

BIOSYNTHÈSE ET RENOUVELLEMENT DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET DES DEPSIDES VOISINS DANS LE GENRE *COFFEA*

I. Incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ dans les depsides des feuilles de caféiers Arabica et Robusta

J. P. COLONNA

Directeur de Recherches

Centre ORSTOM de Dakar *

INTRODUCTION

L'examen de vingt-cinq types de caféiers différents montre que les organes végétatifs aussi bien que les organes reproducteurs contiennent généralement cinq depsides de la série cinnamique (Colonna, 1977, 1978a, 1978b, 1979). Il s'agit de :

- l'acide chlorogénique ou depside mono-caféyl-3-quinique,
- l'acide cryptochlorogénique ou depside mono-caféyl-4-quinique,
- l'acide néochlorogénique ou depside mono-caféyl-5-quinique,
- l'acide mono-féruyl-3-quinique,
- la « fraction isochlorogénique », comportant trois depsides dicaféyl-quiniques, difficiles à séparer et ne différant que par les positions respectives des deux estérifications sur la molécule d'acide quinique (positions 3-4, 3-5 ou 4-5).

On rappellera que l'acide chlorogénique, ester de l'acide quinique avec l'acide caféique, représente, de façon typique, la classe de substances organiques nommées depsides ; ce terme désigne les composés résultant de la condensation du carboxyle d'un acide phénol, principalement de la série cinnamique, avec un groupement hydroxyle d'un autre acide (Sondheimer, 1964). On notera que la découverte de l'acide chlorogénique, de ses isomères, des dep-

sides voisins, de leur structure et de leurs propriétés est très largement liée aux caféiers (Colonna, 1979).

Ces esters, leurs constituants et les composés voisins présentent un intérêt pratique et économique indéniable. Ils sont impliqués dans les réactions des végétaux aux agressions virales (Tanguy, 1979), fongiques (Pangelova-Shturkova, 1979) et plus généralement de tous ordres (Uritani, 1961) ; dans la coloration, les qualités organoleptiques et la conservation de plusieurs productions végétales (Roberts et Wood, 1953 ; Wilkinson *et al.*, 1954 ; Forsyth, 1955 ; Badin *et al.*, 1962 ; Ribereau-Gayon, 1968 ; Popov *et al.*, 1979) ; dans diverses réponses physiologiques des organismes humains et animaux (Gounelle de Pontanel *et al.*, 1970) ou végétaux comme, par exemple, dans certains phénomènes de cicatrisation (Fleuriet et Macheix, 1984). On attribue à l'acide cinnamique et à ses dérivés une légère toxicité (Hoskins, 1984).

Leur intérêt scientifique est aussi important :

— on peut se demander s'ils jouent un rôle de matière de réserve (Ruckenbrod, 1954 ; Butler, 1960), de composé de détoxification (Pridham, 1965), de substances de croissance (Vendrig et Buffel, 1961 ; Nitsch, 1970), de pigment (Trebst et Eck, 1961 ; Monties, 1974), d'élément d'un système d'oxydoréduction (Johnson, 1952 ; Jones et Hulme, 1961 ; Abukharma *et al.*, 1967), d'activateur ou

* Centre ORSTOM, BP 1386, Dakar, Sénégal.

d'inhibiteur de divers systèmes enzymatiques (Schwimmer, 1958; Sondheimer et Griffin, 1962; Krogman et Stiller, 1962; Mazelis, 1962), de précurseurs dans les processus de lignification (Sarkanen et Ludwig, 1971);

— de nouvelles précisions sur leur distribution et leur répartition chez les végétaux sont régulièrement rapportées dans la littérature (Melin *et al.*, 1979; Soboleva, 1980; Sergeeva *et al.*, 1980; Romussi *et al.*, 1980; Walter et Schadel, 1981; Thompson, 1981; Shibuya, 1984);

— d'autres questions se posent quant à leur degré de participation aux activités métaboliques (Billot *et al.*, 1978; Waites *et al.*, 1978; Engelsma, 1979; Macheix *et al.*, 1981; Fleuriet et Macheix, 1980, 1981, 1985), aux conditions de leur biosynthèse (Hanson, 1966; Steck, 1968; Rhodes et Woollorton, 1976, 1978; Legrand, 1977; Parmentier, 1979; Hollaender et Amrhein, 1980; Koumba-Koumba *et al.*, 1982; Kojima et Villegas, 1984) et, d'une façon générale, à leur signification biologique (Goris, 1914; Combes, 1936; Seshadri, 1951; Harborne, 1964; El-Basyouni et Neish, 1966; Colonna, 1979);

— diverses études concernent les systèmes enzymatiques impliqués dans leur formation (Lamb, 1979; Massalà *et al.*, 1980; Nagels *et al.*, 1982; Shimizu et Kojima, 1984; Macheix et Ibrahim, 1984; Suzich *et al.*, 1984; Feutry et Letouzé, 1984; Villegas et Kojima, 1985) et leur dégradation (Mino *et al.*, 1981).

Dans le but d'établir ou d'infirmer la participation active de l'acide chlorogénique et des depsides voisins au métabolisme, ainsi que dans le but de préciser certaines étapes de leur biosynthèse, il a semblé indispensable de déterminer, grâce à l'utilisation de précurseurs radioactifs, les modalités et le rythme de renouvellement de ces composés

dans les tissus végétaux. La fourniture de précurseurs radioactifs à des feuilles devrait permettre de suivre la rapidité de l'incorporation de la radioactivité dans les « pools » foliaires de depsides, comme la vitesse de sa disparition. La présence constante de cinq depsides dans les feuilles de caféiers à des doses totales très appréciables, allant de 1 à 7 % de la masse de matière sèche (Colonna, 1978), impose le choix de cette plante pour ces expériences. Faisant généralement appel à des feuilles isolées de différents types de caféiers, placées dans des conditions compatibles avec un fonctionnement métabolique correct, il a été procédé à diverses séries d'expériences de marquage de l'acide chlorogénique et des composés voisins. Dans la série d'expériences rapportée ici, des feuilles de caféier isolées furent maintenues en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ en présence de lumière. L'incubation n'a porté que sur une seule durée de métabolisation. Le processus photosynthétique a déjà été utilisé pour préparer biologiquement différents métabolites marqués et en particulier l'acide quinique, constituant du depside chlorogénique (Weinstein *et al.*, 1959; Goldschmid *et al.*, 1964; Boudet, 1968). La présente série d'expériences, qui concerne deux types de caféiers et fait appel à ce processus, répond à plusieurs motivations particulières :

