

EVOLUTION DES FLAVONOÏDES AU COURS DE LA CROISSANCE DES BRACTÉES DE *POINSETTIA*

JEAN BILLOT*

Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences, Tananarive, République Malgache

(Reçu le 3 Février 1974)

Key Word Index—*Euphorbia pulcherrima*, Euphorbiaceae, poinsettia, bracts, anthocyanins; flavonoids, biogenesis

Abstract—The changes in flavonoids were studied during the growth of *Poinsettia* bracts. Pelargonidin glycosides appeared after cyanidin glycosides, the 3-rutinoside after the 3-monoglucoside. The 3-mono-glucosides were predominant at all times. The bracts contained kaempferol and quercetin, both as aglycones and glycosides. There was no direct relationship between the pathways of flavonol and anthocyanin biosynthesis, but two separate pathways corresponding to the 4'-monohydroxylated- and 3',4'-dihydroxylated-, flavonoids. Flavanonols and isoflavones were detected but not characterized.

Résumé—L'évolution des flavonoïdes a été étudiée au cours de la croissance des bractées de *Poinsettia*. Les anthocyanosides du pélagonidol apparaissent après ceux du cyanidol. Le 3-monoglucoside du pélagonidol apparaît avant le 3-rutinoside. Les 3-monoglucosides prédominent à tous les stades. Les bractées renferment du kaempférol et de la quercétine à l'état d'aglycones et de glycosides. Il n'y a pas de relation directe entre flavonols et anthocyanes du point de vue biosynthétique. Il y aurait deux voies de biosynthèse, parallèles, mais sans liens directs, correspondant aux flavonoïdes monohydroxylés en 4' sur le noyau latéral et aux flavonoïdes dihydroxylés en 3',4'. La présence de flavanonols et d'isoflavones est reconnue.

INTRODUCTION

LES ÉTUDES consacrées à la biosynthèse des anthocyanes ont surtout été conduites sur les fleurs et les feuilles pourpres. Elles concernent essentiellement la biosynthèse du cyanidol.¹⁻⁶ Signalons que les anthocyanosides du cyanidol prédominent très nettement dans les feuilles, où ils sont le plus souvent seuls présents.⁷ Parmi les Euphorbiacées, les feuilles pourpres d'*Acalypha* renferment deux anthocyanosides du cyanidol, dont le 3-monoglucoside représentant 88%.⁸ D'autres études ont été faites sur la biosynthèse du delphinidol et de ses dérivés méthylés.⁹⁻¹¹ Il y a, par contre, peu de travaux sur la genèse du pélagonidol.¹² La formation des anthocyanes a été suivie au cours du développement des boutons

* Adresse actuelle: Département de Physiologie Végétale—U.E.R. du Centre d'Études Supérieures Ligériennes Université d'Orléans—45017 Orléans-Cedex, France

¹ GRIEBACH, H. (1958) *Z. Naturforsch.* **13b**, 335.

² GRIEBACH, H. et PATSCHKE, L. (1961) *Z. Naturforsch.* **16b**, 645.

³ PATSCHKE, L., BARZ, W. et GRIEBACH, H. (1964) *Z. Naturforsch.* **19b**, 1110.

⁴ GRIEBACH, H. et BOPP, M. (1959) *Z. Naturforsch.* **14b**, 485.

⁵ PATSCHKE, L. et GRIEBACH, H. (1965) *Z. Naturforsch.* **20b**, 1030.

⁶ PATSCHKE, L., BARZ, W. et GRIEBACH, H. (1966) *Z. Naturforsch.* **21b**, 201.

⁷ HARBORN, J. B. (1967) *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press, London.

⁸ BILLOT, J. (1968) Thèse de doctorat. Faculté des Sciences d'Orsay, France.

⁹ HESS, D. (1963) *Z. Bot. Dtsch.* **51**, 142.

¹⁰ HESS, D. (1964) *Planta* **60**, 568.

¹¹ PLA, J., VILLI, A. et PACHECO, M. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 395.

