

LA VARIATION FLAVONIQUE CHEZ LES SOUS-ESPECES DE *L'ANTHYLLIS VULNERARIA*

JEAN-FRANÇOIS GONNET

Service de Phytochimie, Département de Biologie Végétale 741, Université Claude-Bernard-Lyon I,
43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France

(Reçu le 7 Février 1978)

Key Word Index—*Anthyllis vulneraria*; Leguminosae; infraspecific chemosystematics; flavonol glycosides; chemical taxa.

Abstract—Nine infraspecific taxa of *Anthyllis vulneraria* have been investigated for leaf flavonoids. The distribution of 35 flavonol glycosides within 26 populations, indicated the presence of four chemical taxa, each based on different glycosides of 7-methylkaempferol.

INTRODUCTION

En raison d'un polymorphisme important et d'une répartition géographique très vaste, l'anthyllide vulnéraire (*Anthyllis vulneraria*, Leguminosae) a fait l'objet de travaux systématiques très nombreux [1-6], ayant conduit, pour la plupart, à la pulvérisation de l'espèce en une multitude de taxa infraspécifiques. Reprenant cette étude à l'aide des méthodes de la taxonomie moderne, Couderc, après avoir montré que l'*Anthyllis vulneraria* possède un mode de reproduction autogame [7-8]—ce qui signifie que les possibilités d'hybridation naturelle sont inexistantes—a été conduit à reconnaître seulement six sous-espèces, dont une (subsp. *vulgaris*) regroupe quatre variétés [9, 10]. C'est dans le contexte de cette révision systématique infraspécifique que s'inscrit la présente étude des flavonoïdes foliaires de l'anthyllide vulnéraire.

Les échantillons ont été prélevés au sein de populations issues de graines récoltées dans la nature et cultivées en conditions identiques au jardin expérimental de l'Université Paris XI à Orsay. L'analyse flavonique a été abordée dans une première étape par le biais des aglycones, puis étendue à leurs formes naturelles hétérosidiques de manière à pouvoir disposer d'un outil d'une finesse plus appropriée à l'échelle de ce problème. Le traitement mathématique des résultats de cette seconde investigation par l'analyse factorielle a ensuite permis de préciser les affinités biochimiques entre les sous-espèces et variétés étudiées. Parallèlement, l'influence éventuelle de facteurs externes et internes (conditions écologiques, âge, stade physiologique de la plante, ...) sur le métabolisme pigmentaire de l'*A. vulneraria* a été contrôlée, plusieurs années durant, sur des individus de stations naturelles. C'est ainsi qu'il a pu être montré que ces

divers paramètres restent sans influence, qualitativement parlant, sur la définition polyphénolique des échantillons [11]. Les récoltes ont néanmoins été effectuées dans des populations de même âge (2 ans) et au même stade physiologique (fin de floraison).

RESULTATS

Etude des aglycones

Le mélange d'aglycones obtenu après hydrolyse de quelques grammes de feuilles sèches, est en premier lieu chromatographié sur colonne de polyamide. Le contrôle, par CCM de polyamide, des fractions issues de la colonne, suivi d'une confrontation au relevé-type défini au cours de l'analyse exploratoire de l'espèce [12] conduit ensuite à la définition flavonique de l'échantillon. Les résultats obtenus avec les 38 populations étudiées sont résumés dans le Tableau 1.

L'examen de ce tableau permet de dégager le chimisme flavonique de base de l'espèce, qui peut être résumé en la présence constante de six flavonols: quercétine, kaempferol, isorhamnétine et leurs homologues 5-désoxyrés, fisétine, trihydroxy-3,7,4' flavone et geraldol.*

Le répartition, au sens présence/absence, de la rhamnocitrine—dont la teneur, il est important de le souligner, peut représenter jusqu'à 65 % du stock flavonique total—conduit à reconnaître l'hétérogénéité pigmentaire, peu marquée des subsp. *forondae*, *vulgaris* var. *polyphylla* et var. *maritima* et celle, très nette au contraire, de la variété *rubriflora* du subsp. *vulgaris*, qui regroupe un nombre égal de populations RC + et RC -. Les résultats enregistrés avec la distribution du second méthyl-7 flavonol, la rhamnétine, confirment l'hétérogénéité chimique des taxa précités. Il convient toutefois de rester très prudent vis à vis de cette dernière conclusion, ce constituant étant toujours présent en teneur très faible, ce qui a rendu, plus d'une fois, sa détection incertaine.

* A cette définition, il y a lieu d'ajouter également les proanthocyanidines procyanidin et prodelphinidin, uniformément rencontrées chez les échantillons dans le rapport C/D = 2.

