

ETUDE DES COMPOSES PHENOLIQUES DE NICOTIANA TABACUM VARIETE XANTHI,

AU COURS DE L'INFECTION A 20° C

PAR LE VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC, SOUCHE COMMUNE.

-oOo-

Josette TANGUY -(1968)-

-oOo-

I N T R O D U C T I O N

Le travail effectué au cours de l'année précédente et qui est résumé dans le rapport de 1967 a permis : d'identifier les phénols des feuilles de tabacs des variétés Xanthi et Samsun, d'établir la distribution de ces substances dans les feuilles de Nicotiana Xanthi, sain, végétatif, cultivé à 20 et 30° C, et de suivre les changements intervenant dans leur composition au moment de la floraison.

L'étude des composés phénoliques au cours de l'infection virale à 20 et 30° C, dans des Nicotiana Xanthi, à l'état végétatif, puis après floraison a été abordée. Les variations subies par les phénols après infection par le virus de la mosaïque du tabac dans une variété totalement sensible au virus, ont été examinées, et exposées dans le rapport de l'an dernier.

Les résultats obtenus ont alors permis de tirer un certain nombre de conclusions, en particulier que la formation de lésions locales nécrotiques chez Nicotiana Xanthi se traduit par une production importante de deux composés phénoliques (férulylglucose et scopoline), possédant chacun un groupement méthoxyle (O CH₃).

L'utilisation de nouveaux solvants chromatographiques, et l'aide apportée par J.B. HARBORNE, permettent cette année de montrer que l'infection à 20° C du Nicotiana Xanthi à l'état végétatif, par le virus de la mosaïque du tabac souche commune, s'accompagne de la production de férulyl-1 glucose de scopoline, d'un certain nombre de substances présentant entre elles des analogies de structure, et, d'une importante accumulation d'acide férulyl-3 guinique.

Le travail est divisé en trois chapitres : Résultats, Discussion, Expérimentation.

Le chapitre concernant les résultats comprend trois parties : la première traite de l'identification des différentes combinaisons de l'acide férulique dans le Xanthi virosé à 20° C, la seconde donne les résultats des dosages des phénols totaux et des principales substances, tandis que les caractéristiques des composés apparaissant après infection virale à 20° C du Nicotiana Xanthi sont exposées dans le dernier paragraphe.

L'expérimentation ayant été décrite dans le rapport de 1967, seules les nouvelles techniques utilisées, et les modifications apportées à certaines manipulations sont données.

R E S U L T A T S

I - Mise en évidence dans le Nicotiana Xanthi virosé à 20° C, d'un ester de l'acide férulique et du glucose, et de dérivés de l'acide quinique.

Il a été montré l'an dernier que l'hypersensibilité du Nicotiana Xanthi à l'égard du virus de la mosaïque du tabac, s'accompagnait en particulier d'une accumulation de férulylglucose.

Les études récentes indiquent l'existence d'esters des acides cinnamiques et de sucres et de dérivés de l'acide quinique. Les caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques de ces deux types de combinaisons sont voisines, ce qui explique qu'elles aient été confondues.

Le butanol acétique et l'acide acétique dilué ne séparant pas de façon satisfaisante les différents esters d'un même acide cinnamique, le premier problème à résoudre est de trouver un ou plusieurs solvants capables de bien les séparer. Il devient ensuite nécessaire d'isoler ^{et} de purifier chaque produit, afin d'étudier son spectre, sa résistance à l'hydrolyse acide et alcaline, et d'identifier les résidus phénoliques et non phénoliques apparaissant dans les hydrolysats.

Les solvants utilisés en particulier le butanol ammoniacal et le butanol éthanol, sont ceux proposés par HARBORNE et CORNER (13). Les dérivés des acides cinnamiques et du glucose ont des R_f plus élevés que ceux des esters de l'acide quinique dans le butanol ammoniacal et le butanol éthanol, tandis que c'est le contraire dans le butanol acétique. Ces différents composés possédant une double liaison peuvent exister sous deux formes isomères cis et trans, qui se transforment facilement l'un dans

l'autre, et sont séparées par chromatographie sur papier dans l'acide acétique dilué.

Il est très difficile de comparer directement un Rf expérimental aux valeurs signalées dans la littérature, étant donné la difficulté d'obtenir des Rf reproductibles. Il devient indispensable d'opérer sur chaque chromatogramme par comparaison avec des produits de référence. Comme la majorité de ceux-ci ne sont pas disponibles commercialement, il est nécessaire de les isoler de plantes où ils ont été signalés.

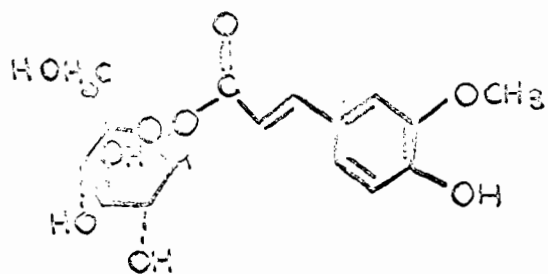
Les esters du glucose ont été identifiés par HARBORNE et CORNER (13), dans les feuilles de Raphanus sativus, les pétales de Pétunia hybrida et d'Antirrhinum majus. Les acides ferulylquinique ont été mis en évidence dans les grains verts de café par PICTET et BRANDENBERGER (16), et LENTNER et DEATHERAGE (14). CORSE et al (4) ont déterminé la structure du depside le plus important, c'est-à-dire l'acide férulyl-3 quinique. L'acide caféyl-4 quinique fut détecté pour la première fois dans les grains verts de café par SONDHEIMER (20), qui le désigna sous le nom de bande "510". Sa structure fut élucidée par WAISS (26). L'acide p-coumaryl quinique a été trouvé dans les pommes et les poires par CARTWRIGHT et al (1). WILLIAMS (27) a montré qu'il existait deux isomères dont le plus important était de l'acide p-coumaryl-3 quinique, et que ce phénol était abondant dans les pommes vertes à cidre de la variété "Yarlington Hill".

Le p-coumaryl-1 glucose est alors isolé d'un extrait de pétales d'Antirrhinum majus, le férulyl-1 glucose et le caféyl-1 glucose sont obtenus de Pétunia hybrida, tandis que l'acide p-coumaryl-3 quinique est extrait de pommes vertes à cidre. C'est à partir de grains verts de café de la variété Robusta que les acides ferulyl-3 et caféyl-4 quinique sont isolés et purifiés.

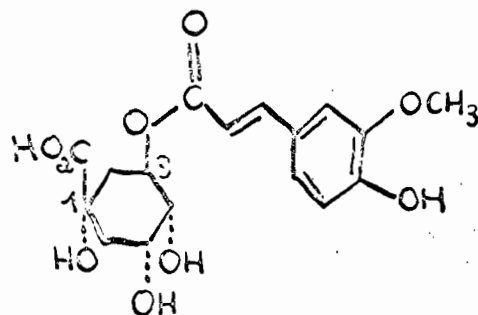
Le tableau I donne les caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques des dérivés des acides cinnamiques détectés dans les tabacs virosés à 20° C.

Le tableau II représente les aglycones et les résidus non phénoliques détectés après élution et hydrolyse des principaux spots.

L'infection à 20° C d'un Nicotiana Xanthi par le virus de la mosaïque du tabac, fait apparaître pour l'acide férulique deux types d'esters : un ester du glucose (férulyl-1 glucose), un ester de l'acide quinique (acide férulylquinique). L'acide férulylquinique est en réalité un mélange de trois isomères dont le plus important est l'acide férulyl-3 quinique (voir tableau I et II).



férulyl-1 glucose



acide férulyl-3 quinique

La formation de lésions locales nécrotiques se traduit donc par une production importante de férulyl-1 glucose. Ce composé n'est jamais décelé dans des tabacs sains ou virosés à 30° C. Le tabac inoculé par le virus de la mosaïque et qui séjourne à 20° C accumule l'acide p-coumaryl-3 quinique mais surtout les acides férulylquinique en particulier l'acide férulyl-3 quinique. Ces substances ne sont qu'à l'état de traces dans les tabacs sains et disparaissent au moment de la généralisation du virus dans la plante c'est-à-dire à 30° C.

Le Nicotiana tabacum variété Samsun totalement sensible au virus ne produit ni les acides férulylquinique ni le férulylglucose, quant à la scopoline son accumulation est moindre que dans la variété Xanthi.

L'hypersensibilité s'accompagne également d'une augmentation des acides chlorogénique (acide caféyl-3 quinique, acide caféyl-4 quinique et acide caféyl-5 quinique), de la rutine (rhamnoglucoside-3 quercétine), et de la nicotiflorine (rhamnoglucoside-3 kaempférol).

Il devient alors indispensable de procéder à une estimation quantitative des composés phénoliques totaux, puis à des dosages séparés des principales substances.

II - Dosage global des composés phénoliques. Estimation quantitative des principales substances après séparation par chromatographie sur papier.

Le dosage utilise la grande oxydabilité des substances phénoliques. Le réactif employé est un mélange de phosphomolybdate et de tungstate de sodium, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en milieu alcalin, en un mélange de bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite (absorption maximum comprise entre 725 et 750 μ) est proportionnelle au taux de composés phénoliques. La composition de ce réactif a été établie par FOLIN et DENIS (8), puis modifiée par FOLIN et CIOCALTEU (7).

La même méthode est appliquée aux composés séparés et purifiés par chromatographie sur papier. Dans tous les cas, on compare à une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions *
Pour le dosage global des substances phénoliques, la courbe étalon est établie avec de l'acide chlorogénique (acide caféyl-3 quinique), les résultats sont alors exprimés en mg d'acide chlorogénique.

* que le dosage proprement dit, ce qui nécessite l'utilisation de produits de référence.

Les phénols dosés séparément sont les suivants :

- acides chlorogénique (caféyl-3 quinique
caféyl-4 quinique
caféyl-5 quinique).
- acides férulylquinique (3 isomères).
- acide p-coumarylquinique.
- férulyl-1 glucose.
- scopoline (glucoside-7 scopolétine).
- rutine et nicotiflorine (rhamnoglucoside-3
quercétine), (rhamnoglucose-3 kaempférol).

La scopoline (glucoside-7 scopolétine) ne possédant aucun hydroxyle libre, ne réagit pas avec le réactif de FOLIN CIOCALTEU. Il est alors nécessaire de rompre par hydrolyse acide la liaison hétérosidique, afin de libérer la scopolétine et de la doser.

1°) Phénols totaux.

L'hypersensibilité du Xanthi à l'égard du virus de la mosaïque du tabac se traduit par une augmentation des composés phénoliques totaux (tableaux : III, IV, V, VI, VII ; figures : 1, 2). L'accroissement est très important lors des séjours compris entre 60 et 120 heures. Ce phénomène diminue progressivement, et à partir d'un temps de 204 heures à 20° C, les quantités en phénols totaux sont plus importantes dans les plantes saines témoins que dans les tabacs infectés correspondants. Une chute en phénols totaux est également constatée après une période de 24 heures à 20° C après inoculation de la plante par le virus.

2°) Acides chlorogénique - Rutine et Nicotiflorine.

a) Acides chlorogénique.

Les tabacs virosés séjournant à 20° C entre des périodes comprises entre 60 et 144 heures ont des teneurs en acide chlorogénique beaucoup plus élevées que les tabacs sains correspondants (tableaux : VIII, IX ; figures : 3,4). A partir d'un temps de 168 heures à 20° C, l'augmentation est moins importante, et les mesures établies sur des tabacs de la variété Xanthi récoltés en Février 1968 ont montré que ces acides subissaient une certaine diminution par rapport aux mêmes substances contenues dans les plantes saines témoins. Une baisse est aussi notée dans des Nicotiana Xanthi séjournant 24 heures à 20° C après inoculation.

b) Rutine et Nicotiflorine.

Comme le montre les résultats (tableaux : X, XI ; figures : 5,6), les courbes enregistrées avec la rutine et la nicotiflorine sont similaires à celles établies pour les acides chlorogénique. L'accumulation apparaît maximale dans des tabacs nécrosés de la variété Xanthi ayant séjourné à 20° C entre les périodes comprises entre 60 heures et 120 heures.

3°) Les acides p-coumaryl et férulylquinique.

Le Nicotiana Xanthi inoculé avec le virus de la mosaïque du tabac réagit à 20° C en accumulant de l'acide p-coumarylquinique et surtout de l'acide férulylquinique (tableaux : XII, XIII, XIV, XV ; figures : 7, 8, 9, 10). La production en acide férulylquinique apparaît être maximale au cours d'un séjour de 108 heures à 20° C, elle décroît ensuite tout en restant relativement élevée. Le p-coumarylquinique semble surtout s'accumuler dans des tabacs virosés à 20° C entre 60 heures et 108 heures.

4°) Férulylglucose - Scopoline.

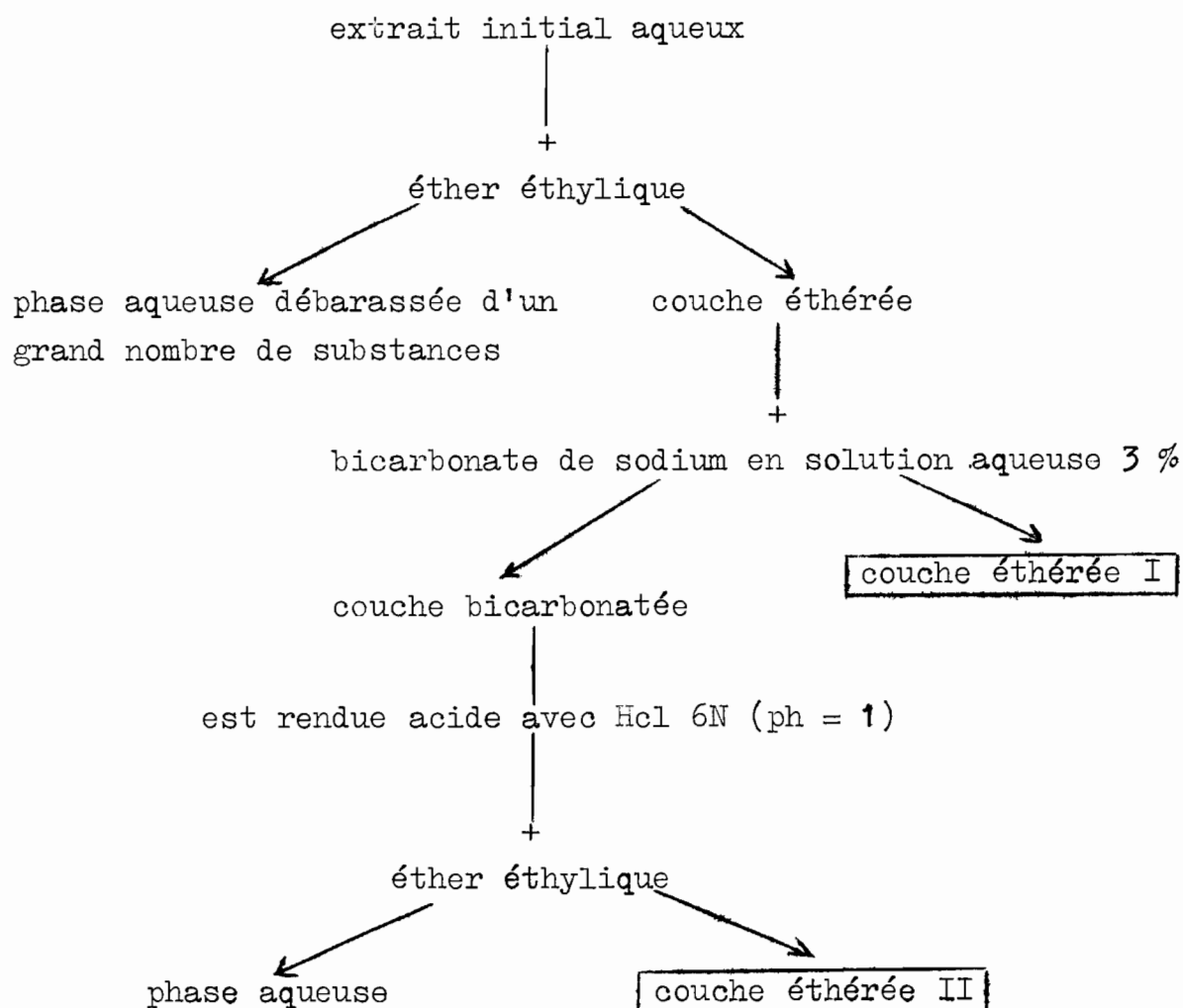
Le férulylglucose et la scopoline ne sont jamais détectés dans les extraits de feuilles d'un Nicotiana Xanthi sain. Le férulylglucose commence à apparaître comme le montre les résultats (tableaux : XVI, XVII ; figure : 11, 12) dans des tabacs virosés ayant passé 72 heures à 20° C après inoculation. La scopoline (tableau : XVIII ; figure : 13) est synthétisée un peu avant puisqu'elle se détecte à partir d'une période de 48 heures à 20° C. La teneur en férulylglucose augmente régulièrement et est maximale pour des séjours à 20° C compris entre 120 et 156 heures. Quant à la scopoline son maximum semble être atteint dans un Nicotiana Xanthi séjournant 108 heures à 20° C après inoculation. La teneur en cette substance décroît régulièrement mais reste cependant importante pour un tabac infecté ayant séjourné 216 heures à 20° C.

III - Etude des substances apparaissant dans le Nicotiana Xanthi infecté à 20° C par le virus de la mosaïque du tabac souche commune.

La formation de lésions locales nécrotiques chez Nicotiana tabacum var. Xanthi, se traduit par une importante production de composés possédant un certain nombre de caractéristiques communes. Ils sont invisibles sans réactifs en lumière ultra-violette, mais donnent en présence d'une solution concentrée d'ammoniaque une fluorescence bleue. Cette réaction est également obtenue après pulvérisation au carbonate de sodium. Ces différentes substances sont toujours accompagnées de deux autres composés également invisibles dans l'ultra-violet sans réactifs, mais devenant violets soit au contact de vapeurs d'ammoniaque, soit en présence d'un réactif alcalin.

Le tableau XIX donne les Rf de ces substances dans un grand nombre de solvants.

Ces divers composés sont transférés dans un solvant non miscible à l'eau comme l'éther éthylique, puis repris par une solution alcaline de bicarbonate de sodium. Après réacidification, la solution aqueuse est extraite à nouveau par de l'éther éthylique. Les opérations sont effectuées de la façon suivante :



La solution alcaline faible doit neutraliser les constituants les plus acides, en les transformant en sels solubles dans l'eau ; les composés les moins acides doivent donc se trouver dans la couche étherée I, tandis que les plus acides doivent être dans la couche étherée II.

