

ORIGINE ET CARACTERES DE LA SÉCRÉTION D'AGLYCONES FLAVONOLIQUES PAR LES BOURGEOIS D'*AESCULUS HIPPOCASTANUM*

YVETTE CHARRIÈRE et MICHEL TISSUT

Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université I de Grenoble, France

(Reçu le 18 juillet 1972. Accepté le 8 novembre 1972)

Key Word Index—*Aesculus hippocastanum*; Hippocastanaceae; flavonol aglycones; secretion; leucoanthocyanins; coumarins; annual variation.

Abstract—Flavonol aglycones are present in the oil excreted by buds of *Aesculus hippocastanum* L. and are probably synthesized in glandular hairs situated on the inner side of bud scales. Flavonols are most abundant in the hairs, being much less concentrated in all other scale tissues. Flavonol accumulation in the buds reaches a maximum both in the Spring and the Autumn and this is related to the accumulation of leaf flavonols and leucoanthocyanes and of scale and bark coumarins.

Résumé—Les aglycones de flavonols présents dans la sécrétion des bourgeons de marronnier sont vraisemblablement produits par des poils glandulaires situés à la face interne des écailles. Les flavonols sont présents en grande abondance dans les poils, et, à concentration beaucoup plus faible, dans les autres tissus de l'écaille. Le cycle annuel de la sécrétion montre deux pics, à l'automne et au printemps. Ce cycle est comparé à celui des flavonols et des leucoanthocyanes foliaires, et à celui des coumarines des tiges et des bourgeons.

INTRODUCTION

CONTRAIREMENT aux leucoanthocyanes et aux catéchines qui peuvent se polymériser, la plupart des flavonoïdes sont généralement présents chez les végétaux supérieurs sous forme d'hétérosides hydrosolubles contenus dans les vacuoles¹ ou les plastes² de la cellule. On connaît cependant aujourd'hui un certain nombre d'exemples de production des mêmes flavonoïdes sous forme d'aglycones libres, hydrophobes, s'accumulant à l'extérieur de la matière vivante: (a) Pour les plantes herbacées, ce phénomène se rencontre chez un grand nombre de Primulacées (*P. obconica*, *veris*, *elatior*, *florindae* . . .³) dont les parties aériennes sont recouvertes d'une glue ou d'une farine riches en flavonoïdes. Il apparaît également chez certaines Fougères dont la face inférieure des frondes est tapissée d'une poudre orangée constituée de flavonols (*Pityrogramma chrysoconica*⁴), de chalcones ou de dihydrochalcones (*P. chrysophylla*⁵); (b) Chez les végétaux ligneux, l'accumulation d'aglycones flavonoïdiques peut se produire à deux niveaux différents: soit dans les bois de cœur⁶⁻⁹

¹ GUILLERMOND, A. et GAUTHERET, R. (1933) *Compt. Rend.* **196**, 369.

² MONTIES, B. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg.* **15**, 1, 29.

³ WOLLENWEBER, E. et SCHNEPF, E. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, S216.

⁴ WOLLENWEBER, E. (1972) *Phytochem.* **11**, 425

⁵ NILSSON, M. (1961) *Acta Chem. Scand.* **15**, 154, 211.

⁶ MAHESH, U. B. et SESHADRI, T. R. (1954) *J. Sci. Ind. Res.* **13**, B835.

⁷ MENTZER, C., PACHECO, H. et VILLE, A. (1954) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1137.

⁸ PERKIN, A. G. et COPE, F. (1895) *Soc.* **67**, 937.

⁹ CHADENSON, M., MOLHO-LACROIX, L., MOLHO, D. et MENTZER, C. (1955) *Compt. Rend.* **240**, 1362.

