

REPARTITION DES FLAVONOLS DANS L'ÉPAISSEUR DES FEUILLES DE QUELQUES VÉGÉTAUX VASCULAIRES

MICHEL TISSUT et PATRICK RAVANEL

Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université Scientifique et Médicale de Grenoble, B.P. 53 X—38041 Grenoble Cedex, France

(Reçu le 11 décembre 1979)

Key Word Index—*Betula*; *Corylus*; *Fagus*; *Fraxinus*; *Allium*; flavonols; proanthocyanidins; localisation; epidermis.

Abstract—The tissue localisation of flavonoids has been studied in leaves of *Betula*, *Corylus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Pisum*, *Platanus*, *Quercus*, *Spinacia* and *Tilia* and scales of onion bulbs. All these species contain flavonols which are, for the most part, located in the upper epidermis of the leaves. In the onion bulb, flavonols are exclusively in the epidermis. The flavonols are glycosylated and dissolved in the vacuoles. The leaves were fractionated by an original technique of abrasion of the frozen material. The physiological significance of such a distribution of flavonoids in the adult leaves or scales is discussed.

INTRODUCTION

Dès le début du siècle, la localisation tissulaire des flavonoïdes a fait l'objet d'études détaillées en ce qui concerne les anthocyanes—visibles en microscopie optique. De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que, pour les parties végétatives, deux types d'accumulations anthocyaniques, vraisemblablement non équivalentes, peuvent avoir lieu: (1) accumulation des organes jeunes; (2) accumulation des organes foliacés adultes, affectant des tissus en général nettement délimités et que Nozzolillo [1] montre comme étant essentiellement superficielle (dans 61 espèces sur 66).

La localisation tissulaire des autres polyphénols est bien moins finement connue. Des résultats intéressants ont été obtenus sur des végétaux à épiderme séparable [2, 3]. On est loin, cependant, d'avoir une vue globale de cette distribution, d'autant moins que des polyphénols ont été trouvés dans tous les organes de divers végétaux supérieurs avec des répartitions variables d'une espèce à l'autre. Cependant, dans la confusion apparente qui règne dans la répartition des multiples formes polyphénoliques, une règle paraît être généralement respectée: chez les Angiospermes terrestres, les organes foliacés sont très généralement pourvus de flavonoïdes (surtout flavonols et flavones) avec une teneur de l'ordre de 1 à quelques % de la masse sèche. Cette teneur fait l'objet de régulations plus ou moins complexes, qui, chez les Dicotylédones surtout, mettent en jeu la qualité et la quantité de la lumière incidente.

Au cours de la dernière décennie, les recherches de biologie cellulaire ont permis d'obtenir deux résultats de très grande importance: (1) Des plastes, et même vraisemblablement des chloroplastes sont impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes. (2) Ces plastes peuvent être le siège d'une accumulation flavonoïdique, sous forme d'aglycones libres [4] ou de glycosides [5]. Certains plastes, comme ceux de *Phaseolus aureus* ou de *Morus alba* paraissent dépourvus de flavonoïdes, d'autres contiennent des flavonoïdes de même structure que ceux qui représentent l'ensemble flavonoïdique foliaire [5],

d'autres, enfin, comme dans l'avoine, [3], contiennent des flavonoïdes plus ou moins spécifiques.

Dans un schéma de synthèse, Alibert *et al.* [6] montrent que l'élaboration, au moins partielle, de l'ensemble des flavonoïdes des feuilles, par les plastes, peut être envisagée. Les problèmes de localisation et de transfert des flavonoïdes dans la cellule et dans les tissus se posent donc maintenant avec acuité.