¹² CO, H. et MARKAKIS, P. (1966) *Phytochemistry* **5**, 755.

floraux d'*Impatiens balsamina* qui ne renferment que des anthocyanosides du pélargonidol.¹³⁻¹⁵

Alors que de nombreux travaux ont été consacrés à la physiologie des anthocyanes dans les feuilles pourpres¹⁶ d'une part, et d'autre part à l'évolution des flavonoides au cours de la vie de la plante,¹⁷⁻¹⁹ les bractées n'ont pas ou peu été étudiées du point de vue du métabolisme des flavonoides. Les bractées de *Poinsettia* (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) renferment quatre anthocyanosides, deux du cyanidol et deux du pélargonidol (les 3-glucosides et 3-rutinosides).²⁰⁻²¹ Les autres flavonoides n'ont pas été étudiés à notre connaissance. Dans cette étude, nous avons cherché à préciser les variations de la composition en flavonoides au cours de la croissance des bractées dans les conditions naturelles.

RÉSULTATS

Croissance des bractées

Le Tableau 1 donne les caractéristiques des cinq stades analysés au cours de l'évolution des bractées. La croissance s'accompagne de synthèses importantes, mais la masse de substance fraîche d'une bractée augmente moins que sa surface, de façon globale, la croissance en surface d'une bractée est 4 à 5 fois supérieure à l'augmentation de sa masse de substance fraîche (Tableau 1). Dès les premiers stades, les bractées sont colorées en rouge. Les bractées des stades 1 à 3 ont leur face supérieure rouge foncé à aspect velouté et leur face inférieure plus claire. Le changement visible à l'œil se produit au stade 4 où les deux faces des bractées sont rouge clair, comme dans les bractées adultes.

TABLÉAU 1. DÉVELOPPEMENT DES BRACTÉES DE *Poinsettia*. VARIATIONS DES TENEURS EN ANTHOCYANES ET FLAVONOÏDES EXPRIMÉS PAR RAPPORT À LA MASSE DE SUBSTANCE FRAÎCHE.

	Stades de développement				
	1	2	3	4	5
Masse de substance fraîche d'une bractée (mg)	17	34	82	185	1100
Surface d'une bractée (cm ²)	0,4	1,6	3	8	88
Anthocyanosides totaux (μmoles gF)	6	14	21	45	12
Flavonols (μmoles gF)	1	2,7	2,6	3,9	3,3
Glycosides de flavonols (μmoles gF)	3,6	4,1	4,7	4,8	3,3

Étude quantitative

Nous n'avons dosé que les pigments correspondant aux trois groupes principaux Anthocyanosides, Quercétine et Kaempférol aglycones, Glycosides des mêmes flavonols.

La quantité d'anthocyanes est très faible au début de la croissance (0,104 μmole bractée au stade 1). La croissance d'une bractée s'accompagne d'une synthèse très importante de

¹³ HAGEN C. W. JR (1966) *Am. J. Botany* **53**, 46.

¹⁴ HAGEN C. W. JR (1966) *Am. J. Botany* **53**, 54.

¹⁵ MANSELL R. L. et HAGEN C. W. JR (1966) *Am. J. Botany* **53**, 875.

¹⁶ JACQUIMIN H. (1969) Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Paris, France.

¹⁷ DELAVIAU P. G. (1967) Thèse de doctorat, Paris, France.

¹⁸ TRONCHET J. (1970) *Ann. Sci. Univ. Besançon* **3e ser.** 7, 15.

¹⁹ PARIS R. R. et DUREL S. (1972) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **119**, 531.

²⁰ ASIN S. (1958) *Plant. Physiol.* **33**, 14.

²¹ SHWARTZ R. N., ASIN S., NORRIS K. H. et MASSIE D. R. (1969) *Am. J. Botany* **56**, 227.

pigments anthocyaniques, dont la teneur atteint 12,3 $\mu\text{mole/bractée}$, à l'état adulte. Les quantités relatives exprimées par rapport à l'unité de surface présentent un maximum très net pour le stade 3 où il y a quatre fois plus d'anthocyanes par cm^2 qu'au stade adulte. Les bractées jeunes, de surface réduite (1/30 de la surface d'une bractée adulte pour le stade 3), sont les plus riches en anthocyanes par unité de surface, ce qui correspond à leur coloration nettement plus soutenue. On retrouve le même maximum au stade 3 pour les valeurs exprimées en $\mu\text{moles/gF}$ (Tableau 1).

