

# LES FLAVONOÏDES DES RAMEAUX VÉGÉTATIFS DE *PERIPLOCA GRAECA*

DANIEL MELIN

Laboratoire de Biologie Végétale, Faculté des Sciences, 25030 Besançon Cédex, France

(Reçu le 27 mars 1975)

**Key Word Index**—*Periploca graeca*; Asclepiadaceae; flavonoïds; flavonols; anthocyanidins; proanthocyanins; phenolic acids; esculetin; morphogenesis; twining stems; creeping stems.

**Abstract**—The flavonoid content of the vegetative stems of *Periploca graeca* include derivatives of flavonols (quercetin and kaempferol), anthocyanidins (cyanidin and paeonidin), proanthocyanins and phenolic acids ("cinnamic" group). On the whole, the three types of lateral stems (short upright, twining and creeping) have the same type of flavonoids, but the creeping axis are richer in anthocyanins and the short upright axis have esculetin derivatives in the young tissues. The quantitative results show that the short upright stems contain more flavonoids, especially flavonols, than the other axes. Nevertheless, the variations in the flavonoids levels in the course of the season are not correlated with the rate of elongation or on the twisting of the stems. Consequently, it is not likely that the phenolic substances play a direct role in the growth and circumnutation in our material.

## INTRODUCTION

*Periploca graeca* L. est une Asclépiadacée méditerranéenne qui s'adapte bien au climat français. Cultivée en conditions naturelles cette espèce grimpante présente trois types de rameaux végétatifs sur chaque pied: des rameaux érigés, orthotropes, courts (20 cm de long) et rectilignes; des rameaux volubiles, orthotropes, plus ou moins obliques, longs (plusieurs mètres) et animés de mouvements révolutifs; et des rameaux rampants, diégétropes, longs (plusieurs mètres) et dépourvus de mouvements. Ainsi un seul génotype s'exprime phénotypiquement de trois manières en ce qui concerne le port des rameaux. L'étude de la croissance de ces axes et du déterminisme du port voluble nous a conduit à analyser, entre autres, les substances de croissance contenues dans ce matériel. Si auxines, gibbérellines et cytokinines sont les principales substances de croissance il n'est pas rare de lire des démonstrations [1-9] prouvant l'action des substances phénoliques (et particulièrement celles qui dérivent de l'acide cinnamique) dans la multiplication, l'allongement et la différenciation cellulaires. Il semble que ces substances intervien-

draient dans le fonctionnement du système enzymatique auxines-oxydase [10,11] ou dans la production de l'ATP par le blocage de la transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique [12,13]. Récemment il a été décrit une action sur la synthèse des protéines [14]. Ces substances phénoliques pourraient intervenir aussi dans les processus biochimiques qui suivent la réaction au contact des vrilles de Pois [15] et dans ceux qui président à la mise en place du mouvement des tiges volubiles [16].

Nous avons conduit l'analyse des flavonoïdes et des anthocyanes dans notre matériel en considérant 4 niveaux sur chaque type de rameaux. Nous obtenons 4 extraits (Fig. 1), 2 pour l'axe et 2 pour les feuilles.

La famille des Asclépiadacées a fourni le matériel végétal pour quelques déterminations de flavonoïdes [17] mais à notre connaissance aucun travail de ce genre n'a porté sur *Periploca graeca* L. Nous avons donc dressé un inventaire assez complet des flavonoïdes du *Periploca graeca* L. en analysant les acides-phénols (groupe cinnamique), les coumarines, les flavonols, les anthocyanidols et les leucoanthocyanidols.