RÉSULTATS

Localisation intracellulaire de l'accumulation des flavonoïdes des organes foliacés étudiés

Les tuniques de bulbe d'oignon sont le siège d'une synthèse flavonique intense [7]. L'observation au cytophotomètre, sous lumière ultraviolette longue (370 nm) des cellules de l'épiderme externe obtenues par coupe, met en évidence la très forte absorption du seul contenu vacuolaire, corrélée avec la présence des flavonols en concentration très forte. Les cellules dépourvues de flavonols ont une vacuole claire: c'est le cas des cellules du parenchyme. De plus, les cellules de l'épiderme interne des tuniques profondes sont peu riches en flavonols. Leur contenu vacuolaire absorbe peu l'UV long. Après maintien des tuniques isolées en milieu aéré humide, l'épiderme interne élabore des flavonols; le contenu vacuolaire de ses cellules devient alors très absorbant. Enfin, le spectre différentiel d'un tel épiderme vivant et de son semblable traité par le méthanol rapidement, est très semblable au spectre du mélange flavonique de l'oignon. L'accumulation des glycosides flavoniques du bulbe d'oignon est donc essentiellement vacuolaire (Fig. 1).

Dans les autres matériels étudiés, chlorophylliens et un peu moins riches en flavonols, l'observation cytophotométrique est malaisée et on obtient une preuve indirecte de l'existence d'une accumulation flavonique vacuolaire (1) par absence de quantités importantes de flavonols dans les autres compartiments cellulaires (en particulier les chloroplastes), suffisant à représenter le contenu flavonique global de la feuille, (2) par obtention d'une