Tableau 1 Répartition et dosage relatif des aglycones flavoniques au sein de chaque population d'*A. vulneraria*

Population*	Taxon infrasp. (subsp.)	Q†	K	Ir	Rt‡	Rc
1 Ornans	<i>alpestris</i> Hegetschw. et Heer	24	16	35	+	25
2 Chamrousse	<i>vulgaris</i> (Koch) Willk. et Lange var. <i>vulgaris</i>	24	15	31	+	30
3 Dormillouze	"	32	32	17	+	19
4 Godivelle	"	17	18	35	9	21
5 Vallée de la Meuse	<i>vulgaris</i> var. <i>polyphylla</i> Ser.	29	27	35	-	9
6 Chambéry	"	36	33	13	+	18
7 Villard	"	16	60	20	4	-
8 Le Diable	"	20	31	42	+	7
9 Le Chapuis	"	23	37	26	2	12
10 Le Sapet	"	19	29	17	+	35
11 Combe d'Ire§	"	24	27	23	+	26
12 St-Sorlin d'Arve§	"	19	31	27	+	23
13 Blanc-Nez	<i>vulgaris</i> var. <i>maritima</i> (Koch) Willk.	11	27	14	2	46
14 Gris-Nez	"	16	25	34	+	25
15 Pointe aux Oies	"	10	24	34	+	32
16 Trégastel	"	23	40	37	+	-
17 Guisseney	"	17	27	28	+	28
18 Pont du Ravi	<i>vulgaris</i> var. <i>rubriflora</i> (DC.) Willk.	11	47	28	-	14
19 St-Sauveur	"	20	53	27	-	-
20 " stérile mâle	"	24	45	31	-	-
21 Superbagnères	"	18	42	36	4	-
22 Peyresourde	"	14	32	25	+	29
23 Portet d'Aspet	"	22	22	35	+	21
24 Gavarnie	"	3	50	47	+	-
25 " stérile mâle	"	8	44	48	+	-
26 Saccourvielle	"	24	25	31	+	20
27 Astau	"	5	68	27	+	-
28 Stilon	"	14	43	36	+	7
29 Luchon	"	18	36	34	-	12
30 Montpellier§	<i>hispida</i> (Boiss. et Reut.) Rouy	31	27	29	+	13
31 Iseran velu	<i>vulnerarioides</i> (All.) Bonj.	36	12	46	2	4
32 Pied Moutet	"	22	43	16	-	19
33 Mont-Louis	<i>forondae</i> (Sennen) Cullen	16	38	12	+	34
34 Argelès	"	23	29	19	-	29
35 Argentière	"	9	62	29	-	-
36 Kopavogur	<i>borealis</i> (Rouy) Jalas	2	24	9	+	65
37 Beuzec§	"	9	25	25	+	41
38 Beuzec atypique§	"	7	27	17	+	49

* Les populations sont désignées par le lieu d'origine des graines ou des plants.

† Q = Quercétine + fisétine; K = Kaempférone + désoxy-5 kaempférone; Ir = Isorhamnétine + geraldol; Rt = Rhamnétine; Rc = Rhamnocitrine.

‡ Du fait de sa teneur très faible, la Rt est, à 5 exceptions près, signalée présente (+) ou absente (-).

§ Populations récoltées directement dans la Nature.

Etude des hétérosides

Il faut tout d'abord signaler que cette analyse, pour des raisons quantitatives, n'a pu être pratiquée que sur 26 des 38 populations. De plus, seuls les hétérosides entraînés par l'acétate d'éthyle ont fait l'objet d'une étude en chromatographie bidimensionnelle sur CM de polyamide. Le relevé hétérosidique de chaque population a été établi après reproduction photographique et comparaison de tous les chromatogrammes obtenus [11]. De la sorte, ce sont 35 hétérosides au total, tous de fluorescence violette, qui ont pu être détectés. Six d'entre eux, constituants majeurs, ont été identifiés [13]: ce sont les arabinosides et galactosides en 3 de la quercétine (n° 1 et 3), du kaempférone (n° 4 et 7) et de l'isorhamnétine (n° 5 et 6). Pour ce qui est des autres, la nature de l'aglycone a pu être déterminée pour 20 d'entre eux: quercétine (n° 2 et 8), kaempférone (n° 9, 10, 11 et 24), isorhamnétine (n° 19, 23 et 27), et rhamnacitrine (n° 12, 13, 15, 18, 20,

22, 25, 29, 31, 33 et 34). Les 9 derniers enfin sont restés structuralement inaccessibles: on retiendra toutefois qu'il ne peut s'agir d'hétérosides de rhamnacitrine, ces composés ayant été rencontrés une fois au moins dans des populations dépourvues de cet aglycone. On remarquera également l'absence de glycosides de la rhamnétine et des désoxy-5 flavonols: bien que leur existence ne puisse être mise en doute, la faible teneur des composés concernés doit suffire à expliquer qu'ils soient passés inaperçus.

