOPP (M.) -1959- Studies on the biogenetic relation between quercetin and cyanidine in buckwheat with the help of a C14 labeled compound.
Z. Naturforsch., 14b, 485.

GRISEBACH (H.) -1962- Die Biosynthese der Flavonoide.
Planta Med., 385.

GRISEBACH (H.) -1965- Dans Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.
Goodwin (T.) Ed. Acad. Press, New-York.

GRISEBACH (H.) -1967- Biosynthetic patterns in micro-organisms and higher plants.
Wiley J. and Sons Ed. New-York, London, Sydney.

GUEDOV (P.) -1969- Changes in amount of flavonoids in Corchorius olitorius.
Farm. Zh. (Kiev), 24, 63.

GUERIN (H.), DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1971- Localisations histochimiques. Procédés simples de localisation de pigments flavoniques. Application à quelques Phanérogames.
Bull. Soc. bot. Fr., 118, 29.

HAAG-BERRURIER (M.) -1964- Recherches phytochimiques sur la Piloselle, Hieracium Pilosella L.. Etude particulière des oxycoumarines et des flavonoïdes.
Thèse Doct. Etat Pharmacie, Strasbourg.

HAHLBROCK (K.) & WELLMANN (E.) -1970- Light-induced flavone biosynthesis and activity of P.A.L. and U.D.P. - apiose synthetase in cell suspension cultures of Petroselinum hortense.
Planta, 94, 236.

HAHLBROCK (K.), SUTTER (A.), WELLMANN (E.), ORTMANN (R.) & GRISEBACH (H.) -1971- Relationship between organ development and activity of enzymes involved in flavone glycoside biosynthesis in young parsley plants.
Phytochem., 10, 109.

HANGELDIAN (A.) -1959- Les tapis d'Orient.
Le Prat Ed., Paris.

HARBORNE (J.B.) -1954- Use of Alkali and Aluminium Chloride in the spectral Study of phenolic plant pigments.
Chem. and Ind., 11, 1142.

HARBORNE (J.B.) -1962- dans The Chemistry of Flavonoid Compounds.
Geissman T. Ed. Pergamon Press, Oxford.

HARBORNE (J.B.) -1964- Biochemistry of Phenolic Compounds.
Academic Press, London and New-York.

HARBORNE (J.B.) -1967- Comparative Biochemistry of the Flavonoids.
Academic Press, London and New-York.

HARPER (D.) & SMITH (H.) -1969- Analytical and preparative thin layer chromatography of flavonol glycosides and their acylated derivatives from pea tissues.
J. Chromatogr., 41, 138.

HARPER (D.) & SMITH (H.) -1969- Precursor-incorporation evidence on the locus of phytochrome control in the biosynthetic pathway of flavonoids in Pisum sativum.
Biochem. Biophys. Acta., 184, 230.

HARPER (D.), AUSTIN (D.) & SMITH (H.) -1970- The photocontrol of precursor incorporation into the Pisum sativum flavonoids.
Phytochem., 9, 497.

HEATHCOTE (J.C.) & HAWORTH (C.) -1969- An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates.
J. Chromatogr., 43, 84.

HEIN (S.) -1959- Untersuchungen über die Flavonoide und Saponine in Verbascum-Arten, insbesondere in den Blüten von Verbascum phlomoïdes.
Planta Med., 7, 185.

HELLER (R.) -1953- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro".
Thèse Doct. Sc. Nat., Paris.

HESS (D.) -1964- Der Einbau methylgruppen-markierter Ferulsaüre und Sinapinsaüre in die Anthocyans von Petunia hybrida.
Planta, 60, 568.

HESS (D.) -1968- Biochemische Genetik. Springer Verlag., Berlin.

HOROWITZ (R.) & GENTILI (B.) -1960- Flavonoids of Citrus-Isolation of some aglycones from the Lemon (Citrus limon).
J. Org. Chem., 25, 2183.

HUTCHINSON (A.), TAPER (C.) & TOWERS (G.) Studies of phloridzin in Malus.
Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 901.

JACQUIN-DUBREUIL (A.) -1967- Isolement d'un nouvel hétérodide flavonique de la Gaude, Reseda luteola L..
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 264, 149.

BU LILLE

JACQUIN-DUBREUIL (A.) -1972- Dosage densitométrique direct par reflexion des flavonoïdes de la Gaude, Reseda luteola L., séparés par chromatographie sur couche mince.
J. Chromatogr., 71, 487.