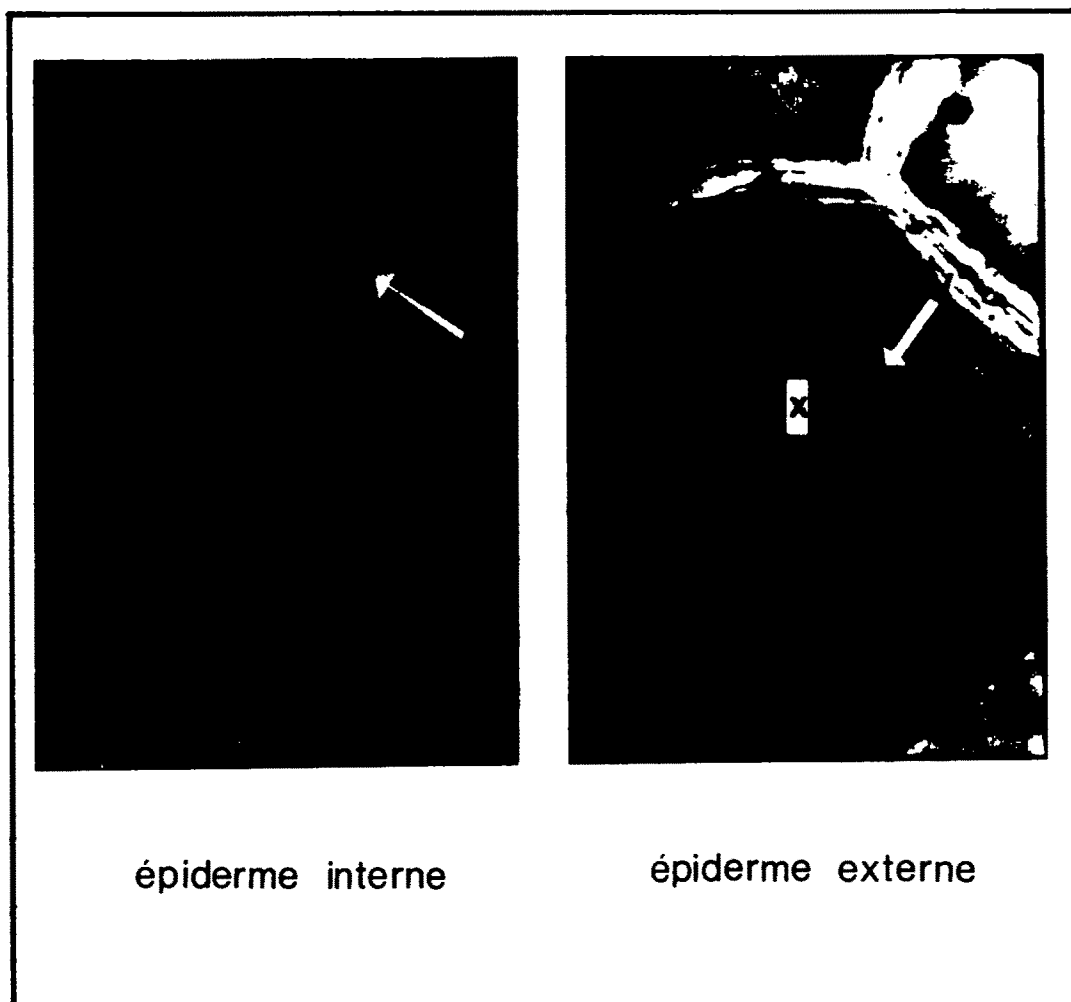


Fig. 1. Microphotographie de cellules d'épiderme externe et interne de tunique de bulbe d'oignon, en lumière ultraviolette longue. Cy: cytoplasme; N: Noyau; P: Paroi; V: Vacuole; X: Surface de mesure d'absorbance au cytophotomètre; Z: Zone de décollement due à la plasmolyse.

fraction très importante des glycosides flavoniques foliaires par traitement du matériel vivant à l'éther éthylique qui provoque l'éclatement cellulaire et l'expulsion du contenu vacuolaire d'un certain nombre de cellules. Les glycosides flavoniques (à l'exception des monorhamnosides et des monoarabinosides qui se solubilisent dans l'éther) se rassemblent dans la phase aqueuse qui se forme au cours du traitement. On récupère ainsi rapidement de 20 à 30% du contenu flavonique foliaire. Dans les matériels étudiés, l'existence d'une accumulation flavonique vacuolaire paraît donc bien établie.

Répartition des flavonols dans l'épaisseur des organes foliacés étudiés

Des fractionnements par abrasion du matériel congelé ont été réalisés sur des feuilles développées de *Betula pubescens* Ehrh., *Corylus avellana* L., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus excelsior* L., *Pisum sativum* L., *Platanus acerifolia* Willd., *Quercus pedunculata* Ehrh., *Spinacia oleracea* L., et *Tilia argentea* Desf. On distingue quatre fractions: supérieure, moyenne-supérieure, moyenne-inférieure et inférieure, ces fractions ayant comme constituant majeur,

respectivement, l'épiderme supérieur, le parenchyme palissadique, le parenchyme lacuneux et l'épiderme inférieur.

Les Figs. 2 et 3 montrent la répartition des flavonols dans ces fractions et font apparaître la teneur spécialement forte de l'épiderme supérieur. Chez le bouleau le platane et le chêne, les fractions inférieures ont une teneur plus forte que les parenchymes. La présence des flavonols dans la fraction moyenne-supérieure contaminée de manière peu contrôlable par de l'épiderme supérieur ne permet pas de conclure à la présence ou à l'absence de quantités importantes de flavonols dans les parenchymes palissadiques. La présence de quantités non nulles de flavonols dans la fraction moyenne-inférieure plaide en faveur de la possibilité, pour les cellules parenchymateuses, d'accumuler de faibles quantités de flavonols.

Chez l'oignon, la répartition flavonique dans les tuniques superficielles du bulbe est clairement démontrée par cytophotométrie. Seuls, les épidermes accumulent des flavonols, l'épiderme externe étant, de loin, le plus riche. Le parenchyme, lui, dépourvu de flavonols, synthétise des acides-phénols simples (présence d'une activité phénylalanine-ammoniac-lyase correspondante) [7].