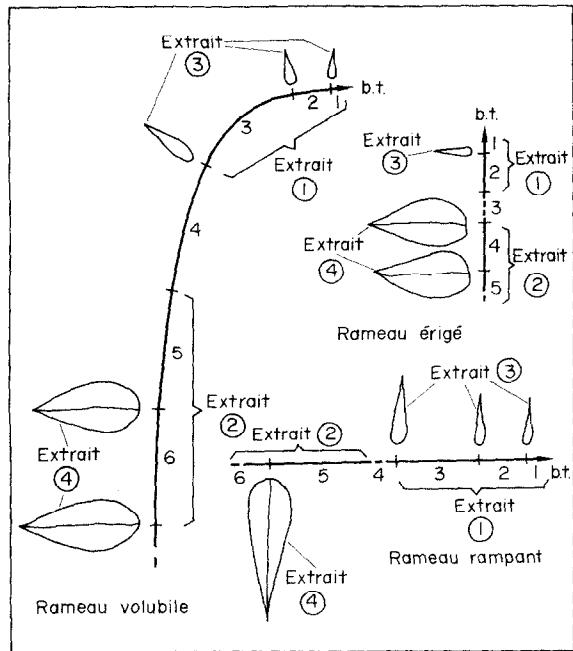


Fig. 1. Représentation schématique des types de rameaux végétatifs et mise en place des niveaux prélevés sur chacun pour préparer les extraits de flavonoïdes. Extraits (1) et (2) = extraits de tiges; Extraits (3) et (4) = extraits de feuilles.

## RESULTATS

### Inventaire des flavonoïdes des rameaux de *P. graeca* L.

Par les techniques chromatographiques (papier, CCM) et spectroscopiques classiques nous avons déterminé les substances flavonoïdiques majeures de notre matériel: (a) dérivés des acides-phénols, des coumarines et des flavonols [18-21] (Tableau 1); et (b) les autres substances (anthocyanes, leucoanthocyanes, et les taches inconnues). En ce qui concerne les anthocyanes nous avons trouvé après hydrolyse le cyanidol et le paeonidol. Les substances naturelles donnent 5 taches en chromatographie sur papier (solvant: HOAc-HCl-H<sub>2</sub>O, 15:3:82) dont 2 seulement sont exploitables. Ce sont le 3,5-diglucoside de paeonidol et le 3-rutinoside, 5-glucoside de paeonidol. Ce dernier, signalé par Harborne [22] dans *Magnolia lennei*, est considéré comme rare. Les leucoanthocyanes sont au nombre de trois: la leucopaeonidine, la leuco-cyanidine et une troisième indéterminée. Son *R<sub>f</sub>* de 0,72 dans le Forestal autorise à la rapprocher de celle que Voirin [23] a appelée L"72". Enfin, deux taches que nous avons appelées PP<sub>1</sub> et PP<sub>2</sub>,

se rencontrent régulièrement dans notre matériel, révélées uniquement par le réactif de Barton, ce qui souligne leur nature polyphénolique. Leur structure est indéterminée.

### Etude qualitative et quantitative

A. Les composés naturels. L'analyse des 4 extraits sur chacun des trois types de rameaux latéraux (voir Introduction) donne les résultats portés dans le Tableau 1. Ils mettent en évidence que: (a) la teneur est toujours plus élevée dans les feuilles que dans les tiges; (b) les organes jeunes sont plus riches en flavonoïdes que leurs homologues adultes; (c) les rameaux rampants sont à tous les niveaux les plus riches en flavonoïdes des trois types d'axes sans que cela soit dû à la présence des anthocyanes; et (d) parmi toutes les comparaisons que nous pouvons faire en prenant les totaux deux à deux, nous retiendrons celle des jeunes entre-noeuds, les rameaux volubiles contiennent presque 2 fois moins de substances phénoliques que les autres types.

Les rapports: R (= Teneur en flavonoïdes d'un organe jeune/Teneur en flavonoïdes d'un organe similaire adulte) et Rf1 (Teneur en flavonosides d'un organe jeune/Teneur en flavonosides d'un organe similaire adulte) montrent que la baisse de teneur en flavonoïdes est plus lente dans les rameaux volubiles que dans les autres ( $R = 1,39$  contre 1,66 et 1,73) alors que c'est l'inverse pour les feuilles. Il n'en est pas de même pour la variation de la teneur en flavonosides. Lors de l'arrêt de la croissance les réajustements du contenu phénolique diffèrent selon le type physiologique de rameaux.

Les dérivés de l'acide caféïque constituent partout un fort pourcentage du total, mais plus nettement dans les feuilles juvéniles "volubiles" (82%). Par ordre d'importance décroissante nous trouvons ensuite les flavonosides (surtout dans les feuilles) les dérivés d'acides *p*-coumarique et férulique puis les dérivés de coumarine.