L'exploitation du tableau de répartition des 35 hétérosides entre les 26 populations par l'analyse factorielle a ensuite permis de préciser leurs affinités biochimiques.

Une première approche, effectuée par l'intermédiaire de la méthode en 'composantes principales' [14], n'a pas permis de les matérialiser dans un espace graphique à deux dimensions. Le dépouillement des

Tableau 2. Matrice des données de l'analyse des correspondances

Populations n°	Hétérosides n°																				
	2	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
2	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
6	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
9	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
11	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
12	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
14	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
17	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
18	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
20	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
23	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
30	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
31	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
33	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
34	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
36	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

résultats de ce premier calcul a pourtant abouti à éliminer du tableau de données 13 hétérosides dont la valeur systématique s'est montrée très peu significative. De la sorte, ce sont donc 22 glycosides seulement qui ont été retenus pour l'établissement d'une nouvelle matrice de données (Tableau 2), qui a été traitée à l'aide d'une seconde méthode de calcul factoriel, l'analyse des correspondances.

Celle-ci, outre sa supériorité technique sur l'analyse en composantes principales, présente l'avantage de combiner au classement des populations celui des hétérosides, en associant chacun d'eux aux populations qu'il discrimine le mieux [15]. Graphiquement parlant, les

caractères les plus discriminatoires sont éloignés de l'un ou/et l'autre des axes factoriels tandis que les moins significatifs sont localisés au voisinage de l'origine.

Les résultats de ce second traitement sont traduits par la Fig. 1, dans lequel populations et hétérosides sont répartis en fonction de leurs coordonnées sur les deux premiers axes facteurs qui couvrent 43 % de la variabilité de la matrice. La prise en considération des coordonnées sur les axes 3 et 4 porte la valeur du recouvrement à plus de 70%, mais sans modification significative de la répartition observée.

L'examen du graphique $F_1 \times F_2$ conduit à la reconnaissance des unités chimiosystématiques suivantes: un

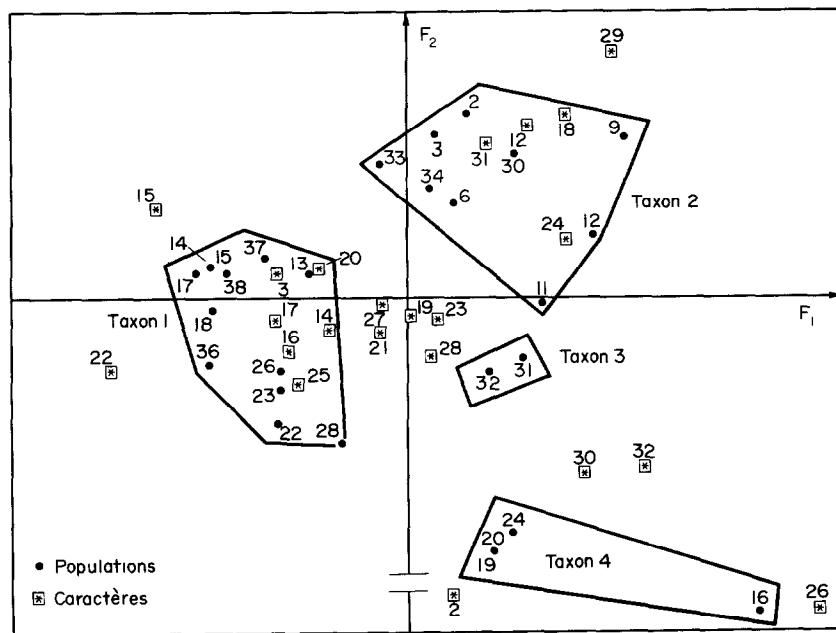


Fig. 1. Diagramme des affinités polyphénoliques des populations analysées (Analyse des correspondances).