— déterminer tout d'abord quel niveau de radioactivité atteindra l'acide chlorogénique, pour chacun des deux types de caféiers, en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$;

— comparer ensuite les résultats obtenus pour le depside caféyl-3-quinique et pour ses isomères ou les depsides voisins;

— préciser enfin les modalités de préparation d'acide chlorogénique radioactif, en prévision de travaux ultérieurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les deux expériences de cette série ont été réalisées :

— d'une part sur des feuilles isolées de rang deux, décomptées à partir de l'extrémité libre des rameaux, prélevées sur un caféier Arabica adulte;

— d'autre part sur des feuilles de même rang provenant de plants de caféier Robusta, en pots, âgés de huit mois, maintenus en salle climatisée dans des conditions quasi optimales.

Extraction, séparation et dosage des depsides; détermination de la radioactivité

Le matériel végétal est fixé ici par l'azote liquide, lyophilisé, conservé quelques jours à $-30\text{ }^\circ\text{C}$, puis broyé à $-30\text{ }^\circ\text{C}$ en milieu hydroéthanolique. Après avoir subi un traitement par le chloroforme (Colonna, 1977a, 1977b), il est soumis à une extraction en continu, selon le dispositif d'Alibert (1968), par quatre solvants successifs : mélange éthanol-acétate d'éthyle (1-1, v/v), méthanol, étha-

nol, eau. L'ensemble des filtrats, eaux de lavage du chloroforme et divers extraits est évaporé en continu sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif, et finalement amené à sec puis repris par 2 à 5 cm³ d'éthanol à 70° Gay Lussac (Colonna, 1978).

La séparation des depsides (Colonna, 1969), présents dans un extrait de feuilles de caféier, s'obtient par le moyen de la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier Whatman n° 3 tamponné; on utilise le solvant BAEt-MFE :

- BAE = n-butanol, acide acétique, eau (4-1-5, v/v), (Partridge *et al.*, 1948);
- MFE = méthylisobutylcétone, acide formique, eau (3-1-2 v/v), (Jean et Reid, 1959);
- t = tampon phosphate 0,067 M de pH 7,5 (McFarren, 1951).

Après localisation aux UV à 360 et 254 nm (Colonna, 1969, 1971b), les « spots » de papier renfermant les depsides sont découpés puis élués par l'éthanol pour spectrophotométrie dans l'UV contenant 30% d'eau bi-distillée. Le dosage s'effectue, par spectrophotométrie dans l'UV, par rapport à un blanc élué d'une zone témoin du papier à chromatographie, sur une aliquote de l'éluat. La droite étalon est donnée en figure 1. Le maximum d'absorption se situe à 328 nm pour les depsides mono-caféyl-quiniques et à 325 nm pour le depside férulyl-quinique.

Une autre aliquote sert dans le même temps au comptage de la radioactivité. Pour ces déterminations un compteur à scintillation Carbotrimètre Intertechnique SL30 a été employé. L'Instagel

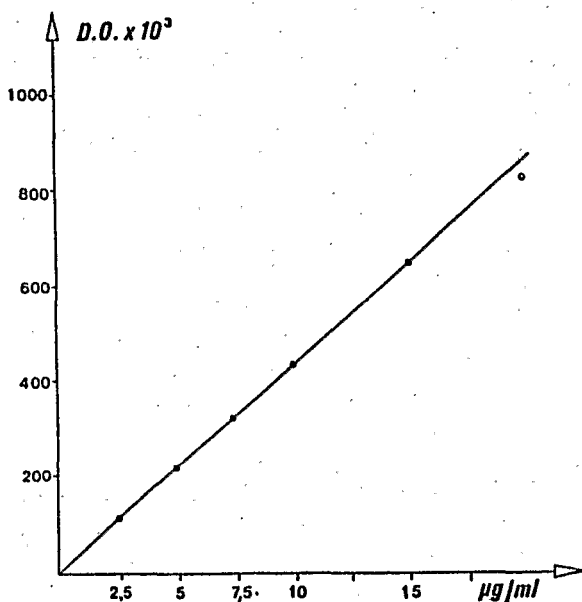


Fig. 1. — Droite de référence pour le dosage spectrophotométrique des acides mono-caféyl-quiniques

fournit alors les meilleurs résultats comme liquide scintillant. On admet que les courbes de correction peuvent différer quelque peu en fonction de la nature de l'agent du « quenching » ou lorsque les effets de plusieurs agents s'ajoutent. Aussi, deux courbes de correction ont-elles été établies. La première correspond aux quantités d'éthanol introduites dans l'Instagel par l'aliquote des éluats hydroéthanoliques pratiquement incolores. La seconde tient compte des effets ajoutés de l'éthanol et de la coloration des extraits hydroéthanoliques totaux. Dans les conditions de ces mesures, le « quenching » demeure faible; le rendement du comptage est de l'ordre de 90%.

Dispositif et conditions de l'expérimentation

Le dispositif représenté et explicité sur la figure 2, p. 86, est placé sous une hotte à forte ventilation. Une pompe à vide permet d'établir une dépression dans l'ensemble du montage. Les différents éléments reliés entre eux peuvent être mis en communication ou isolés par le jeu des robinets 1, 2, 3, 4 et 5.