L'examen de ce tableau permet de se rendre compte de la répartition des substances. En dehors d'une grande homogénéité d'ensemble, les faits intéressants à souligner sont: (a) la présence d'anthocyanes seulement dans les rameaux rampants; (b) la présence d'hétérosides de kaempferol seulement dans les limbes adultes. Nous avons observé des traces de ce flavonol dans les limbes

Tableau 1. Teneur en flavonoides des trois types de rameaux latéraux (tiges et feuilles) développés en conditions naturelles

| Designation des substances  | Rameaux volubiles |         |                |              | Teneurs mg/g de matière fraîche<br>Rameaux rampants |         |                |              | Rameaux Erigés |         |                |              |
|---|-------------------|---------|----------------|--------------|---|---------|----------------|--------------|----------------|---------|----------------|--------------|
|   | E-N 1-3           | E-N 5-6 | Fles juvéniles | Fles adultes | E-N 1-3   | E-N 5-6 | Fles juvéniles | Fles adultes | E-N 1-3        | E-N 5-6 | Fles juvéniles | Fles adultes |
| Acide isochlorogénique (C <sub>3</sub> )                          | 0,439             | 0,1     | 2,12           | 0,17         | 0,268   | 0,14    | 2              | 0,21         | —              | 0,2     | 1,37           | 0,2          |
| Acide chlorogénique (C <sub>1</sub> )                             | 2,15              | 1,3     | 10,67          | 1,8          | 4,3   | 1,6     | 11,18          | 2,78         | 2,6            | 1,42    | 8              | 1,45         |
| Acide néochlorogénique (C <sub>2</sub> )                          | 0,8               | 0,55    | 4,4            | 1            | 1,3   | 1       | 4,1            | 2,2          | 1,6            | 0,61    | 2,07           | 1,32         |
| Cafeyl-1 glucose (C <sub>4</sub> )                                | 0,216             | 0,05    | 0,31           | 0,40         | 0,482   | 0,10    | 0,47           | 0,67         | 0,9            | 0,1     | 0,50           | 0,76         |
| Acides p-coumaryl-quiniques (PC <sub>1</sub> et PC <sub>2</sub> ) | (3,605)*          | (2,00)  | (17,50)        | (3,37)       | (6,350)   | (2,84)  | (17,75)        | (5,86)       | (5,1)          | (2,33)  | (11,94)        | (3,73)       |
| P-coumaryl-1 glucose (PC <sub>3</sub> )                           | 0,28              | 0,15    | 0,52           | 0,57         | 0,20  | 0,25    | 0,67           | 0,71         | 0,8            | 0,21    | 0,50           | 0,50         |
| Dérivé de PC <sub>1</sub> (B1)                                    | —                 | —       | —              | —            | 0,157   | —       | 0,218          | 0,154        | —              | —       | —              | —            |
| (0,45)  | (0,25)            | (0,732) | (0,67)         | (0,737)      | (0,42)  | (1,198) | (0,981)        | (0,98)       | (0,32)         | (0,70)  | (0,68)         | 0,54         |
| Acides férulyl-quiniques (Fer <sub>1</sub> et Fer <sub>2</sub> )  | 0,128             | 0,19    | 0,40           | 0,21         | 0,286   | 0,188   | 0,48           | 0,48         | 0,20           | 0,30    | 0,25           | 0,67         |
| Férulyl-1 glucose (Fer <sub>3</sub> )                             | 0,041             | 0,144   | 0,25           | 0,41         | 0,536   | 0,64    | 0,242          | 0,70         | 0,54           | 0,62    | 0,42           | 0,676        |
| Dérivé d'esculétine (BE)  | —                 | (0,169) | (0,334)        | (0,65)       | (0,62)  | (0,822) | (0,828)        | (0,722)      | (1,18)         | (0,74)  | (0,92)         | (0,67)       |
| Esculétine (Esc)  | —                 | 0,198   | 0,15           | 0,12         | —   | 0,178   | 0,21           | 0,11         | 0,24           | 0,25    | 0,27           | 0,17         |
| Isoquercitrine (I.Q.)   | 0,06              | (0,44)  | traces         | (0,76)       | (0,84)  | 0,05    | (0,438)        | (0,99)       | (1,02)         | (0,522) | (0,53)         | (0,94)       |
| Rutine (R)  | 0,425             | 0,37    | 1,6            | 0,50         | 0,235   | 0,17    | 2,9            | 0,84         | 0,56           | 0,38    | 1,92           | 0,7          |
| Astragaline (A)   | —                 | (0,485) | (0,37)         | (1,7)        | 0,22  | —       | —              | 0,25         | (0,65)         | (0,507) | (2,20)         | 0,26         |
| Nicotiflorine (N)   | —                 | —       | —              | 0,194        | —   | —       | —              | 0,36         | —              | —       | —              | 0,20         |
| Anthocyanes   | —                 | —       | —              | (1,014)      | —   | 0,25(?) | 0,31(?)        | 0,13(?)      | (1,64)         | —       | —              | (1,35)       |
| Totaux R  | 4,709             | 3,394   | 21,342         | 6,514        | 8,444   | 5,076   | 24,190         | 11,002       | 7,992          | 4,607   | 16,45          | 8,026        |
| R-flavonols   | 1,39              | —       | 3,28           | —            | 1,65  | —       | 2,2            | —            | 1,73           | —       | 2,05           | —            |
|   | 1,3               | —       | 1,6            | —            | 1,06  | —       | 2,07           | —            | 1,35           | —       | 1,63           | —            |