Seules les substances donnant une fluorescence violette en présence de vapeurs d'ammoniaque passent en totalité dans la phase étherée II.

Les principaux composés appelés (I, J, K, L, M, et N) sont séparés par la chromatographie sur papier et élués avec de l'éthanol contenant 30 % d'eau. La première séparation se fait par une chromatographie linéaire dans le butanol éthanol, tandis que la dernière purification est accomplie par une chromatographie bidimensionnelle (butanol éthanol en première direction - acide acétique 2 % en seconde direction).

Chaque éluat donnant une réaction fortement positive avec le réactif de FOLIN CIOCALTEU, les substances sont donc réductrices.

Il n'est pas possible d'isoler en une seule opération dans le butanol éthanol les composés I et J. La chromatographie à deux dimensions réalisée en utilisant le butanol éthanol, et un solvant aqueux montre qu'il y a en réalité 3 substances (I, J et S).

La figure 14 montre la position de ces constituants sur un chromatogramme, tandis que le tableau XX, donne les Rf de ces composés dans les solvants précédents.

J, est toujours accompagné d'un composé H, donnant une fluorescence jaune vert, en présence de vapeurs d'ammoniaque, ou après pulvérisation au carbonate de sodium.

La distribution de ces nombreuses substances apparaissant dans un Xanthi virosé à 20° C est donnée par le schéma de chromatogramme (figure 15).

Chaque éluat est soumis à une hydrolyse acide. L'extrait aqueux est repris par de l'éther éthylique. Cette couche éthérée est alors mise à sec et rendue alcoolique. La couche aqueuse est débarrassée de son acidité, et les deux phases sont chromatographiées.

Dans tous les cas, il apparaît dans la couche éthanolique les substances déjà décelées dans les extraits directs non hydrolysés, à savoir les composés invisibles sans réactifs en lumière ultra-violette, mais développant une fluorescence violette après exposition aux vapeurs d'ammoniaque, ou après pulvérisation avec un réactif alcalin.

Les composés S, K, L, donnent naissance par hydrolyse acide aux substances M et N. D'autre part, M et N dans des conditions acides se transforment partiellement en L.

Dans l'hydrolysate acide de J, on détecte un composé (Q), apparaissant bleu en ultra-violet sans réactifs, et devenant jaune vert lumineux après pulvérisation au carbonate de sodium, ou en présence de vapeurs d'ammoniaque. Cette substance proviendrait de l'hydrolyse acide de H. Elle a des Rf dans les solvants utilisés très proches de ceux des acides o-coumarique et gentisique. Les fluorescences et les colorations développées sans ou avec les réactifs spécifiques de ces trois composés (o-coumarique - gentisique - Q) sont identiques. Ce produit pourrait être hydroxylé en ortho.

Un chromatogramme à deux dimensions de ce même hydrolysate de J, révèle une isomérisation partielle de J en I. En effet la substance J non hydrolysée s'isomériserait partiellement en I dans le solvant aqueux. Les composés I et J seraient alors deux

formes isomères (trans et cis).

Les chromatogrammes réalisés sur toutes les phases aqueuses et révélés au phtalate d'aniline hydrogéné mettent en évidence deux sucres : le glucose et l'arabinose.

Les figures 16 ... 24 et les tableaux correspondants (XXI ... XXVI) permettent de mieux comprendre les similitudes existant entre ces nombreuses substances.

Dans un travail ultérieur, il sera réalisé les hydrolyses basiques, ainsi que les mesures spectroscopiques de ces divers composés.

D I S C U S S I O N

Des perturbations importantes doivent intervenir dans la chaîne de biosynthèse des phénols au cours de l'infection virale et de la floraison.

Il apparaît important de réunir les données relatives à la formation des composés phénoliques dans le tabac.

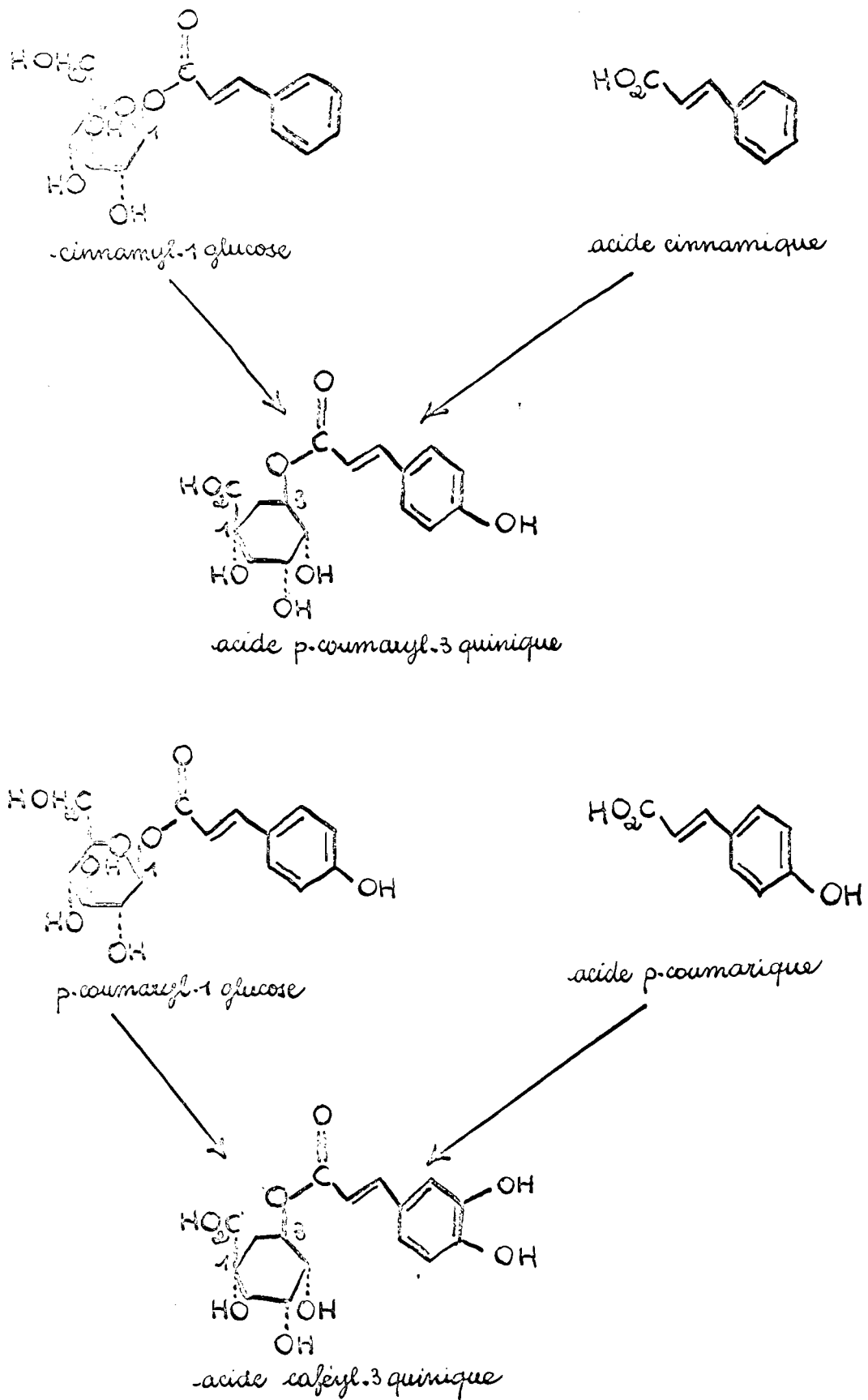
C'est l'emploi des molécules marquées par ^{14}C qui a fait faire les plus grands progrès dans l'étude de la biosynthèse des composés phénoliques. Les substances sont introduites sous forme de solution liquide, par absorption par une surface coupée, généralement dans un organe détaché de la plante. Cela peut apporter des modifications importantes et non interprétables du métabolisme, mais quelles que soient les réserves que l'on puisse faire et les précautions qu'elles imposent, il n'en reste pas moins vrai que c'est l'emploi des traceurs radioactifs qui a conduit aux résultats les plus importants.

Dans cette partie, nous envisageons les mécanismes de formation dans les feuilles de tabac d'un certain nombre de composés phénoliques comme l'acide chlorogénique, l'acide p-coumarylquinique, la lignine et la scopoline.

L'utilisation de molécules marquées par ^{14}C a permis à RONECKLES (17) de montrer que l'acide p-coumarique et le p-coumaryl-1 glucose sont les précurseurs de l'acide chlorogénique (l'acide caféyl-3 quinique), dans les feuilles de tabac de la variété Delcrest, tandis que l'acide cinnamique et le cinnamyl-1 glucose sont les intermédiaires dans la biosynthèse de l'acide p-coumarylquinique. Les esters du glucose (cinnamyl-1 glucose et p-coumaryl-1 glucose) sont plus facilement incorporés dans les dérivés de l'acide quinique, que les acides libres correspondants.

Une autre observation importante, est que l'acide caféique n'est pas métabolisé en acide chlorogénique.

Les différentes réactions sont résumées par les schémas suivants :



Les résultats sont similaires à ceux obtenus par UNDERHILL et al (25) sur la biosynthèse de la quercétine dans le sarrasin (Fagopyrum tartaricum). Le noyau B de la quercétine (ce noyau ayant une hydroxylation identique à celui de l'acide caféylquinique), et les carbones 2, 3 et 4 sont formés à partir des acides cinnamique et p-coumarique.

Ces données sont un peu différentes de celles rapportées par LEVI et ZUCKER (15), dans les tubercules de pomme de terre (Solanum tuberosum) ("Kennebec"), puisque ces derniers ont trouvé que les acides cinnamyl-3 et p-coumaryl-3 quinique interviennent dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique. Ils n'ont pu détecter une stimulation de synthèse de l'acide caféyl-3 quinique par l'acide p-coumarique.

HANSON et ZUCKER (11) ont montré qu'une préparation de polyphénoloxydase extraite de tubercules de pomme de terre, est capable d'oxyder l'acide p-coumaryl-3 quinique en acide caféyl-3 quinique, et également de transformer l'acide p-coumarylshikimique en acide caféylshikimique.

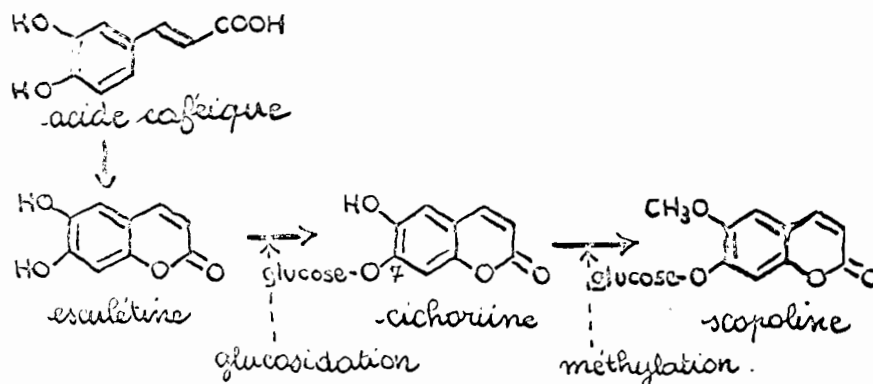
D'après RUNECKLES (18), l'acide férulique est activement métabolisé dans les tissus de feuilles de Nicotiana tabacum var. Delcrest en acide glucosidoférulique, en férulyl-1 glucose en scopoline et à un degré moindre en acide férulyl-3 quinique. Les résultats obtenus permettent de dire que l'acide férulique n'intervient pas dans la formation de l'acide chlorogénique (acide caféyl-3 quinique). Au cours des expériences réalisées à la lumière, il s'accumule surtout de l'acide glucosidoférulique,

de la scopoline, puis un peu de férulyl-1 glucose et de l'acide férulyl-3 quinique. A l'obscurité le métabolite prédominant de synthétisé est le férulyl-1 glucose.

L'incorporation de l'acide férulique et de l'acide p-coumarique dans les esters du glucose et dans les glucosides correspondants, avec cependant une plus grande incorporation dans les derniers a été constatée par RONECKLES et WOOLRICH (19) dans les feuilles de tabac de la variété Delcrest.

Le même phénomène a été observé par HARBORNE et CORNER (13). Ces derniers ont montré que lorsque les acides cinnamiques sont fournies à des pétioles de feuilles détachées d'un grand nombre de plantes (Solanum species - Raphanus sativus - Datura knightii), il se forme surtout les esters de ces acides et des sucres.

Pour DEWEY et STEPKA (5) la scopoline serait métabolisée dans le tabac d'après le schéma suivant :



Il y aurait méthylation durant la conversion de la nicotine en nornicotine.

HARBORNE (12) note la présence dans des extraits de fleurs de nombreuses Solanées : d'esculine de cichoriine et de scopoline. Il en conclue que le précurseur commun à la scopoline et à la cichoriine serait de l'esculine.

C'est l'utilisation de molécules marquées d'acide férulique qui a permis à RONECKLES (18) de montrer que cet acide est métabolisé dans les feuilles de Nicotiana tabacum variété Delcrest en scopoline.

Il est alors important de connaître les intermédiaires conduisant de l'acide férulique à la scopoline.

Les travaux réalisés par STECK (21) sur les feuilles de tabacs de la variété Hicks mettent en évidence le rôle de l'acide glucosidoférulique dans la biosynthèse de la scopoline. Ce composé est très instable et se transforme en un sel basique.

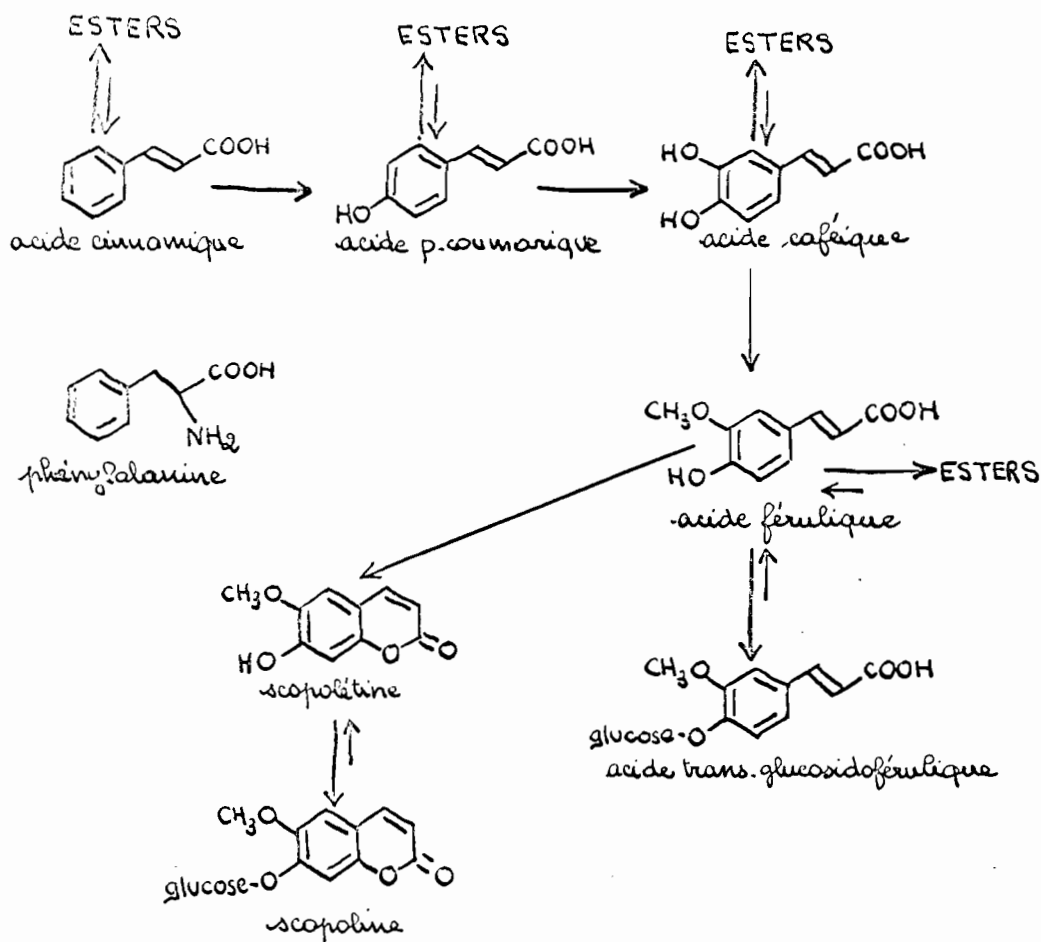
Les résultats obtenus par STECK (21) permettent également de penser que le férulyl-1 glucose n'intervient pas dans le processus précédent mais a un rôle important puisqu'il semble être à l'origine de la lignine dans le tabac.

Parmi les précurseurs les plus probables de l'acide glucosidoférulique, se trouvent l'acide férulique et l'acide caféyl-4 glucose.

Les expériences faites par STECK (22) sur les feuilles de tabacs de la variété Hicks montrent que c'est l'acide férulique et non l'acide caféyl-4 glucose qui est incorporé dans l'acide glucosidoférulique. De la même façon l'acide caféique est rapidement métabolisé en acide glucosidoférulique. Cela signifie donc que, seuls les aglycones sont invoqués dans la biogénèse de la scopoline, et que la méthylation précède la glucosidation.

Le processus de formation de la scopolétine dans les tissus de tabac cultivés in vitro, et proposé par FRITIG (9) est différent du précédent .

Il est résumé de la manière suivante :



Pour l'auteur, la synthèse préalable et rapide de la scopolétine exclut l'intervention d'un intermédiaire comme l'acide glucosidoférulique. La scopoline proviendrait de la glucosidation de la scopolétine libre. D'autre part, la méthylation précède la cyclisation, et doit se faire lorsque les

substituants sur le noyau aromatique sont en place.

Dans ce même travail, FRITIG met également en évidence la grande vitesse de renouvellement du chlorogénique.

STECK (22) n'a jamais pu obtenir une incorporation significative de caféyl ou de férulylglucose en scopolétine, il a cependant trouvé une certaine conversion de scopolétine exogène en scopoline dans les feuilles de tabac. Cette transformation est extrêmement rapide. Cependant, après 72 heures de métabolisme, la scopolétine n'est pas un aussi bon précurseur de la scopoline que l'acide trans glucosidoférulique.

