

ÉTUDE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE ET CHROMATOGRAPHIQUE DES FLAVONOLS DU HÊTRE (*FAGUS SYLVATICA* L.)

MICHEL TISSUT

Laboratoire de Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences de Grenoble, France

(Received 18 January 1967)

Résumé—Les flavonols des feuilles, fleurs et bourgeons du Hêtre (*Fagus sylvatica* L.) ont été étudiés. Les 3-glucosides du kaempférol et de la quercétine et, en faibles quantités, le kaempférol 3-diglucoside sont présents dans les feuilles pendant la presque totalité de la période végétative. Les bourgeons, à leur éclosion, et les jeunes pousses contiennent du kaempférol 7-glucoside pendant une très courte période et seulement chez les arbres stériles. Un flavonol acylé a été trouvé dans le pollen. Son comportement spectrophotométrique et chromatographique dans plusieurs solvants est comparable à celui du kaempférol 3-(*p*-coumaroylglucoside) (tiliroside). Une brève étude des acides hydroxycinnamiques a permis la mise en évidence des acides caféique, chlorogénique et d'un acide non encore identifié. Le rôle éventuel du flavonol acylé, le programme d'apparition des différents types d'aglycones, par comparaison avec les familles botaniques voisines, les variations génétiques possibles à l'intérieur de l'espèce, sont discutés.

Abstract—The flavonols of the leaves, flowers and buds of beeches have been studied. Kaempferol and quercetin 3-glucosides and small amounts of kaempferol 3-diglucoside are present in the leaves during most of the vegetative period. The opened buds and the young leaves contain, for a very short period and only in sterile trees, kaempferol 7-glucoside. An acylated flavonol has been found in the pollen, the spectrophotometric and chromatographic behaviour of which in several solvents are very similar to that of kaempferol 3-(*p*-coumaroylglucoside) (tiliroside). Caffeic acid, chlorogenic acid and an unidentified caffeic ester are also present. The possible function of the acylated flavonol, the chronological appearance of the different aglycones compared with what occurs in related families, the genetical differences which may appear in the *F. sylvatica* species, are discussed.

INTRODUCTION

Nous avons procédé à une détermination qualitative des flavonols dans les bourgeons, les feuilles et les fleurs de Hêtre croissant dans une station de moyenne montagne aux environs de Grenoble (Laffrey, 900 m d'altitude). Les résultats, qui font l'objet du présent article, doivent nous servir de référence pour une étude plus vaste concernant l'influence de l'altitude sur le contenu flavonique des organes végétatifs et floraux de Hêtre.

Le Hêtre, caractéristique de l'étage montagnard humide, se trouve, dans la station choisie, à son niveau normal et dans des conditions favorables à son développement. Dans cette station, la strate arborescente est principalement composée de Hêtres; les autres espèces (*Picea excelsa* Link., *Pinus silvestris* L., *Fraxinus excelsior* L., *Quercus pedunculata* Ehrh.) sont mal représentées. La strate arbustive est clairsemée (*Corylus avellana* L., *Lonicera xylosteum* L., etc. ...). Des pépinières naturelles très denses de jeunes Hêtres, âgés d'environ dix ans, l'éclipsent totalement par endroits. La strate herbacée, pauvre, qui est composée de représentants courants à cette altitude, est caractéristique du *Fagetum typicum* (*Oxalis acetosella* L., *Asperula odorata* L., très abondant, *Luzula nivea* L., etc. ...). Le sol, qui est un mull, est également caractéristique de cette association.

L'analyse qui suit comporte: (1) une étude chromatographique des glucosides flavoniques

et de leurs composants (aglycones et glucides), et (2) une étude spectrophotométrique dans le visible et l'u.v. des glucosides et aglycones flavoniques purifiés.^{1,2}

RESULTATS

Analyse des Aglycones Flavoniques des Organes Annuels

L'hydrolyse acide du matériel végétal donne deux aglycones A et B. L'analyse spectrale¹ indique que les flavonols A et B ont des hydroxyles libres en 3-, 4'- et 7-. D'après leurs spectres d'absorption et leurs R_f , on voit qu'ils sont identiques, respectivement, au kaempférol et à la quercétine.