(*Pinus*, *Prunus*, *Artocarpus* . . .) et parfois dans l'écorce ou le liège,^{10,11} soit à l'extérieur, au niveau des bourgeons ou des très jeunes pousses annuelles.¹²

TABLEAU 1. NATURE DES AGLYCONES FLAVONOÏDIQUES LIBRES, PRÉSENTS DANS LES BOIS DE COEUR OU LES SÉCRÉTIONS DE BOURGEONS DE DIFFÉRENTS ARBRES

Différentes espèces des genres	Sécrétions de bourgeons					Flavonoïdes dans les bois de coeur											
	<i>Aesculus</i>	<i>Platanus</i>	<i>Alnus</i>	<i>Betula</i>	<i>Populus</i>	<i>Artocarpus</i>	<i>Melicope</i>	<i>Rhus</i>	<i>Pterocarpus</i>	<i>Gleditsia</i>	<i>Robinia</i>	<i>Distemonanthus</i>	<i>Prunus</i>	<i>Nothofagus</i>	<i>Larix</i>	<i>Thuja</i>	<i>Pinus</i>
Flavones			+	+	+	+					+	+	+				+
Flavonols	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+				+
Flavanones				+	+								+	+			+
Flavanonols								+		+	+		+	+	+	+	+
Chalcones					+						+						+
Isoflavones									+				+				

Quel que soit le site d'accumulation, le mélange d'aglycones sécrété est généralement complexe (Tableau 1) (Il ne comprend pas moins de 23 aglycones différents chez *Betula ermanii*) et les flavonoïdes méthylés y sont très fréquents. Ces caractères sont donc très différents de ceux du mélange hétérosidique des feuilles qui ne comporte généralement que deux ou trois aglycones peu ou pas méthylés.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la production d'aglycones de flavonoïdes par les végétaux ligneux, au niveau du bois ou des bourgeons apparaît comme un phénomène limité à un petit nombre d'espèces, disséminées dans l'ensemble des végétaux supérieurs. Ainsi, la sécrétion flavonique des bourgeons apparaît chez les Salicacées (*Populus*, mais pas *Salix*),¹³⁻¹⁶ les Bétulacées (*Alnus*, *Betula*, mais pas *Corylus* ni *Carpinus*)¹⁷⁻²¹ chez les Platanacées¹² (*Platanus*), les Hippocatanacées (*Aesculus*)^{22,23} et chez certaines Rosales.^{24,25a,b} Il n'apparaît actuellement pas de relation entre l'accumulation des aglycones dans les bois de coeur et leur sécrétion par les bourgeons (Tableau 1).

¹⁰ KURTH, E. F., RAMANATHAN, V. et VENKATARAMAN, K. (1956) *J. Sci. Ind. Res.* **15B**, 139.

¹¹ HERGERT, L. et KURTH, E. F. (1952) *Tappi.* **35**, 59.

¹² CHARRIÈRE, Y. (1970) Thèse 3ème cycle.

¹³ EGGER, K. et TISSUT, M. (1968) *Compt. Rend.* **267**, 1329.

¹⁴ EGGER, K., TISSUT, M. et WOLLENWEBER, E. (1968) *Phytochem.* **8**, 2425.

¹⁵ WOLLENWEBER, E. et EGGER, K. (1969) *Phytochem.* **10**, 225.

¹⁶ CHADENSON, M., HAUTEVILLE, M., CHOPIN, J., WOLLENWEBER, E., TISSUT, M. et EGGER, K. (1971) *Compt. Rend.* **273**, 2658.

¹⁷ WOLLENWEBER, E. et LEBRETON, P. (1971) *J. Biochem.* **53**, 8, 935.

¹⁸ WOLLENWEBER, E. et EGGER, K. (1971) *Tetrahedron* **21**, 1767.

¹⁹ WOLLENWEBER, E., BOUILLANT, M. L., LEBRETON, P. et EGGER, K. (1971) *Z. Naturforsch.* **26**, 11.

²⁰ WOLLENWEBER, E. et WASSUM, M. (1972) *Tetrahedron* **9**, 767.

²¹ WOLLENWEBER, E. et EGGER, K. (1972) *Z. Pflanzenphysiol.* **65**, 5, 427.

²² EGGER, K., WOLLENWEBER, E. et TISSUT, M. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 464.

²³ WOLLENWEBER, E. et EGGER, K. (1970) *Tetrahedron* **19**, 1601.