Il est très possible que des feuilles intactes et des tissus de tabac cultivés in vitro peuvent avoir des voies de synthèse différentes pour la scopoline.

Sachant que la phénylalanine ou un de ses dérivés en $C_6 - C_3$ (10), est à l'origine de l'acide caféique dans le tabac, si on résume la chaîne de biosynthèse des phénols dans les feuilles de Nicotiana tabacum s'établirait suivant le schéma donné par la figure 25.

Les composés soulignés sont ceux qui s'accumulent dans le Nicotiana Xanthi, lors d'une infection à 20° C par le virus de la mosaïque du tabac.

Cette chaîne de biosynthèse pose un certain nombre de problèmes, en particulier ceux relatifs à l'hydroxylation, à la méthylation et à l'estérification.

On peut penser que la formation d'ortho-diphénols à partir de monophénols peut-être réalisée dans la plante par la phénolase, système enzymatique complexe.

LEVY et ZUCKER (15) ont montré qu'une préparation de phénolase extraite de la pomme de terre transforme l'acide

p-coumarylquinique (1 OH) en acide chlorogénique (2 OH). Les phénolases possédant deux types d'activité, d'une part, elles sont susceptibles de transformer les monophénols en diphénols (activité crésolase), d'autre part, elles oxydent les diphénols en quinones (activité catécholase). Dans la plante il faut donc admettre que les diphénols formés sont protégés contre la deuxième activité.

La méthylation des groupements OH doit pouvoir se faire par l'intermédiaire de la méthionine, agissant comme donneur du groupement méthyle (CH_3) (voir rapport 1967). Des systèmes enzymatiques susceptibles d'effectuer cette réaction (par exemple la transformation de l'acide caféique en acide férulique) ont été mis en évidence chez les végétaux supérieurs par FINKLE et NELSON (6) et chez les microorganismes par CATROUX (2).

SWAIN (23) pense qu'il est également possible que les groupements méthoxyles se fassent par une méthoxylation directe du cycle benzénique, sans passer par le stade phénol. Les fonctions phénols apparaîtraient par déméthoxylation et, il y aurait ainsi protection des ortho-diphénols vis à vis de l'activité catécholase des phénolases.

En ce qui concerne les acides phénols, plus particulièrement les acides cinnamiques, les esters constituent leur forme de combinaison la plus courante. Des préparations enzymatiques, susceptibles de provoquer la formation de ces esters ont été isolées chez les microorganismes par TOWERS (24), et chez les végétaux supérieurs par CORNER et SWAIN (3). Mais ces mécanismes sont à l'heure actuelle peu connus.

EXPERIMENTATION

I - Isolement de produits purs.

L'obtention à l'état pur d'un seul composé phénolique, à partir d'un mélange complexe est réalisée par l'utilisation de la chromatographie sur papier, éventuellement à l'échelle préparative. C'est la seule méthode susceptible de résoudre tous les problèmes de fractionnement même lorsqu'un extrait végétal contient un grand nombre de substances phénoliques. Dans quelques cas de grandes feuilles chromatographique épais (WHATMAN n° 3) sont employées. La solution à analyser est déposée sur toute la longueur des feuilles. Les papiers épais ne donnent pas toujours des séparations satisfaisantes, et il est préférable d'effectuer ces fractionnements sur du papier courant (WHATMAN n° 1). Après séparation dans un solvant convenable, les bandes sont découpées puis éluées avec de l'alcool éthylique contenant 30 % d'eau. Dans de nombreux cas, il n'est pas possible d'isoler un produit en une seule opération, car la bande renfermant la substance contient plusieurs pigments. Il faut après avoir fait la première séparation, purifier à nouveau dans un autre solvant. Il peut être nécessaire de recommencer l'opération plusieurs fois.

Par approches successives, on peut isoler à l'état pur chaque composé phénolique. Il est toujours important en effectuant ce travail de se référer continuellement au chromatogramme à deux dimensions, qui permet de situer à chaque instant l'état d'avancement des fractionnements.

Parfois la chromatographie à une seule dimension, ne permet pas, quelque soit le solvant utilisé, de bonnes séparations.

On doit alors effectuer des chromatogrammes à deux dimensions sur papier WHATMAN n°1.

Les produits chromatographiquement purs sont mis directement en solution dans la liqueur d'élution.

Le tableau XXVII donne les différents solvants utilisés pour la purification des substances phénoliques.

II - Identification des produits isolés.

Il faut d'abord comparer les Rf dans plusieurs solvants, avec ceux des produits de référence, puis utiliser la spectroscopie en milieu neutre et alcalin.

Il devient ensuite nécessaire d'effectuer sur ces produits purs, une hydrolyse acide ou alcaline, et éventuellement les deux. Le phénol simple (aglycone) est détecté à l'aide de la chromatographie et de la spectroscopie. Toujours en faisant appel à ces mêmes méthodes, les glucides et les autres produits intervenant dans la structure du composé naturel, sont identifiés.

Les détails de ces opérations sont exposés dans le rapport de travail (1967), et dans le rapport de stage (Liverpool 1967).

Cependant, quelques modifications sont apportées. Ainsi l'hydrolyse acide réalisée sur des extraits totaux de feuilles virosées à 20° C de Nicotiana Xanthi pour obtenir la scopolétine, est effectuée avec de l'acide chlorhydrique 2N. La solution étant rendue normale, les opérations sont faites au bain-marie bouillant pendant 45 minutes.

L'hydrolyse alcaline des esters des acides cinnamiques et des sucres, et des dérivés de l'acide quinique est effectuée

par de la soude, en rendant la solution 2N. Elle est réalisée à la température du laboratoire durant 35 minutes.

La réalisation du spectre d'une substance après son élution est une opération assez délicate. Le problème le plus important est d'éliminer l'interférence des impuretés que le solvant extrait du papier. Le lavage préalable du papier n'est pas satisfaisant, car à chaque fois qu'un solvant circule sur le papier, il extrait de nouvelles impuretés. Une précaution utile consiste à traiter le papier de la même manière que la chromatographie proprement dite, mais sans déposer la solution à analyser. On obtient alors après élution, une solution contenant uniquement, les impuretés du papier et c'est par rapport à cette liqueur que le spectre de la substance est tracée. La même chose est réalisée lors des dosages de substances, après séparation par chromatographie sur papier puis élution.

Il est préférable d'avoir un éluat aussi concentré que possible de façon à le diluer avec du solvant pur. Ainsi les impuretés qui se trouvent en gros proportions au volume du solvant ayant traversé une certaine surface de papier, se trouvent réduites à un taux minimum.

Il est nécessaire de définir la nature du solvant utilisé, et de comparer les spectres des corps à étudier à des spectres de produits de référence préparés dans les mêmes conditions.

III - Dosage des composés phénoliques.

1°) Les réactifs.

a) Réactif de FOLIN CIOCALTEU.

Un mélange contenant 100 g de tungstate de sodium ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molybdate de sodium ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),

700 ml d'eau, 50 ml d'acide phosphorique à 85 % et 100 ml d'acide chlorhydrique concentré, est mis à bouillir sous réfrigérant à reflux pendant 10 heures. Après ce temps, 150 g de sulfate de lithium, 50 ml d'eau et quelques gouttes de brome sont ajoutés. Le mélange est alors chauffé à 100° C, de façon à pouvoir éliminer l'excès de brome. La liqueur est ensuite mise à refroidir, diluée à un litre, puis filtrée. Elle est gardée au frigidaire dans une bouteille bien fermée.

b) Solution de carbonate de sodium.

Elle est faite en dissolvant 20 g de CO_3Na_2 anhydre dans 100 ml d'eau.

c) Utilisation du réactif.

Une prise d'essai convenable de la solution à doser étant faite, on complète à 10 ml avec de l'eau distillée. Après addition d'1 ml du réactif de FOLIN CIOCALTEU, il est ajouté trois minutes plus tard 2 ml de la solution de carbonate de sodium. Après chaque réactif, il est nécessaire de bien agiter les tubes, afin d'obtenir une solution homogène.

Les tubes sont mis au bain-marie bouillant durant 1 minute puis mis à refroidir. Après avoir dilué la solution bleue à 25 ml avec de l'eau distillée, les densités optiques sont mesurées à 725 μ , une heure après la fin des opérations, sur un spectrophotomètre Unicam 500.

Les lectures sont faites par rapport à un blanc, ne contenant que de l'eau additionnée des réactifs.

Les résultats sont établis à l'aide d'une courbe étalon enregistrée à partir d'une solution de référence, obtenue en dissolvant 100 mg du marqueur dans un litre d'eau (100 γ /ml). Ici les teneurs en phénols totaux sont exprimées en mg d'acide chlorogénique pour 100 g de poids frais.

Les différentes substances phénoliques (marqueurs - phénols du tabac) dosées après élution de chromatogramme de papier, donnent un léger précipité après addition de carbonate. Il est alors nécessaire de filtrer les solutions avant les lectures. Dans tous les cas, le blanc se trouve constitué par une solution contenant les impuretés du papier et dans laquelle on ajoute les réactifs et que l'on dilue à 25 ml avec de l'eau distillée.

Les différentes gammes élalon sont préparées dans les mêmes conditions que le dosage proprement dit. Les nombreux produits de référence sont dosables pour des concentrations comprises entre 1 et 10 γ /ml.

B I B L I O G R A P H I E

- (1) CARTWRIGHT (R.A.), ROBERTS (E.A.H.), FLOOD (A.E), WILLIAMS (A.H.) - Chem. and Ind., p. 1062, 1955.
- (2) CATROUX (G.), HENNEQUIN (J.R.), FOURNIER (J.C.), BLACHÈRE (H.) - C.R. Acad. Sci. 264, Série D, p. 2533, 1967.
- (3) CORNER (J.J.), SWAIN (T) - Nature 207, p. 637, 1965.
- (4) CORSE (J.), SONDHEIMER (E.), LUNDIN (R.) - Tetrah., 18 p. 1207, 1962.
- (5) DEWEY (L.J.), STEPKA (W.) - Arch. Biochem. Biophys., 100, p. 91, 1963.
- (6) FINKLE (B.J.), NELSON (R.F.) - Biochem. Biophys. Acta., 78, p. 747, 1963.
- (7) FOLIN (O.), CIOCALTEU (V.) - J. Biol. Chem., 73, p. 627, 1927.
- (8) FOLIN (O.), DENIS (D.) - J. Biol. Chem., 22, p. 305, 1915.
- (9) FRITIG (B.) - Thèse Sci. Nat., Strasbourg, 1968.
- (10) GEISSMAN (T.A.), SWAIN (T.) - Chem. and Ind., p. 984, 1957.
- (11) HANSON (K.R.), ZUCKER (M.) - J. Biol. Chem., 238, p. 1105, 1963.
- (12) HARBORNE (J.B.) - Biochem. J., 74 p. 270, 1960.
- (13) HARBORNE (J.B.), CORNER (J.J.) - Biochem. J., 81, p. 242, 1961.
- (14) LENTNER (C.), DEATHERAGE (F.) - Food. Research., 24, p. 483, 1959.
- (15) LEVY (C.C.), ZUCKER (M.) - J. Biol. Chem., 235, p. 2418, 1960.
- (16) PICTET (G.), BRANDENBERGER (H.) - J. of Chromato., 4, p. 396, 1960.
- (17) RONECKLES (V.C.) - Can. J. of Biochem. and Physiol., 41, p. 2249, 1963.
- (18) RONECKLES (V.C.) - Can. J. of Biochem. and Physiol., 41, p. 2259, 1963.
- (19) RONECKLES (V.C.), WOOLRICH (K.) - Phytochemistry., 2, p. 1, 1963.
- (20) SONDHEIMER (E.), SZYMANSKY (C.D.), CORSE (J.W.) - Agri. and Food Chem., 9, p. 146, 1961.
- (21) STECK (W.) - Can. J. of Biochem., 45, p. 889, 1967.
- (22) STECK (W.) - Can. J. of Biochem., 45, p. 1995, 1967.
- (23) SWAIN (T.) - in Wood Extractives., W.E. HILLIS, éditeur, Academic Press, New York, 1962.
- (24) TOWERS (G.H.N.) - in Biochemistry of phenolic compounds, J.B. HARBORNE, éditeur, Academic Press, New York.
- (25) UNDERHILL (E.W.), WATKIN (J.E.), NEISH (A.C.) - Can. J. of Biochem. and Physiol., 35, p. 219, 1957.
- (26) WAISS (A.C.), LUNDIN (R.E.), CORSE (J.) - Chem. and Ind., 28, p. 1984, 1964.
- (27) WILLIAMS (A.H.) - Chem. and Ind., p. 1200, 1958.

Légende du Tableau I

Solvants :

A = butanol : 4, acide acétique : 1, eau : 5

B = acide acétique 10 p 100

C = butanol : 1, ammoniacque 2 N : 1

D = butanol : 4, éthanol : 1, eau : 2,2

E = acide acétique 2 p 100

Marqueurs :

CAG 1 = caféyl - 1 glucose (Pétunia hybrida)

FEG 1 = férulyl - 1 glucose (Pétunia hybrida)

PCG 1 = p - coumaryl - 1 glucose (Antirrhinum majus)

FEQ 3 = férulyl - 3 quinique (café variété Robusta)

PCQ 3 = p - coumaryl - 3 quinique (pommes vertes à cidre)

TABLEAU I. Caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques des dérivés des acides cinnamiques dans le Xanthi infecté à 20°C par le virus de la mosaïque du tabac.

	$R_f \times 100$ dans les solvants:					Spectres (et OH à 95°)			Fluorescences.	
Substances	A	B	C	D	E	λ_{max} (m μ)	λ_{min} (m μ)	$\Delta \lambda_{max}$ (m μ) alcali	UV	UV + NH ₃ .
XANTHI.										
D.	65	71, 81	3	D 49 D' 46 D'' 41	63, 72 68, 79 70, 81	235, (295), 325 235, (295), 325 ↑ épaule -	263 262 -	46 46 -	bleu léger bleu léger bleu léger	vert vert vert
E.	72	75, 85	9	54	68, 80	230, (292), 312	250	50	-	violet
G.	55	79	19	69	65, 75	240, (300), 330	263	50	bleu léger	vert
MARQUEURS.										
CAG.1.	43	73	8	63	60, 70	250, (305), 334	265	66	bleu	vert
FEG.1.	51	80	19	69	65, 75	240, (300), 330	263	52	bleu	vert
PCG.1	59	93	28	73	68, 80	235, , 312	260	52	-	violet
FEQ.3	65	71, 81	3	49	63, 72	235, (295), 325	263	46	bleu	vert
PCQ.3	72	75, 85	9	54	68, 80	230, (292), 312	250	50	-	violet

TABLEAU II. Les aglycones et les résidus non phénoliques détectés après hydrolyse des dérivés des acides cinnamiques, dans le Xanthi virosé à 20°C.

Substances identifiées après.

Substances	HYDROLYSE ACIDE.		HYDROLYSE BASIQUE.	
	aglycone	résidu non phénolique.	aglycone	résidu non phénolique
XANTHI				
D D' D''	} acide férulique (petite quantité).	acide quinique	acide férulique	acide quinique
E	acide p-coumarique (léger)	acide quinique	acide p-coumarique	acide quinique
G	acide férulique (léger)	glucose.	acide férulique	glucose.
MARQUEURS				
FEG.1	acide férulique (léger)	glucose	acide férulique	glucose
FEQ.3	acide férulique (léger)	acide quinique	acide férulique	acide quinique
PCQ.3	acide p-coumarique (léger)	acide quinique	acide p-coumarique	acide quinique

Remarque: Les acides férulique et p-coumarique sont détruits partiellement par chauffage acide.

densités optiques (725 mμ)

Les courbes étalons.

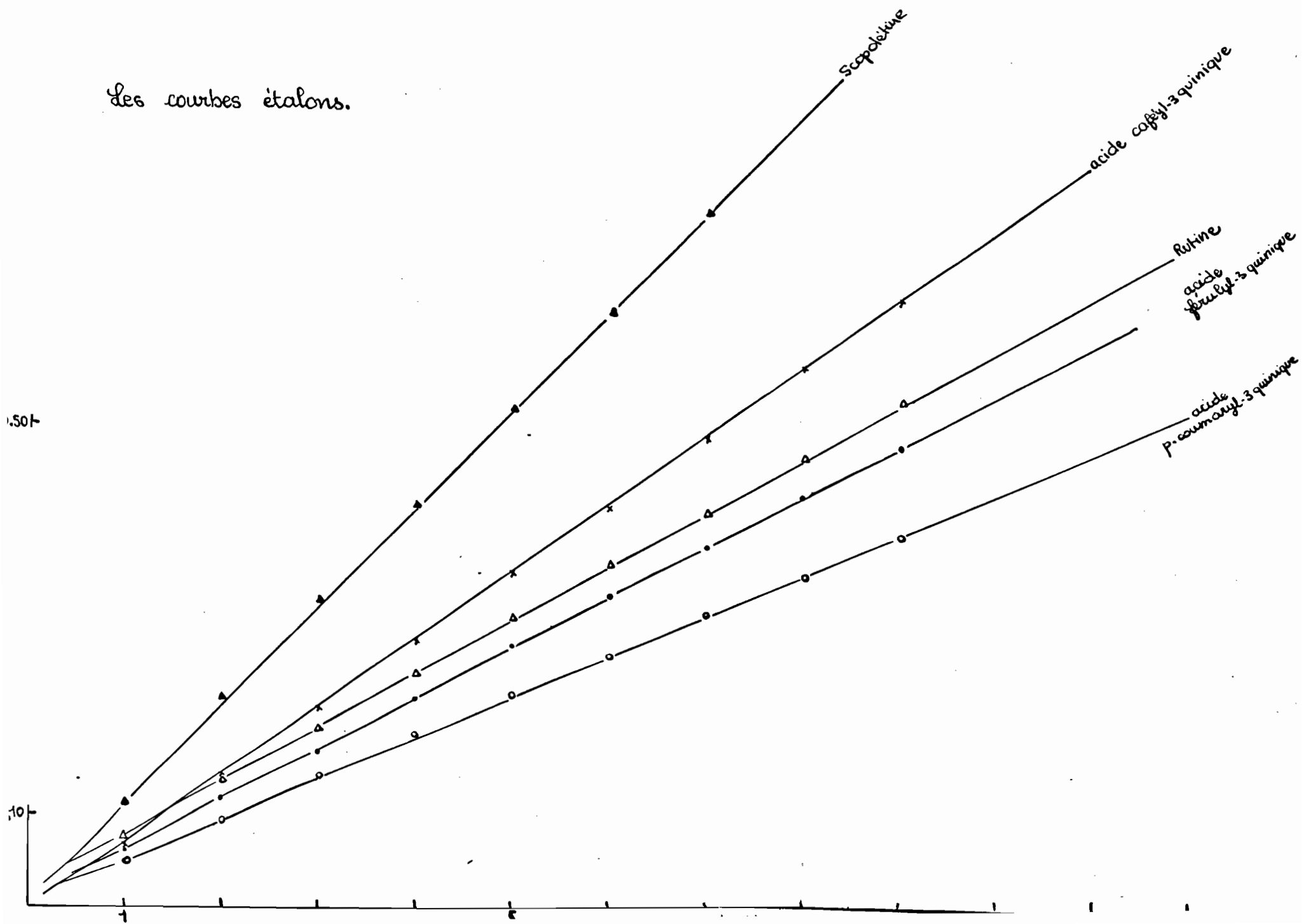


TABLEAU III.

DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

NOVEMBRE 1966

	Teneur en Phénols totaux en mg d'acide chlorogénique / 100g P.F
X.V.S 40h à 20°C X.V.MT " "	90 118,75
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	90 128,75
X.V.S 110h à 20°C X.V.MT " "	91,25 137,50
X.V.S 182h à 20°C X.V.MT " "	83,75 83,75
X.V.MT 72h à 20°C puis 72h à 30°C X.V.MT 72h à 20°C " 144h à 30°C	100 58,75.

TABLEAU IV.

DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX.

NOVEMBRE 1967.

	Teneur en Phénols totaux en mg d'acide chlorogénique / 100g P.F
X.V.S 40h à 20°C X.V.MT " "	71,25 100
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	71,25 105
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	71,25 93,75
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	71,25 107,50
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	71,25 82,50
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	73,75 82,50

X.V.S = Nicotiana Xanthi Sain , état végétatif.X.V. MT: Nicotiana Xanthi Virosé , état végétatif.

P.F. = Poids frais.

TABLEAU V.

DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

JUILLET 1967

	Teneur en phénols totaux en mg d'acide chlorogénique / 100 g P.F
X.V.S 72h à 20°C	82,50
X.V.MT " "	115
X.V.S 96h à 20°C	78,75
X.V.MT " "	125
X.V.S 108h à 20°C	82,50
X.V.MT " "	126,50
X.V.S 120h à 20°C	82,50
X.V.MT " "	118,75
X.FL.FEU.S 72h à 20°C	105
X.FL.FEU.MT " "	112,50
X.FL.FEU.S 120h à 20°C	107,50
X.FL.FEU.MT " "	153,75
X.FL.FL.S 120h à 20°C	265
X.FL.FL.MT " "	320

X.FL.Feu = Nicotiana Xanthi à fleurs, Feuilles.

X.FL.FL = Nicotiana Xanthi à fleurs, fleurs.

(voir rapport 1967.)

S = sain

MT = Virosé

TABLEAU VI.

DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX.

JANVIER 1968.

	Teneur en Phénols totaux en mg d'acide chlorogénique/100g P.F
X.V.S. 24h à 20°C X.V.MT. " "	100 78,75
X.V.MT. 48h à 20°C X.V.S " "	100 78,75
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	93,75 150
X.V.S. 72h à 20°C X.V.MT. " "	115 153,75
X.V.S 84h 20°C X.V.MT " "	95 132,50
X.V.S. 96h à 20°C X.V.MT. " "	93,75 128,75
X.V.S. 108h à 20°C X.V.MT. " "	86,25 128,75
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT. " "	93,75 128,75
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT. " "	93,75 118,75
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	78,75 102,50
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT. " "	78,75 90
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	107,50 118,75
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	90 93,75
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	107,50 71,25

Q. de Phénols totaux (en mg d'acide chlorogénique / 100g poids frais)

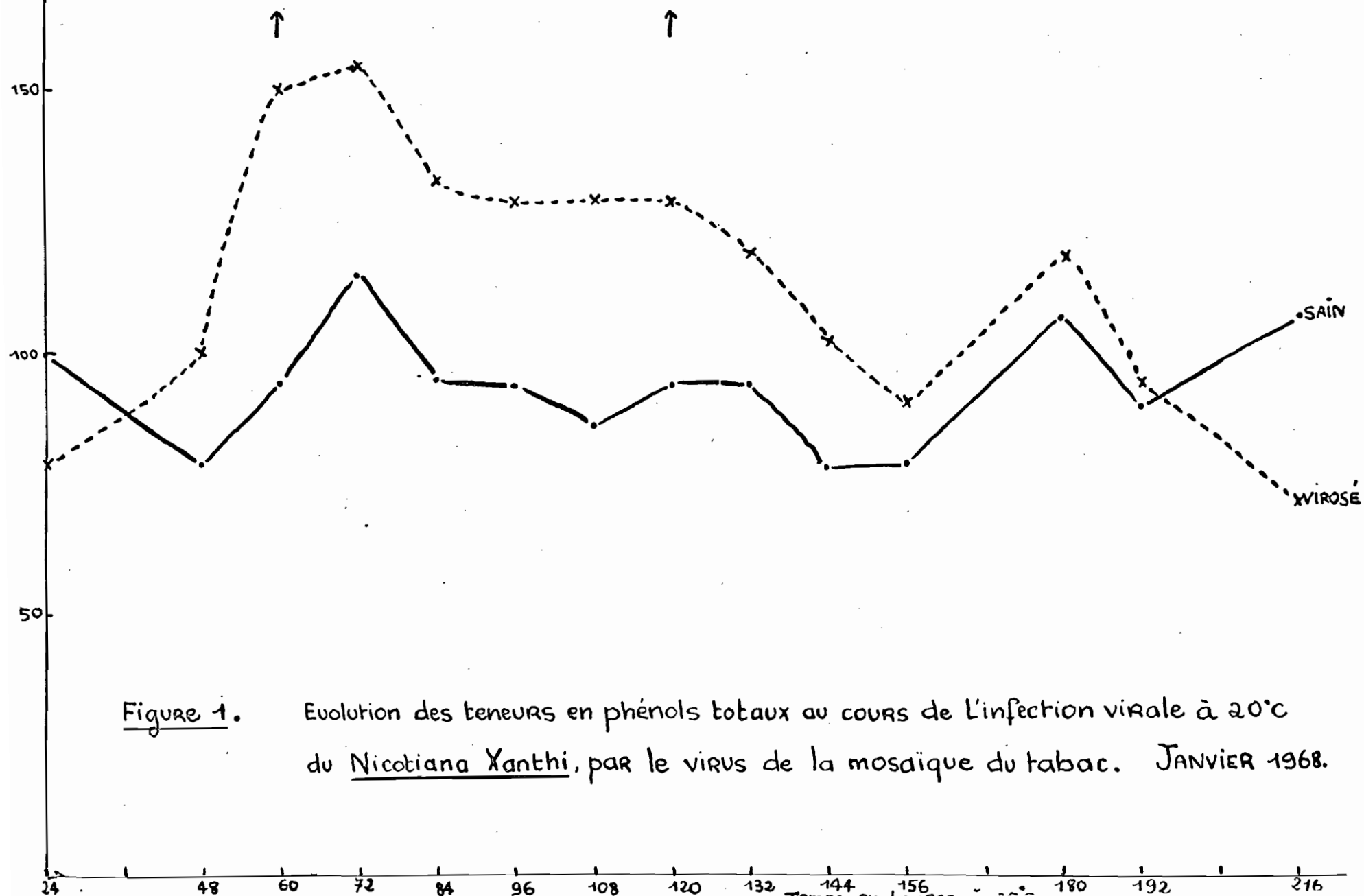


TABLEAU VII.

DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX

AVRIL 1968.

	Teneur en Phénols totaux en mg d'acide chlorogénique / 100g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT. " "	71,25 62,50
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	71,25 77,50
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT. " "	71,25 87,50
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	71,25 95
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	100 → X.V.MT 71,25 → X.V.S.
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	71,25 100
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	71,25 100
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	71,25 107,50
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	75 115
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT. " "	75 115
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	75 118,75
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	71,25 107,50
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	71,25 100
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	71,25 90
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT. " "	75 90
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT. " "	75 90
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	75 87,50
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	75 80,
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	75 65
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	75 67,50

Q. de Phénols totaux (en mg d'acide chlorogénique/100g poids frais).

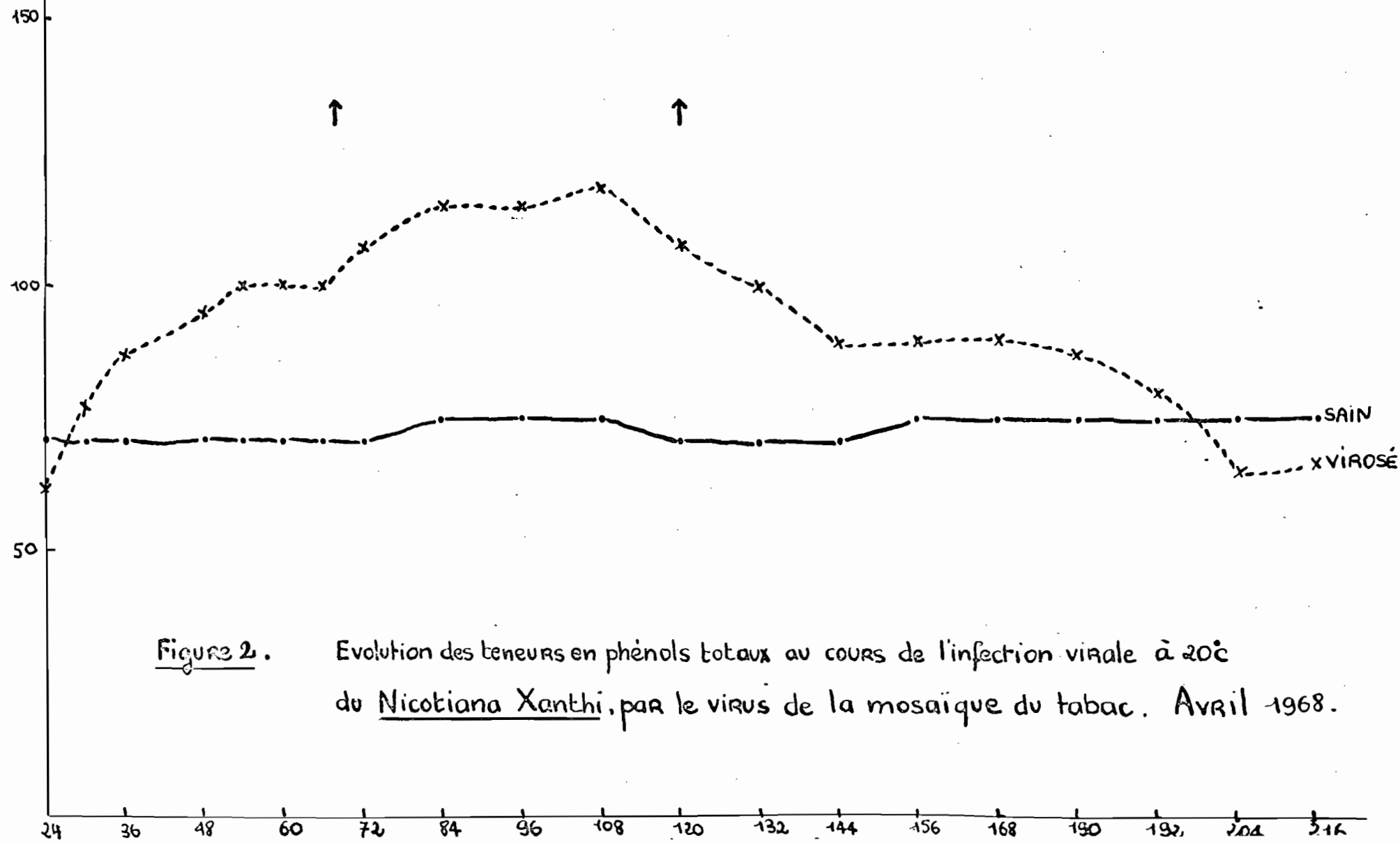


Figure 2.

Evolution des teneurs en phénols totaux au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. Avril 1968.

	Teneur en γ /g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	145 107,50
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	150 215
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	165 320
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	200 350
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	130 292,50
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	130 270
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	145 300
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	122,50 230
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	115 200
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	100 165
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	130 180
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	130 115
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	122,50 100
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	122,50 87,50

Q. d'acide chlorogénique en γ / g de poids frais.

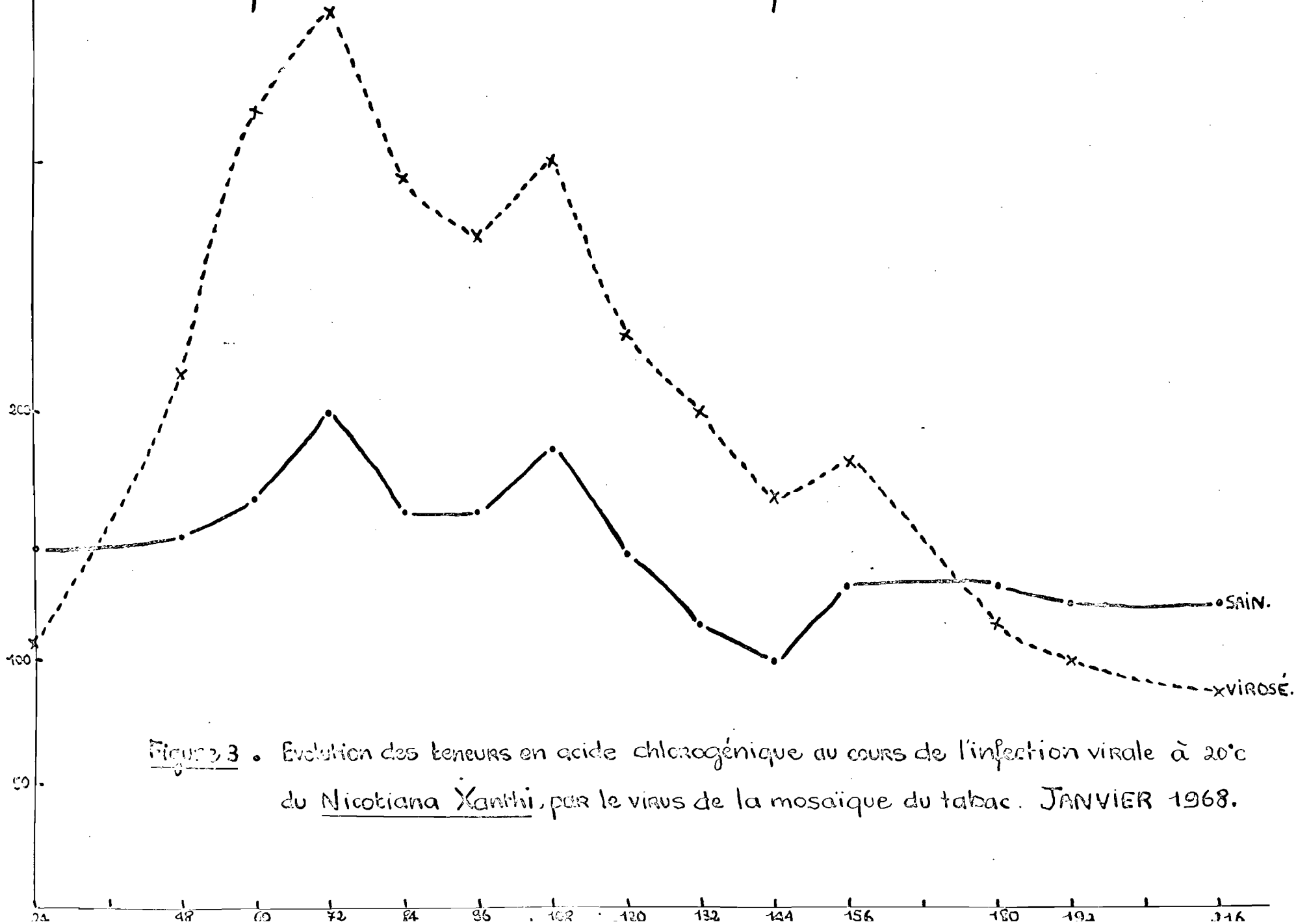
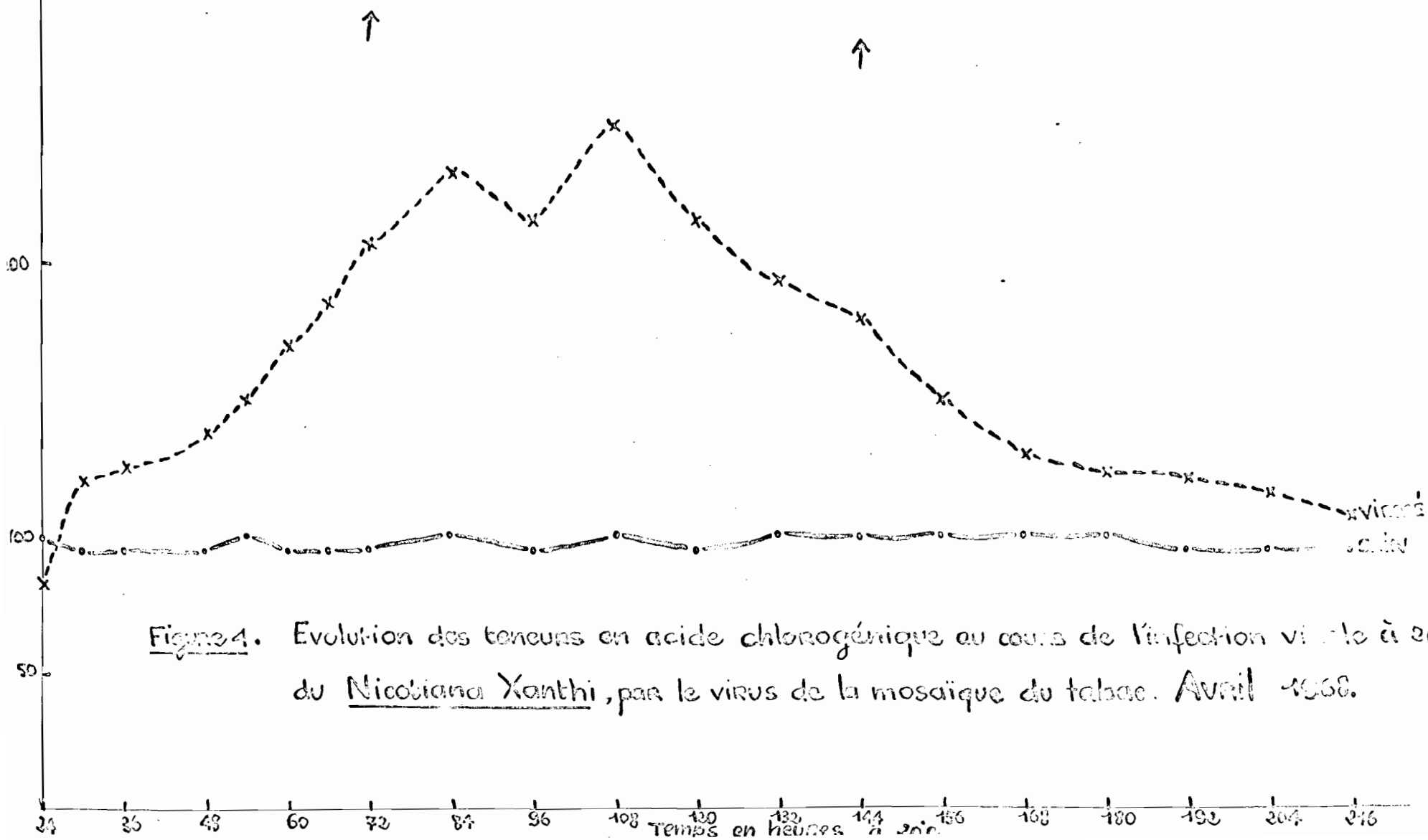


Figure 3 . Evolution des teneurs en acide chlorogénique au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. JANVIER 1968.