Les feuilles de caféier, trempant chacune par leur pétiole dans un becher d'eau distillée, sont placées dans un cristalliseur de douze litres constituant l'enceinte à métabolisation. Le pétiole est tranché sous l'eau; sa section reste toujours immergée. Une fois fermée, l'enceinte à métabolisation est étanche.

Le passage d'un courant d'air décarbonaté débarrasse l'atmosphère de l'enceinte du CO₂ qu'elle contient. Après établissement d'un vide de 4 mm de mercure, on libère le ¹⁴CO₂ par action de l'acide lactique 4N sur ¹⁴CO₃Ba (CEA, 36,5 mCi/mM). On entraîne alors le gaz radioactif dans l'enceinte de métabolisation par admission d'air décarbonaté, jusqu'au retour à la pression atmosphérique. La teneur en CO₂ de l'enceinte atteint alors 0,1%, grâce à l'addition préalable au ¹⁴CO₃Ba, d'une quantité adéquate de carbonate inerte.

Chaque expérience utilise 5 mCi et dure 72 h, sans dommage apparent pour les feuilles; la teneur en eau des feuilles se situe, en fin d'expérience, à 65% pour l'Arabica et à 70% pour les jeunes Robusta; ces valeurs correspondent à peu près aux valeurs initiales et sont comparables à ce que l'on rencontre normalement au champ. La température à l'intérieur de l'enceinte se situe autour de 25 °C à l'obscurité et de 30 °C à la lumière. Afin d'augmenter la durée de la photosynthèse, les périodes obscures ne s'étendent que sur 7 h par 24 h. L'éclairage atteint 4 000 lux au niveau des

feuilles à l'intérieur de l'enceinte. A la fin de l'expérience, l'enceinte est purgée par un courant d'air décarbonaté durant 1 h ; le $^{14}\text{CO}_2$ se trouve piégé

dans les deux barboteurs à soude. Les feuilles, après pesée et fixation à l'azote liquide, sont lyophilisées.

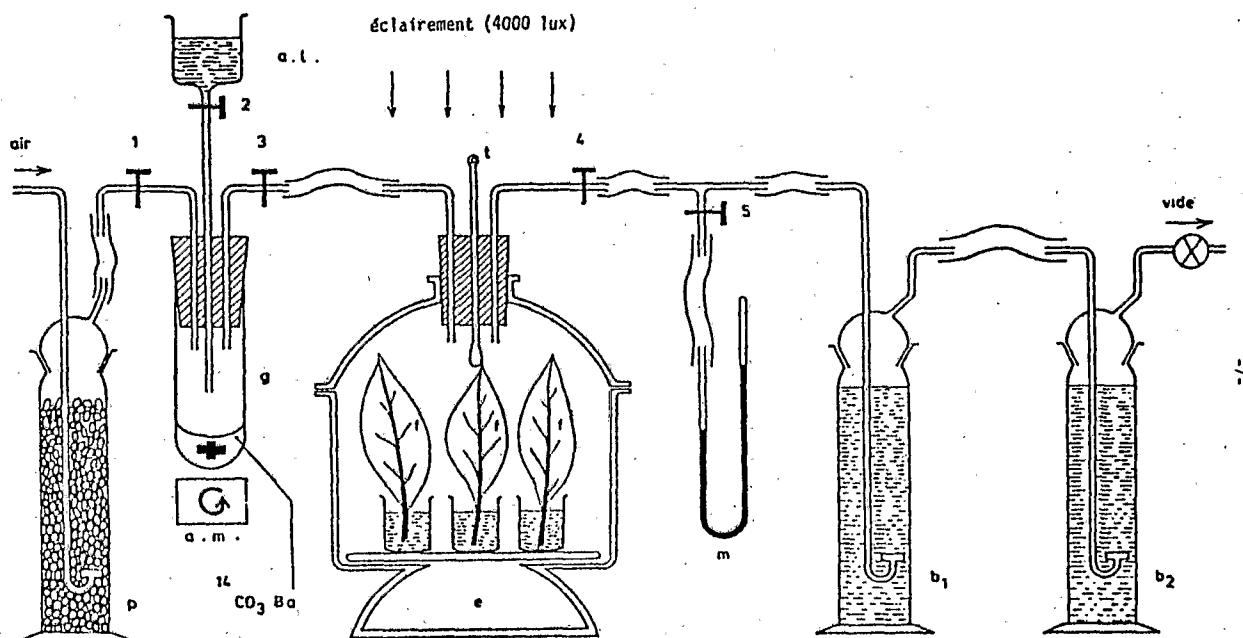


Fig. 2. — Montage expérimental permettant le fonctionnement métabolique de feuilles ou de rameaux de caféier en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$. 1, 2, 3, 4 et 5 = robinets ; P = piège à CO_2 contenant de la potasse en pastilles ; a.l. = récipient contenant l'acide lactique 4N ; g = générateur de $^{14}\text{CO}_2$ par action de l'acide lactique sur le $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$; e = enceinte à métabolisation (photosynthèse, etc.) ; t = thermomètre ; m = manomètre à mercure ; b1, b2 = barboteurs à soude

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Biosynthèse, à partir de $^{14}\text{CO}_2$, d'acide chlorogénique-[U- ^{14}C] par les feuilles de caféiers Arabica et Robusta

Les données et les résultats présentés dans les tableaux I et II établissent qu'au bout de 72 h, une partie des chaînons carbonés provenant de la photosynthèse se trouve incorporée dans la molécule d'acide chlorogénique, aussi bien pour les feuilles de caféier Arabica que pour celles de caféier Robusta.

Des différences existent toutefois entre ces deux caféiers.