premier ensemble regroupant les populations Blanc-Nez (n° 13), Gris-Nez (n° 14), Pointe aux Oies (n° 15) et Guisseny (n° 17) (subsp. *vulgaris* var. *maritima*), Kopavogur (n° 36), Beuzec (n° 37) et Beuzec atypique (n° 38) (subsp. *borealis*), Pont du Ravi (n° 18), Peyresourde (n° 22), Portet d'Aspet (n° 23), Saccourvielle (n° 26) et Stilon (n° 28) (subsp. *vulgaris* var. *rubriflora*), est individualisé par l'hétéroside n° 22 (aglycone rhamnocitrine). A l'intérieur de ce groupe, une subdivision peut être opérée sur la base des hétérosides n° 15 (aglycone rhamnocitrine) définissant les populations des subsp. *borealis* et *vulgaris* var. *maritima*, et de l'hétéroside n° 2 (aglycone quercétine) commun aux populations Peyresourde, Portet d'Aspet, Saccourvielle et Stilon, c'est à dire le subsp. *vulgaris* var. *rubriflora pro parte*. La position 'moyenne' des populations Pont du Ravi et Kopavogur s'explique, pour la première par le fait qu'elle soit dépourvue du composé n° 2 et pour la seconde, par l'existence simultanée dans son chimisme des hétérosides n° 2 et 15.

Un second ensemble, défini essentiellement par l'hétéroside n° 29, réunit les populations Chamrousse (n° 2) et Dormillouze (n° 3) (subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*), Chambéry (n° 6), Le Chapuis (n° 9), Combe d'Ire (n° 11) et Saint Sorlin d'Arve (n° 12) (subsp. *vulgaris* var. *polyphylla*), Mont Louis (n° 33) et Argelès (n° 34) (subsp. *foronae*) et Montpellier (n° 30) (subsp. *hispida*) qui sont les SEULES à posséder ce glycoside de rhamnocitrine. Il sera noté, de plus, que tous ces échantillons ont en commun les hétérosides n° 12 (aglycone rhamnocitrine) et n° 24 (kaempférol), et pour la plupart, les composés n° 18 et 31, deux hétérosides de rhamnocitrine. La relative dispersion graphique de ces populations s'explique par le 'tiraillement' opéré par certains autres glycosides: la présence du composé n° 15 chez les populations Mont Louis et Argelès explique leur recentrage sur l'axe facteur 1; de même, la présence des composés n° 26 et 32 chez Combe d'Ire et Saint-Sorlin entraîne leur déplacement en direction de l'axe facteur 2.

A proximité de l'ensemble ainsi structuré, se situent les populations Iseran velu (n° 31) et Pied Moutet (n° 32) représentatives du subsp. *vulnerarioides*; il faut souligner que ces populations partagent avec celles du groupe précédent les composés n° 12, 24 et 31 et plus particulièrement avec les populations Combe d'Ire et Saint Sorlin, les hétérosides n° 26 et 32. Par contre, ils s'individualisent par l'absence de l'hétéroside n° 29, considéré comme le caractère discriminant du second ensemble, ce seul paramètre suffisant à expliquer leur relatif éloignement. Toutefois, il semble que le problème doive être posé en d'autres termes: les caractères n° 32 et surtout 26 apparaissent en effet comme beaucoup plus discriminatoires que les caractères n° 24 et 31, c'est donc par rapport aux premiers qu'il semble préférable de situer les deux populations en question.

Reste enfin le problème des populations Saint-Sauveur (n° 19), Saint-Sauveur stérile mâle (n° 20) et Gavarnie (n° 24) (subsp. *vulgaris* var. *rubriflora*) et Trégastel (n° 16) (subsp. *vulgaris* var. *maritima*). Malgré leur relative dispersion graphique, ces quatre populations peuvent être considérées comme constitutives d'un quatrième ensemble, défini tout d'abord par un caractère négatif, l'absence de tout hétéroside de rhamnocitrine et, en second lieu, par trois caractères discriminatoires: les glycosides n° 2, 26 et 32. L'éloignement entre les populations du subsp. *vulgaris* var. *rubriflora* et celle de la

variété *maritima* trouve son explication dans l'influence exercée sur la position graphique de ces populations par des caractères beaucoup moins significatifs: les hétérosides n° 14, 17, 27 et 28, que sont seules à posséder au sein de ce dernier ensemble les populations de la variété *rubriflora*.

En conclusion, l'analyse factorielle des correspondances appliquée aux résultats de l'étude des glycosides flavoniques, conduit à la reconnaissance de quatre taxa chimiques à l'intérieur du complexe infraspécifique de l'*Anthyllis vulneraria*:

présence de glycosides de rhamnocitrine:

- + Hétéroside n° 22: subsp. *vulgaris* var. *maritima*
 pro parte,
 subsp. *vulgaris* var. *rubriflora*
 pro parte,
 subsp. *borealis* TAXON 1

- + Hétéroside n° 29: subsp. *vulgaris* var. *vulgaris*,
 subsp. *vulgaris* var. *polyphylla*,
 subsp. *hispida*.