	Teneur en γ /g.P.F
X.V.S 24h à 20°C	100
X.V.MT " "	85
X.V.S 30h à 20°C	95
X.V.MT " "	120
X.V.S 36h à 20°C	95
X.V.MT " "	125
X.V.S 48h à 20°C	95
X.V.MT " "	137,50
X.V.S 54h à 20°C	100
X.V.MT " "	150
X.V.S 60h à 20°C	95
X.V.MT " "	170
X.V.S 66h à 20°C	95
X.V.MT " "	185
X.V.S 72h à 20°C	95
X.V.MT " "	207,50
X.V.S 84h à 20°C	100
X.V.MT " "	232,50
X.V.S 96h à 20°C	95
X.V.MT " "	215
X.V.S 108h à 20°C	100
X.V.MT " "	250
X.V.S 120h à 20°C	95
X.V.MT " "	215
X.V.S 132h à 20°C	100
X.V.MT " "	192,50
X.V.S 144h à 20°C	100
X.V.MT " "	180
X.V.S 156h à 20°C	100
X.V.MT " "	150
X.V.S 168h à 20°C	100
X.V.MT " "	130
X.V.S 180h à 20°C	100
X.V.MT " "	122,50
X.V.S 192h à 20°C	95
X.V.MT " "	120
X.V.S 204h à 20°C	95
X.V.MT " "	115
X.V.S 216h à 20°C	95
X.V.MT " "	107,50

Q. d'acide chlorogénique en γ/g de poids frais.



	Teneur en γ/g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	68,75 46,25
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	53,75 75
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	62,50 107,50
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	90 213,75
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	62,50 151,25
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	62,50 151,25
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	57,50 151,25
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	53,75 90
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	53,75 85
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	53,75 75
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	48,75 62,50
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	48,75 53,75
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	53,75 50
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	57,50 46,25

%. de Rutine et de Nicotiflorine en γ / g poids frais.

Figure 5. Evolution des teneurs en rutine et Nicotiflorine au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac.
JANVIER 1968.

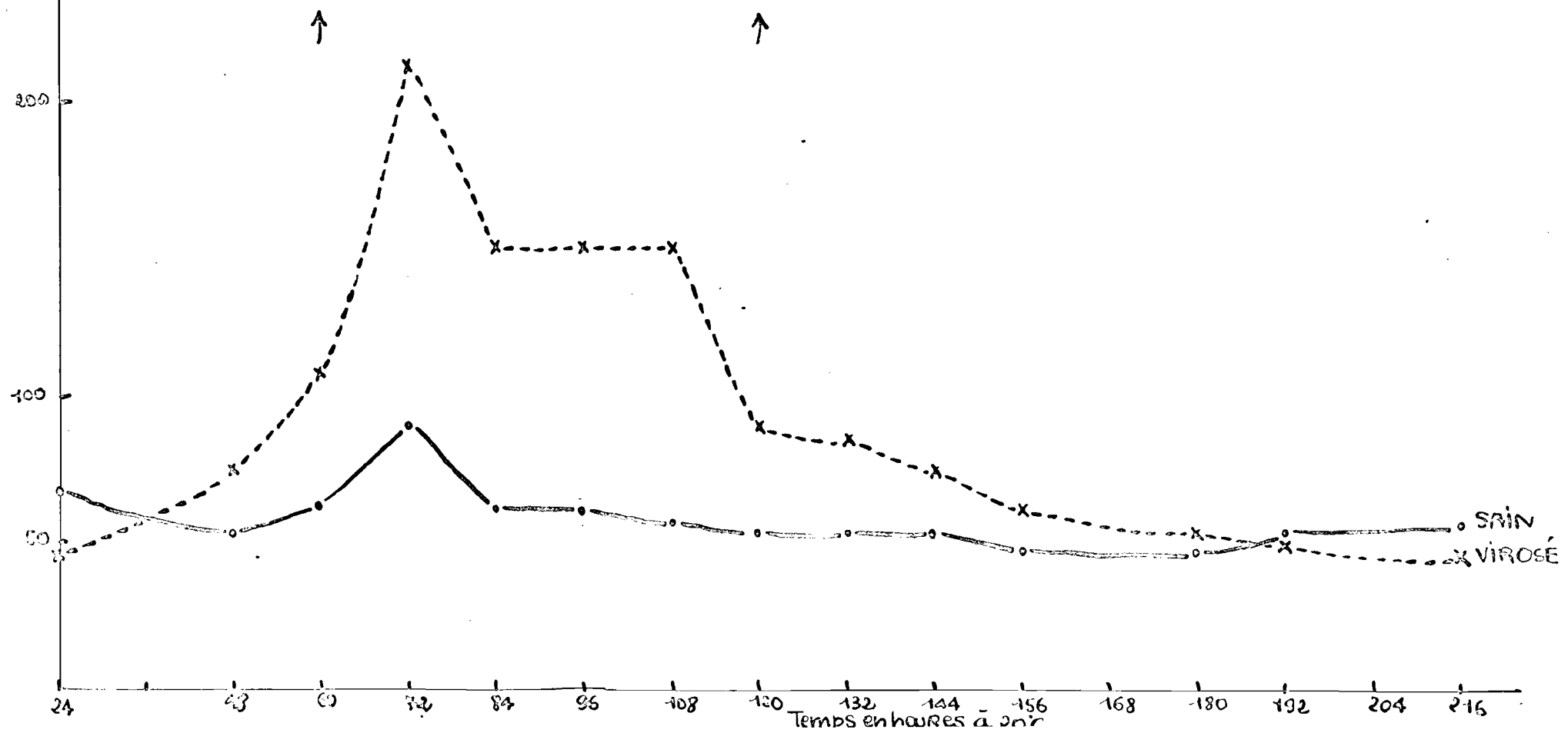


TABLEAU XI.

DOSAGE DE LA ROUTINE ET DE LA NICOTIFLORINE

AVRIL 1968

	Teneur en $\gamma/\text{g P.F}$
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	46,25 35
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	43,75 48,75
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT " "	43,75 48,75
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	41,25 57,50
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	43,75 71,25
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	41,25 80
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	41,25 80
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	43,75 90
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	43,75 98,75
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	43,75 90
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	43,75 102,50
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	43,75 80
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	43,75 71,25
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	43,75 71,25
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	46,25 73,75
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT " "	43,75 53,75
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	43,75 48,75
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	43,75 48,75
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	43,75 48,75
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	43,75 43,75

A 22598 ③

Q. de Rutine et de Nicotiflorine en γ/g poids frais.

Figure 6. Evolution des teneurs en Rutine et Nicotiflorine au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. AVRIL 1968.

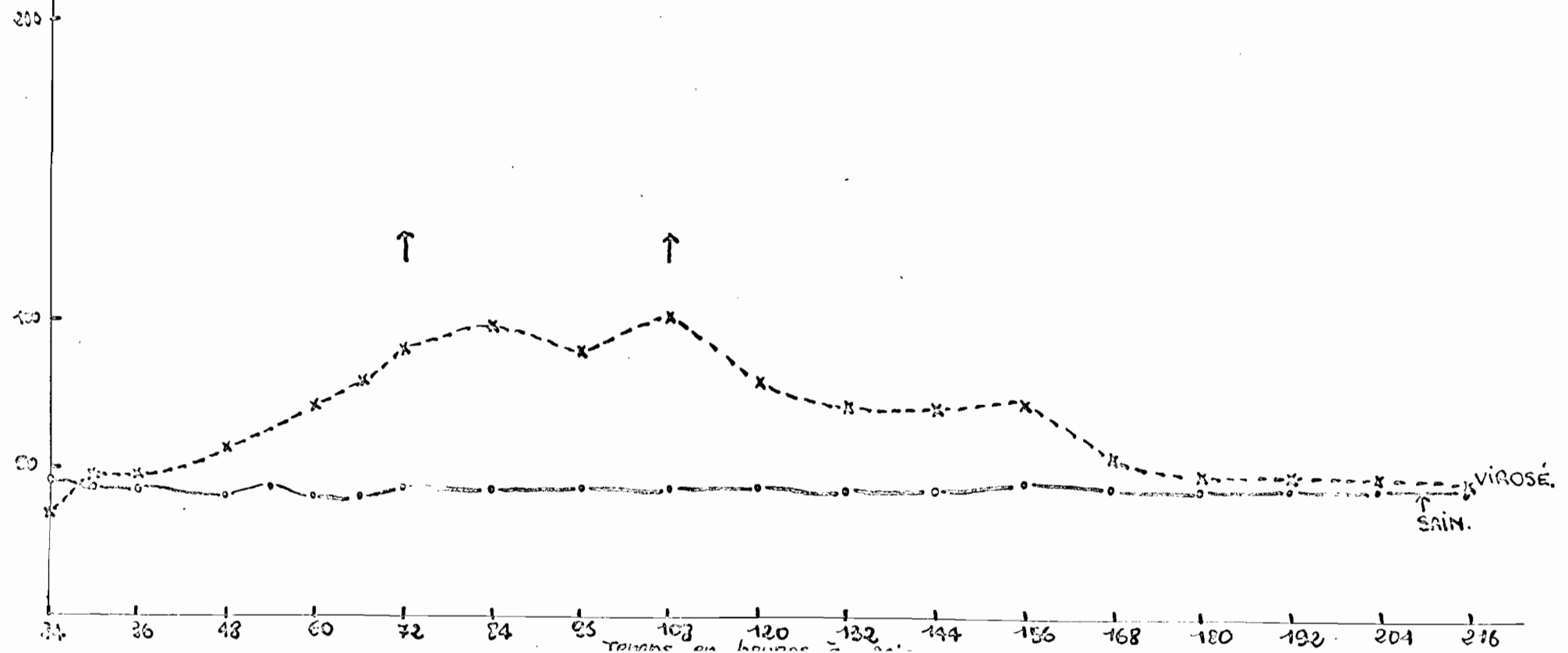


TABLEAU XII.

DOSAGE DU FERULYLOVINIQUE.

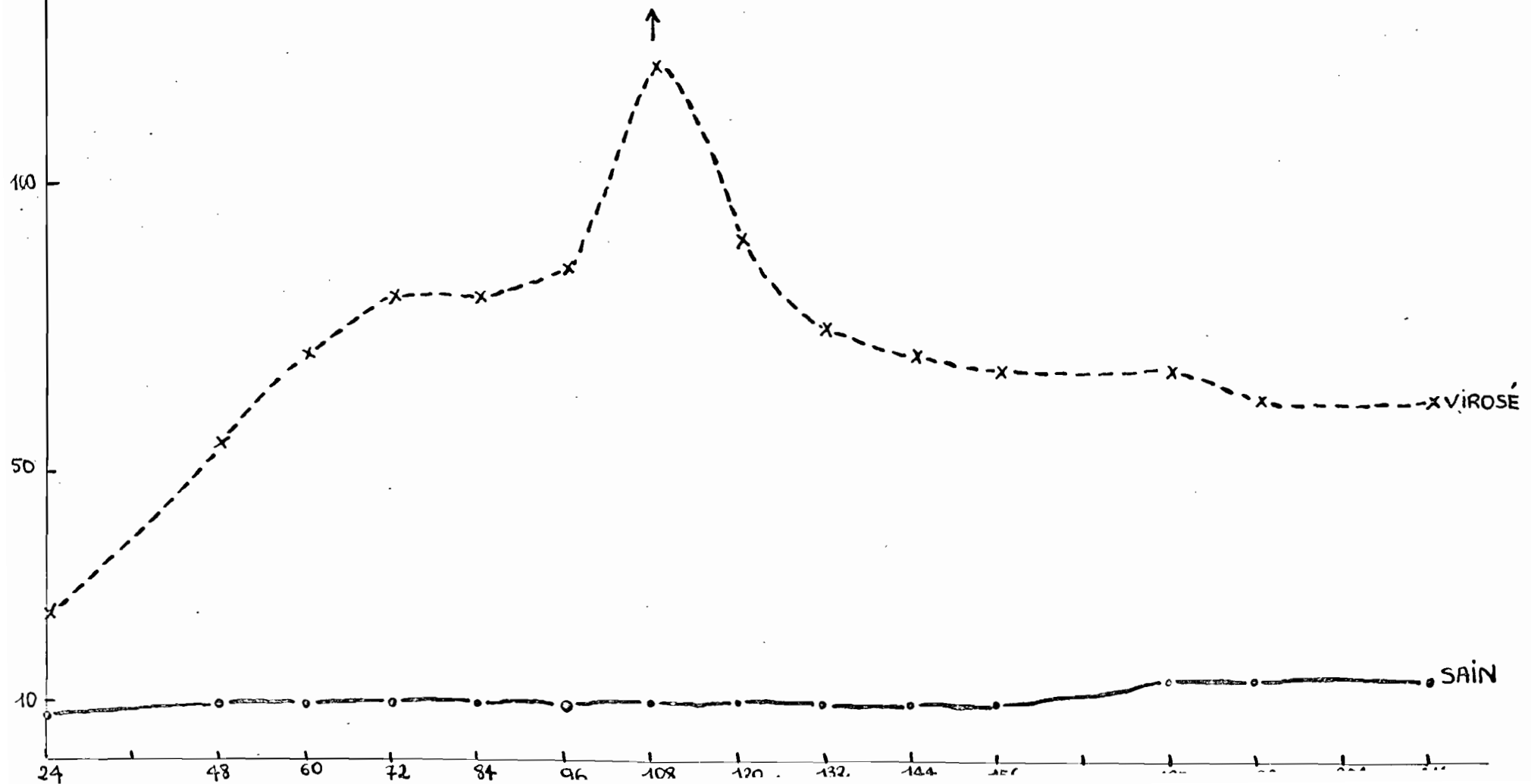
JANVIER 1968

	Teneur en γ/g P.F.
X.V.S 24h à 20°C	7,50
X.V.MT " "	25
X.V.S 48h à 20°C	10
X.V.MT " "	55
X.V.S 60h à 20°C	10
X.V.MT " "	70
X.V.S 72h à 20°C	10
* X.V.MT " "	80
X.V.S 96h à 20°C	10
X.V.MT " "	85
X.V.S 108h à 20°C	10
X.V.MT " "	120
X.V.S 120h à 20°C	10
X.V.MT " "	90
X.V.S 132h à 20°C	10
X.V.MT " "	73,75
X.V.S 144h à 20°C	10
X.V.MT " "	70
X.V.S 156h à 20°C	10
X.V.MT " "	67,50
X.V.S 180h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	62,50
X.V.S 216h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	62,50
* X.V.S 84h à 20°C	10
X.V.MT " "	80

Q. de férulylquinique en μ /g poids frais.

Figure 7. Evolution des teneurs en acide férulylquinique au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac.

JANVIER 1968.



	Teneur en γ /g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	10 23,75
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	10 40
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT " "	10 40
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	10 53,75
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	10 63,75
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	10 72,50
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	10 72,50
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	10 82,50
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	10 87,50
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	10 87,50
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	10 110
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	10 92,50
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	10 92,50
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	10 92,50
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	10 82,50
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT " "	10 81,50
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	10 77,75
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	10 77,50
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	10 77,50
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT 216h à 20°C	10 77,50

Q. de férulylquinique en γ/g poids frais.

Figure 8. Evolution des teneurs en acide férulquinique au cours de l'infection virale à 20°C du *Nicotiana Xanthi*, par le virus de la mosaïque du tabac.

Avril 1968.