La première différence se rapporte à la radioactivité de l'extrait soluble total. Pour 5 mCi fournis dans chaque expérience, l'ensemble des extraits solubles correspondant à quatre feuilles d'Arabica, c'est-à-dire à 4 868 mg de matière fraîche, contient 403 μCi , soit 8 % de la radioactivité fournie ; dans le cas du Robusta, cette valeur atteint 499 μCi , soit 10 % de l'apport radioactif total, pour trois feuilles pesant 4 745 mg à l'état frais (tableau I). Si l'on admet que la radioactivité de la fraction soluble reflète, au moins en partie, l'activité photosynthétique et métabolique des feuilles fonctionnant en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ depuis 72 h, on peut en déduire que les tissus foliaires des jeunes caféiers Robusta présentent, ici, une activité métabolique

TABLEAU I

Données et résultats relatifs à l'incorporation de la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ dans le « pool » chlorogénique des feuilles de rang deux de caféiers Arabica et Robusta

Type de caféier	MMF d'une feuille (mg)	Eau (% MMF)	Acide chlorogénique par feuille (mg)	Radioactivité par feuille dans	
				l'extrait soluble total (μCi)	l'acide chlorogénique (μCi)
Arabica	1 302	65	2,7	95	278
	1 214	66	3,1	120	316
	1 251	66	2,5	90	435
	1 101	67	2,2	98	220
	T 4 868		T 10,5	T 403	T 1 249
	M 1 217	M 66	M 2,6	M 101	M 312
Robusta	1 495	71	6,3	184	8 892
	1 699	70	6,2	154	6 791
	1 551	69	6,2	161	6 640
	T 4 745		T 18,7	T 499	T 22 323
	M 1 582	M 70	M 6,2	M 166	M 7 441

MMF = Masse de matière fraîche
T = total ; M = moyenne

supérieure à celle des tissus foliaires de *Coffea arabica*. Ceci n'est pas incompatible avec l'état physiologique des deux types de matériel végétal utilisés.

La deuxième différence concerne la proportion de radioactivité incorporée dans l'acide chlorogénique par rapport à la radioactivité de la fraction soluble. Elle ne se monte, dans les conditions de cette expérimentation, qu'à 0,31 % pour les tissus foliaires du caféier Arabica, mais à 4,47 % dans le cas du Robusta. Cette disparité concorderait avec le fait que l'espèce *C. arabica* renferme moins d'acide chlorogénique et de depsides que le caféier Robusta ; c'est aussi un arbuste plus petit, qui produit

moins de bois : le rythme de biosynthèse de l'acide chlorogénique peut y être normalement plus faible (tableau I).

La troisième différence, résultant des deux précédentes, a trait aux activités spécifiques atteintes et aux quantités obtenues d'acide chlorogénique marqué (tableaux I et II) :

— chaque feuille de caféier Arabica fournit, ici, 2,2 à 3,1 mg de depside caféyl-3 quinique- $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ dont la radioactivité spécifique varie de 36 à 63 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$. Chaque gramme de tissu foliaire à l'état frais permet l'obtention en moyenne de 2,2 mg d'acide chlorogénique- $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ avec une radioactivité spécifique d'environ 43 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$.

— l'incorporation de la radioactivité du $^{14}\text{CO}_2$ dans la molécule du depside prédominant se poursuit beaucoup plus activement dans le cas du caféier Robusta, au cours de cette série d'expériences ; en effet, dans les mêmes conditions que ci-dessus, on obtient, à partir de chaque feuille de ce caféier, de 6,1 à 6,3 mg d'acide chlorogénique d'activité spécifique allant de 400 à 500 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$. Un gramme de tissu foliaire à l'état frais fournit environ 3,9 mg d'acide chlorogénique- $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ de radioactivité spécifique moyenne de l'ordre de 431 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$.

Il convient de noter que ces radioactivités spécifiques, relatives à un ester de l'acide quinique, sont du même ordre que celle obtenue par Boudet (1968) pour l'acide quinique dans une expérience du même type effectuée dans des conditions voisines : en effet, cet auteur a pu préparer, en 87 h, à partir de jeunes feuilles de *Quercus pedunculata* Ehrh., de l'acide quinique- $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ radiochromatographiquement pur, d'activité spécifique égale à 95 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$.

TABLEAU II

Activités spécifiques, en $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, des différents depsides- ^{14}C , biosynthétisés par des feuilles de caféiers Arabica et Robusta, à partir de $^{14}\text{CO}_2$: a = acide néochlorogénique ; b = acide cryptochlorogénique ; c = acide chlorogénique ; d = acide férulyl-quinique

Type de caféier	Feuille	Radioactivité spécifique des depsides en $\mu\text{Ci}/\text{mM}$			
		a	b	c	d
Arabica	1	19,2	11,1	37,1	42,8
	2	9,6	9,2	36,7	36,3
	3	13,0	10,7	62,6	46,4
	4	18,1	10,1	36,0	31,3
	T	59,9	41,1	172,4	156,8
	M	15,0	10,3	43,1	39,2
Robusta	1	63,4	74,8	508,1	-
	2	88,3	89,2	394,3	-
	3	85,1	79,6	385,5	-
	T	236,8	243,6	1 287,0	-
	M	78,9	81,6	429,4	-

T = total ; M = moyenne

Biosynthèse, à partir de $^{14}\text{CO}_2$, d'acides néochlorogénique-[U- ^{14}C], cryptochlorogénique-[U- ^{14}C] et férulyl-quinique-[U- ^{14}C], par les feuilles de caféiers Arabica et Robusta

A partir des expériences précédentes et en opérant comme pour l'acide chlorogénique, il a été possible de déterminer la masse et la radioactivité totales de chaque depside secondaire, pour chaque feuille.

Les quantités obtenues pour ces depsides, par feuille, sont évidemment très inférieures à celles de l'acide chlorogénique, qui est toujours très largement prédominant. Le nombre de feuilles doit être multiplié par dix ou vingt si l'on désire préparer des quantités du même ordre que celles qui se rapportent au depside caféyl-3 quinique.