²⁴ CHARRIÈRE, Y. en préparation.

²⁵ (a) LEBRETON, P., WOLLENWEBER, E., SOUTHWICK, L. et MABRY, T. J. (1971) *Compt. Rend.* **272C**, 1529;

(b) WOLLENWEBER, E., LEBRETON, P. et CHADENSON, M. (1972) *Z. Naturforsch.* **27B**, 567.

Chez tous les genres à bourgeons sécréteurs mentionnés ci-dessus, terpènes et flavonoïdes s'associent toujours pour constituer le produit de sécrétion. Ces bourgeons contiennent des trichomes glandulaires pédicellés pluricellulaires (*Alnus*, *Platanus*, *Aesculus*) portés par les écailles (*Aesculus*, *Platanus*) et les jeunes feuilles (*Alnus*), ou encore un épiderme sécréteur ondulé, tapissant les écailles, la base des stipules et le bord des jeunes feuilles du bourgeon de *Populus*.

Nous analyserons ici les différents caractères de la sécrétion des bourgeons d'une seule espèce, *Aesculus hippocastanum* L. Ces bourgeons comme ceux des espèces voisines *A. carnea* et *A. turbinata* exsudent de grandes quantités de matériel visqueux. Ce n'est pas le cas de espèces *A. pavia*, *A. parviflora* et *A. neglecta*.

Chez *Aesculus hippocastanum* L., nous étudierons successivement la localisation de la sécrétion, celle des organes sécréteurs figurés, puis la cinétique annuelle de la production flavonique, en comparaison avec celle des terpènes, des flavonols et des leucoanthocyanes foliaires et des coumarines des écorces et des bourgeons.

RESULTATS

Composition de la sécrétion

La sécrétion libre, prélevée à la surface des écailles, chromatographiée sur couche mince de polyamide, apparaît composée de dix aglycones différents dont huit présentent une fluorescence jaune-ocre sous lumière UV (360 nm) et deux sont absorbants. Ces composés sont des flavonols parmi lesquels le kaempférol, la quercétine et la myricétine, ainsi que des dérivés méthylés de ces aglycones (triméthyléther 7,3',4'-myricétine, triméthyléther 7,3',4'-quercétine, diméthyléther 3,3'-quercétine, méthyléther 3-kaempférol rhamnazine, isorhamnétine) ont été identifiés.^{22,23} Le mélange contient également de faibles quantités de coumarines (aesculéline essentiellement) qui proviennent des écailles où ces substances, présentes sous forme de glycosides, sont extrêmement abondantes, de même que dans l'écorce des tiges.

Chez le marronnier, les flavonoïdes *foliaires* sont aussi des flavonols, représentés par les 3-glucosides, les 3-rhamnosides et les 3-arabinosides de kaempférol et de quercétine.²⁶ Il ya donc une certaine parenté entre la synthèse flavonique des feuilles et des écailles. Il faut cependant noter que seules ces dernières possèdent l'équipement enzymatique correspondant à la trihydroxylation du noyau B et aux méthylations. Chez d'autres végétaux, comme le platane, le bouleau ou le peuplier, les différences entre flavonoïdes de sécrétion et flavonoïdes foliaires sont beaucoup plus importantes encore.

La teneur en flavonols de la sécrétion libre d'*Aesculus*, exprimée en quercétine, varie pour les échantillons que nous avons analysés, entre 23 et 32 % de la masse sèche de sécrétion globale (terpènes + flavonols) (22 et 29 % de la masse déterminée au moment du prélèvement). La richesse en flavonols du mélange est maximale pendant l'hiver et minimale à l'automne et au printemps.

Aux différents stades étudiés, la composition de l'ensemble flavonique reste qualitative-ment identique mais des variations apparaissent dans les proportions relatives des différents composants. Ce phénomène se produit également dans les secrétats de bourgeons d'autres espèces (*Platanus*, *Populus*, *Alnus viridis*, *A. glutinosa*).¹²

²⁶ TISSUT, M. (1970) Thèse Doctorat Etat Grenoble, CNRS A.O.4860.