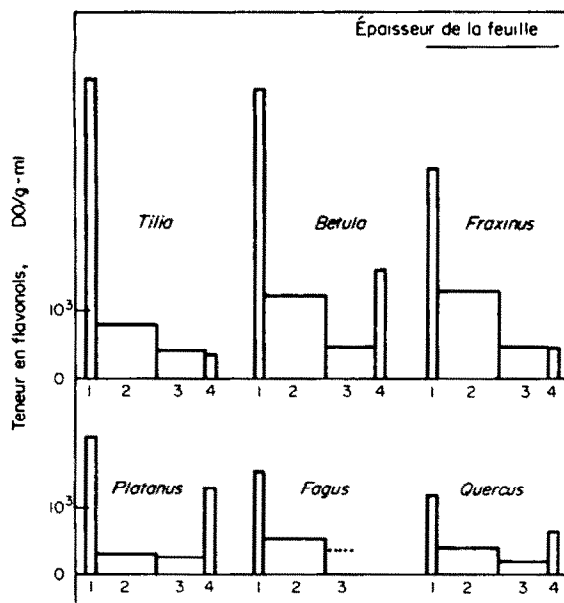


Fig. 2. Répartition des flavonols dans l'épaisseur de la feuille de *Tilia*, *Betula*, *Fraxinus*, *Platanus*, *Fagus*, *Quercus*.

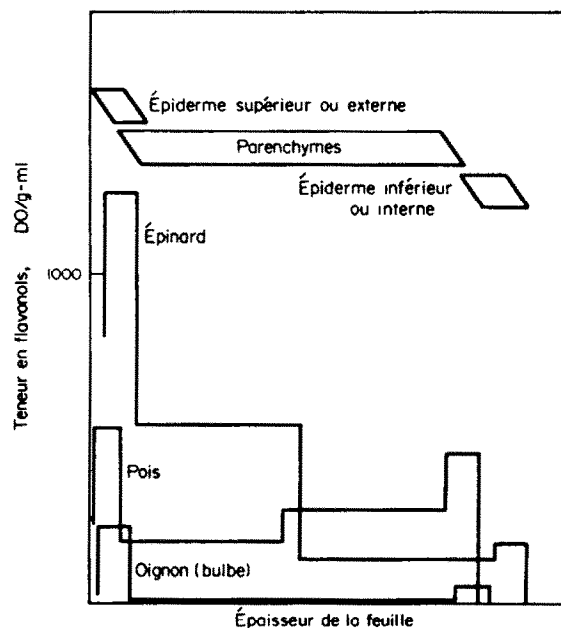


Fig. 3. Répartition des flavonols dans l'épaisseur de la feuille de *Pisum*, *Spinacia* et du bulbe d'oignon.

Répartition des leucoanthocyanes solubles.

Le bouleau, le chêne, le noisetier et le platane élaborent des leucoanthocyanes au niveau de leurs feuilles. La répartition en profondeur de ces flavonoïdes a été également déterminée (Fig. 4). Ils ont une répartition beaucoup plus uniforme que les flavonols. Les surfaces ne présentent pas d'accumulation particulièrement forte. La même observation peut être faite avec les leucoanthocyanes totales et l'acide chlorogénique de la feuille de hêtre. La répartition préférentiellement superficielle des flavonols paraît donc être une caractéristique propre à ce groupe de flavonoïdes, dans les matériels étudiés.

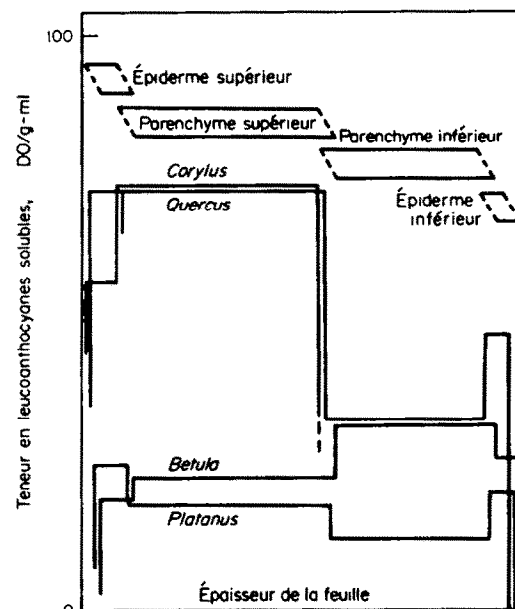


Fig. 4. Répartition des leucoanthocyanes solubles dans l'épaisseur de la feuille de *Betula*, *Corylus*, *Platanus* et *Quercus*.