Différents anthocyanosides. Le tableau 2 indique les pourcentages des quatre anthocyanosides pour les divers stades de développement. Dans les bractées adultes, il y a prédominance des anthocyanosides du cyanidol qui constituent les deux tiers des pigments anthocyaniques pour un tiers aux anthocyanosides du pélargonidol. Ces valeurs, sont en accord avec les résultats de travaux antérieurs²¹. Dans les bractées les plus jeunes, il n'y a pratiquement que des anthocyanosides du cyanidol, le 3-monoglucoside du pélargonidol n'étant qu'en quantité très faible.

TABLEAU 2 POURCENTAGES DES QUATRE ANTHOCYANOSIDES DES BRACTÉES DE *Poinsettia* POUR LES DIFFÉRENTS STADES DE LA CROISSANCE

Anthocyanoside	Stades de développement				
	1	2	3	4	5
Cyanidol 3-glucoside	67	65	53	45	43,5
3-rutinoside	31	20,5	27	28	21
Total	98	85,5	80	73	64,5
Pélargonidol 3-glucoside	2	12,5	15	18,5	25,5
3-rutinoside	—	2	5	8,5	10
Total	2	14,5	20	27	35,5

Au cours de la croissance des bractées, les anthocyanosides du cyanidol sont toujours prédominants, mais leur importance relative diminue de 98 à 64%, ce qui correspond à l'apparition progressive des anthocyanosides du pélargonidol à partir du stade 2. Les deux anthocyanosides du cyanidol sont présents, dès le premier stade et le 3-glucoside est toujours en quantité plus importante que le 3-rutinoside. Les deux anthocyanosides du pélargonidol apparaissent successivement: d'abord le 3-glucoside dont le pourcentage augmente à partir du stade 2 jusqu'à représenter un quart des pigments dans les bractées adultes, c'est-à-dire légèrement plus que le 3-rutinoside du cyanidol. Ensuite, le 3-rutinoside qui apparaît en très petite quantité qu'au stade 2 et dont la synthèse est lente, puisqu'il ne représente jamais plus de 10% des pigments anthocyaniques totaux.

Flavonols. Le Tableau 1 donne les quantités totales en flavonols, aglycones et glycosides, exprimées en $\mu\text{mol/gF}$. Les pourcentages relatifs de quercétine et de kaempférol sont indiqués sur le tableau 3. Dès le stade 1, le kaempférol est présent, mais en très petite quantité. La quercétine est toujours le flavonol prédominant, surtout dans les premiers stades où elle est environ quatre fois plus abondante que le kaempférol, alors que le rapport quercétine/kaempférol n'est que de 1,5 dans les bractées adultes. La synthèse de la quercétine et du kaempférol se poursuit pendant toute l'évolution des bractées, mais les courbes obtenues ont une allure générale, différente de celles obtenues pour les anthocyanes, traduisant une synthèse plus régulière. En particulier, pour les teneurs en $\mu\text{mol/cm}^2$ le maximum se situe au stade 4 pour la quercétine, tandis que les teneurs en kaempférol varient

assez peu avec également un maximum au stade 4. Jusqu'au stade 4, les glycosides de flavonols sont plus abondants que les deux aglycones. Ils représentent 77% des flavonols totaux au stade 1 et seulement 50% au stade 5.

TABLEAU 3. PROPORTION DES FLAVONOLES DES BRACTÉES DE *Poinsettia* POUR UNE SÉRIE DE STADES DE LA CROISSANCE

Flavonol	Stades de développement				
	1	2	3	4	5
Quercétine	75	80	86	75	60
Kaempferol	25	20	14	25	40

Les quantités de flavonols sont toujours inférieures à celles des anthocyanes, ceci dès le stade 1. Comparée aux flavonols totaux (aglycones + glycosides), la quantité d'anthocyanes se maintient dans un rapport qui varie peu (1,4 au stade 1 et 1,9 au stade 5). Par contre, le rapport anthocyanes/(quercétine + kaempférol) passe de 6 au stade 1, à 3,7 au stade 5, ce qui indique que la synthèse de la quercétine et du kaempférol se ralentit moins à partir du stade 4 que la synthèse des anthocyanes.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Les bractées de *Poinsettia* renferment de nombreux flavonoides. Elles se caractérisent, outre les anthocyanes, par la présence de flavonols à l'état d'aglycones, quercétine et kaempférol. De tels aglycones ne se rencontrent pas, en général, dans les feuilles, mais peuvent s'accumuler dans les tuniques des bulbes d'Oignon.²² Il faut remarquer l'absence de flavones reconnues sur les chromatogrammes. Les anthocyanes et les flavonols des bractées appartiennent à deux séries homogènes: l'une monohydroxylée en 4 (pélargonidol, kaempférol), l'autre dihydroxylée en 3',4' (cyanidol, quercétine). Les flavanonols présents appartiennent peut-être à ces deux séries (dihydrokaempférol, dihydroquercétine).