JURD (L.) -1956- A spectrophotometric Method for the Detection of o. Dihydroxyl Groups in Flavonoid Compounds.
Arch. Biochem. and Biophys., 63, 376.

JURD (L.) -1962- Spectral Properties of Flavonoïd Compounds dans The Chemistry of Flavonoïds Compounds.
Geissman T. Ed. Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris.

JURD (L.) -1962- dans The Chemistry of Flavonoids Compounds.
Geissman T. Ed. Pergamon Press, Oxford, London, New-York, Paris.

JURD (L.) -1969- Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural corelations.
Phytochem., 8, 445.

JURD (L.) & HOROWITZ (R.) -1957- Spectral Studies on Flavonols. The Structure of Azalein.
J. Org. Chem., 22, 1618.

KOCH (M.) -1965- Gentianine et swertiamarine de l'Anthocleista procera Leprieur ex. Bureau (Loganiacées).
Thèse Pharm. Paris.

KUKENOV (M.) -1970- Content of flavonoids in some species of knotweeds and sorrels.
Tr. Inst. Bot. Akad. Nauk SSR, 28, 199 ; C.A. 73, 127774.

KUKENOV (M.) & MIKHAILOVA (V.) -1971- Dynamics of the accumulation of the flavonoïds in representatives of the family Polygonaceae.
Tr. Inst. Bot. Akad. Nauk Ka. SSR, 29, 139 ; C.A. 76, 56648.

KISELEVA (A.), MINAEVA (V.) & GORBALEVA (G.) -1971- Accumulation of flavonols in Bupleurum aureum during its introduction.
Byull. Gl. Bot. Sada., 82, 86 ; C.A. 77, 16585.

KOVOOR (A.) -1954- Action de quelques substances stimulantes d'origine naturelle sur le développement des tissus végétaux cultivés "in vitro".
Ann. Biol., 30, 417.

KOZJEK (F.) -1968- Chemistry of Vincetoxicum officinale culture.
Farm. Vestn. (Ljubljana), 19, 234 ; C.A. 71, 10253.

LARSON (J.) -1969- Magnesol thin-layer chromatography of flavonoid compounds.
J. Chromatogr., 43, 287.

LARSON (R.) -1971- Glucosylation of quercetin by a maize pollen enzyme.
Phytochem., 10, 3073.

LEBRETON (P.) & CHOPIN (J.) -1963- Contribution à l'étude spectrographique infrarouge des composés flavoniques.
Spectro. Chim. Acta., 19, 2099.

LEIBA (S.) -1967- Sur les flavonoides de la Bryone (Bryonia dioïca Jacq., Cucurbitacées).
Thèse Doct. Univ. Pharmacie, Paris.

LEIBA (S.), DELAVEAU (P.) & PARIS (R.) -1968- Répartition et variations des pigments flavoniques chez la Bryone (Bryonia dioïca Jacq., Cucurbitacées).
Plant. Méd. Phytother., 2, 81.

LIPFERT (R.) & HONERLAGEN (H.) -1970- Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der flavonoïden Inhaltsstoffe in den Früchten der Mariendistel.
Deut. Apoth. Ztg., 110, 873.

MABRY (T.), MARKHAM (K.) & THOMAS (M.) -1970- The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.

MAKHSUDOVA (B.), PAKUDINA (Z.) & SADYKOV (A.) -1968- Flavonols of Hibiscus and hybrids of Hibiscus with cotton plants.
Khim. Prir. Soedin., 3, 346 ; C.A. 68, 27517.

MARSH (C.) -1960- Reactions of uridine diphosphate sugars catalysed by enzymes of French-bean leaves.
Biochim. Biophys. Acta., 44, 359.

MASCRE (M.) & PARIS (R.) -1936- Recherches biochimiques et pharmacologiques sur le rutoside.
Bull. Sci. pharmacol., 43, 279.

MELIN (D.) -1964- Etude par chromatographie sur papier du contenu en flavonoïdes des feuilles de Periploca graeca L..
Ann. sci. Univ. Besançon, 2ème série, Bot., 20, 87.

MC CLURE (J.) & WILSON (K.) -1970- Photocontrol of C-glycosylflavones in Barley seedlings.
Phytochem., 9, 763.

MEL'NICHUCK (G.) -1971- Consolida regalis flavonoids.
Ukr. Bot. Zh., 28, 525 ; C.A. 76, 32233.

MICHAUD (J.) -1966- Dosage colorimétrique des polyphénols réducteurs.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 105, 219.