Récolte Août 1970.

Les chiffre entre parenthèses sont les totaux des dérivés par aglycone ou par type de substances.

La point d'interrogation qui suit les chiffres des teneurs en anthocyanes marque l'incertitude du résultat puisque la technique d'extraction n'est pas très adaptée.

Moyenne de 10 analyses, coefficient de variation = 7%.

juvéniles des rameaux volubiles et érigés; (c) la présence d'esculétine dans les entre-noeuds jeunes des seuls rameaux érigés; (d) la présence du *p*-coumaryl-1 glucose seulement dans les rameaux rampants (axes et feuilles); et (e) l'absence de l'acide isochlorogénique dans les entre-noeuds jeunes des axes érigés.

B. Les flavonols et des leucoanthocyanes. Afin de rechercher quelques précisions supplémentaires sur la relation éventuelle entre flavonols et volubilisme évoquée par Tronchet [16] nous avons multiplié les dosages dans notre matériel en utilisant la technique de Lebreton *et al.* [24].

*Teneurs absolues en flavonols et leucoanthocyanes.* Les résultats sont présentés dans le Tab-

leau 2 pour du matériel végétal prélevé au mois d'août, soit au moment du développement optimum. Les valeurs obtenues par cette technique correspondent bien à celles qui sont obtenues par le dosage colorimétrique après chromatographie sur papier et élution en ce qui concerne les axes (compte tenu du rapport des masses moléculaires: hétérosides/aglycones). Pour les limbes il existe une différence qui provient de la présence de kaempférol qui est exprimé en quercétol dans le dosage spectrophotométrique.

Ce sont les rameaux "érigés" qui possèdent le plus de flavonols, ensuite viennent les rameaux volubiles, enfin les rameaux rampants. Pour les feuilles ce sont au contraire celles des rameaux

Tableau 2. Comparaison des teneurs en eau, azote total, flavonols et leucoanthocyanidols des tiges et feuilles des 3 types de rameaux de *Periplaca graeca* L. récoltés en août