Localisation de la sécrétion

Le bourgeon de marronnier est constitué de quatre paires d'écailles brunes enveloppant une paire d'écailles internes vertes qui protègent la pousse télescopée (Fig. 1). Seules les écailles brunes sont sécrétrices. Pour rapporter la production flavonique à tel ou tel dispositif anatomique, il convient d'étudier la répartition des flavonoïdes dans l'épaisseur de ces écailles. Cette étude a été réalisée par deux voies différentes: le fractionnement mécanique et l'observation en microscopie de fluorescence.

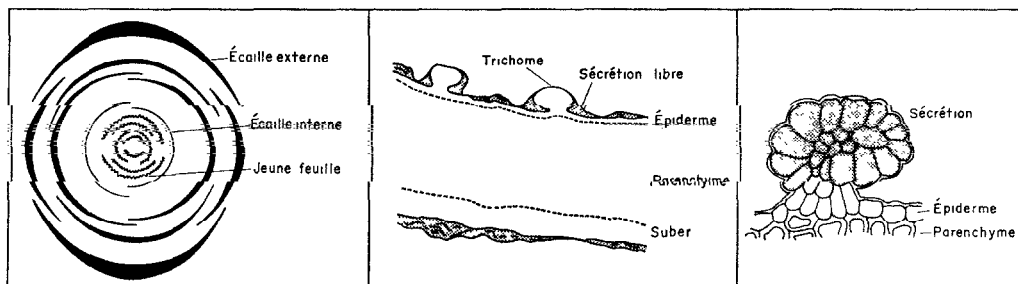


FIG. 1. COUPE TRANSVERSALE D'UN BOURGEON D'*Aesculus hippocastanum*.

FIG. 2. SCHEMA D'UNE COUPE TRANSVERSALE D'ÉCAILLE DE BOURGEON.

FIG. 3. COUPE LONGITUDINALE D'UN TRICHOME ADULTE (G x 700).

Le dosage dans les différentes fractions distinguées dans l'épaisseur de l'écaille montre la présence des flavonols dans chacune des quatre fractions réalisées. On peut estimer approximativement que les fractions 1-4 correspondent respectivement aux trichomes mêlés à de la sécrétion libre, à l'épiderme supérieur, au parenchyme et au suber (Fig. 2). Le fractionnement est effectué à l'apex des écailles, région qui est pauvre en sécrétion libre, de manière à limiter l'imprégnation des trichomes par cette sécrétion. De plus, pour définir

TABLEAU 2. TENEUR FLAVONOLIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS TISSULAIRES

		Trichomes + sécrétion libre	Epiderme	Parenchyme	Suber	Sécrétion libre
DO-ml/g	{1	1380	302	364	260	1976
k.DO-ml/g.	{2	150	35	38	30	219
	{1	34	1	56	6	
T%	{2	35	1	57	7	

1—Dosage spectrophotométrique; 2—dosage densitométrique. DO-ml/g.teneur flavonolique de 1 g-sec de chaque fraction; T% repartition du contenu flavonolique de l'écaille, exprimée par 100 unités arbitraires dans les différentes fractions.

la teneur flavonique des trichomes seuls, nous avons précédé au lessivage progressif par l'acétone, de la surface de l'écaille, puis à la récupération des trichomes qui paraissent rapidement dépourvus de sécrétion libre. Dans les échantillons analysés, le contenu flavonique des trichomes est environ quatre fois supérieur à celui de la sécrétion libre. Au total, les teneurs flavoniques (flavonols par unité de masse de fraction) les plus fortes correspondent aux trichomes et à la sécrétion libre; les autres fractions ont une teneur au moins quatre fois plus faible que celle de la sécrétion libre (Tableau 2). Cependant,

en raison de l'épaisseur particulièrement grande du parenchyme, (75 % de l'épaisseur de l'écaille) le contenu de cette fraction est important: il représente plus de 50 % des flavonols totaux de l'écaille pour les stades d'automne. La chromatographie des différentes fractions montre la présence d'abondantes quantités de coumarines (aesculine et dérivés glycosylés de la fraxétine) dans les seules fractions tissulaires et surtout dans le parenchyme.