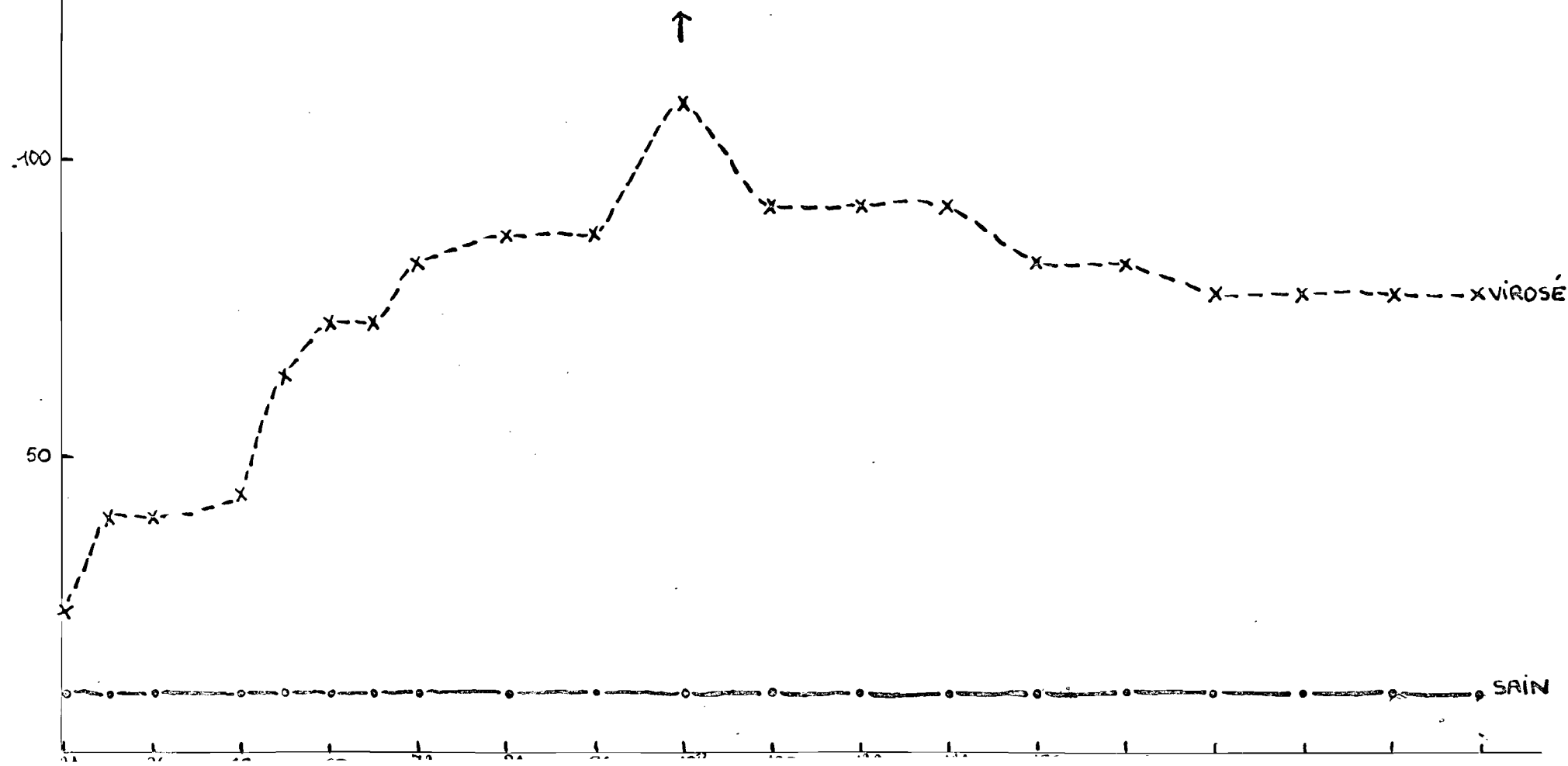


TABLEAU. XIV.

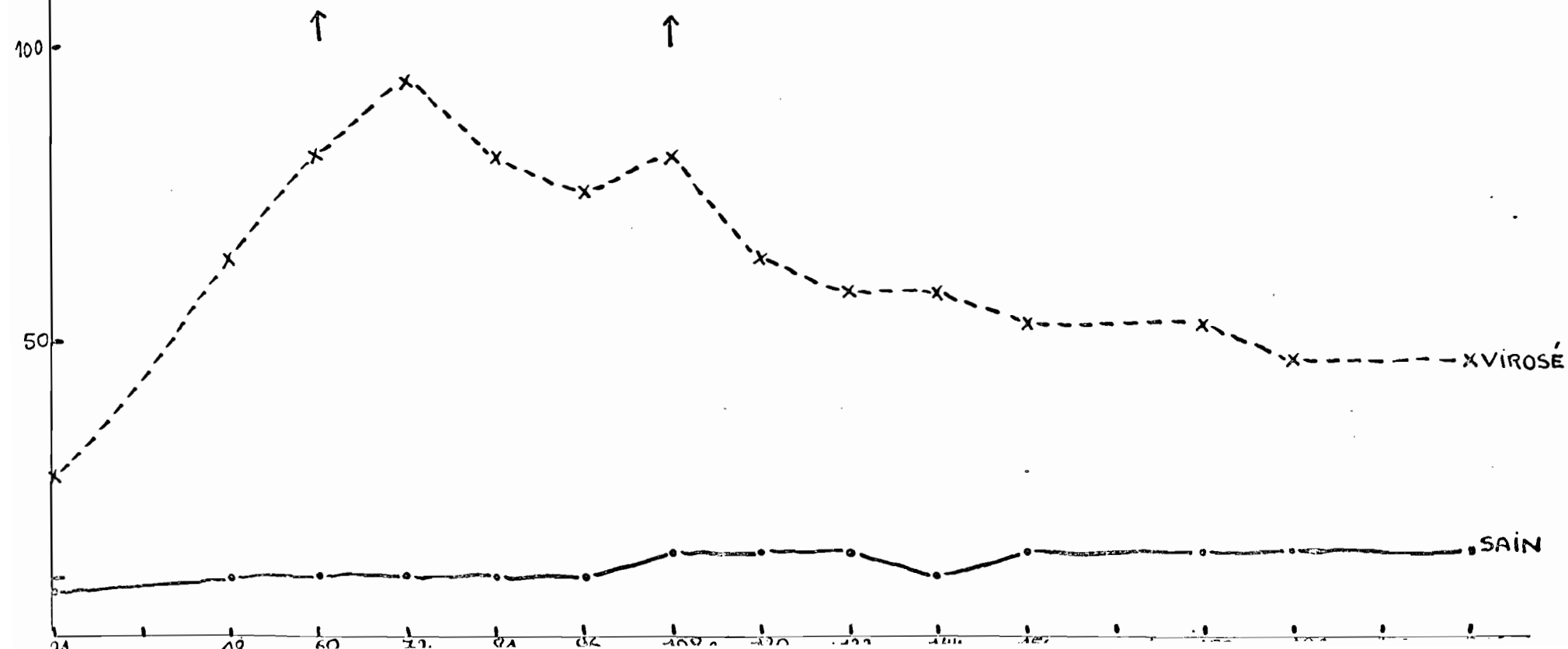
DOSAGE DU P- COUNARYLQUINIQUE

JANVIER 1968

	Teneur en γ/δ P.F
X.V.S 24h à 20°C	7,50
X.V.MT " "	27,50
X.V.S 48h à 20°C	10
X.V.MT " "	63,75
X.V.S 60h à 20°C	10
X.V.MT " "	81,25
X.V.S 72h à 20°C	10
X.V.MT " "	93,75
X.V.S 84h à 20°C	10
X.V.MT " "	81,25
X.V.S 96h à 20°C	10
X.V.MT " "	75
X.V.S 108h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	81,25
X.V.S 120h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	63,75
X.V.S 132h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	57,50
X.V.S 144h à 20°C	10
X.V.MT " "	57,50
X.V.S 156h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	52,50
X.V.S 180h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	52,50
X.V.S 192h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	46,25
X.V.S 216h à 20°C	13,75
X.V.MT " "	46,25

Q. de p.coumarylquinique en γ /g poids frais.

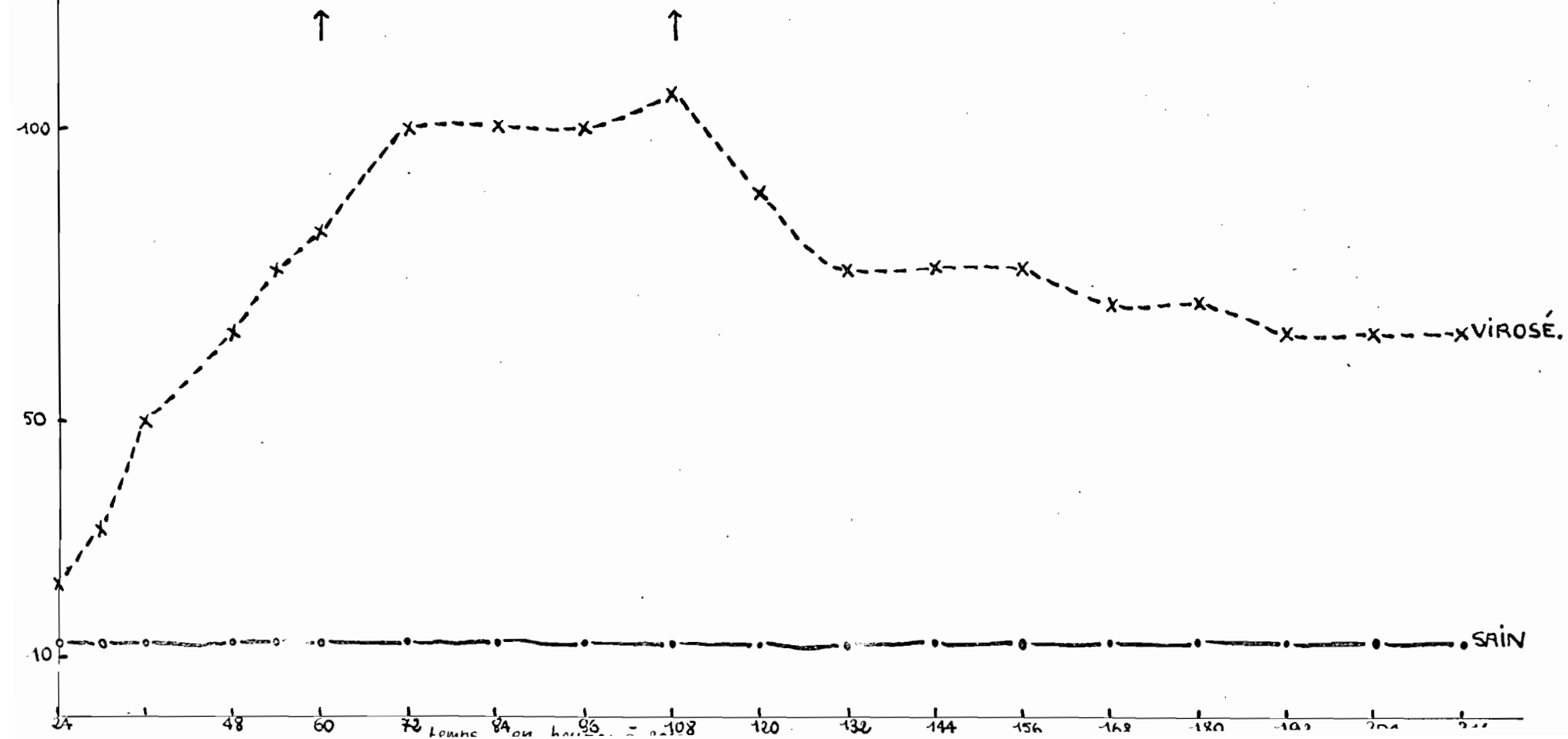
Figure 9. Evolution des teneurs en acide p.coumarylquinique au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. JANVIER 1968



	Teneur en γ -g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	12,50 22,50
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	12,50 31,25
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT " "	12,5 50
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	12,50 65
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	12,50 76,25
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	12,50 82,50
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	12,50 100
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	12,50 100
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	12,50 100
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	12,50 106,25
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	12,50 88,75
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	12,50 76,25
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	12,50 76,25
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	12,50 76,25
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT " "	12,50 70
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	12,50 70
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	12,50 65
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	12,50 65
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	12,50 65

Q. de p.coumarylquinique en γ /g poids frais.

Figure 10. Evolution des teneurs en acide p.coumarylquinique au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. Avril 1968.



	Teneur en γ /g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	0 10
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	0 10
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	0 25
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	0 37,50
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	0 43,75
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	0 52,50
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	0 62,50
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	0 67,50
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	0 70
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT	0 75
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	0 62,50
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	0 62,50
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	0 52,50

Q. de fénylyglucose γ /g poids frais.

Figure 11. Evolution des teneurs en fénylyglucose au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. JANVIER 1968.

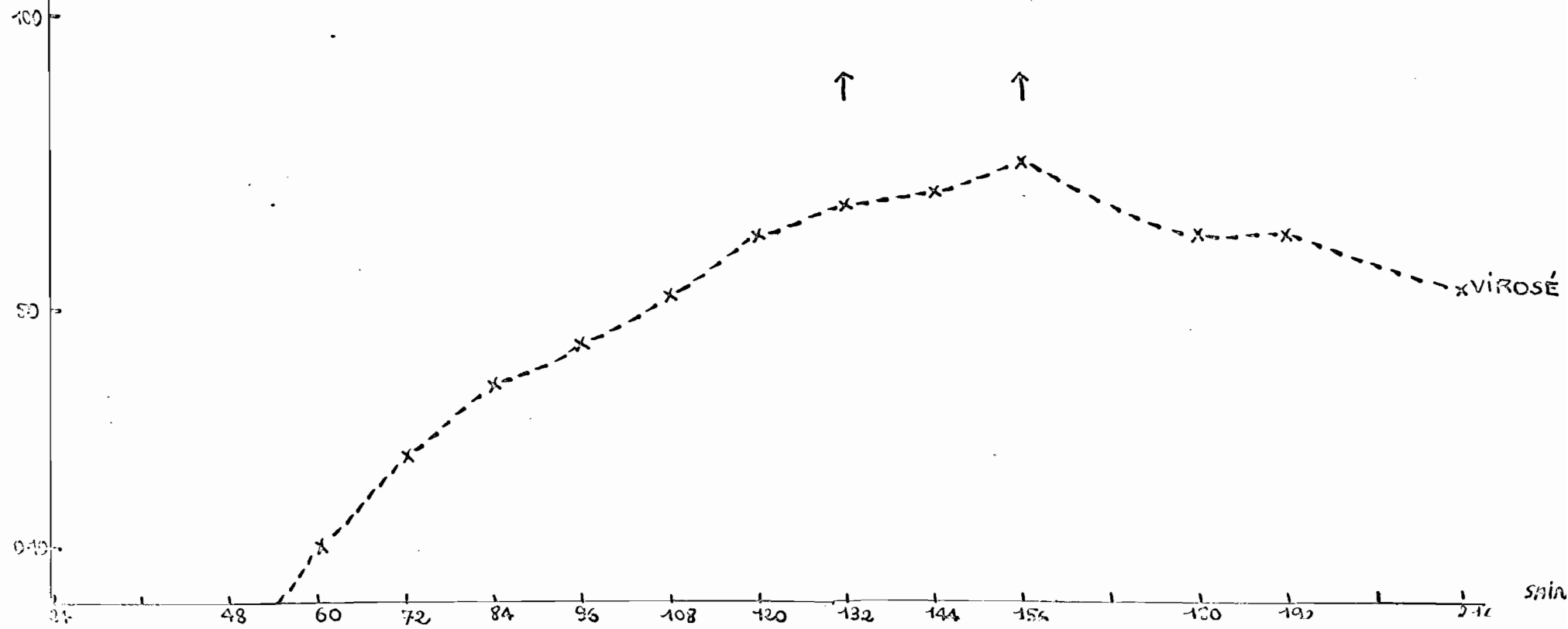


TABLEAU XVII.

DOSAGE DU FERULYLGLUCOSE

AVRIL 1968

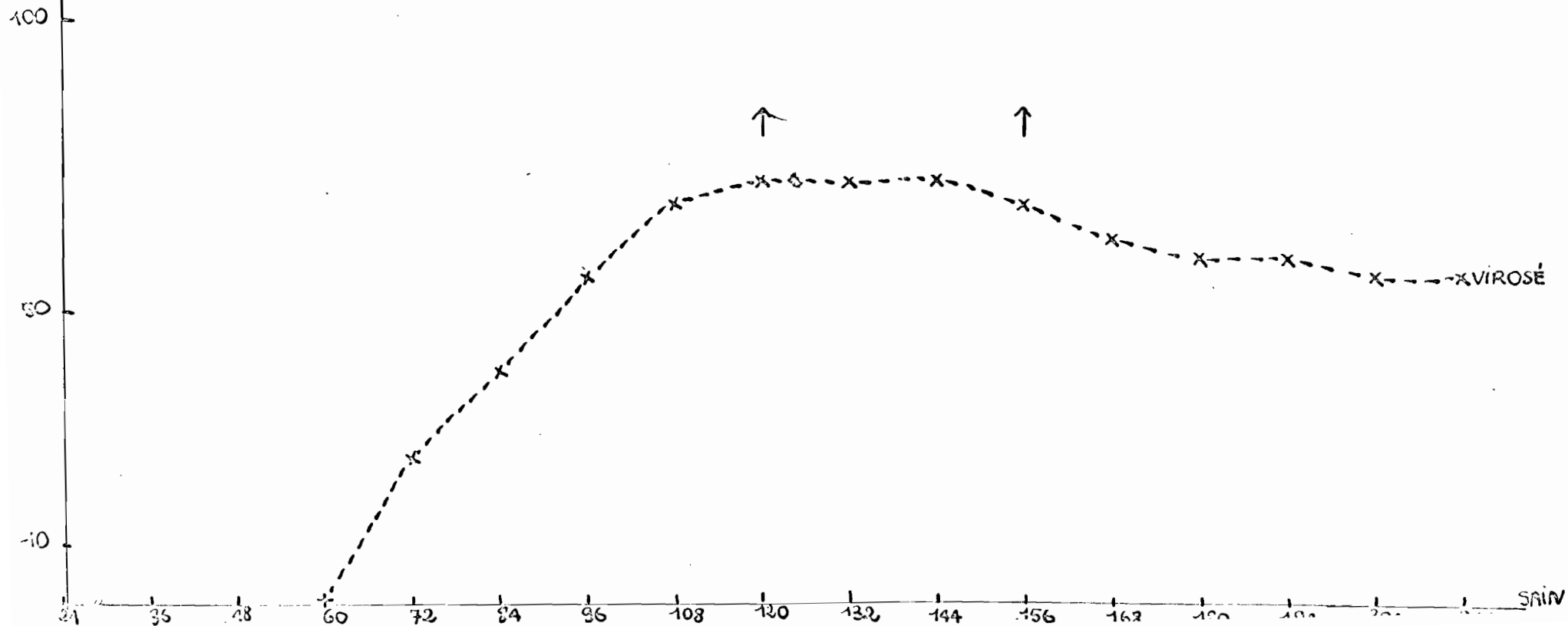
	Teneur en γ / g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	0 25
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	0 40
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	0 56,25
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	0 68,75
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	0 72,50
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	0 72,50
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	0 72,50
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	0 68,75
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT " "	0 62,50
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	0 58,75
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	0 56,25
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	0 56,25
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	0 56,25

22598

⑤

Q. de férulylglucose γ /g. poids frais.

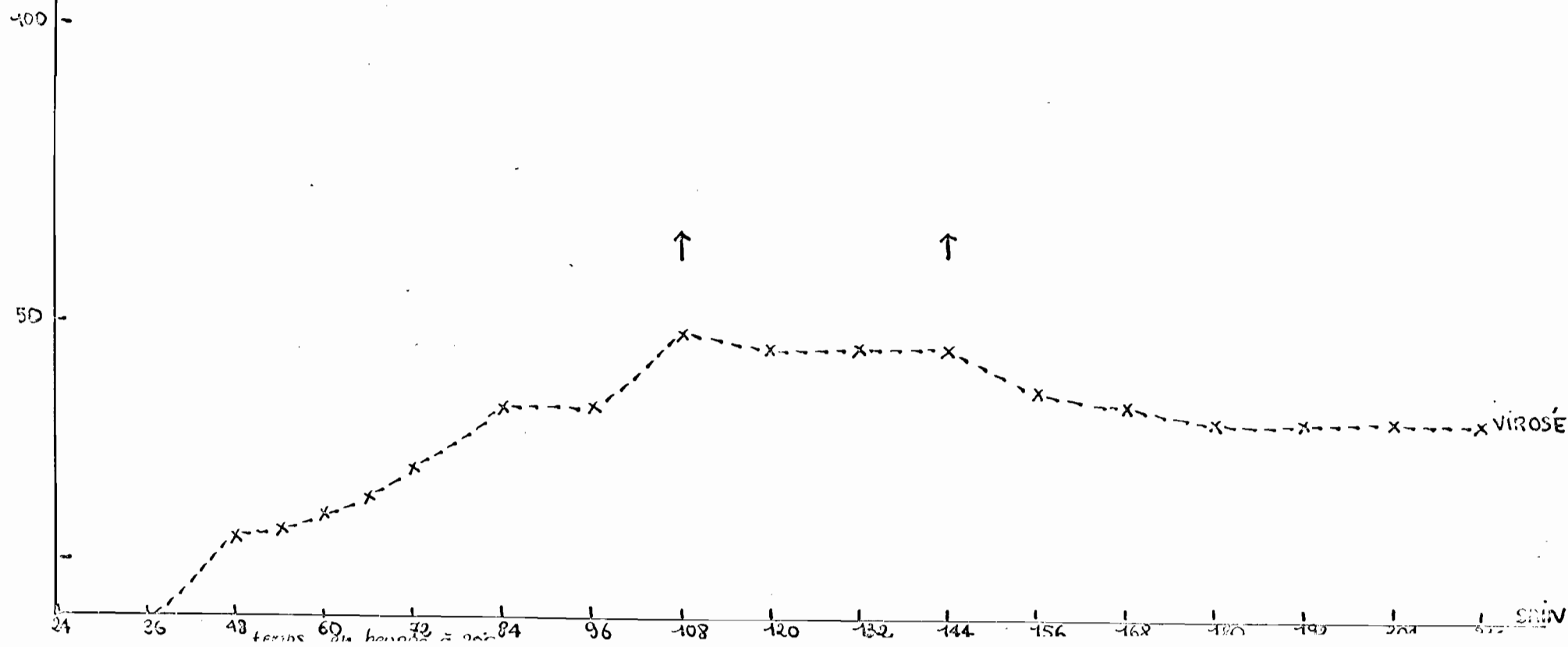
Figure 12. Evolution des teneurs en férulylglucose au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. Avril 1968.