L'examen du tableau II fait ressortir pour les feuilles de caféier Arabica que les activités spécifiques des acides néochlorogénique-[U- ^{14}C] et cryptochlorogénique-[U- ^{14}C] prennent des valeurs inférieures (15 et 10 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ en moyenne) à celles de l'acide chlorogénique lui-même (43 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$). Cette différence apparaît encore plus nettement si

l'on considère les résultats relatifs aux feuilles de caféier Robusta.

En ce qui concerne l'acide férulyl-quinique, les résultats, qui existent pour les feuilles de caféier Arabica, se rapprochent nettement de ceux de l'acide chlorogénique quant aux activités spécifiques. En effet, si la moyenne des radioactivités enregistrées pour les feuilles d'Arabica est de 43,1 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ pour le depside caféyl-3 quinique-[U- ^{14}C] (tableau II, colonne c), celle qui correspond au depside férulyl-quinique-[U- ^{14}C] atteint 39,2 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ dans le même cas (tableau II, colonne d).

Un rapprochement entre acide chlorogénique et acide férulyl-quinique a aussi été signalé lors de l'étude des variations métaboliques des depsides chez le caféier (Colonna, 1978); l'hypothèse selon laquelle ces deux depsides joueraient le même rôle de fournisseurs d'unités phénylpropanoïques conduisant à la lignine a pu être avancée. Ce nouveau rapprochement de ces deux composés renforce l'interprétation selon laquelle ce seraient eux, parmi les substances du même type, qui seraient métaboliquement les plus actifs chez le caféier. Le depside dicaféyl-quinique, non pris en considération ici, aurait plutôt un rôle de détoxification. Les deux autres depsides présents n'interviendraient qu'assez peu dans le métabolisme.

CONCLUSION

Quelques faits ressortent de cette expérience :

- Les tissus foliaires des caféiers synthétisent l'acide chlorogénique à partir des unités carbonées photosynthétiques.
- Le rythme de cette biosynthèse paraît plus élevé chez le caféier Robusta que chez le caféier Arabica.
- Il y a aussi biosynthèse des depsides secondaires.
- Les isomères directs de l'acide chlorogénique présentent des activités spécifiques inférieures à celles de ce depside principal.
- Le depside férulyl-quinique, au contraire, semble atteindre des activités spécifiques du même ordre que celle de l'acide chlorogénique; l'activité

métabolique de ces deux composés serait supérieure à celle des autres depsides chez le caféier.

• Les feuilles encore en voie de croissance de jeunes plants de caféiers Robusta constitueraient un matériel convenable pour la préparation biologique d'acide chlorogénique-[U- ^{14}C]. A titre indicatif, on peut s'attendre à une radioactivité spécifique de l'ordre de 400 à 500 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, si l'on opère dans les conditions de cette expérience; dix feuilles de rang deux permettraient d'obtenir au moins 50 mg d'acide chlorogénique marqué.

• Une masse de feuilles environ dix fois supérieure est nécessaire pour préparer biologiquement des quantités comparables de chacun des autres depsides présents chez le caféier.