L'observation des coupes d'écailles en microscopie UV confirme l'existence d'une telle répartition tissulaire des polyphénols: la vive fluorescence bleue des coumarines du parenchyme peut être écartée par un traitement hydroéthanolique des coupes, traitement qui élimine ces substances en laissant en place la majeure partie des aglycones flavoniques plus lipophiles. Ces derniers présentent une fluorescence ocre spontanée et une fluorescence jaune-vert en présence de $AlCl_3$, caractéristiques, qui permettent de localiser ces produits principalement au niveau de la sécrétion libre superficielle et au niveau des trichomes (Tableau 3). Pour ces derniers organes, seule la fluorescence due à l'aluminium se manifeste, avec une latence beaucoup plus faible chez les poils lésés que chez les poils intacts. Au total, les deux techniques de fractionnement et de microscopie UV, fournissent donc une information concordante malgré des imperfections qui sont, pour la première, l'imprécision de la délimitation des tissus séparés, et, pour la seconde, sa faible sensibilité et la possibilité d'interactions entre les diverses fluorescences. Il faut noter, de plus, que ces deux techniques, basées sur la détection des flavonoïdes, ne permettent pas de suivre les autres composants de la sécrétion.

TABLEAU 3. LOCALISATION DES FLUORESCENCES EN LUMIERE UV (360 nm)

Traitement préalable	Réactif	Trichomes	Epiderme	Parenchyme	Suber	Sécrétion libre	Produit de diffusion
Néant	1	A ou Fjv +	Fb	Fb et Fjv	Fb	Fjv ++	0
H ₂ O	2	Fjv ++	Fjv	Fjv +	Fjv	Fjv ++	0
MeOH	1	A	Fjv	Fjv	Fb	0	Fjv ++
Néant	3	Fj ++	Fjv	Fjv +	Fb	Fjv ++	0

1— $AlCl_3$ en solution méthanolique (5%); 2— $AlCl_3$ en solution aqueuse (15%); 3— $ZrOCl_2$ en solution éthanolique (10%). A—absorption; Fjv—fluorescence jaune-vert; Fb—fluorescence bleue; Fj—fluorescence jaune. L'intensité de la fluorescence est indiquée par (+).

Origine Anatomique des Flavonoïdes non Glycosylés

Il existe à la surface des écailles, des structures glandulaires typiques (Figs. 2 et 3) qui sont des trichomes pluricellulaires plus ou moins sphériques à pédicelle court. Ces trichomes se localisent essentiellement à la face interne des écailles brunes où leur densité maximale est de 200–300/cm², ce qui correspond aux époques de forte sécrétion (automne et printemps). La densité minimale, qui est associée à une sécrétion très faible, est de l'ordre de 10–20 trichomes/cm² (hiver). A cette saison, les glandes présentent des signes évidents de dégénérescence cellulaire; aux périodes d'activité, les cellules glandulaires turgescentes ont un cytoplasme dont la coloration jaune-brun en lumière visible est renforcée par traitement par $AlCl_3$. Chez le trichome jeune (mars), la coloration brune apparaît progressivement.

S'il paraît évident que la phase terpénique est produite par les trichomes, il persiste un certain doute quant à l'origine des flavonols: leur grande abondance dans la fraction superficielle contenant les trichomes, la coloration de ces organes, leur fluorescence en présence

de AlCl_3 , le synchronisme entre développement glandulaire et production flavonique sont autant d'arguments en faveur de la formation de ces polyphénols dans les trichomes. Cependant, la présence des flavonols dans le parenchyme de l'écaïlle et la fluctuation importante du rapport flavonols sécrétés/nombre de trichomes au cours du cycle annuel nous amènent à introduire quelques réserves quant à cette origine. Des observations menant aux mêmes résultats ont été également effectuées chez *Platanus*.¹²

