

POLYPHENOLS DES FEUILLES DE COTONNIERS ET INFLUENCE SUR LEUR COMPOSITION D'UN CHOC HYDRIQUE OU NUTRITIONNEL

JANINA BRZOWSKA, PAWEL HANOWER et JOSETTE TANGUY

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centres d'Adiopodoumé, B.P. 20-Abidjan,
Côte d'Ivoire, et de Bondy-93, France

(Reçu Revisé le 15 février 1973. Acepté le 15 mars 1973)

Key Word Index—*Grossypium* sp.; Malvaceae; cotton; polyphenolic; synthesis effect of stress.

Abstract—A range of phenolic compounds were found in leaves of three cotton species. Water and nutrient stress (sulfur deficiency) both caused a significant decrease in phenolic content. Possible interpretations of the observed phenomena are given.

INTRODUCTION

LES RECHERCHES des 10–15 dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont nullement des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives et qualitatives et interviennent dans de processus vitaux les plus divers.^{1–5} Le mode de leur action et sa signification physiologique ne sont pas encore toujours clairs.⁶

Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies.⁷ Toutefois les tentatives de lier cette résistance à la teneur globale en composés phénoliques dans tel ou tel organe n'ont pas été, en général, concluantes, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement, la verticilliose.^{5,8–10} L'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés ou dans les zones proximales représente un autre aspect de cette intervention.^{11–13} Le phénomène d'accumulation des phénols est également observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques^{14,15} et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre.¹⁶ Cette accumulation pourrait donc être envisagée comme une réponse non spécifique à différents types d'agression.

¹ DAVIES, D. D., GIOVANELLI, J. and AP REES, T. (1964) *Plant Biochemistry*, p. 397, Blackwell, Oxford.

² MACHEIX, J. J. (1968) *Fruits* 32, 13.

³ MAASCH, H. J. and RUGE, U. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 337.

⁴ WEISSENBÖCK, G. (1970) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 83, 79.

⁵ ZAPROMIETOV, M. N. (1970) *Z. Obsh. Biol.* 31, 201.

⁶ RIBÉREAU-GAYON, P. (1968) *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, p. 202, Dunod, Paris.

⁷ ROHRINGER, R. and SAMBORSKI, D. (1967) *Ann. Rev. Phytopathol.* 5, 77.

⁸ KANASH, S. S. (1947) *Agrobiologiya* 6, 84.

⁹ STROGONOV, B. P. (1947) *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol* 6, 777.

¹⁰ RUBIN, B. A. and PEREVYASKINA, L. I. (1951) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 79, 303.

¹¹ KUC, J., HENZE, R. E. and ULISTRUP, A. M. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3121.

¹² MARTIN, C. (1958) Thèse Doct. Sc. Nat. Paris.

¹³ TANGUY, J. (1970) Thèse Doct. Sc. Nat., Paris.

¹⁴ LIBERMAN, M., CRAFT, C. C. and WILLCOX, M. S. (1959) *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 74, 642.

¹⁵ AKAZAWA, T., URITANI, I. and KUBATA, H. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 150.

¹⁶ LOCHE, J. (1966) *Contribution à l'Etude des Polyphénols de la Plante de Tabac* (SERRA, ed.), Vol. 3, p. 15, Ann. de la direction des études et de l'équipement, France.

14 NOV 1973
O. R. S. T. U. M.

Collection de Référence

n° ext. I 6424 Bio & Anal

Cette hypothèse nous a incités à entreprendre une étude des composés phénoliques chez les cotonniers, plantes particulièrement riches en ces substances, en rapport avec deux types d'agression: un choc nutritionnel, la carence en soufre, et un choc hydrique, la sécheresse.

RESULTATS

Composition en Phénols des Feuilles de Cotonnier Gossypium sp.

Les feuilles de cotonnier sont très riches en composés phénoliques: flavane-3 ols et flavane-3,4 diols, flavonosides, dérivés de l'acide cinnamique, anthocyanes et dérivés de l'acide benzoïque. Le groupe des flavanes renferme de l'épicatéchine, de la catéchine, puis de la leucocyanidine, présente sous des formes peu et très polymérisées, appelées tanins condensés, constituées par la réunion d'un grand nombre de molécules de leucocyanidine. Les flavonols, le kaempférol, la quercétine et la gossypétine se trouvent sous forme d'hétérosides. Les flavonosides sont très abondants dans les extraits foliaires. Les principaux sont: kaempférol-3 rhamnoglucoside, quercétine-3 rhamnoglucoside, quercétine-3 glucoside, kaempférol-3 glucoside et de nombreux hétérosides de gossypétine.