| Rameaux                   | Teneur* en     |                      |                  |                     |
|---------------------------|----------------|----------------------|------------------|---------------------|
|                           | % du poids sec |                      | ‰ du poids frais |                     |
|                           | Eau            | N <sub>2</sub> total | Flavonols        | Leucoanthocyanidols |
| <b>Rameaux volubiles:</b> |                |                      |                  |                     |
| Feuilles juvéniles        | 277            | 6,51                 | 1,46 (0,1)‡      | 0,62 (0,05)         |
| Feuilles adultes          | 245            | 4,83                 | 0,915 (0,057)    | 1,11 (0,057)        |
| E-N 1-3†                  | 535            | 5,32                 | 0,197 (0,01)     | 0,23 (0,02)         |
| E-N 5-6                   | 390            | 1,61                 | 0,159 (0,02)     | 0,13 (0,01)         |
| <b>Rameaux rampants:</b>  |                |                      |                  |                     |
| Feuilles juvéniles        | 260            | 4,97                 | 2,91 (0,14)      | 4,9 (0,3)           |
| Feuilles adultes          | 245            | 4,34                 | 1,50 (0,06)      | 5,7 (0,3)           |
| E-N 1-3                   | 630            | 3,78                 | 0,097 (0,007)    | 0,38 (0,027)        |
| E-N 5-6                   | 410            | 1,47                 | 0,104 (0,01)     | 0,24 (0,02)         |
| <b>Rameaux "érigés":</b>  |                |                      |                  |                     |
| Feuilles juvéniles        | 325            | 4,27                 | 1,62 (0,07)      | 1,36 (0,09)         |
| Feuilles adultes          | 270            | 3,99                 | 1,02 (0,05)      | 1,48 (0,11)         |
| E-N 1-2                   | 460            | 2,1                  | 0,37 (0,02)      | 0,08 (0,01)         |
| E-N 4-5                   | 270            | 0,84                 | 0,29 (0,015)     | 0,09 (0,01)         |

\* Moyenne de 10 analyses.

† Les entre-noeuds sont numérotés à partir du bourgeon terminal.

‡ Ecart-type de la moyenne:  $s_{de} \bar{M}$ .

rampants les plus riches. Une discordance se manifeste dans la répartition de ces substances entre les feuilles et les axes des rameaux.

Le port des rameaux est établi tôt dans leur développement et sauf cas rares, il ne varie pas au cours de la saison. Nous avons suivi l'évolution de la teneur en flavonols par des analyses tous les mois. Nous obtenons pour les rameaux volubiles par exemple les tracés de la Fig. 2.

Dans les tiges les teneurs en flavonols augmentent jusqu'en juillet et même en août (E-N 5-6) puis diminuent nettement ensuite. Tissut [25] obtient pour les pousses annuelles de nombreuses espèces ligneuses des tracés de même type (variations plus amples). Dans les feuilles jeunes la synthèse est intense en début de saison puis le métabolisme se stabilise. Dans les limbes adultes la teneur diminue jusqu'en août puis reprend en septembre. Aucun phénomène physiologique particulier concomitant n'a été remarqué. Sur *Asplenium trichomanes*, Voirin [23] trouve un minimum de teneur en flavonol en août, que la température soit constante ou en alternance naturelle. Récemment Lebreton *et al.* [26] ont souligné la difficulté qu'il y avait à interpréter les variations saisonnières de la teneur flavonique. En ce qui nous concerne, nous retiendrons que dans notre matériel la vitesse de croissance, l'aptitude à la circumnutation et les caractéristiques du mouvement révolutif sont constantes alors que la teneur en flavonols varie. D'une manière générale la quantité de leucoanthocyanes augmente au cours de la saison dans tous les organes. Ces précurseurs de la lignine pourront être utilisés un peu plus tard.

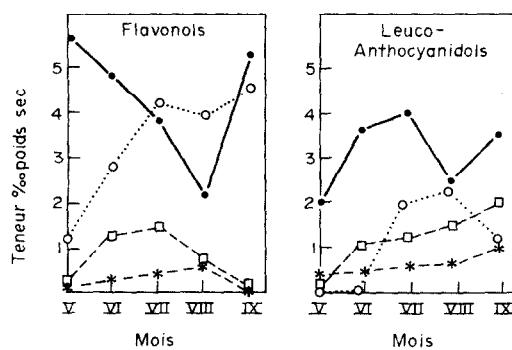


Fig. 2. Influence de la saison sur les teneurs en flavonols et en leucoanthocyanidols. □□ Entre-noeuds jeunes (1-3); \*\* Entre-noeuds adultes (5-6); ○○ Feuilles jeunes; ●● Feuilles adultes.