Cycle annuel de la sécrétion comparé à celui d'autres polyphénols

Les bourgeons sont complètement formés sur la pousse feuillée de l'année dès le mois de juin pour les axillaires (les bourgeons correspondant au premier couple de feuilles restant atrophiés) et dès juillet pour le bourgeon terminal. Ces organes sont maintenus en dormance jusqu'à l'hiver et s'ouvrent en mars-avril. La production flavonique (Fig. 4) connaît deux phases d'activité maximale, en automne et au printemps, peu avant l'éclosion du bourgeon. La sécrétion, présente en faible quantité dès juillet augmente donc fortement au moment de la chute des feuilles. Les flavonols formés disparaissent à l'entrée de l'hiver, période au cours de laquelle leur teneur reste faible et stable. La reprise d'activité du bourgeon, en mars, se traduit par l'apparition d'une nouvelle poussée de trichomes qui sont à l'origine d'une sécrétion visiblement très abondante mais moins riche en flavonols qu'à l'automne.

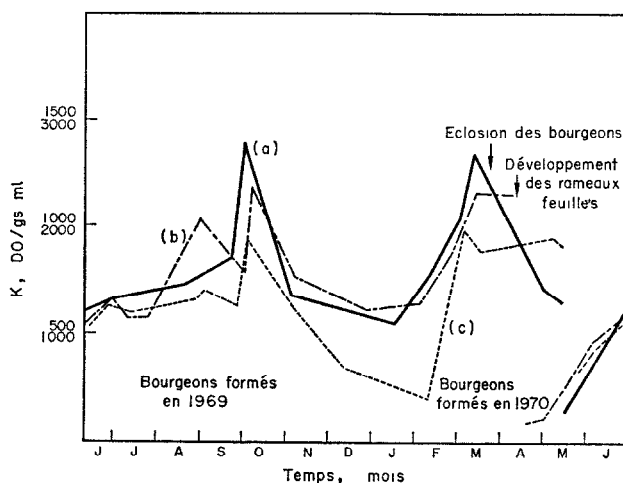


FIG. 4. CYCLE ANNUEL DE LA TENEUR (a) EN FLAVONOLS DES ÉCAILLES DES BOURGEONS D'*Aesculus hippocastanum*; (b) EN COUMARINES DE L'ÉCORCE DES TIGES DE L'ANNÉE; (c) EN COUMARINES DES BOURGEONS.

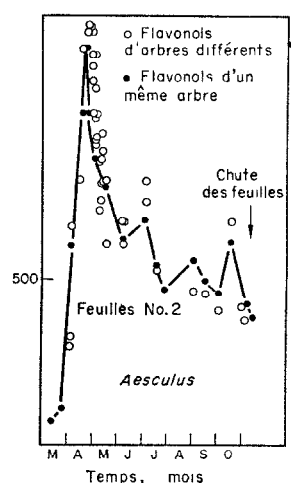


FIG. 5. CYCLE ANNUEL DE LA TENEUR FLAVONIQUE FOLIAIRE D'*Aesculus hippocastanum*.

Si l'on compare cette courbe de la Fig. 4 à celle de l'accumulation flavonique foliaire (Fig. 5), qui est évidemment très décalée dans le temps par rapport à la première, il faut noter dans les deux cas l'existence d'une activité maximale correspondant à la reprise de végétation et à la croissance. Le pic automnal de sécrétion apparaît au contraire comme un phénomène tout à fait singulier. Les quantités de flavonols sécrétés par l'écaïlle ou accumulés dans la feuille sont assez comparables: Un gramme sec de ces organes contient, au moment du pic printanier, l'équivalent de 5-6 mg de quercétine, pour la jeune feuille, et de 1-1,5 mg pour l'écaïlle.

L'intense production de trichomes par les écailles, en mars, coïncide également avec une synthèse active de leucoanthocyanes solubles dans le bourgeon. Au moment de l'éclosion, en avril, ce sont surtout les leucoanthocyanes insolubles, vraisemblablement polymérisés qui s'accumulent.