BIBLIOGRAPHIE

- ABUKHARMA (D. A.), WOOLHOUSE (H. W.). — Polyphenoloxidase activity and the metabolism of glycine by potato tuber slices. *The New Phytologist* (Oxford), vol. 66, n° 4, 1967, p. 349-395.
- BADIN (P.), DEULOFEU (V.), GALMARINI (O. O.). — Chlorogenic acid and chlorogenic like acids in « maté » (*Ilex paraguariensis*, St. Hl.). *Chemistry and Industry* (Londres), 1962, p. 257.
- BILLOT (J.), HARTMANN (Cl.), MACHEIX (J.-J.), RATEAU (J.). — Les composés phénoliques au cours de la croissance de la poire Passe-Crassane. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 16, n° 4, 1978, p. 693-714.
- BOUDET (A. M.). — Synthèse biologique d'acide quinique ¹⁴C uniformément marqué. *Journal of Labelled Compounds* (Bruxelles), vol. 4, n° 2, 1968, p. 139-146.
- BUTLER (W. L.). — Chlorogenic acid of lettuce seeds. *Nature* (Londres), vol. 185, 1960, p. 856-857.
- COLONNA (J. P.). — Sur une méthode de séparation et de dosage des acides mono-caféyl-D-quiniques du caféier. Applications. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* (Paris), vol. 269, 1969, p. 1770-1773.
- COLONNA (J. P.). — Quelques faits essentiels concernant les propriétés et la biosynthèse de l'acide chlorogénique. *Cahiers ORSTOM, Série Biologie* (Bondy), n° 13, nov. 1970, p. 3-24.
- COLONNA (J. P.). — Sur la formation d'un complexe « depside-caféine », lors de la conservation, au froid, en milieu hydro-éthanolique, d'échantillons foliaires de caféiers. Implications méthodologiques pour l'extraction des depsides. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* (Paris), D, vol. 285, n° 3, 1977, p. 253-256.
- COLONNA (J. P.). — Transestérifications et condensations concernant les depsides; le complexe « depside-caféine »; implications méthodologiques pour l'étude des depsides des caféiers. *Annales de l'Université de Madagascar, Série Sciences de la nature et mathématiques* (Tananarive), n° 14, 1977, p. 239-251.
- COLONNA (J. P.). — L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches: leur participation au métabolisme et leur signification biologique. Thèse-Doctorat d'Etat-ès-Sciences (spécialité biologie et physiologie végétale-biochimie et biologie appliquée), Université Paul Sabatier, Toulouse, 20 oct. 1978, 210 p.
- COMBES (R.). — La nutrition glucidique de la corolle. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* (Paris), vol. 203, 1936, p. 1283-1284.
- EL-BASYOUNI (S. Z.), NEISH (A. C.). — Occurrence of metabolically active bound forms of cinnamic acid and its phenolic derivatives in acetone powders of wheat and barley plants. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 5, 1966, p. 683-691.
- ENGELSMA (G.). — Effect of daylength on phenol metabolism in the leaves of *Salvia occidentalis*. *Plant Physiology* (New York), vol. 63, n° 4, 1979, p. 765-768.
- FEUTRY (A.), LETOUZE (R.). — Light-dark modulation of hydroxycinnamate: CoA ligase activity from stems of *Salix babylonica* cultivated *in vitro*. *Planta* (Heidelberg), vol. 162, 1984, p. 311-315.
- FLEURIET (A.), MACHEIX (J.-J.). — Quinyl esters and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 20, n° 4, 1981, p. 667-671.
- FLEURIET (A.), MACHEIX (J.-J.). — Orientation nouvelle du métabolisme des acides hydroxycinnamiques dans les fruits de tomates blessés (*Lycopersicon esculentum*). *Physiologia Plantarum* (Copenhague), vol. 61, 1984, p. 64-68.
- FLEURIET (A.), MACHEIX (J.-J.). — Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 24, n° 5, 1985, p. 929-932.
- FORSYTH (W. G. C.). — Cacao phenolic substances. 3. Separation and estimation on paper chromatograms. *Biochemical Journal* (Londres), vol. 60, 1955, p. 108-111.
- GOLDSCHMID (O.), QUIMBY (G. R.). — Lignin precursors: the role of quinic acid. *T.A.P.P.I., Journal of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (New York), vol. 47, 1964, p. 528-533.
- GORIS (A.). — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glycosides chez les végétaux. Ed. Lechevalier, 2^e éd., 1914, 448 p.
- GOUNELLE de PONTANEL (M.), DUMAS-ASTIER (M.). — La place du café en diététique. *Produits et Problèmes Pharmaceutiques* (Paris), vol. 25, n° 12, 1970, p. 958-966.
- HANSON (K. R.). — Chlorogenic acid biosynthesis. Incorporation of ¹⁴C-cinnamic acid into the cinnamoyl and hydroxycinnamoyl conjugates of the potato tuber. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 5, 1966, p. 491-499.
- HARBORNE (J. B.). — Phenolic glycosides and their natural distribution. In *Biochemistry of Phenolic Compounds*. Academic Press (Londres), 1964, p. 129-169.
- HOLLAENDER (H.), AMRHEIN (N.). — The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Physiology* (New York), vol. 66, n° 5, 1980, p. 823-829.
- HOSKINS (J. A.). — The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 4, n° 6, 1984, p. 283-292.
- JEAN (J.), REID (W. W.). — Chlorogenic acids of tobacco. *Chemical Industry* (Tokyo), 1959, p. 655-675.
- JOHNSON (G.). — Chlorogenic acid, a possible metabolite in the terminal oxidase system of the white potato. *Science* (Washington), vol. 115, 1952, p. 675.
- JONES (J. D.), HULME (A. C.). — Preparation of mitochondria from the peel of apples. *Nature* (Londres), vol. 191, 1961, p. 370-372.
- KOJIMA (M.), VILLEGAS (R. J. A.). — Detection of enzyme in sweet potato root which catalyzes trans-esterification between 1-O-p-coumaroyl D-glucose and D-quinic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* (Tokyo), vol. 48, n° 9, 1984, p. 2397-2399.
- KOUMBA-KOUMBA (D.), MACHEIX (J.-J.). — Biosynthesis of hydroxycinnamic derivatives in apple fruit cell suspension culture. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 20, n° 2, 1982, p. 137-142.
- KROGMAN (D. W.), STILLER (M. L.). — Naturally occurring cofactor for photosynthetic phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (New York), vol. 7, 1962, p. 46-49.
- LAMB (C. J.). — Regulation of enzyme levels in phenylpropanoid biosynthesis: characterization of the modulation by light and pathway intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (New York), vol. 192, n° 1, 1979, p. 311-317.
- LEGRAND (M.). — Biochimie des réactions de défense des plantes: modifications du métabolisme des phénylpropanoïdes au cours de la réaction d'hypersensibilité du tabac au virus de la mosaïque du tabac. Thèse-Doctorat d'Etat-ès-Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 1977, 185 p.
- MACHEIX (J.-J.), IBRAHIM (R. K.). — The O-methyltransferase system of apple fruit cell suspension culture. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* (Jena), vol. 179, 1984, p. 659-664.