MICHAUD (J.) & LESCA (M.F.) -1968- Densitométrie des hétérosides du lutéolol et du quercétol.
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 107, 49.

MINAEVA (V.), VOLKHONSKAYA (T.) & KISELEVA (A.) -1968- Storage of flavone compounds during ontogenesis with respect to vertical zonation.
Polez. Rast. Prir. Flory. Sib., 109 ; C.A. 69, 103867.

MINAEVA (V.), VOLKHONSKAYA (T.) & VALUTSKAYA (A.) -1966- (Pub.1968) Bupleurum flavonoids, biological role.
Fenol'nye Soedin. Ikh Biol. Funkts. Mater. Vses. Simp., 180 ; C.A. 71, 10260.

MOHR (H.) -1964- The control of plant growth and development by light.
Biol. Rev., 39, 87.

MOLDENHAUER (F.) -1856- Darstellung Eigenschaften und procentische Zusammensetzung des Luteolins.
Ann. Chem. Pharm., 100, 180.

MONTIES (B.) -1969- Présence de composés polyphénoliques dans les chloroplastes d'Angiospermes.
Bull. Soc. fr. Physiol. végét., 15, 29.

MÜLLER (R.) & POHL (R.) -1970- Die Flavonolglycoside von Euphorbia amygdaloides und ihre quantitative Bestimmung in verschiedenen Entwicklungsstaden der Pflanze.
Planta Med., 18, 114.

MUMFORD (F.), SMITH (D.) & CASTLE (J.) -1961- An inhibitor of acid-oxydase from Pea tips.
Plant Physiol., 36, 752.

MUMFORD (F.), SMITH (D.) & HEYTLER (P.) -1964- The effect of red light on the flavonoid composition of etiolated pea plumules.
Biochem. J., 91, 517.

MURASHIGE (T.) & SKOOG (F.) -1962- A revised medium for rapid growth and bioassayswith Tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 473.

MURGU (L.) & PARIS (R.) -1970- Sur les composés polyphénoliques de Spirea crenata L..
Plant. Med. Phytother., 4, 201.

NAKAOKI (T.) -1935- Glucoside of the flavone of the white flowers. Constituents of Cosmos bipennatus.
Pharm. Soc. Japan, 55, 967.

NETIEN (G.) & COMBET (J.) -1968- Essais sur la culture "in vitro" des tissus de plantes médicinales.
2ème Collq. intern. Plant. méd. Angers.

NICK (E.) -1953- Beitrage zur Physiologie der Gerbstoffe und Flavonfarbstoffe bei Polygonum Bistorta L..
Pharmaz., 8, 940.

NITSCH (J.) & NITSCH (C.) -1959- Growth factors in the Tomato fruit
Proc. 4th Int. Conf. on Plant Growth Regulation, Yonkers, New-York.

NITSCH (J.) & NITSCH (C.) -1960- Action de quelques flavonoïdes sur la croissance de tissus de Topinambour cultivés "in vitro".
Bull. Soc. bot. Fr., 107, 326.

NITSCH (J.) & PARIS (R.) -1962- Action des flavonoïdes sur la croissance de tissus de Topinambour cultivés "in vitro".
Bull. Soc. bot. Fr., 109, 113.

NOMURA (Y.) -1959- Organic spot tests. Detection of I-2 dihydroxy compounds.
Bull. Chem. Soc. Japan, 32, 889.

OBERDORFER (E.) -1970- Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Süd-Deutschland.
Ulmer E. Edit. Stuttgart.

OUNG-BORAN -1965- Contribution à l'étude botanique, chimique et pharmacologique de Baptisia australis L..
Thèse Doct. Univ. Pharmacie, Lyon.

PACHECO (H.) -1958- Biochimie comparée des pigments colorants les fleurs de Crucifères-Sur la structure du glucoside A extrait des fleurs de Diplotaxis tenuifolia.
Bull. Soc. Chim. biol., 40, 511.

PAHLICH (E.) -1969- Bildung und Beeinflussbarkeit von Flavonoiden und Chlorogensaüren in Keimlingen Silybum Marianum.
Flora (Jena) Abt B, 158, 443.

PARIS (R.) -1955- Sur la présence d'un glucoside de la lutéoline chez la Gaude (Reseda luteola L.).
Ann. Pharm. fr., 13, 485.

PARIS (R.) -1962- Chromatographie sur papier de quelques dérivés flavoniques.
Bull. Soc. Chim. biol., 34, 767.