DISCUSSION

L'existence d'un ensemble de flavonoïdes hydrosolubles accumulés dans les vacuoles, évidente dans le cas des anthocyanes, est maintenant confirmée en ce qui concerne les flavonols. La microscopie électronique a d'ailleurs permis récemment d'obtenir un résultat analogue en ce qui concerne les cellules à polyphénols de racines de banane et de coton [8], grâce à l'adjonction de caféine au milieu de fixation. Cet ensemble flavonique vacuolaire n'exclut pas la possibilité d'existence d'autres sites d'accumulation dont on possède d'ailleurs des exemples chez certains végétaux : localisation dans les parois cellulaires (bois de coeur de Rosacées, exine des pollens ...), dans les espaces intracellulaires et les plastes d'organes de sécrétion [4], dans les plastes [5].

L'accumulation vacuolaire ne représente pas un ensemble strictement isolé du reste de la cellule. Nos mesures de turn-over montrent que chez l'oignon et le pois, les flavonols sont en contact avec des enzymes qui sont capables de les transformer. Cependant, il est très vraisemblable que la forte hydrophilie apportée par la glycosylation représente un moyen d'orientation vers la vacuole des flavonoïdes élaborés ailleurs, dans le plaste ou, dans certains cas, dans le cytosol [9]. Parallèlement, cette glycosylation est probablement le moyen d'exclure les flavonoïdes d'un certain nombre de structures lipophiles comme les membranes des organites, qui sont altérées, d'une manière générale, par ces composés, pour des concentrations toujours inférieures à 10^{-3} M [10].

Dans les organes foliacés étudiés, la localisation d'une part très importante des flavonols est superficielle, très certainement épidermique. Tronchet [2] a montré la localisation épidermique des flavonoïdes foliaires de nombreuses plantes succulentes à épiderme détachable. Dans le bulbe d'oignon, les flavonols se trouvent également dans les épidermes. Cette situation paraît donc très analogue à celle des anthocyanes étudiées par Nozzolillo. Ces observations permettent la formulation d'une hypothèse générale: Il existerait chez de très nombreux

végétaux supérieurs terrestres une accumulation vacuolaire superficielle de flavonoïdes dans les organes foliacés. Cette accumulation serait particulièrement forte au niveau de la face supérieure des feuilles de dicotylédones.

L'existence d'une solution flavonique vacuolaire essentiellement épidermique pose aujourd'hui le problème de son site de biosynthèse et de son transfert. La part de l'intervention des chloroplastes, d'éventuels plastides spécialisés du type de ceux observés par Holtis [11] et du cytosol doit donc maintenant être définie.