Les anthocyanosides du cyanidol sont les premiers synthétisés et ils sont toujours prédominants. Les anthocyanosides du pélargonidol n'apparaissent que progressivement au cours de l'évolution des bractées. Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse de deux voies de synthèse distinctes, l'une pour le pélargonidol (ayant un OH en 4'), l'autre pour les anthocyanidols dihydroxylés.⁹ On retrouve les mêmes résultats en ce qui concerne les flavonols. En particulier, le kaempférol ne disparaît pas alors que se forme la quercétine, comme cela est connu pour les feuilles.¹⁸

Du point de vue de la glycosidation des anthocyanidols, les 3-rutinosides sont toujours moins importants que les 3-glucosides et, dans le cas du pélargonidol, le 3-glucoside apparaît le premier. Ce résultat est comparable à celui obtenu sur des cultures de tissu d'*Haplopappus gracilis* où le 3-glucoside du cyanidol s'accumule à une vitesse deux fois supérieure à celle du 3-rutinoside.²³ Contrairement à ce que l'on observe lors du développement des boutons floraux,^{15, 24} il n'y a pas disparition des 3-monoglucosides lorsque sont formés les 3-diglycosides. Au contraire, les résultats sont en faveur d'une compétition du glucose et du rutinose, vis-à-vis de l'anthocyanidol ou de ses précurseurs, subissant la glycosidification. Cette dernière paraît plus facile avec le glucose, se faisant en priorité de façon prépondérante.

²² TISSI, E. M. (1972). *Physiol. Veg.* **10**, 381.

²³ STICKLAND, R. G. et STICKLAND, N. (1972). *Ann. Bot.* **36**, 443.

²⁴ BILLOT, J. Résultats non publiés sur le développement des fleurs de *Jacaranda* (Bignoniaceae).

La présence de flavanonols sur les chromatogrammes est importante à noter. Dans les premiers stades, il ne semble y avoir qu'un seul aglycone, qui pourrait correspondre à la série dihydroxylée. Le rôle central des flavanonols, dans la biosynthèse des flavonoïdes, est actuellement reconnu²⁵⁻²⁷ Il faudrait reprendre avec précision l'étude de flavonoïdes "mineurs" pour voir si l'on trouve également des flavanones, et pour identifier les isoflavones, mieux représentées dans les premiers stades. Les résultats obtenus sont en accord avec le schéma pour la biosynthèse des flavonoïdes.^{6,28} Nos résultats indiquent qu'il n'y a pas de relation directe entre la biosynthèse des flavonols et celle des anthocyanes, et sont donc en faveur de l'hypothèse, selon laquelle la transformation des flavonols en anthocyanidols apparaît comme peu probable *in vivo*. Le rôle des flavanonols comme précurseurs à la fois des anthocyanes et des flavonols expliquerait leur présence dans les bractées, et le fait, que les isoflavones deviennent moins importantes dans les derniers stades du développement, s'accorde avec le fait que leurs précurseurs sont à ce moment utilisés surtout pour la synthèse de deux autres types de flavonoides. En conclusion, les bractées de *Poinsettia* apparaissent comme un matériel intéressant pour la biosynthèse des flavonoides, puisque les divers groupes s'y trouvent bien représentés.

EXPERIMENTALE

Les bractées ont été prélevées durant le mois de mai sur des plantes cultivées en pleine terre à Tananarive. **Extraction, purification.** Aussitôt récoltées, les bractées sont pesées et mises en présence de MeOH-HCl 1% froid. Après centrifugation, les extraits sont concentrés sous vide. La moitié de chaque extrait est traitée par AcOEt + H₂O. La phase inférieure renfermant les anthocyanosides et les glycosides de flavonols est concentrée à 1 ml dans MeOH-HCl 1%.