Les dérivés de l'acide cinnamique comprennent les esters des acides hydroxycinnamiques et de l'acide quinique, les acides chlorogéniques (acide caféyl-3 quinique, acide caféyl-4 quinique et l'acide caféyl-5 quinique), l'acide *p*-coumaryl-3 quinique (présent en quantité importante), l'acide férulyl-3 quinique (présent à l'état de traces), des esters du glucose comme le caféyl-1 glucose, le férulyl-1 glucose, le *p*-coumaryl-1 glucose et des dérivées estérifiées avec plusieurs molécules d'oses (glucose, rhanose) et des coumarines. Ces dernières se trouvent sous formes de leur β -glucosides, la scopoline ou glucosyl-7 scopolétine, la skimmine, ou glucosyl-7 umbelliférone, et probablement la cichorine ou glucosyl-7 esculétine puisque dans les hydrolysats on a identifié de l'esculétine. Le groupe de l'acide benzoïque contient un glucoside dont la partie phenolique est l'acide gentisique.

Dans les extraits foliaires on note également la présence d'une anthocyane qui serait le monoglucosyl-3 cyanidine. Abondante chez la variété HAR elle se trouve en quantité trace chez *G. anomalum*, faisant ainsi apparaître une différence entre espèces.

TABLEAU 1. INFLUENCE DE LA SECHERESSE ET DE LA CARENCE EN SOUFRE SUR LA TENEUR EN PHENOLS TOTAUX DES FEUILLES DE COTONNIERS (MOYENNES DE 6 DOSAGES)

Espèce ou variété	Phénols totaux en % de la matière sèche			
	Témoin	Sécheresse naturelle	Choc osmotique	Carence en soufre
	3,52	1,62	—	—
HAR 444-2	3,47	—	0,74	—
	3,35	—	—	1,29
<i>G. thurberi</i>	3,01	1,96	—	—
<i>G. anomalum</i>	4,58	3,76	—	—

Reproductibilité des dosages $\pm 3\%$.

Incidences de la Carence en Soufre et de la Sécheresse sur les Composés Phénoliques

La carence en soufre se traduit par une baisse importante des phénols totaux (Tableau 1). L'observation des chromatogrammes réalisés à partir d'extraits de feuilles carencées en

soufre fait apparaître une chute très nette de tous les composés identifiés (flavanes, flavonosides, dérivés de l'acide cinnamique, anthocyane, et dérivé de l'acide benzoïque).

Le choc hydrique s'accompagne également d'une baisse des teneurs en phénols totaux (Tableau 1). Cette baisse est très importante pour HAR, surtout en cas d'un choc osmotique au PEG, et beaucoup moins sensible chez *G. anomalum*, laquelle, par ailleurs, apparaît comme étant la plus riche en polyphénols parmi les trois espèces étudiées. La baisse semble surtout concerner l'anthocyane, les flavanes et tous les esters faisant intervenir une molécule de glucose et une molécule d'un acide hydroxycinnamique (caféyl-1 glucose, férulyl-1 glucose, *p*-coumaryl-1 glucose).

DISCUSSION

La composition en polyphénols de divers organes du cotonnier a été peu étudiée et les données ne sont que fragmentaires surtout en ce qui concerne les feuilles, les organes de reproduction ayant retenu davantage l'intérêt. C'est pourquoi il nous a paru utile de procéder à un inventaire des composés phénoliques foliaires.

Parmi les composés identifiés les flavonoïdes appartenant aux différents groupes occupent une place importante. Très nombreux et abondants sont en particulier les glucosides de flavonols. Des flavonosides ont déjà été mis en évidence, au nombre de six, dans les fleurs, et au nombre de trois, dans les feuilles de cotonnier.¹⁷ La présence de flavonols à l'état libre—quercétine et lié—isoquercitrine, a été signalée dans les jeunes pousses.¹⁸ Les catéchines, dont deux, comme nous l'avons démontré, sont des constituants des feuilles, ont été étudiées précédemment dans les organes reproducteurs. Elles entrent dans la composition des capsules et des graines immatures¹⁹ et représentent, avec les leucoanthocyanes, les principaux composés phénoliques du tégument des graines de cotonnier.²⁰

Les feuilles contiennent une gamme très vaste de dérivés de l'acide cinnamique dont les coumarines. L'identification des coumarines nous semble un fait important car, à notre connaissance, ces composés n'ont jamais été signalés chez le genre *Gossypium*.