Les coumarines, présentes dans les écailles ou dans les écorces des tiges (Fig. 4) totalement absentes des feuilles, ont un cycle d'accumulation différent de celui des flavonoïdes foliaires, mais qui n'est pas sans analogies avec celui de la sécrétion: elles sont absentes des tiges nouvellement formées, en juin, et des bourgeons correspondants. Leur teneur augmente ensuite jusqu'à un maximum automnal (octobre). Pendant l'hiver, la teneur diminue faiblement dans l'écorce, plus nettement dans les écailles et augmente de nouveau à la reprise de la végétation. Cette fluctuation, qui rappelle celle des flavonoïdes de sécrétion, paraît, comme elle, liée à l'arrêt puis à la reprise de l'activité métabolique générale.

Une telle courbe d'accumulation confirme la grande différence physiologique séparant flavonoïdes foliaires et coumarines dont la production paraît impossible pendant les périodes de croissance (ex. jeunes tiges) dans ce matériel et dont le cycle présente d'assez fortes analogies avec celui des flavonols de sécrétion.

DISCUSSION

A la lumière des connaissances actuelles sur le métabolisme des flavonoïdes par les organes aériens, le cas des polyphénols de sécrétion comporte un ensemble de caractères remarquables: Il s'agit d'une production de flavonols à l'abri de la lumière, réalisée en partie en période de faible activité métabolique de la pousse, sans qu'intervienne l'étape de glycosylation qui est inéluctable pour les flavonols foliaires. L'étude des régulations et des modalités de cette biosynthèse est donc très certainement intéressante.

Les dispositifs anatomiques qui sont à l'origine de cette synthèse sont très vraisemblablement les trichomes qui produiraient donc conjointement terpènes et flavonols. Cette double activité de synthèse de substances associées dans un mélange hydrophobe a déjà été signalée chez les végétaux par Hansel.²⁷ Il faut cependant noter que la présence des flavonols dans l'épaisseur des tissus de l'écaille pose un problème: S'agit-il d'une simple diffusion dans les espaces intercellulaires ou, au contraire, d'un acte physiologique lié à l'activité cellulaire du parenchyme, comme l'étude des ultrastructures semble le montrer dans les ensembles sécréteurs d'autres végétaux?²⁴

Les variations du rapport terpènes/flavonols dans la sécrétion peuvent avoir deux origines: Soit, la synthèse de ces substances étant tout à fait parallèle, le rythme de leur destruction serait différent, soit la dissymétrie affecterait directement les synthèses. Il est possible que l'étude du vieillissement de la sécrétion isolée résolve ce problème. Par contre, pour lever les réserves que nous avons signalées quant à l'origine anatomique des flavonols, il faudrait que la culture *in vitro* des trichomes isolés à l'état jeune soit réalisable.

L'existence d'une sécrétion de bourgeons pose naturellement le problème des avantages qu'elle apporte au végétal apte à la produire et du rôle des différents composants apparemment indissociables de cette sécrétion. Le fait que cette propriété ne caractérise pas tous les végétaux ligneux, et qu'elle affecte des espèces dont l'aire de répartition en altitude et latitude n'a rien de remarquable, montre qu'elle constitue un élément mineur dans le déterminisme écologique de ces espèces. Le pic de sécrétion automnal donne à penser qu'il s'agit d'une protection de la pousse télescopée contre les rigueurs de l'hiver (l'hydrophobie

²⁷ HANSEL, R. (1962) *Planta Med.* **10**, 361.