	Teneur en γ / g P.F
X.V.S 24h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 30h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 36h à 20°C X.V.MT " "	0 0
X.V.S 48h à 20°C X.V.MT " "	0 13,75
X.V.S 54h à 20°C X.V.MT " "	0 15
X.V.S 60h à 20°C X.V.MT " "	0 17,50
X.V.S 66h à 20°C X.V.MT " "	0 20
X.V.S 72h à 20°C X.V.MT " "	0 25
X.V.S 84h à 20°C X.V.MT " "	0 35
X.V.S 96h à 20°C X.V.MT " "	0 35
X.V.S 108h à 20°C X.V.MT " "	0 47,50
X.V.S 120h à 20°C X.V.MT " "	0 45
X.V.S 132h à 20°C X.V.MT " "	0 45
X.V.S 144h à 20°C X.V.MT " "	0 45
X.V.S 156h à 20°C X.V.MT " "	0 37,50
X.V.S 168h à 20°C X.V.MT " "	0 35
X.V.S 180h à 20°C X.V.MT " "	0 32,50
X.V.S 192h à 20°C X.V.MT " "	0 32,50
X.V.S 204h à 20°C X.V.MT " "	0 32,50
X.V.S 216h à 20°C X.V.MT " "	0 32,50

Q. de scopoline γ /g. de poids frais.

Figure 13. Evolution des teneurs en scopoline au cours de l'infection virale à 20°C du Nicotiana Xanthi, par le virus de la mosaïque du tabac. Avril 1968.



TABEAU XIX. R_f des composés apparaissant dans un Xanthi virosé à 20°C. par le virus de la mosaïque du tabac.

Composés	$R_f \times 100$. dans					Fluorescences.	
	A	B	C	D	E	UV	+ NH ₃
I	51	79	39	60	60	-	bleu lumineux
J	49	87	42	58	77	-	bleu lumineux.
K	48	39	20	50	28	-	bleu lumineux
L	80	8	60	77	3	-	bleu lumineux
M	81	60	74	81	50	-	bleu lumineux
N	84	69	82	85	56,5	-	bleu lumineux
O	81	73	18	82	70,5	-	violet
P	68	70	-	68	62,5	-	violet

A = butanol:4 . acide acétique: 1 . eau: 5.

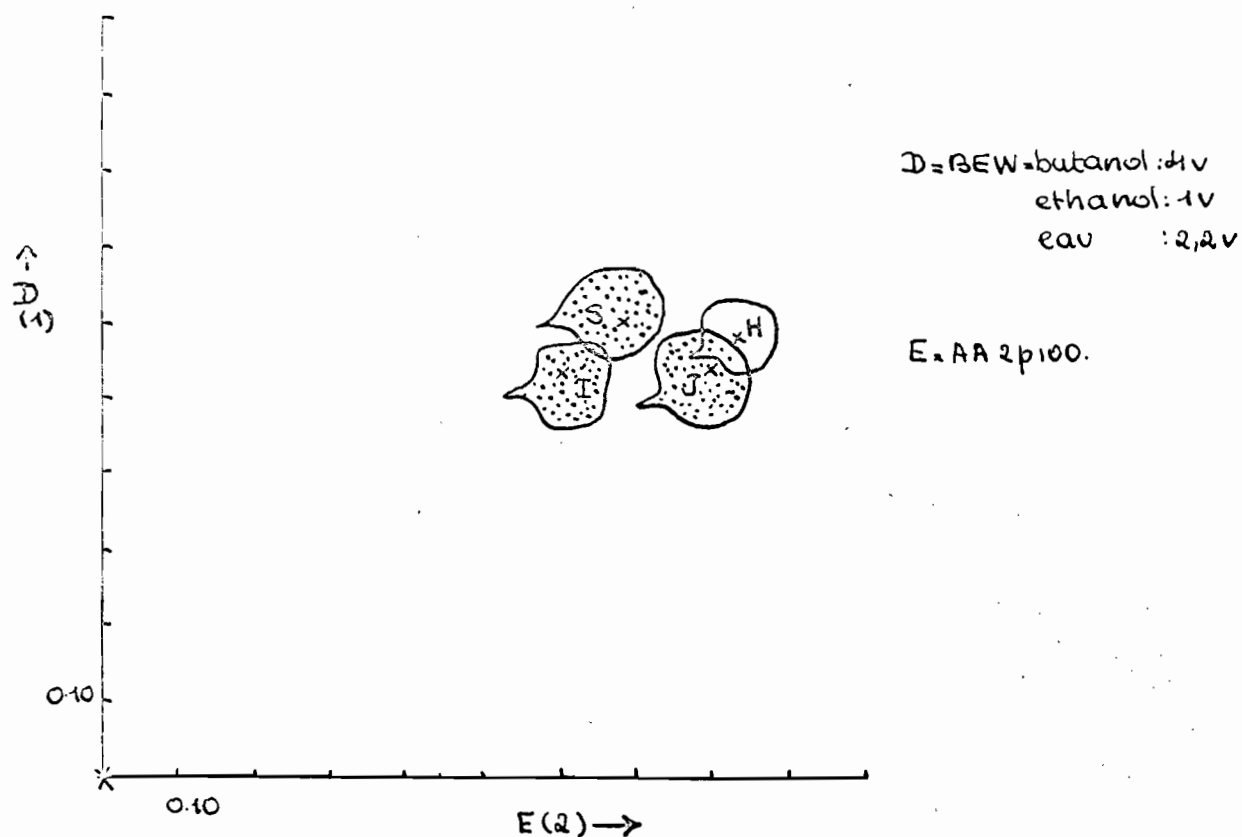
B = acide acétique 10p 100

C = butanol: 1 . ammoniacque 2N: 1

D = butanol: 4 . éthanol: 1 . eau: 2,2.

E = acide acétique 2p 100.

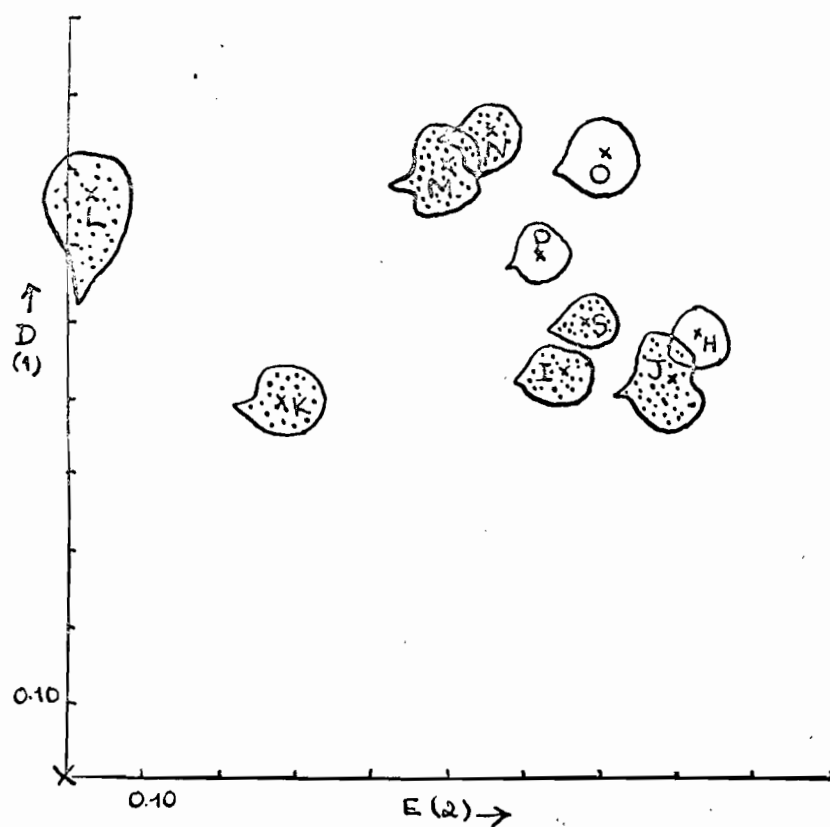
Figure 14. Chromatogramme montrant la position des substances I, J, S et H dans le butanol-éthanol et l'acide acétique



TABEAU XX. R_f de ces composés dans les solvants considérés.

	$R_f \times 100$		Fluorescences	
	D	E	UV	+ NH ₃
I	53,50	60	-	bleu lumineux
J	54	80	-	bleu lumineux
S	60	68	-	Jaune vert
H	57	83	-	bleu lumineux

Figure 15. Chromatogramme montrant la position des composés apparaissant dans un Nicotiana Xanthi, virosé à 20°C.



D = Butanol:14
 éthanol:1
 eau:22

E = AA 2P-100

HYDROLYSE ACIDE de J

Figure 16. Couche éthanolique, primitivement étherée (aglycones)

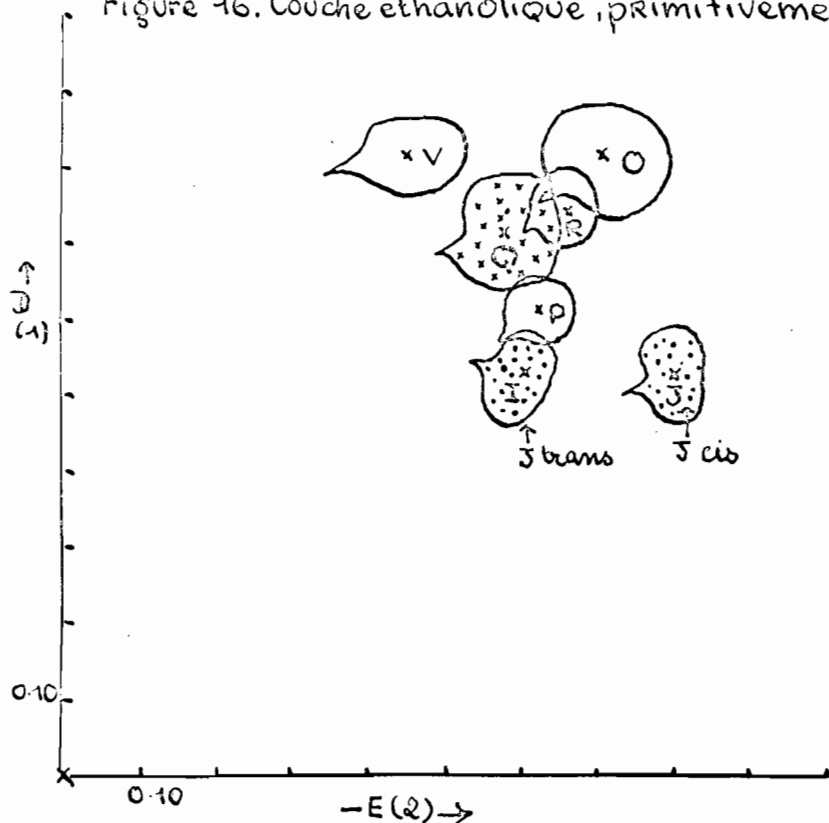
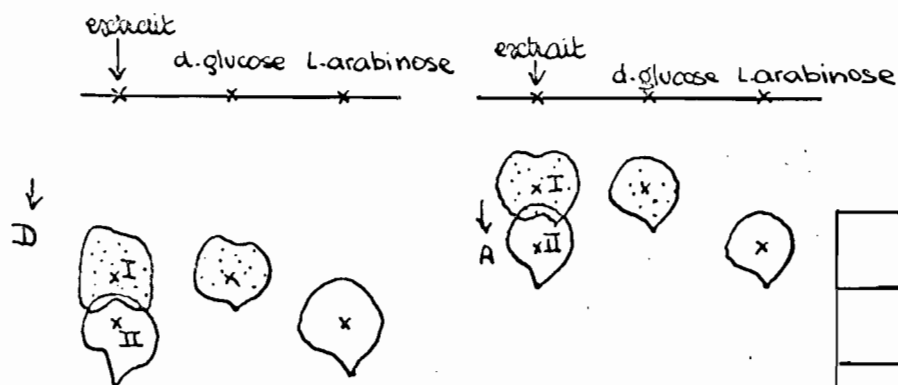


TABLEAU XXI. R_f

	$R_f \times 100$		Fluorescences	
	D	E	UV	+NH ₃
O	82	70	-	violet
V	82	42	-	violet
R	78	65	-	violet
Q	75	60	bleu	jaune vert
P	68	62	-	violet
I	54	60	-	bl. lumineux
J	54	80	-	bl. lumineux

Vet O : deux isomères (trans et cis), d'un dérivé du groupe cinnamique ?

Figure 17. Couche aqueuse (résidus non phénoliques)



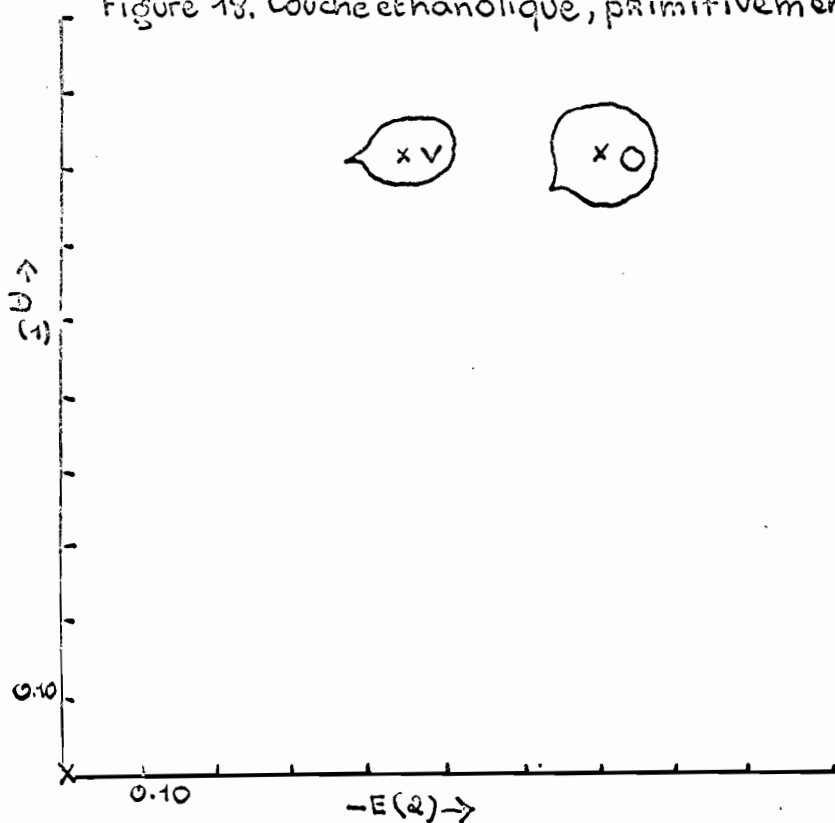
A = BAW = butanol : 4
acide acétique : 1
eau : 5

TABLEAU XXII.

	$R_f \times 100$		Colorations (phthalate d'aniline hydrogène)
	D	E	
I	24	12	brun
II	30	20	rouge
glucose	24	12	brun
arabinose	30	20	rouge

HYDROLYSE ACIDE de I

Figure 18. Couche éthanolique, primitivement étherée (aglycones)

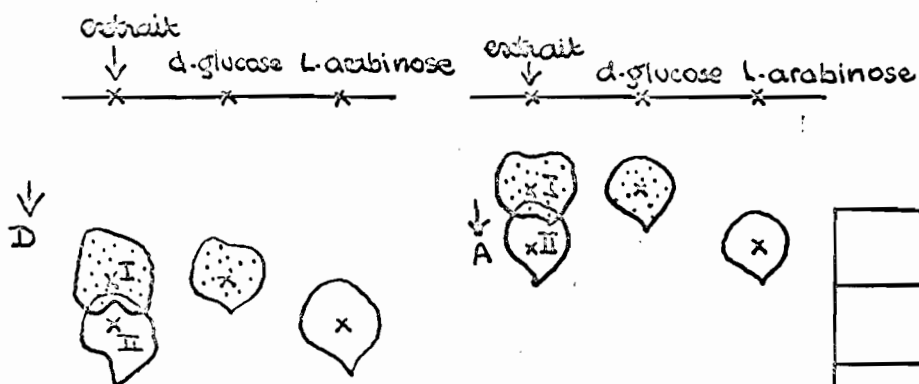


TABEAU XXIII.