Analyse des Glycosides des Bourgeons et des Feuilles

La chromatographie bidimensionnelle montre deux types de compositions suivant les extraits: 1°) extraits de bourgeons prêts à s'épanouir et de feuilles très jeunes; 2°) extraits de feuilles adultes (Fig. 1). Le flavonol 4 se trouve uniquement dans les feuilles jeunes ou les bourgeons, en fortes quantités chez le Hêtre jeune et l'adulte stérile. Le flavonol 5, lui, est en grandes quantités dans les feuilles adultes et presque inexistant dans les jeunes.

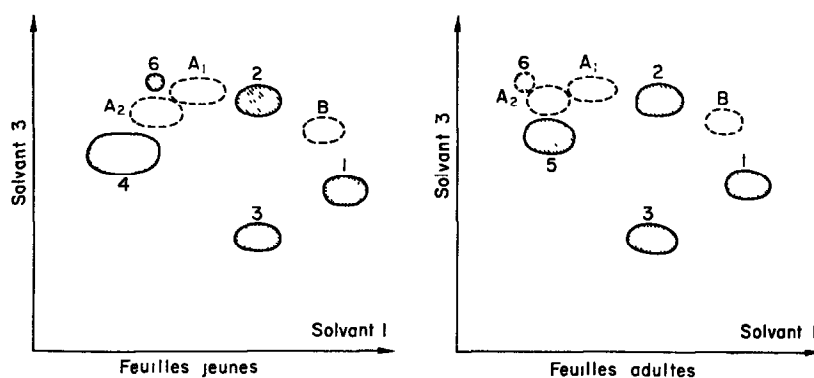


FIG. 1. SCHEMA DE CHROMATOGRAPHIES BIDIMENSIONNELLES D'EXTRAITS FLAVONIQUES DE FEUILLES D'AGES DIFFERENTS.

En pointillé: Flavonols à fluorescence jaune à jaune-brun en u.v.; en hachures: Flavonols absorbant l'u.v.; en blanc: Acides hydroxycinnamiques.

Les flavonols 2,5 et 6 sont respectivement identiques (Tableaux 1 et 2) au kaempférol 3-glucoside, à la quercétine 3-glucoside et au kaempférol 3-diglucoside. Le flavonol 4, composé de kaempférol et glucose, instable dans l'éthylate de sodium, a donc les hydroxyles en 3- et 4'-libres. En outre, sa fluorescence en u.v. et le déplacement bathochrome de l'ordre de 60 nm de la bande I avec $AlCl_3$ prouvent que l'hydroxyle en 3- est libre. Le test avec l'acétate de sodium est négatif, et la glucosidation se fait en 7-. La forte adsorption du flavonol 4 sur la résine CG 50 écartant la possibilité d'une double glucosidation, ce corps est le kaempférol 7-glucoside (populnine). Notons que son spectre d'absorption dans l'éthanol comporte, à 255 nm environ, une inflexion caractéristique, inhabituelle chez les flavonols monohydroxylés sur le noyau B et probablement attribuable à la glucosidation en 7-. Le flavonol 4, comparé à

¹ L. JURD, Dans *Chemistry of Flavonoid Compounds* (Édité par T. A. GEISSMAN). Pergamon Press, Oxford (1962).

² L. JURD et R. M. HOROWITZ, *J. Org. Chem.* **22**, 1618 (1957).

un échantillon authentique de populnine synthétique, a mêmes propriétés spectrales et chromatographiques que ce dernier.

Les flavonols 1 et 3, respectivement identiques au kaempférol et à la quercétine figurent à l'état de traces dans les extraits et tirent probablement leur origine d'hydrolyses partielles des glucosides en cours de manipulation.

TABLEAU 1. RÉSULTATS DE L'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES GLUCOSIDES ET DE LEURS COMPOSANTS

N°	Couleur de fluorescence en lumière u.v.	Couleur de fluorescence en u.v. avec AlCl ₃	R _f Solvant			Produits d'hydrolyse	
			1	2	4	Aglycone	Partie glucidique
2	Absorbant	Jaune-brun	0,64	0,84	0,4	Kaempférol	Glucose
4	Jaune-brun	Jaune-vert	0,44	0,61	0,42	Kaempférol	Glucose
5	Absorbant	Brun	0,57	0,77	0,3	Quercétine	Glucose
6	Absorbant	Brun	0,47		0,7	Kaempférol	Glucose

TABLEAU 2. RÉSULTATS DE L'ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES GLUCOSIDES

N°	Spectre d'absorption dans l'éthanol* (nm)				Spectre d'absorption avec AlCl ₃ (nm)				Avec AcONa† (Δ nm)	Avec EtONa (nm)
	II	Infl.	Infl.	I	II	Infl.	Infl.	I		
2	265	—	302	354	275	304	350	400	+ 11	Stable 278, 329, 408
4	{ 255 268 }	—	325	368	271	305	351	426	0	Instable 320
5	257	268	308	364	272	304	363	408	+ 20	Stable 275, 336, 420
6	268	—	300	351	273	305	350	395	+ 8	Stable

* Pour les spectres, les nombres indiqués correspondent aux longueurs d'onde en nm des inflexions (Infl.) et des maxima d'absorption pour les bandes II et I.