PARIS (R.) & BEAUQUESNE (L.) -1950- Les dérivés flavoniques.
Ann. Pharm. fr., 8, 228.

PARIS (R.) & BRUM-BOUSQUET (M.) -1971- Sur les pigments flavoniques du Genêt à balai, Sarothamnus scoparius Koch..
Répartition et métabolisme.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 273, 1116.

PARIS (R.), HERISSET (A.) & CHAUMONT (J.P.) -1968- Sur les polyphénols (flavonoïdes, acides-phénols, coumarines) des capitules de l'Anthemis nobilis L., variations au cours de la floraison.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 267, 740.

PERKIN (A.) -1896- Luteolin Part I et Luteolin Part II.
J. Chem. Soc., 69, 206 et 799.

PETIARD (V.) -1970- Amélioration des plantes. Production d'alcaloïdes par culture des tissus.
D.E.A., U.E.R. Sciences, Orsay.

PISLARASU (N.), ISTUDOR (V.) & POPOVICI (C.) -1969- Chemical study of Sophora prodanii. Dynamics of quercetol and rutoside accumulation.
Farmacia (Bucharest), 17, 695 ; C.A. 72, 114838.

POETHKE (W.) & BULIN (P.) -1969- Phytochemische Untersuchung einer neu gezüchteten Kamillensorte.
Pharm. Zentrahl., 108, 733.

PORTER (W.), BRICE (B.), COPLEY (M.) & COUCH (J.) -1947- Tentative spectrophotometric method for the determination of rutin in various preparations.
Circulaire A.I.C. 159, Bureau of agricultural and industrial chemistry, agicultural research administration U.S. Depart. of Agriculture.

RADZHABOV (S.) & PAKANAEV (Ya.) -1971- Dynamics of flavonoid compounds in Sophora pachycarpa.
Rast. Resur., 7, 274 ; C.A. 75, 85149.

RAYNAUD (J.) & LEBRETON (P.) -1970- Les hétérosides flavoniques de l'Anemone hepatica L..
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 271, 1128.

RIBEREAU-GAYON (P.) -1968- Les composés phénoliques des végétaux.
Dunod Edit., Paris.

RAZINSKAITE (D.) -1971- Active substances of Hypericum perforatum. Flavonoids and dynamics of their contents.
Liet. T.S.R. Mokslu Akad. Darb., Ser. 1, 89 ; C.A. 75, 72427.

RETEZEANU (M.), TARPO (E.), DROCAN (R.) & TEODORESCU (A.) -1972- Chemical study of Rosa rugosa. Flavone contents of the fruits and the leaves of Rosa rugosa.
Farmacia (Bucharest), 20, 167 ; C.A. 77, 58790.

SATO (M.) -1966- Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts.Conversion by the isolated chloroplasts of p-coumaric acid to caffeic acid.
Phytochem., 5, 385.

SATO (M.) -1967- Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts.Phenolase as an enzyme concerning the formation of esculetin.
Phytochem., 6, 1363.

SCHULTZ (G.) -1969- Translocation of flavonoids in the aerial parts of Trifolium.
Z. Pflanzenphysiol., 61, 29.

SHOSTAKOVSKII (M.), TYUKAVKINA (N.), KIRILLOW (A.), LAPTEVA (K.) & DEVYATKO (N.) -1972-
Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR, Ser Khim. Nauk., 2, 121.

SKRZYPCZAKOWA (L.) -1968- Flavonoids in the family Liliaceae. Flavone derivatives in the flowers of Colchicum automnale L..
Diss. Pharm. Pharmacol., 20, 551 ; C.A. 70, 17543.

SMITH (H.) & ATTRIDGE (T.) -1970- Biochemical studies on the photocontrol of flavonoids biosynthesis. Increased phenylalanine ammonia-lyase activity due to light treatment and its significance for the mode of action of phytochrome.
Phytochem., 9, 487.

SMITH (H.) & HARPER (D.) -1970- Biochemical studies on the photocontrol of flavonoid biosynthesis-effects of short-and long-term irradiation on the flavonoid complement of the terminal buds of Pisum sativum var. Alaska.
Phytochem., 9, 477.

STAFFORD (H.) -1965- Flavonoids and related compounds produced in the first internode of Sorghum vulgare Pers. in darkness and in light.
Plant. Physiol., 40, 130.

SUBRAMANIAN (S.) & NAGARAJAN (S.) -1970- Chemical components of the roots and seeds of Cassia mimosoides.
Indian J. Pharm., 32, 70.