R_f

$R_f \times 100$		Fluorescences	
D	E	UV	+NH ₃
O 82	70	-	violet
V 82	42	-	violet

Figure 19. Couche aqueuse (résidus non phénoliques)

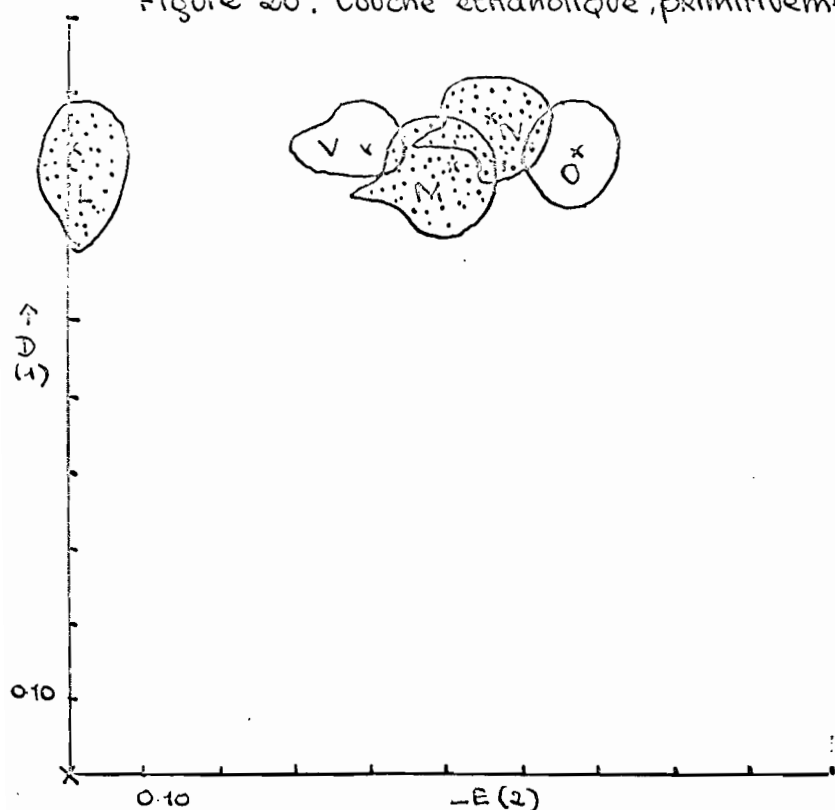


TABEAU XXIV.

$R_f \times 100$		Colorations (phthalate d'aniline hydrogéné)
D	A	
I 24	12	brun
II 30	20	rouge
glucose 24	12	brun
arabinose 30	20	rouge

HYDROLYSE ACIDE de L.

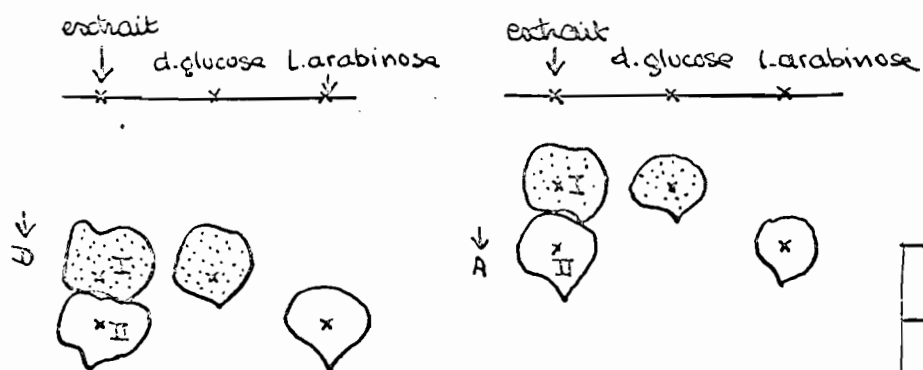
Figure 20. Couche éthanolique, primitivement étherée (aglycones).



TABEAU XXV

$R_f \times 100$		Fluorescences	
D	E	UV	NH ₃
L 80	3	-	bleu lumineux
M 80	51	-	bleu lumineux
N 86	56	-	bleu lumineux
O 81	68	-	violet
V 81	40	-	violet

Figure 21. Couche aqueuse (résidus non phénoliques)

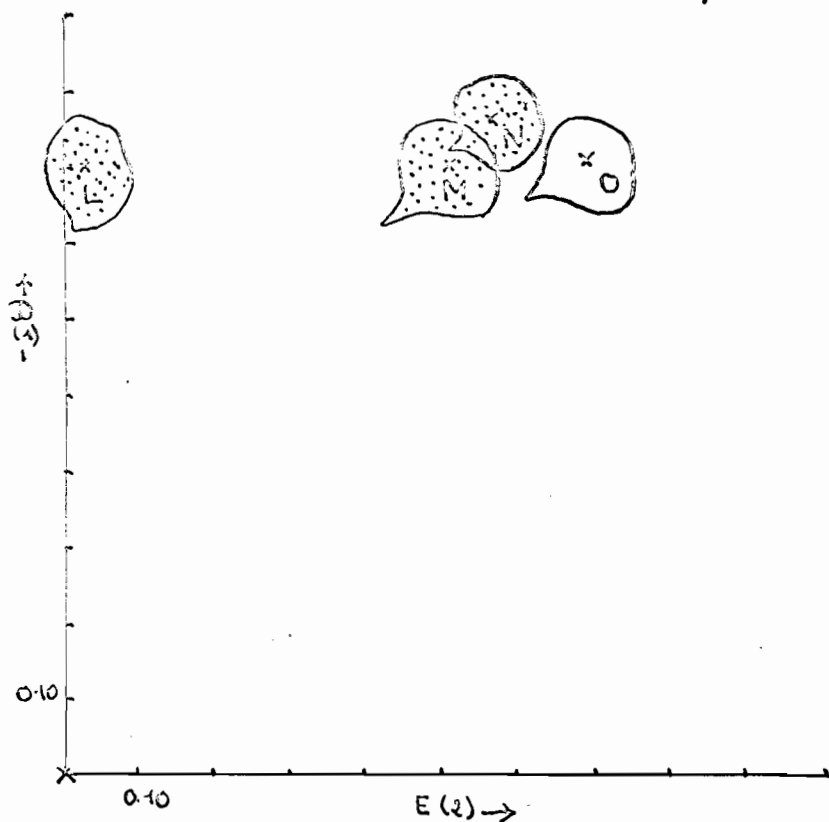


TABEAU XXVI.

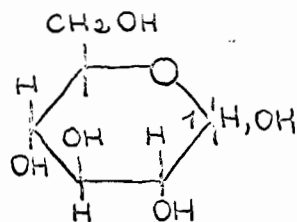
$R_f \times 100$		Colorations (phtalate d'aniline hydrogéné)
D	A	
I 24	12	brun
II 30	20	rouge
glucose 24	12	brun
arabino- nose 30	20	rouge

HYDROLYSE ACIDE de K

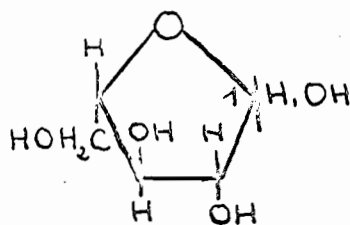
Figure 22. Couche éthanolique primitivement étherée (aglycones)



dans la couche aqueuse : D-glucose + L-arabinose.



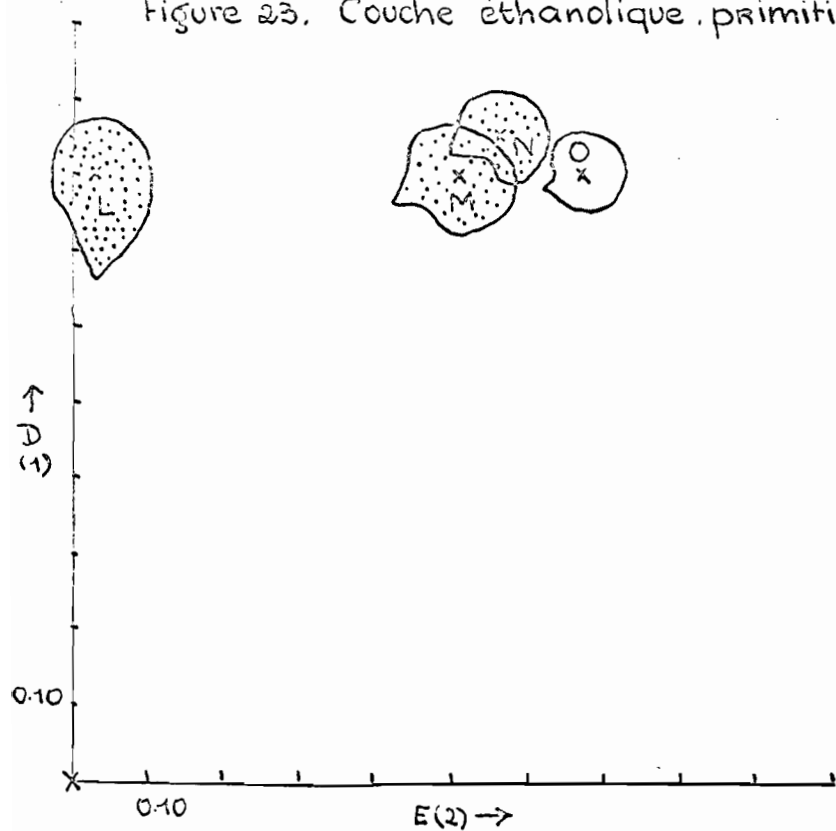
D-GLUCOSE



L-ARABINOSE.

HYDROLYSE ACIDE de S.

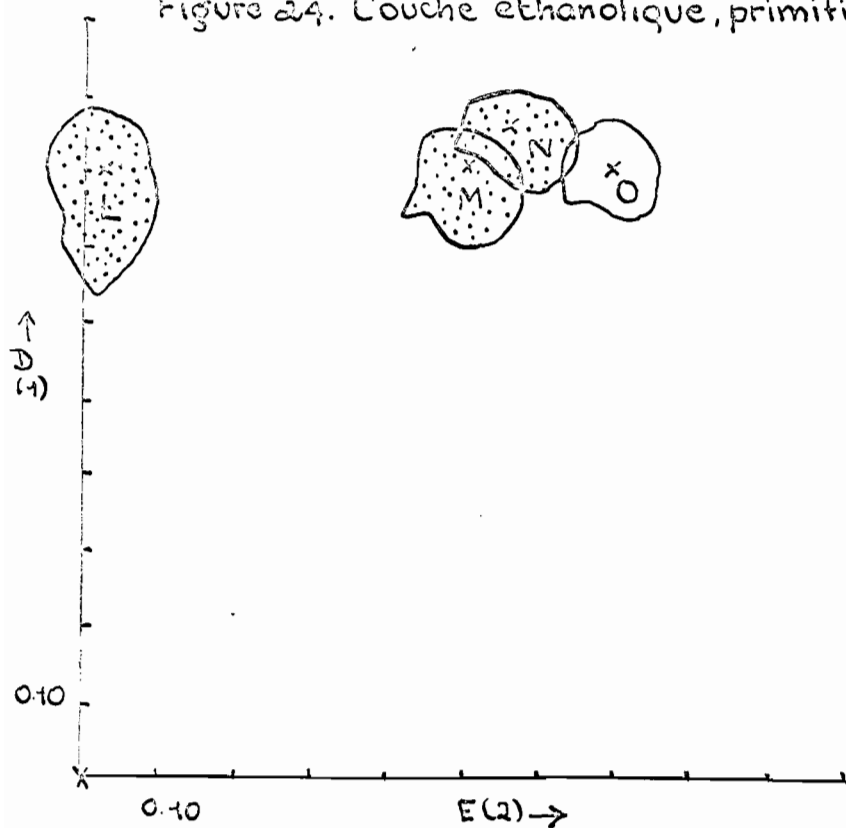
Figure 23. Couche éthanolique, primitivement éthersée (aglycones)



dans la couche aqueuse : D-glucose + L-arabinose

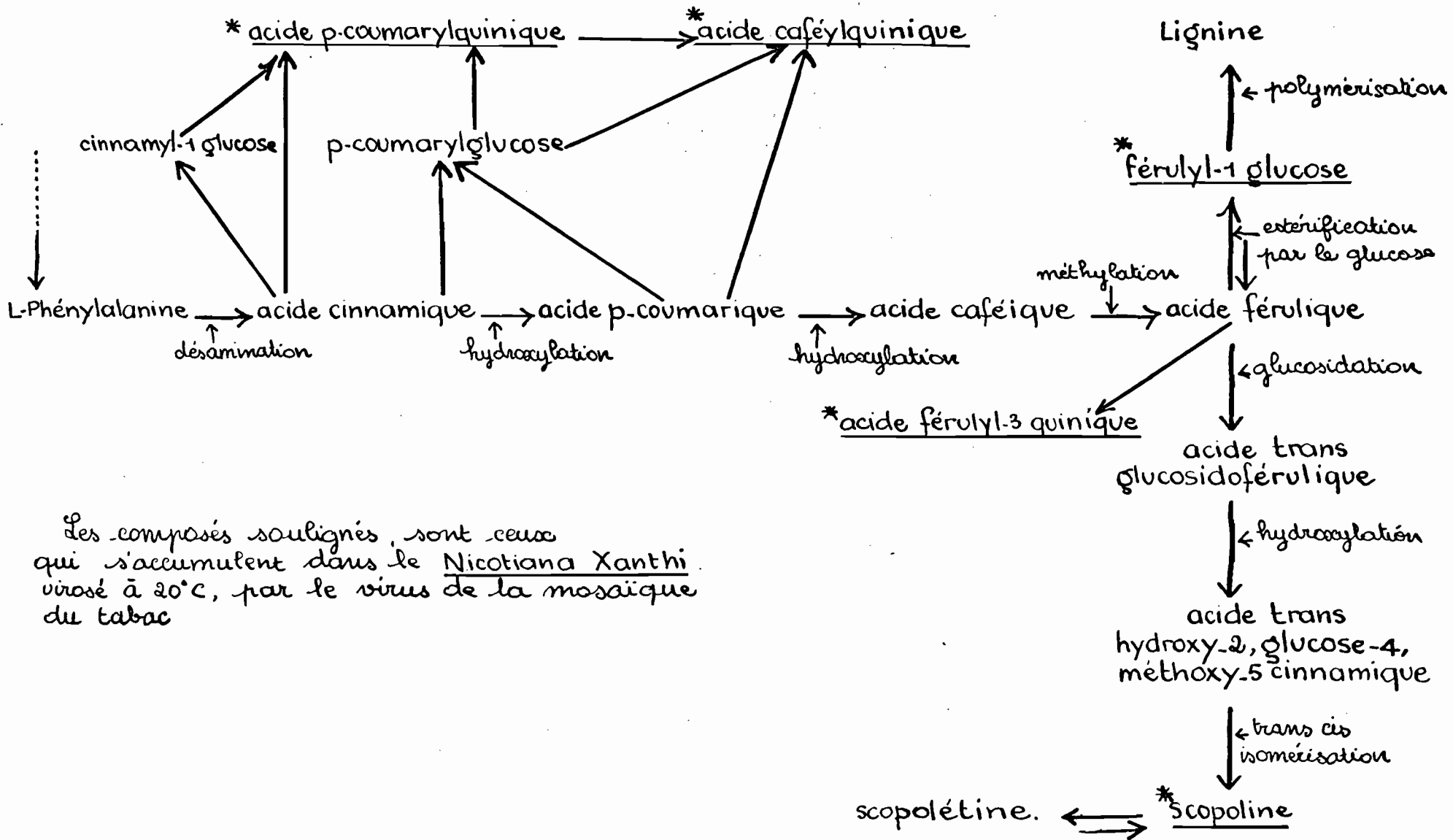
HYDROLYSE ACIDE de M et N.

Figure 24. Couche éthanolique, primitivement éthérée (aglycones).



dans la couche aqueuse : D.glucose + L.arabinose.

Figure 25. Schéma proposé pour la synthèse des phénols dans les feuilles de tabac.



Les composés soulignés, sont ceux qui s'accumulent dans le Nicotiana Xanthi virósé à 20°C, par le virus de la mosaïque du tabac

TABLEAU XXVII. Les différents solvants utilisés pour la purification des substances phénoliques.

	1ère purification		2ème purification.	
	Papier	Solvant	Papier	Solvant
<u>Marqueurs.</u>				
FEG-1 (Pétunia).	Whatman n°3	BEW (4.1.2,2)	Whatman n°2	BAW (4.1.5)
PCG-1 (Antirrhinum majus)	Whatman n°3	BEW	Whatman n°2	BAW
CAG-1 (Pétunia)	Whatman n°3	BEW	Whatman n°2	BAW
FEQ-3 (café)	Whatman n°2	BEW	Whatman n°2	BAW
CAQ-3 CAQ-4 CAQ-5 (café)	} Whatman n°2	BEW	Whatman n°2	BAW
PCQ-3 (pommes)				
Whatman n°2	Whatman n°2	BEW	Whatman n°2	BAW
<u>Xanthi</u>				
FEQ	Whatman n°2	BEW	Whatman n°1	BAW
PCQ-3	Whatman n°2	BEW	Whatman n°1	BAW
FEG-1	Whatman n°2	BEW	Whatman n°1	BAW
CAQ	Whatman n°2	BEW	Whatman n°1	BAW
Rutine et Nicotiflorine	Whatman n°2	AA 2p-100	Whatman n°1	BAW
Scopoletine	Whatman n°1	AA 2p-100	Whatman n°1	BAW
Les substances inconnues	Whatman n°2	BEW	Whatman n°1 à deux dimensions.	{ BEW (1) AA 2p-100 (2)

BEW: butanol:4. éthanol:1. eau:2,2

BAW: butanol:4. acide acétique:1. eau:5

AA 2p100: acide acétique 2p100

Tanguy Josette. (1968).

Etude des composés phénoliques de *Nicotiana tabacum* variété Xanthi, au cours de l'infection à 20°C par le virus de la mosaïque du tabac, souche commune.

Bondy : ORSTOM, 28 p. multigr.