† Avec l'acétate de sodium, on indique seulement le déplacement de la bande II en nm, par rapport à sa position dans l'éthanol.

Brève Analyse des Acides Hydroxycinnamiques des Feuilles

La chromatographie bidimensionnelle montre deux acides hydroxycinnamiques A₁ et A₂, très peu séparés par le système de solvants cité plus haut, et un acide, B, en faibles quantités, dont le comportement chromatographique dans plusieurs solvants est identique à celui de l'acide caféique.

A₁ et A₂, chromatographiés dans l'acide acétique à 10%, y sont pratiquement juxtaposés en une large tache de R_f moyen 0,60, au niveau de l'acide chlorogénique test. La reprise de cette tache pour une nouvelle chromatographie sur Polyamid dans le solvant 4 sépare nettement A₂ (R_f=0,5: identique à celui de l'acide chlorogénique test) et A₁ (R_f=0,87). Le spectre d'absorption de A₂ confirme son identité avec l'acide chlorogénique.

Pour A₁, on trouve un R_f très voisin de celui de A₂ dans l'acide acétique à 10% et dans les solvants 1 et 3, une réaction colorée en présence de NH₃ identique à celle de A₂ (fluorescence verte en u.v.) et un spectre d'absorption différant de celui de A₂ par un pic prononcé à 290 nm (au lieu d'une inflexion à 300 nm). Il s'agit probablement d'un depside voisin de l'acide chlorogénique.

Analyse des Fleurs

Outre des quantités assez faibles de kaempférol 3-glucoside et 3-diglucoside et de quercétine 3-glucoside, les fleurs mâles contiennent un flavonol particulier qui se trouve déjà—chez les arbres qui fleuriront—dans les bourgeons à peine ouverts. Il migre sur Amberlite CG50 plus lentement que le flavonol 4 avec l'éthanol à 40%; son R_f dans le solvant 1 est de 0,83 et de 0,71 dans le solvant 3. Sur Polyamid, dans le solvant 4, il est de 0,17. Son spectre d'absorption (Fig. 2) est caractéristique des flavonols acylés. Son hydrolyse acide donne du kaempférol et du glucose; son hydrolyse alcaline libère de l'acide *p*-coumarique et du kaempférol 3-glucoside. Ce flavonol a donc une structure comparable à celle du kaempférol 3-(*p*-coumaroyl-glucoside) tiliroside.^{3, 4}

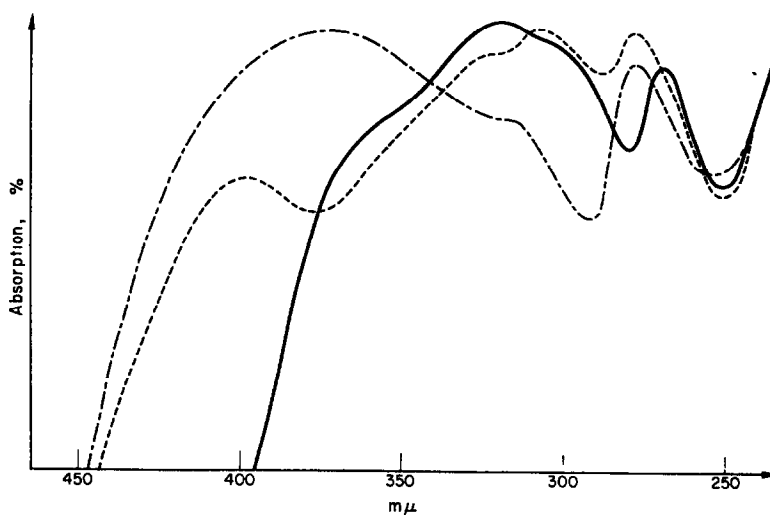


FIG. 2. SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE DU FLAVONOL POLLINIQUE.
—: Spectre dans l'éthanol; ----: Spectre avec $AlCl_3$; - - - - -: Spectre avec l'éthylate de sodium.