En outre, cela nous conduit à la formulation d'hypothèses sur le rôle joué par les flavonoïdes foliaires superficiels. Celui d'écran vis-à-vis de la lumière UV solaire paraît le plus vraisemblable et a été envisagé à plusieurs reprises [2, 12, 13]; il nécessite plusieurs remarques: (1) Les UV solaires paraissent pouvoir être expérimentalement dangereux pour le végétal. Swain [14] retient la possibilité de mutagenèse, de dimérisation de la thymine du DNA (λ_{\max} 260 nm) envisagée par Setlow [15] et de photodestruction du NAD et du NADP (λ_{\max} 340 nm) avancée par Webb et Tai [16]. (2) L'exposition aux UV courts (entre 280 et 340 nm) sera maximale pour les pollens anémophiles qui peuvent être emportés à de très hautes altitudes et qui sont effectivement très riches en flavonoïdes [17]. (3) L'accumulation des flavonoïdes superficiels subit, au moins chez les dicotylédones, des régulations complexes sous l'action de la lumière de diverses λ et intensités. (4) Dans pratiquement tous les cas étudiés ici (celui de l'épinard étant le moins net), les flavonoïdes superficiels sont des flavonols ayant une bande I absorbant fortement l'UV long. L'écran réalisé couvre ainsi beaucoup plus que ce que nous avons considéré comme bande d'UV dangereuse. Ceci nous amène à envisager la possibilité d'un avantage supplémentaire pour la plante, lié à l'absorption de la lumière entre 350 et 400 nm. (5) La réalisation, par les plantes, d'accumulations superficielles, à l'état solide, de substances absorbant l'UV, bien que théoriquement possible, paraît exceptionnelle [4, 18]. L'exemple le plus typique est certainement celui des pollens anémophiles, qui sont d'ailleurs entièrement desséchés au moment du transport. C'est dire que l'écran flavonique liquide paraît bien être le système le plus largement répandu. Ce dernier fait nous amène à envisager que les flavonoïdes superficiels puissent avoir des fonctions multiples: écran UV, d'une part, mais aussi, système de protection, non indispensable, contre diverses agressions mécaniques ou parasitaires. Deux arguments renforcent cette idée: 1. Chez certaines plantes (pois, bouleau, platane) et pas chez d'autres (frêne, épinard) l'épiderme inférieur est lui aussi très riche en flavonoïdes. 2. Dans le bulbe d'oignon, peu exposé à la lumière, les flavonols superficiels sont présents en grande quantité et d'une manière très semblable à ce qui se passe dans de véritables feuilles.

EXPERIMENTAL

Observation des cellules d'oignon en lumière UV. Les coupes réalisées dans les tuniques d'oignon sont montées entre lame et lamelle, observées et photographiées à l'aide d'un cytophotomètre MPVI Leitz avec des grossissements de 200 à 400 fois. L'alimentation UV est équipée de 2 filtres (Joyce Chromoscan ref. 340 et 379) réalisant une bande passante de 40 nm de large et centrée sur 374 nm. Les UV sont arrêtés au delà de la coupe par un filtre jaune. Des mesures de DO sont effectuées sur des surfaces réglables, qui peuvent être très petites, bien inférieures à celle de la vacuole ou du noyau et correspondre à l'épaisseur du film

Tableau 1. Nature des flavonols dans les végétaux étudiés

Genre	Flavonols
<i>Betula</i>	3-galactosides et 3-rhamnosides de kaempférol (K) et quercétol (Q) 3-rhamnoside de myricétine (M) flavonols complexes
<i>Corylus</i>	3-glucosides, 3-rhamnosides, 3-arabinosides de K et Q 3-rhamnoside de M
<i>Fagus</i>	3-glucosides et 3-rhamnosides de K et Q
<i>Fraxinus</i>	3-glucosides et 3-rhamnoglucosides de K et Q
<i>Pisum</i>	3-triglucosides de K et Q
<i>Platanus</i>	3-coumaroyl et 3-feruloyltriglucosides de K et Q 3-glucosides, 3-rhamnosides, 3-arabinosides, 3-rhamnoglucosides de K et Q M
<i>Quercus</i>	3-glucosides de K, Q, et isorhamnétine 3-rhamnosides de K et Q flavonols complexes
<i>Spinacia</i>	patulétine 4 autres aglycones
<i>Tilia</i>	3-glucosides 7-rhamnosides de K et Q 3,7-dirhamnosides de K et Q 3-glucosides de K, Q, M 3-rhamnosides de K, Q, M
<i>Allium cepa:</i> (bulbe)	4'-glucosides de K et Q 7,4'-glucosides de K et Q 3,4'-glucosides de K et Q

cytoplasmique ou des parois. Les cellules sont plasmolysées par du NaCl 0,3 M.