- subsp. *foronae* ... TAXON 2

- + Hétéroside n° 26: subsp. *vulnerariooides* TAXON 3

absence de glycosides de rhamnocitrine:

- subsp. *vulgaris* var. *rubriflora*
 pro parte,
 subsp. *vulgaris* var. *maritima*
 pro parte TAXON 4

Les conclusions auxquelles conduit cette étude chimio-systématique doivent maintenant être confrontées aux diagnoses morphologiques issues des travaux taxonomiques de Couderc dans le but de parvenir à une meilleure définition des affinités entre populations et taxa infraspécifiques étudiés. Ceci sera l'objet d'une autre publication à paraître très prochainement.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spécimens d'herbier correspondant aux différents taxa décrits par Couderc sont conservés au Laboratoire de Biologie végétale C, Université Paris XI, F-91405 Orsay.

Aglycones: de 0.5 à 1 g de feuilles sèches sont hydrolysés par HCl 2N bouillant (40 min). Extraction des aglycones par Et₂O; reprise de l'extrait par MeOH et séparation en 15 fractions par CC de polyamide élue par C₆H₆-MeCOEt-MeOH [16]. Analyse des fractions par CCM sur polyamide DC 11 (solvant C₆H₆-MeCOEt-MeOH, 6:1:3). Photométrie en lumière UV (365 nm) d'une CCM monodimensionnelle pour évaluer les proportions relatives des différents aglycones (Tableau 1).

Hétérosides: suivant la quantité de matériel disponible, l'analyse est répétée 3-5 fois pour chaque population. 0.5-1 g de feuilles broyées sont extraits 3 × 100 ml MeOH-H₂O, 6:4. Filtration, concentration et reprise par H₂O. Extraction des hétérosides par AcOEt (3 × 50 ml), chromatographie bidimensionnelle sur CM de polyamide DC 11 (solvent: 1-C₆H₆-MeCOEt-MeOH, 25:10:11 et 2-H₂O-MeOH-MeCOEt-AcMe₂CO, 30:15:10:4). Photographie des chromatogrammes en lumière UV (365 nm) et relevé des hétérosides.

Identification des hétérosides majeurs, voir réf. [13]. Autres hétérosides: isolement à partir de 5-10 CCM bidimensionnelles, mêmes solvants que ci-dessus. Après délimitation des spots en UV, grattage du polyamide et élution par MeOH; hydrolyse par 2 ml 2N HCl; extraction par Et₂O; identification de l'aglycone en CCM sur DC 11 (solvent 6:1:3) en présence de témoins des 5 aglycones majeurs de l'*A. vulneraria*.

Remerciements—L'auteur tient à remercier Monsieur H. Couderc, Laboratoire de Taxonomie Végétale de l'Université Paris XI, qui a fourni les échantillons végétaux, ainsi que

Monsieur J. D. Lebreton, Laboratoire de Biométrie de l'Université Lyon I, qui s'est chargé du traitement mathématique des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rouy, G. et Foucaud, J. (1897) *Flore de France* 284.
2. Rothmaler, W. (1941) *Rep. Spec. nov. regni Veget.* **50**, 177.
3. Fournier, P. (1946) *Les Quatre Flores de France*, 561, Paris.
4. Jalas, J. (1952) *Arch. Soc. Vanamo* **7**(1), 49.
5. Cullen, J. (1968) dans *Flora europea* (Tutin *et al.*, ed.), Tome II, p. 179.
6. Marsen-Jones, E. et Turril, W. B. (1933) *J. Genet.* **27**, 261.
7. Couderc, H. (1971) *C.R. Acad. Sci.* **272**, 1256.
8. Couderc, H. (1971) *Bull. Soc. Bot. Fr.* **118**, 359.
9. Couderc, H. (1975) Thèse Doctorat d'Etat Sciences Naturelles, Paris.
10. Couderc, H. (1975) *Rev. Gén. Bot.* **82**, 93.
11. Gonnet, J. F. (1974) Thèse Doctorat Spécialité, Lyon.
12. Gonnet, J. F. et Jay, M. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2313.
13. Gonnet, J. F. (1975) *Phytochemistry* **14**, 823.
14. Hotteling, H. (1933) *J. Educ. Psychol.* **24**, 417.
15. Lebart, L. (1969) *Consommation*, Dunod, Paris, 65.
16. Wollenweber, E. (1970) Thèse Université Heidelberg.