Nous avons extrait de fleurs sèches de Tilleul pharmaceutique (*Tilia silvestris* s.l., incluant *T. cordata* Miller et *T. platyphyllos* Scop.) un flavonol acylé qui est certainement le tiliroside authentique. Le flavonol acylé du Hêtre a même R_f que celui-ci, dans l'acide acétique à 10% et dans les solvants 1, 3 et 4. Il a également un comportement spectrophotométrique, dans le visible et l'u.v., tout à fait comparable.

La présence de cet unique flavonol, entrès fortes quantités, dans un extrait de pollen pur, sa disparition des extraits de fleurs mâles âgées, dont les etamines sont vidées, montrent qu'il est, chez le Hêtre, caractéristique du pollen.

DISCUSSION

Dietrichs et Schaich,⁵ dans leur étude des flavonols des feuilles et bourgeons de *Fagus sylvatica*, mettent en évidence le kaempférol 4'-*p*-coumaroyl-3-diglucoside, absent ici, et ne décrivent pas de flavonol comparable à la populnine, présente ici. Les races étudiées pourraient

³ A. STAMBOULI et R. R. PARIS, *Ann. Pharm. Franc.* **19**, 732 (1961).

⁴ J. B. HARBORNE, *Phytochem.* **3**, 151 (1964).

⁵ H. H. DIETRICHs et E. SCHAICH, *Naturwissenschaften* **50**, 478 (1963).

donc être différentes dans les deux cas; les différences écologiques, phytosociologiques et géographiques qui les séparent justifient en partie cette supposition. Aussi, dans cette optique, l'analyse du contenu flavonique de Hêtres croissant dans les différentes zones de l'aire géographique de cette espèce pourrait apporter des arguments en faveur de son morcellement en un certain nombre de races.

L'apparition des fleurs sur les pousses de l'année, caractère propre aux Fagacées à l'intérieur de l'ordre des Fagales, la précocité de la floraison, peu après l'ouverture des bourgeons, retentissent profondément sur la composition flavonique des organes annuels du Hêtre. Le kaempférol est pratiquement seul présent dans les pousses jeunes, la quercétine apparaissant en quantités notables plus tard, alors que chez les Urticales⁶ et chez les Bétulacées,⁷ où la floraison est bien séparée chronologiquement de la croissance de la pousse, "les flavonols les plus hydroxylés apparaissent comme des termes antérieurs des phénomènes biosynthétiques".⁶

Comme l'antériorité du kaempférol se maintient chez les Hêtres jeunes et chez l'adulte pendant les années de non-floraison, elle paraît être un caractère constant, et seule la synthèse du flavonol acylé pollinique serait induite par les mécanismes de mise à fleur, à partir d'un précurseur, probablement le flavonol 4 qui, faute de cette induction, s'accumulerait au printemps.

Il est difficile d'attribuer au flavonol acylé pollinique un rôle voisin de celui du kaempférol 3-(*p*-coumaroyl)triglucoside) des jeunes pousses de Pois sur le mécanisme mettant en jeu l'AIA oxydase.^{8,9} De même, on ne peut envisager qu'il s'agisse ici de la forme métabolique de l'acide coumarique, corps intermédiaire dans la chaîne de biogenèse de l'acide caféique et peut-être des polyphénols.¹⁰ Du fait de l'étroite localisation de ce flavonol dans les organes de reproduction, il faut le considérer au contraire comme un produit final. Son accumulation dans le pollen (d'où tout ballast inutile semble, en général, banni) prêche en faveur d'un rôle physiologique particulier et important. Ce pourrait être celui de filtre u.v., de 380–250 nm arrêtant donc le rayonnement u.v. solaire, même pour les longueurs d'onde les plus courtes, (300 nm, environ) épargnées par l'ozone stratosphérique. Ce dispositif pigmentaire pourrait être utile au maintien du patrimoine génétique lors du transport des grains par le vent à de très hautes altitudes.

La présence chez le Hêtre de différentes formes de kaempférol, leur filiation chronologique, donnent à penser que les différents types de glycosidation et d'acylation d'un même aglycone flavonique orienteraient le comportement métabolique et physiologique de celui-ci dans des sens très variés et lui donneraient, par suite, sa signification dynamique.