Obtention du suc vacuolaire. 200 g de feuilles sont immergés une nuit dans Et₂O, dans une ampoule à décantation. La phase aqueuse rassemblée à la base de l'ampoule est recueillie. La phase étherée est évaporée et subit une chromatographie en vue de la recherche des flavonols. Si des 3-arabinosides ou des 3-rhamnosides sont présents, ils sont ajoutés à la phase aqueuse.

Fractionnement dans l'épaisseur des feuilles. L'épiderme inférieur des feuilles d'épinard et l'épiderme interne des tuniques d'oignon sont prélevés à la pince fine. Dans tous les autres cas, le matériel fixé sur une plaque est congelé par immersion dans l'azote liquide et subit une abrasion superficielle à l'aide d'un scalpel à lame droite. Les 'copeaux' obtenus sont immédiatement immergés dans l'acétone. La première couche, non verte, fait partie de la fraction supérieure (dans le cas où le matériel est fixé par sa face inférieure); une certaine quantité de substance prélevée est alors écartée, avant le prélèvement d'une couche plus profonde, verte qui constitue la fraction moyenne-supérieure, essentiellement obtenue à partir de parenchyme palissadique. L'opération est recommencée avec du matériel fixé par sa face supérieure de manière à obtenir les fractions inférieure et moyenne-inférieure. La masse sèche des échantillons prélevés est déterminée après extraction acétonique, par centrifugation, dessiccation du culot et pesée.

Dosage des flavonols. La solution acétonique est partagée contre l'éther de pétrole, évaporée, reprise, jusqu'à un volume fixé, par EtOH. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie différentielle en présence de AlCl₃. Dans le cas de l'épinard, les flavonols méthylés dérivant de la patulétine ont un spectre peu modifié par l'aluminium. On utilise alors parallèlement le dosage par spectrophotométrie directe et le dosage en présence d'aluminium [19].

Structure des flavonols dosés [11] (Tableau 1).

Dosage des leucoanthocyanes solubles. Une aliquote des solutions éthanoliques est traitée par HCl 2 N à 100°, 30 min. Les anthocyanes formées sont extraites par BuOH et dosées par spectrophotométrie directe.

BIBLIOGRAPHIE

1. Nozzolillo, C. (1972) *Can. J. Botany* **50**, 29.
2. Tronchet, J. (1968) *C.R. Acad. Sci. Paris* **266**, 882.
3. Weissenbock, G. (1973) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **86**, 351.
4. Charriere-Ladreix, Y. (1979) Thèse Doct. es Sciences (état), Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France.
5. Saunders, J. A. et McClure, J. W. (1976) *Phytochemistry* **15**, 809.
6. Alibert, G., Ranjeva, R. et Boudet, A. (1977) *Physiol. Veg.* **15**, 279.
7. Tissut, M. (1972) *Physiol. Vég.* **10**, 381.
8. Mueller, W. C. et Greenwood, A. D. (1978) *J. Exp. Botany* **29**, 757.
9. Hrazdina, G., Wagner, G. J. et Sigelman, H. W. (1978) *Phytochemistry* **17**, 53.
10. Tissut, M., Chevallier, D. et Douce, R. (1979) *Phytochem.* (à paraître).
11. Poltis, J. (1959) *Bull. Torrey Bot. Club* **86**, 387.
12. Tissut, M. (1970) Thèse Doct. es Sciences (état), Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France.
13. Caldwell, M. M. (1971) in *Phytochemistry* (Giess, A. C., ed.) Vol. 6, p. 131. Academic Press, New York.
14. Swain, T. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. et Mabry, H., eds.) p. 1097. Chapman & Hall, London.
15. Setlow, R. B. (1967) *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis* Vol. 10, p. 51.
16. Webb, S. J. et Tai, C. E. (1969) *Nature* **224**, 1123.
17. Herdt, E., Sütfield, R. et Wiermann, R. (1978) *Cytobiologie* **17**, 433.
18. Wollenweber, E. (1978) *Am. Fern. J.* **68**, 107.
19. Lebreton, P. (1962) Thèse Doct. es Sciences (état), Faculté des Sciences de Lyon, France.