*Teneurs relatives en quercétol et kaempférol dans les axes.* Dans les trois types de rameaux nous avons des dérivés des deux flavonols quercétol et kaempférol. L'influence des deux substances sur la croissance ou sur le mouvement révolutif peut être différente. Nous mesurons par densitométrie (Appareil Chromoscan) le pourcentage que représente chaque flavonol par rapport au total. Le quercétol est toujours le flavonol dominant avec 60–65%, sans différence significative entre les types de rameaux. La mesure densitométrique appliquée sur les hétérosides de flavonols met en évidence la dominance constante du rutinoside-3-quercétol ou rutine (exemple: limbes adultes: rutine 51% ( $\pm 4$ ), isoquercitrine 12,5% ( $\pm 1,5$ ), astragoline 18% ( $\pm 2$ ) et nicotiflorine 18,5% ( $\pm 1,5$ ]).

#### *Les anthocyanes des rameaux rampants*

Seuls les axes rampants présentent une teinte rouge (anthocyanes) et les dosages antérieurs révèlent qu'ils contiennent moins de flavonols que les axes volubiles par exemple. On peut se demander si la synthèse ne se partage pas entre ces deux catégories de flavonoïdes. Nous avons dosé les anthocyanes dans les rameaux rampants.

Les teneurs, exprimées en 3,5 diglucoside de malvidol, des extraits de chaque entre-noeud montrent une grande stabilité dans les jeunes entre-noeuds (de 0,306 à 0,251 mg/g de M.F. pour les 5 premiers) puis une baisse dans les segments adultes (0,2 mg/g dans l'entre-noeud 7). En additionnant la teneur en anthocyanes des entre-noeuds jeunes (0,26 mg/g) et la teneur en flavonols (0,285 mg/g, voir Tableau 1) on obtient une valeur pour les dérivés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> un peu supérieure mais voisine de 0,485 mg/g qui est la teneur correspondante dans les rameaux volubiles.

Les rameaux rampants présentent une face supérieure rouge et une face inférieure verte ce qui leur confère une dorsiventralité morphologique. La moitié supérieure est 2,5 fois plus riche en anthocyanes que l'inférieure (0,36 mg/g contre 0,14 mg/g de M.F.). Malgré cela la répartition de la chlorophylle est homogène tout autour des axes horizontaux.

La dorsiventralité morphologique de ces axes est en fait la conséquence d'une dorsiventralité biochimique dont les répercussions sur la physiologie de l'organe sont à étudier.

#### DISCUSSION

*Periploca graeca* L. a, comme beaucoup d'espèces volubiles, un contenu flavonoïdique assez simple. Il comporte moins de dérivés naturels qu'*Aristolochia sipho* L., autre espèce volubile ligneuse [27] mais les aglycones sont les mêmes. Les dérivés de l'acide caféique sont abondants et dominent ce contenu.

Aux différents ports correspondent des variations assez faibles mais nettes du contenu en flavonoïdes. Les entre-noeuds jeunes des rameaux longs ne contiennent pas d'esculétine, ceux des rameaux érigés en contiennent. Les entre-noeuds jeunes des rameaux volubiles possèdent beaucoup moins de dérivés d'acide férulique que les niveaux correspondants des autres axes (0,169% contre 0,82 et 0,74%). Il en est de même pour l'acide p-coumarique. Si le rôle inhibiteur de croissance des coumarines a été maintes fois démontré, c'est récemment qu'un même rôle fut mis en évidence pour l'acide férulique [28].

Les axes longs sont plus pauvres que les courts en flavonols bien qu'au niveau des feuilles ce ne soit plus vrai. Nous préciserons la relation entre la teneur en flavonols et la vitesse de croissance ou le port des tiges en utilisant un matériel cultivé en conditions uniformes puisque les variations de teneur en fonction de la saison sont trop importantes.

Il ressort donc de cette étude qu'il n'est pas possible d'attribuer une répartition qualitative ou quantitative, ou les deux à la fois, des flavonoïdes pour chaque catégorie physiologique de rameaux. Néanmoins des différences significatives sont mises en évidence et elles nous serviront de base pour le travail futur. Ces différences portent sur les anthocyanes, les coumarines et les acides phénols. Il faut aussi considérer une intervention possible par la voie d'équilibres différents entre les classes de substances. Par exemple les rameaux volubiles ont un rapport composés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>/composés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> beaucoup plus élevé que les autres axes.