du secrétat pourrait diminuer le risque de congélation des tissus; elle pourrait assurer l'isolement physiologique des bourgeons en rendant les échanges gazeux plus difficiles et participer ainsi à leur repos métabolique). Les analogies des cycles d'accumulation de la sécrétion et des coumarines, la présence des flavonols sécrétés dans toute l'écaïlle, permettent de supposer, par contre, un rôle physiologique plus interne. L'observation de coupes d'écaïlles en microscopie ultraviolette fait d'ailleurs apparaître un stockage de longue durée, en période hivernale, de la sécrétion dans le parenchyme; par contre, en période de grande activité métabolique (printemps), la sécrétion disparaît rapidement de ce tissu. Cette observation est confirmée, chez d'autres espèces, par l'étude des ultrastructures. Le pic de sécrétion printanier, lui, paraît tout différent et d'interprétation difficile: la sécrétion ne badigeonnant à peu près pas les jeunes feuilles, il ne peut s'agir, comme cela semble le cas chez *Populus*, d'une limitation de la transpiration après l'éclosion. Par contre, elle pourrait être favorable au processus d'éclosion lui-même. Enfin, en ce qui concerne la fraction flavonique de la sécrétion, l'activité de ces substances vis à vis de certains germes bactériens ou fongiques pourrait représenter un avantage important.

TECHNIQUES

Matériel Le fractionnement tissulaire des écaïlles a été effectué à partir de lots de bourgeons terminaux prélevés à l'automne, sur plusieurs arbres, chaque lot étant constitué des bourgeons d'un même arbre. Pour l'étude des cycles, des bourgeons, des feuilles et de l'écorce de pousse terminale sont prélevés périodiquement, à des intervalles d'une semaine à un mois suivant l'époque, au cours des années 1968-1971. Tous les prélèvements sont réalisés sur des individus déterminés; des références biométriques sont notées de manière à contrôler la validité de l'échantillon d'un prélèvement à l'autre. Le matériel desséché et pesé est stocké à -15° à l'obscurité.

Fractionnement tissulaire. L'apex des écaïlles moyennes des bourgeons de certains lots subit un fractionnement mécanique dans le sens de l'épaisseur: la sécrétion libre est enlevée avec un coton imbibé d'acétone, des couches successives sont ensuite prélevées par abrasion à l'aide d'un scalpel fin, le contrôle continu de l'opération se faisant grâce à une loupe binoculaire. La première fraction, prélevée face interne, est essentiellement constituée par les trichomes; viennent ensuite les fractions principalement constituées par de l'épiderme, du parenchyme et du suber.

Extractions. Le matériel non chlorophyllien est extrait par le MeOH à chaud dans un appareil de Soxhlet pendant 45 mn. Les feuilles sont extraites à froid par l'acétone aqueuse, la solution obtenue est fractionnée par l'éther de pétrole pour enlever les chlorophylles et les caroténoïdes, la solution hydroacétonique obtenue est diluée au 1/50^e dans l'EtOH à 96° pour le dosage spectrophotométrique des flavonols. Une aliquote de la solution initiale est évaporée, reprise par HCl 2 N et maintenue à 100° pendant 30 mn. Les glycosides flavoniques sont hydrolysés et les leucoanthocyanes sont transformés quantitativement en anthocyanes. Le résidu d'extraction par l'acétone subit le même traitement pour doser les leucoanthocyanes insolubles.

Chromatographies. La séparation des différents composants analysés est obtenue par chromatographie sur couche mince de polyamide dans les solvants 1 et 2 pour les aglycones flavoniques et dans le solvant 3 pour les coumarines. Solvant 1, C₆H₆-MeOH-MeCOEt (30:7:13); Solvant 2, C₆H₆-MeOH-dioxane (8:1:1); Solvant 3, C₆H₆-MeOH-MeCOEt (8:5:5).

Dosages Les composés chromatographiés sont dosés sur couche mince par densitométrie dans l'UV long à l'aide d'un appareil Chromoscan. Les filtres utilisés ont une bande passante de 50 nm centrée sur 380 nm (dosage des flavonols), sur 358 nm (dosage des coumarines). Les flavonols sont dosés en solution alcoolique par spectrophotométrie différentielle en présence de AlCl₃ à 425 nm pour les aglycones et 405 nm pour les glycosides en 3.

Observations en microscopie UV. Les coupes transversales d'écaïlles obtenues manuellement ou avec un microtome à congélation sont traitées par différents solvants (H₂O, MeOH, EtOH) et réactifs (AlCl₃, ZrOCl₂) et sont observées en lumière visible et ultraviolette à l'aide d'un équipement Fluorex Reichert 95001 m; λ 343 nm).