- MACHEIX (J.-J.), SUEN (R.), IBRAHIM (R. K.). — Metabolism of phenylpropanoid compounds in apple fruit cell suspension culture. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* (Léna), vol. 176, 1981, p. 195-205.
- McFARREN (E.). — Buffered filter paper chromatography of the amino-acids. *Analytical Chemistry* (Washington), 23, 1951, p. 168-174.
- MASSALA (R.), LEGRAND (M.), FRITIG (B.). — Effect of alpha-aminoacetate, a competitive inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase, on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. *Physiological Plant Pathology* (Londres), vol. 16, n° 2, 1980, p. 213-226.
- MAZELIS (M.). — Pyridoxal phosphate-dependant oxidative decarboxylation of methionine by peroxidase. Characteristics and properties of the reactions. *The Journal of Biological Chemistry* (Baltimore), 237, 1962, p. 104-108.
- MELIN (C.), BILLOT (J.), DUPIN (J. F.). — Les composés phénoliques de la cerise Bigarreau Napoléon. I. Les dérivés hydroxycinnamiques. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 17, n° 3, 1979, p. 557-572.
- MINO (Y.), SAKAI (R.), TAMURA (A.). — Degradation of chlorogenic acid by the enzymes from the timothy leaf spot fungus, *Cladosporium phlei*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* (Tokyo), vol. 47, n° 5, 1981, p. 606-610.
- MONTIES (B.). — Etude de quelques relations entre polyphénols et photosynthèse : présence, compartimentation et métabolisme des polyphénols dans les chloroplastes. Thèse-Doctorat d'Etat-ès-Sciences, Faculté de Paris. Orsay, 1974, 199 p.
- NAGELS (L.), MOLDEREZ (M.), PARMENTIER (F.). — UDPG : p-coumarate glucosyltransferase activity in enzyme extracts from higher plants. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 20, n° 5, 1981, p. 965-967.
- NITSCH (J. P.). — Hormonal factors in growth and development. In : The biochemistry of fruits and their products, vol. 1, sous la direction de Hulme (A. C.), Academic Press (Londres), 1970, p. 427-472.
- PARMENTIER (F.). — The biosynthesis of chlorogenic acid in Solanaceae. *Linnean Society Symposium Series*, 7, 1979, p. 269-271.
- PARTRIDGE (S. M.), WESTALL (R. G.). — Filter-paper partition chromatography of sugars. I. General description and application to the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and faetal blood of sheep. *Biochemical Journal* (Londres), vol. 42, 1948, p. 238-250.
- PLANGELOVA-SHTURKOVA (I.). — En bulgare (Changes in chlorogenic acid and rutin content in the leaves of plum cultivars differing in their susceptibility to *Polystigma rubrum* (Pres.)). *Fiziologija Na Rastenijata* (Sofia), vol. 5, n° 2, 1979, p. 3-8.
- POPOV (P. S.), OSIK (N. S.), RAMAZANOVA (I. G.). — En russe (Effect of the storage life of sunflower seeds on the level of chlorogenic acid in them). *Maslozhirovaja Promyshlennost* (Moscou), 1, 1979, p. 11-13.
- PRIDHAM (J. B.). — Low molecular weight phenols in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* (Palo Alto), vol. 16, 1965, p. 13-36.
- RHODES (M. J. C.), WOOLTORTON (L. S.). — Enzymic conversion of hydroxycinnamic acids to paracoumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 15, n° 6, 1976, p. 947-951.
- RIHODES (M. J. C.), WOOLTORTON (L. S. C.). — Changes in the activity of hydroxycinnamyl CoA : quinate hydroxycinnamyl transferase and in the levels of chlorogenic acid in potatoes and sweet potatoes stored at various temperatures. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 17, n° 8, 1978, p. 1225-1229.
- RIBEREAU-GAYON (P.). — Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod (Paris), 1968, 254 p.
- ROBERTS (E. A. H.), WOOD (D. J.). — Separation of tea polyphenols on paper chromatography. *Biochemical Journal* (Londres), vol. 53, 1953, p. 332-336.
- ROMUSSI (G.), MOSTI (L.), CAFAGGI (S.). — En allemand (Glycosides and depsides from the leaves of *Castanea sativa* Mill). *Die Pharmazie* (Berlin), vol. 35, n° 10, 1980, p. 647-648.
- RUCKENBROD (H.). — Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. *Planta* (Heidelberg), vol. 46, 1955, p. 19-45.
- SARKANEN (K. V.), LUDWIG (C. H.). — Lignins : occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience (Londres), 1971.
- SCHWIMMER (S.). — Influence of polyphenols and potato compounds on potato phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry* (Baltimore), vol. 232, 1958, p. 715-721.
- SERGEEVA (N. V.), BANDYUKOVA (V. A.), SHAPIRO (D. K.), NARIZHNAYA (T. I.), ANIKHIMOVS-KAYA (L. V.). — En russe (Phenolic acids from fruits of some species of the *Amelanchier* medic. genus). *Khimija Prirodnykh Soedinenij* (Tashkent), 5, 1980, p. 726-728.
- SESHADRI (T. R.). — Biochemistry of natural pigments (exclusive of haeme pigments and carotenoids). *Annual Review of Biochemistry* (Palo Alto), vol. 20, 1951, p. 487-511.
- SHIBUYA (N.). — Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 23, n° 10, 1984, p. 2233-2237.
- SHIMIZU (T.), KOJIMA (M.). — Partial purification and characterization of UDPG : t-cinnamate glucosyltransferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam. *The Journal of Biochemistry* (Tokyo), vol. 95, 1984, p. 205-212.
- SOBOLEVA (V. A.). — En russe (Polyphenol compounds of *Ricinus communis* and *Mercurialis perennis*). *Khimija Prirodnykh Soedinenij* (Tashkent), 1, 1980, p. 123-124.
- SONDHEIMER (E.). — Chlorogenic acids and related depsides. *The Botanical Review* (Bronx), vol. 30, n° 4, oct.-déc. 1964, p. 667-712.
- SONDHEIMER (E.), GRIFFIN (D. H.). — Activation and inhibition of indole acetic acid oxidase activity from peas. *Science* (Washington), 131, 1960, p. 672.
- STECK (W.). — Metabolism of cinnamic acid in plants: chlorogenic acid formation. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 7, 1968, p. 1711-1717.
- SUZICH (J. A.), RANJEVA (R.), HASEGAWA (P. M.), HERRMANN (K. M.). — Regulation of the shikimate pathway of carrot cells in suspension culture. *Plant Physiology* (New York), 75, 1984, p. 369-371.
- TANGUY (J.). — Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotianae* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune. Thèse-Doctorat d'Etat-ès-Sciences. Faculté de Paris. 1970, 136 p. et *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 9, 1970, p. 169-187.
- THOMPSON (D. P.). — Chlorogenic acid and other phenolic compounds in fourteen sweet potato cultivars. *Journal of Food Science* (Chicago), vol. 46, n° 3, 1981, p. 738-740.
- TREBST (A.), ECK (H.). — Untersuchungen über die Beteiligung des Sauerstoffs in photosynthetischen Reaktionen mit Hilfe von Hemmstoffen. *Zeitschrift für Naturforschung. B.* (Tübingen), 16, 1961, p. 459-461.
- URITANI (I.). — The role of plant phenolic in disease resistance and immunity. Symposium on biochemistry of plant-phenolic substance. Colorado State University, 1961, p. 98-118.
- VENDRIG (J. C.), BUFFEL (K.). — Growth stimulating activity of transcaffeic acid isolated from *Coleus rehmeltanus*. *Nature* (Londres), vol. 192, 1961, p. 276-277.
- VILLEGAS (R. J. A.), KOJIMA (M.). — Sweet potato root enzyme which catalyzes the formation of chlorogenic acid from 1-O-caffeoyl-D-glucose and D-quinic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* (Tokyo), vol. 49, n° 1, 1985, p. 263-265.
- WAITES (M. J.), REYNOLDS (S. B.), FRIEND (J.). — The metabolism of chlorogenic acid in tuber disks of a resistant and a susceptible potato cultivar after inoculation with *Fusarium solani* var. *caeruleum*. *Biochemical Society Transactions* (Londres), vol. 6, n° 2, 1978, p. 441-442.
- WALTER Jr (W. M.), SCHADEL (W. E.). — Distribution of phenols in « Jewel » sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) Lam. roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Washington), vol. 29, n° 5, 1981, p. 904-906.