SUTTER (A.) & GRISEBACH (H.) -1969- Biosynthesis of flavonoids. Occurence of the "NIH-shift" in flavonoid biosynthesis.
Phytochem., 8, 101.

SUTTER (A.), ORTMANN (R.) & GRISEBACH (H.) -1972- Purification and properties of an enzyme from cell suspension cultures of parsley catalysing the transfer of D-glucose from U.D.P.-D-glucose to flavonoids.
Biochem. Biophys. Acta, 258, 71.

SWIFT (L.) -1967- Thin layer chromatographic-spectrophotometric analysis for neutral fraction flavones in orange peel juice.
J. Agr. Food Chem., 15, 99.

TANGUY (J.) & GALLET (M.) -1969- Evolution quantitative en fonction du temps des composés phénoliques chez le Nicotiana Xanthi n.c. infecté à 20° C par le virus de la Mosaïque du Tabac.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 269, 773.

TEOULE (R.) -1960- Contribution à la synthèse de quelques flavones et leurs glucosides.
Thèse Ing. Doct. Lyon.

THOMAS (J.C.) -1971- Premiers essais d'isolement de la substance excitoformatrice du suc de xylème de Carotte.

D.E.A. Biol. vég. Lille.

TISSUT (M.) -1967- Etude spectrographique et chromatographique des flavonoides du Hêtre, Fagus sylvatica L..
Phytochem., 6, 1291.

TISSUT (M.) -1969- Etude de la répartition des flavonoïdes dans les différents tissus de la feuille de Hêtre.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 268, 65.

TISSUT (M.) & EGGER (K.) -1972- Les glycosides flavoniques foliaires de quelques arbres, au cours du cycle végétatif.
Phytochem., 11, 631.

TORCK (M.) -1970- Recherches sur les flavonoïdes des légumineuses.
Thèse Doct. Pharm. Lille.

TRONCHET (J.) -1966- Etude des constituants flavoniques de Convolvulus sepium. Différences observées entre les sujets croissant dans une station ombragée et dans une station fortement insolée
Ann. sci. Univ. Besançon, 3ème série, Bot., 3, 52.

TRONCHET (J.) -1968- Essai de localisation des substances flavonoïdiques dans l'épaisseur des limbes de Bryophyllum crenatum Bak. à divers stades de développement.
C.R. Acad. Sc. Paris, série D, 266, 882.

TRONCHET (J.) -1968- Répartition des diverses substances flavonoïdiques dans les tiges jeunes de 141 espèces d'Angiospermes, de Gymnospermes et de Ptéridophytes.
Ann. sci. Univ. Besançon, 3ème série, Bot., 5, 9.

TRONCHET (J.) -1970- Evolution des flavonols dans les pétioles et les limbes de Paeonia corallina Retz. au cours du développement
Ann. sci. Univ. Besançon, 3ème série, Bot., 8, 15.

TRONCHET (J.) -1971- Les dérivés flavoniques des feuilles d'Allium porrum L.. Localisation, répartition et effets des traumatismes
Bull. Soc. bot. Fr., 118, 173.

TRONCHET (J.) -1972- Les dérivés flavoniques des fruits, localisation, répartition et évolution.
Bull. Soc. bot. Fr., 119, 25.

TYUKAVKINA (N.), LAPTEVA (K.) & DEVYATKO (N.) -1969- A quantitative spectrophotometric determination of flavonoids by means of thin-layer chromatography.
Zh. Anal. Khim., 24, 777 ; C.A. 71, 62390.

UNDERHILL (E.), WATKIN (J.) & NEISH (A.) -1957- Biosynthesis of quercetin in Buckweat.
Canad. J. Biochem. Physiol., 35, 219.

VALUTSKAYA (A.) & MINAEVA (V.) -1970- Accumulation of free and glycosided flavonols in Bupleurum multinerve during the growth period.
Ekol. Morfol. Biokhim. Osob. Polez. Rast. Dikorastushchei. Flory Sib., 213 ; C.A. 2, 126546.

VAUGHAN (P.) & BUTT (V.) -1969- Hydroxylation of flavonoids by a phenolase preparation from leaves of Spinach Beet.
Phytochem., 8, 1373.

VILLE (A.) & PACHECO (H.) -1967- Biogénèse des flavanones et des flavanonols de Robinia pseudoacacia, Prunus avium et Prunus mahaleb.
Bull. Soc. Chim. biol., 49, 657.