TECHNIQUE

Extraction

Les flavonols des feuilles et bourgeons sont extraits par l'eau à l'ébullition et repris par le méthanol. La solution méthylique est traitée par les acétates de plomb neutre et basique, ce dernier précipitant les flavonols à l'exclusion d'une partie de l'isoquercitrine qui forme la fin du précipité avec l'acétate neutre. Les flavonols sont remis en solution aqueuse, à chaud, que l'on traite par de petites quantités d'éther puis d'acétate d'éthyle. Les aglycones et monoglucosides se rassemblent dans ces solvants. Le pollen est directement extrait par le méthanol

⁶ PH. LEBRETON, Thèse de Doctorat es Sciences, p. 80. Faculté des Sciences de Lyon (1962).

⁷ L. HORHAMMER, R. HANSEL et P. FRANK, *Arch. Pharm.* 286, 481 (1953); R. HANSEL et L. HORHAMMER, *Arch. Pharm.* 287, 117 (1954); L. HORHAMMER, E. VORNDRAH et H. WAGNER, *Arch. Pharm.* 289, 316 (1956).

⁸ H. FURAYA et R. G. THOMAS, *Plant Physiol.* 39(4), 634 (1964).

⁹ F. E. MUMFORD, P. H. SMITH et J. E. CASTLE, *Plant Physiol.* 36, 752 (1961).

¹⁰ M. SATO, *Phytochem.* 5, 385 (1966).

à chaud. Le résidu, obtenu par évaporation de la solution alcoolique est épuisé par l'eau chaude. La solution aqueuse est traitée par l'éther éthylique où le flavonol acylé se rassemble.

Chromatographie

Les chromatographies circulaires ou bidimensionnelles ont été effectuées sur papier Macherey-Nagel n° 263 ou Whatman n° 1 suivant les cas, à 20°, avec les solvants suivants: solvant 1, Butanol, Acide acétique, Eau (4:1:5), solvant 2, Isobutanol, Acide acétique, Eau (10:3,5:7) et solvant 3, Acide acétique, Eau 60%.

Les chromatographies sur couche mince de Polyamid ont été faites dans le solvant 4, Méthanol, Acide acétique, Eau (90:5:5).

Les mélanges flavoniques purifiés sont séparés en quantités suffisantes à l'analyse ultérieure, sur colonne de résine, Amberlite CG50¹¹. Les différentes phases obtenues sont chromatographiées à nouveau sur couche mince et les bandes sont éluées dans l'alcool absolu pour l'analyse spectrophotométrique.

Hydrolyses et Chromatographies des Sucres et Aglycones

Les hydrolyses sont effectuées par H₂SO₄ aqueux au B.M. à 100°, pour l'identification des sucres. En fin d'hydrolyse, la solution refroidie est neutralisée par l'eau de baryte. Le surnageant et les eaux de rinçage sont concentrés et soumis à la chromatographie, en présence d'oses-tests.

Les hydrolyses pour identification d'aglycones sont effectuées par HCl 2 N aqueux. Après refroidissement, les aglycones sont extraits par l'éther et chromatographiés dans les solvants 1, 3 et Forestal. L'hydrolyse alcaline du flavonol acylé est faite dans la potasse aqueuse à 1 %, à température de laboratoire, pendant quelques heures.

Analyse Spectrophotométrique

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Beckman DB enregistreur. Chélation avec Al: on ajoute deux gouttes de AlCl₃ à 5 % dans l'éthanol à 4 ml de solution flavonique à la concentration convenable. Spectre avec l'acétate de sodium: les cuves échantillon et témoin contenant toutes deux le flavonol en même concentration, on ajoute à la première l'acétate de sodium fondu à saturation, de manière à obtenir le spectre différentiel. Spectre avec l'éthylate de sodium: on opère de même que pour AlCl₃. On utilise une concentration légèrement supérieure à celle proposée par Jurd et Horowitz,² la présence de traces de Polyamid diminuant la sensibilité de la réaction.

Remerciements—Nous remercions le Professeur L. Kofler et le Docteur Ph. Lebreton pour leurs conseils ainsi que le Docteur A. Grouiller qui nous a gracieusement envoyé un échantillon de populine synthétique.

¹¹ R. VANCRAENENBROEK, A. ROGIST, H. LEMAITRE et R. LONTIE, *Bull. Soc. Chim. Belges* **72**, 619 (1963).