Des différences nettes apparaissent entre les espèces étudiées en ce qui concerne l'anthocyane. Présente dans les feuilles de HAR et de *G. thurberi*, elle est absente ou se trouve à l'état de trace dans celles de *G. anomalum*.

Pour l'ensemble des polyphénols des feuilles une remarque générale s'impose. La grande majorité de ces corps se trouvent sous forme de complexes, engagés dans des combinaisons avec des substances non phénoliques telles que l'acide quinique et, surtout les glucides. Les composés phénoliques sous forme de glucosides sont des constituants des végétaux supérieurs très largement répandus mais leur rôle physiologique est continuellement discuté depuis la fin du siècle dernier.

Les chocs hydrique et nutritionnel se répercutent d'une manière sensible sur le contenu phénolique foliaire. Mais contrairement à ce que l'on pouvait attendre en partant des données de la littérature concernant les viroses, traumatismes, etc. c'est une baisse et non pas une accumulation des polyphénols qui se produit, tant dans le cas de la sécheresse que dans celui de la carence en soufre.

¹⁷ PAKUDINA, Z. P. and SADYKOV, A. S. (1968) in *Fenolnyie Soedineniya i ikh Biologiticheskiye Funktsii* (KURSANOV, A. L. and ZAPROMIETOV, M. N., eds.), p. 50, Nauka, Moscow.

¹⁸ KARIMDJANOV, A. K., ISMAILOV, A. I. and SADYKOV, A. S. (1965) *Khimiya Prirod. Soed.* 5, 350.

¹⁹ SADYKOV, A. S., KARIMDJANOV, A. K., ISMAILOV, A. I. and ISLAMBEKOV, CH. YU. (1968) in *Fenolnyie Soedineniya i ikh Biologiticheskiye Funktsii* (KURSANOV, A. L. and ZAPROMIETOV, M. N., eds.), p. 208, Nauka, Moscow.

²⁰ GUBANOVA, L. G. (1965) Thèse Doct., Leningrad.

Comment expliquer une telle réponse à deux agressions de nature aussi différente? Leur trait commun est la perturbation profonde du métabolisme général de la plante. Pour ce qui est de la sécheresse, on sait depuis très longtemps qu'elle affecte deux principaux processus de l'activité vitale: la photosynthèse et la respiration.²¹ Lors d'un 'stress' très sévère chez Bermuda Grass, la photosynthèse, l'accumulation de l'amidon et la synthèse des protéines se trouvent, toutes les trois, inhibées.²² De ce fait les produits initiaux de la biosynthèse des polyphénols pourraient faire défaut.

Dans un travail récent,²³ on signale que chez le blé, dans certaines conditions de stress hydrique (stress modéré), la contribution de la glycolyse dans le processus de la dégradation du glucose augmente aux dépens de la voie des pentoses phosphates. S'il était ainsi, la diminution de l'activité du cycle des pentoses phosphates se répercuterait sur la biogénèse des composés phénoliques. La dégradation accélérée des composés phénoliques pourrait être une autre cause de leur chute.

Le choc hydrique entraîne des modifications physiques des membranes chloroplastiques ou leur destruction et par là même la libération dans le cytoplasme de certaines enzymes, telles que les hydrolases ou les oxydases contenues initialement dans les organites cellulaires.^{21,24-26}

La disparition de la compartimentation faciliterait, soit la dégradation des molécules phénoliques, par la mise en contact avec des enzymes, soit leur migration vers d'autres organes. L'oxydation des polyphénols pourrait conduire à la formation des mélanines.²⁷

En ce qui concerne la carence en soufre elle pourrait se repercuter sur la voie de biogénèse des polyphénols liée au métabolisme des acides gras qui implique la participation du coenzyme A. Rappelons que le manque de soufre a pour effet une baisse sensible des pigments. La méthionine participe, probablement sous forme de S-adenosylméthionine, aux réactions de méthylation^{28,29} et par là même à la production des composés phénoliques tels que les dérivés de la scopolétine, de l'acide férulique ou de certaines anthocyanes. Dans les conditions de la carence en soufre, la formation de ces composés pourrait donc être freinée.