Les substances phénoliques agiraient sur les processus de croissance au niveau de l'activité auxines-oxydasique et en modifiant l'effet des gibberellines [11,29,30]. Suivant l'équilibre entre les auxines et les gibberellines dans le tissu considéré l'influence sur la croissance des phénols présents pourra être plus ou moins marquée, sur-

tout qu'il est peu vraisemblable que les deux sites d'action de ces substances conduisent à des effets égaux.

La confrontation du contenu flavonoïdique avec la croissance et le port des axes végétatifs de *P. graeca* L. ne permet pas de dégager une relation nette entre les deux phénomènes. L'ambiguïté sera levée lorsque, connaissant les étapes de la synthèse des substances phénoliques dans notre matériel, nous pourrons en perturber la formation.

Par ailleurs nous soulignons quelques résultats importants également: c'est d'abord l'absence d'aglycones libres dans notre matériel, tous les polyphénols sont osidés ou estérifiés par l'acide quinique; c'est aussi l'absence de substances acylées (voir Partie Experimentale); c'est enfin la fréquence des dérivés du quercétol parfois à l'exclusion de ceux du kaempférol (dans les axes). Ce dernier caractère relevé sur plusieurs autres espèces volubiles, et la présence constante de rutine avaient permis à Tronchet [16] d'impliquer directement les flavonols dans l'existence du port voluble. L'étude plus complète de cette relation éventuelle (étude quantitative en particulier) que nous avons réalisée avec notre matériel ne nous permet pas de soutenir la même conclusion.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

*Matériel.* Les plantes croissent en conditions naturelles dans un Jardin expérimental. Le matériel (voir la Fig. 1) est prélevé pour les analyses toujours à la même heure de la journée et un jour ensoleillé qui suit quelques beaux jours.

*Extraction des flavonoïdes.* Les substances naturelles sont extraites par l'éthanol à chaud [16] et par MeOH à froid après broyage. Pour les anthocyanes le matériel frais est épousseté par le méthanol chlorhydrique (1%) à 4° [22].

*Obtention des aglycones.* On pratique des hydrolyses acides (HCl 2N) et alcalines (NaOH 2N, atmosphère N<sub>2</sub>) sur les extraits, sur des éluats de taches après chromatographie et sur des poudres végétales. Dans ce dernier cas il s'agit de la technique de Lebreton *et al.* [24]. Nos prises d'essai sont de 0,5 g. Les anthocyanes sont hydrolysées par HCl 2N au bain-marie bouillant pendant 30 min. Les anthocyanidols sont repris dans un volume minimum d'alcool isoamylique.

*Séparation et identification des substances.* Les substances sont séparées par chromatographie bidimensionnelle sur papier, par chromatographie sur plaque de gel de silice pour les sucres et sur plaque de cellulose non activée pour les anthocyanidols. Le repérage et l'identification sont conduits à l'aide des méthodes usuelles [22,31-33].

*Dosages.* *Flavonols, coumarines, acides-phénols:* nous avons pratiqué deux types de dosages: a. *Dosage des flavonols par spectrophotométrie différentielle* [24]. La chélation avec AlCl<sub>3</sub> permet la détermination de la quantité globale des flavonols. Après chromatographie dans l'acide acétique à 60% les teneurs

relatives sont mesurées par densitométrie (appareil Chromoscan). (b). *Dosage colorimétrique de tous les flavonoïdes après réaction avec le réactif de Folin et Ciocalteu* [34]. Le mode opératoire a été décrit par ailleurs [35].

*Leucoanthocyanes* sont dosées par colorimétrie [24] (550 nm dans le 1-butanol).

*Anthocyanes:* Il s'agit d'un dosage par colorimétrie à la longueur d'onde d'absorption maximale (530 nm). La droite de référence est établie avec le 3-5 diglucoside de malvidol du commerce.

*Etude de l'acylation des flavonols et anthocyanes.* Il est connu depuis longtemps, établi de manière détaillée par Harborne [36], que les anthocyanes (hétérosides d'anthocyanidols) peuvent être estérifiées sur un OH glucidique par un acide phénol du groupe cinnamique. La même structure se rencontre sur les hétérosides de flavonols (tiliroside [37]). La saponification pratiquée sur les solutions d'hétérosides de flavonols et pour les anthocyanes de *Periploca graeca* L. a montré l'absence d'acylation.