Séparation et dosage des anthocyanosides. La phase inférieure, a un seul pic de $\lambda_{max} = 525$ à 527 nm. L'absorption à 530 nm sert au dosage des anthocyanosides totaux. Les 4 anthocyanosides sont séparés par CCM à 2-d sur gel de silice. Solvants utilisés: BAW et EFW (AcOEt-HCOOH-H₂O, 8 2 3). Chaque pigment est récupéré dans MeOH-HCl 1%, et, après centrifugation, le spectre est déterminé. Pour les 2 anthocyanosides du cyanidol, on a $\lambda_{max} = 530$ nm et $E_{440}/E_{max} = 25\%$, pour les deux anthocyanosides du pélagonidol, $\lambda_{max} = 508-510$ nm et $E_{440}/E_{max} = 41\%$.²⁹ Les dosages sont faits au λ_{max} de chaque pigment en utilisant les coefficients d'absorption indiqués par divers auteurs.^{7,30} Pour les anthocyanosides totaux, nous avons utilisé la valeur moyenne, approximative, de $\epsilon = 30\,000$ à 530 nm.^{23,31}

Séparation et dosage des flavonols quercétine et kaempférol. L'extrait total est chromatographié sur papier Whatman No 3MM avec HOAc 15%. La bande correspondant à quercétine + kaempférol est élue par MeOH et sert au dosage spectrophotométrique de l'ensemble des deux flavonols. Puis, l'éluat est concentré et chromatographié à nouveau avec TBA (t-BUOH-HOAc-H₂O, 3 1 1). Quercétine et kaempférol sont élués séparément par MeOH et dosés spectrophotométriquement à 370 nm. Les deux pigments sont obtenus bien purifiés (spectres, R_f dans différents solvants).^{7,32}

Glycosides des flavonols. Leur dosage spectrophotométrique se fait à partir de l'absorption à 360 nm de la phase inférieure, après traitement à AcOEt. Il a été remarqué que lors de la séparation par CCM des anthocyanosides, les glycosides des flavonols accompagnent les taches des quatre anthocyanosides. Pour chaque tache élue, l'absorption à 360 nm, corrigée de l'absorption due au pigment anthocyanique, permet de déterminer les glycosides des flavonols. La somme des quantités obtenues pour les quatre taches correspond à 85%, environ de la quantité de glycosides de flavonols déterminés à partir de l'extrait total. Pour la quercétine, le kaempférol et les glycosides des flavonols, nous avons utilisé une valeur moyenne $\epsilon = 20\,000$, basée sur nos déterminations personnelles à

²⁵ WONG, E., MORTIMER, P. I. et GEISSMAN, T. A. (1965) *Phytochemistry* **4**, 89

²⁶ IMASEKI, WHEELER, T. S. et GEISSMAN, T. A. (1965) *Tetrahedron Letters* **23**, 1785

²⁷ PACHECO, H. (1966) in *Actualités de Phytochimie fondamentale, 2e série* (édité par MENTZER C.) p. 73, Masson, Paris

²⁸ BARZ, W. et GRISEBACH, H. (1966) *Z. Naturforsch.* **21b**, 47

²⁹ HARBORNE, J. B. (1958) *Biochem. J.* **70**, 22

³⁰ FULEKI, T. et FRANCIS, F. J. (1967) *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **91**, 894

³¹ CREASY, L. L., MAXIE, E. C. et CHICHESTER, C. O. (1965) *Phytochemistry* **4**, 517

³² MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. et THOMAS, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Verlag, Berlin

partir de produits purs et sur les valeurs indiquées par la bibliographie ^{7 32 33}

Purification et identification des flavonoïdes. Les différents flavonoïdes ont été isolés et purifiés par des chromatographies en bandes répétées avec TBA et HOAc ³². L'identification est faite par les techniques classiques de chromatographie et de spectrophotométrie ^{7 8 34-36}. Seuls ont été déterminés, avec certitude, les quatre anthocyanosides : la quercétine, le kaempférol et quatre de leurs glycosides.

³³ WARD, L. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (édité par GLISSMAN, T. A.), p. 156. Pergamon Press, Oxford.

³⁴ HARBORNE, J. B. (1958) *J. Chromatog.* **1**, 437.

³⁵ HARBORNE, J. B. (1959) *Chromatog. Rev.* **1**, 209.

³⁶ HANASHIRO, K. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (édité par GLISSMAN, T. A.), p. 248. Pergamon Press, Oxford.