A l'heure actuelle nous ne disposons pas d'éléments suffisants pour choisir parmi les interprétations possibles la ou les causes des phénomènes observés dont chacune peut avoir un déterminisme complexe: synthèse plus lente, destruction plus rapide ou migration vers un autre organe.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel végétal. Deux espèces sauvages de cotonnier, *G. anomalum* et *G. thurberi* et une espèce cultivée, variété HAR 444-2 issue des croisements entre *G. hirsutum*, *G. arboreum* et *G. raimondii*, présentant chacune un degré différent de résistance à la sécheresse, ont été choisies pour cette étude. *G. anomalum* est considérée comme résistante, *G. thurberi*, comme assez sensible et HAR, comme très sensible à la sécheresse. Les

²¹ STOCKER, O. (1961) *Les Effets Morphologiques et Physiologiques du Manque d'eau sur les Plantes. Recherches sur la zone aride—XI. Echanges hydriques des plantes en milieu aride ou semiaride*, p. 69, UNESCO, Paris.

²² BARNETT, N. M. and NAYLOR, A. W. (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1222.

²³ GORDON, L. K. and BICHURINA, A. A. (1970) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **192**, 1384.

²⁴ VIEIRA DA SILVA, J. B. (1970) Thèse Doct. Sc. Nat., Orsay.

²⁵ OPARIN, A. I. (1953) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **35**, 67.

²⁶ HANOWER, P. and BRZOWSKA, J. (1973) *Physiol. Vég.* **11**, à paraître.

²⁷ PATEL, R. P. and OKUN, M. R. (1971) *Biochem. J.* **24**, 439.

²⁸ FINKLE, B. J. and NELSON, R. F. (1963) *Biochem. Biophys. Acta* **78**, 747.

²⁹ HESS, D. (1964) *Z. Naturforsch.* **19b**, 148.

plantes ont été cultivées en serre, soit en pots de terre soit en aquiculture, sur une solution nutritive d'Hoagland modifiée.²⁴ La composition en oligoéléments était celle indiquée par Hevitt.³⁰ Dans le cas de la carence en soufre l'ion chlorure remplaçait l'ion sulfate. Les plantes *-S* étaient privées de soufre dès le début de la végétation. Le choc hydrique a été induit au stade de la floraison, stade critique pour le cotonnier. Il a été provoqué de deux manières différentes: par dessèchement du sol à la suite de l'arrêt de l'arrosage jusqu'au flétrissement des feuilles (sécheresse naturelle); par abaissement du potentiel hydrique de la solution nutritive à l'aide de polyéthylène glycol 600 jusqu'à une valeur de $-20 J$ par mole (choc osmotique). Les analyses des composés phénoliques ont été effectuées sur les feuilles des étages supérieurs prélevées sur 15 à 20 plantes. Deux échantillons par traitement et par espèce ont été ainsi constitués.

Extraction. Les composés phénoliques des feuilles ont été extraits à l'aide de MeOH abs. jusqu'à épuisement. Toutes les opérations ont été réalisées à froid. Les pigments ont été éliminés par de l'éther de pétrole. L'extrait final a été évaporé à sec sous vide et repris par du MeOH aq. à 50%.

Identification des composés phénoliques. Les substances phénoliques ont été séparées, purifiées et identifiées suivant les méthodes décrites antérieurement.^{1,3}

Dosage des phénols totaux. L'estimation quantitative globale des phénols totaux a été réalisée à l'aide du réactif de Folin et Ciocolteu,³¹ le mode opératoire étant celui décrit par Potty.³² La courbe étalon a été établie avec du phénol purifié selon la technique de Draper et Pollard.³³

Remerciements—Nous tenons à exprimer ici notre gratitude à Monsieur C. Lioret, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris-Sud, pour ses critiques et conseils concernant le présent article. Nous remercions de même Monsieur R. Chezeau pour son aide technique dans l'exécution de ce travail.

³⁰ HEVITT, E. J. (1952) *Sand and water culture methods used in study of plant nutrition*, p. 189, Comm. Agr. Bureau.

³¹ FOLIN, O. and CIOCOLTEU, V. (1927) *J. Biol. Chem.* **73**, 627.

³² POTTY, V. H. (1969) *Anal. Biochem.* **29**, 535.

³³ DRAPER, O. J. and POLLARD, A. L. (1949) *Science* **109**, 448.