*Dosage des chlorophylles.* 1 g de matériel frais est mis en contact avec Me<sub>2</sub>CO. Les chlorophylles sont concentrées dans l'éther de pétrole (les flavonols restent dans l'acétone) puis dosées par spectrophotométrie à 652 nm.

*Remerciements*—Nous remercions le Professeur P. Lebreton (Université de Lyon, France) et le Directeur C. Martin (I.N.R.A., Dijon, France) qui nous ont accueilli dans leurs laboratoires et nous ont prodigué leurs conseils.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. Gortner, W. A. et Kent, M. J. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 731.
2. Sondheimer, E. et Griffin, D. H. (1960) *Sciences* **131**, 672.
3. Gamborg, O. L., Wetter, L. R. et Neish, A. C. (1961) *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1113.
4. Nitsch, J.-P. et Nitsch, C. (1961) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **108**, 349.
5. Nitsch, J.-P. et Paris, R. (1962) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **109**, 113.
6. Furuya, M. (1962) *Ph. Thesis, Yale Univ.*
7. Furuya, M., Galston, A. W. et Stowe, B. B. (1962) *Nature* **193**, 456.
8. Furuya, M. et Galston, A. W. (1965) *Phytochemistry* **4**, 456.
9. Colonna, J.-P. (1970) *Cah. ORSTOM Biol.* **13**, 3.
10. Gaspar, Th. (1965) *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège* **7-8**, 391.
11. Pilet, P.-E. et Gaspar, Th. (1968) *Le Catabolisme Auxinique*. Masson, Paris.
12. Stenlid, G. et Samorodova-Bianci, G. (1969) *Lantbrukshögskolans Annaler* **35**, 837.
13. Stenlid, G. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2251.
14. Köves, E., Sirokman, F. et Milassim, M. (1972) *Z. Pflanzenphysiol.* **67**, 370.
15. Jaffe, M. J. et Galston, A. W. (1967) *Plant Physiol.* **42**, 848.
16. Tronchet, J. (1960) *Soc. Fr. Physiol. Vég.* **6**, 99.
17. Sankara Subramanian, S. et Nair, A. G. R. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1703.
18. Sondheimer, E. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 131.
19. Cartwright, R. A., Roberts, E. A. H., Flood, A. E. et Williams, A. H. (1955) *Chem. and Ind.* 1062.
20. Harborne, J. B. et Corner, J. J. (1961) *Biochem. J.* **81**, 242.
21. Tronchet, J. (1966) *C. R. Acad. Sci. D.* **263**, 1216.

22. Harborne, J. B. (1967) *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, pp. 1-35. Academic Press, London.
23. Voirin, B. (1970) Thèse Doct. Etat, Lyon.
24. Lebreton, P., Jay, M. et Voirin, B. (1967) *Chim. Anal.* **49**, 375.
25. Tissut, M. (1970) Thèse Doct. Etat, Grenoble.
26. Lebreton, P., Jay, M. et Voirin, B. (1972) 98e Cong. Nat. Soc. Sav. (à paraître).
27. Tronchet, J. (1965) *Ann. Sci. Univ. Besançon* **2**, 12.
28. Isaia, A. (1971) *Planta* **96**, 175.
29. Phillips, I. D. J. (1961) *Planta* **96**, 27.
30. Phillips, I. D. J. (1962) *Planta* **101**, 277.
31. Randerath, K. (1964) *Chromatographie sur Couches Minces*. Gauthier-Villars, Paris.
32. Nybom, N. (1964) *Physiol. Plantarum* **17**, 975.
33. Cartwright, R. A. et Roberts, E. A. H. (1954) *Chem. and Ind.* 1389.
34. Folin, O., Ciocalteu, V. (1927) *J. Biol. Chem.* **73**, 627.
35. Tanguy, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 19.
36. Harborne, J. B. (1964) *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Academic Press, London.
37. Horhammer, L., Stich, L. et Wagner, H. (1959) *Naturwissenschaften* **48**, 358.