WEINSTEIN (L. H.), PORTER (C. A.), LAURENCOT Jr (J. J.). — Quinic acid as a precursor in aromatic biosynthesis in higher plants. *Contributions from Boyce Thompson Institute for Plant Research* (New York), 20, 1959, p. 121-134.

WEINSTEIN (L. H.), PORTER (C. A.), LAURENCOT Jr (H. J.). — Biosynthesis of uniformly labelled shikimic

and quinic acids in leaves of *Gingko biloba* L. *Contributions from Boyce Thompson Institute for Plant Research* (New York), 21, 1962, p. 439-446.

WILKINSON (F. B.), PHILIPPS (M.), BAGOT (A. M.). — Chlorogenic and caffeic acids in the U.S. type 12 tobacco. *Journal of the AOAC* (Arlington), vol. 37, 1954, p. 1004-1012.

COLONNA (J. P.). — Biosynthèse et renouvellement de l'acide chlorogénique et des depsides voisins dans le genre *Coffea*. I. Incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ dans les depsides des feuilles de caféiers Arabica et Robusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 2, avril-juin 1986, p. 83-92, 2 tabl., 2 fig., 76 réf.

Les feuilles de caféiers Arabica et Robusta, maintenues en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$ pendant 72 h, en conditions compatibles avec le fonctionnement des processus photosynthétiques, métabolisent le gaz carbonique marqué; 8 à 10 % de la radioactivité fournie se retrouvent dans l'extrait total obtenu à partir de ces feuilles.

Chez le caféier Robusta, 4,47 % de cette radioactivité de l'extrait total sont incorporés dans l'acide chlorogénique; cette valeur n'atteint que 0,31 % pour le caféier Arabica.

Chaque gramme de tissu foliaire à l'état frais permet d'obtenir :

— dans le cas du caféier Arabica, environ 2,2 mg d'acide chlorogénique-[U- ^{14}C] présentant une radioactivité spécifique de 43 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ en moyenne;

— dans le cas du caféier Robusta, en moyenne 3,9 mg du même composé avec une radioactivité spécifique de l'ordre de 430 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, soit dix fois plus élevée que la précédente.

Cette expérimentation donne aussi de l'acide férulyl-quinique-[U- ^{14}C], de radioactivité spécifique comparable à celle de l'acide chlorogénique-[U- ^{14}C] ci-dessus; ce fait rapproche métaboliquement ces deux depsides.

Les acides néochlorogénique-[U- ^{14}C] et cryptochlorogénique-[U- ^{14}C] récupérés n'affichent, par contre, que des radioactivités spécifiques inférieures; ils sont d'ailleurs présents dans l'extrait en quantités moindres.

COLONNA (J. P.). — Biosynthese und Erneuerung der Chlorogensäure und verwandter Depside in der Spezies *Coffea*. I. Einarbeitung von $^{14}\text{CO}_2$ in die Depside der Blätter von Arabica- und Robusta-Kaffeebäumen. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 2, avril-juin 1986, p. 83-92, 2 tabl., 2 fig., 76 réf.

Die 72 Stunden lang unter Photosynthese kompatiblen Bedingungen in $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre verweilenden Blätter von Arabica- und Robusta-Kaffeebäumen metabolisieren das markierte Kohlen-dioxid; acht bis zehn Prozent der entstehenden Radioaktivität finden sich in dem aus den Blättern gewonnenen Gesamtextrakt.

Beim Robusta-Kaffeebaum werden 4,47 % dieser Radioaktivität des Gesamtextrakts in die Chlorogensäure eingearbeitet; beim Arabica-Kaffeebaum lautet der entsprechende Grössenwert auf nur 0,31 %.

Ein Gramm Blattgewebe in frischem Zustand führt zu den folgenden Ergebnissen :

COLONNA (J. P.). — Biosynthesis and renewal of chlorogenic acid and related depsides in the genus *Coffea*. I. Incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ in the depsides of Arabica and Robusta coffee leaves. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 2, avril-juin 1986, p. 83-92, 2 tabl., 2 fig., 76 réf.

Arabica and Robusta leaves, maintained in a $^{14}\text{CO}_2$ atmosphere for 72 h under conditions in which photosynthetic processes could take place metabolized the labelled carbon dioxide. Eight to ten per cent of the radioactivity provided were found in the total extract obtained from these leaves.

In the Robusta leaves, 4,47 % of this radioactivity of the total extract were incorporated in the chlorogenic acid. The value attained was only 0,31 % in Arabica leaves.

Each gram of fresh foliar tissue gave :

— for Arabica, about 2.2 mg of chlorogenic acid [U- ^{14}C] with an average specific radioactivity of 43 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$;

— for Robusta, an average of 3.9 mg of the same compound with a specific radioactivity of the order of 430 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, or ten times higher than in the preceding case.

This experimental work also gave ferulyl-quinic acid [U- ^{14}C] of specific radioactivity comparable to that of the chlorogenic acid [U- ^{14}C] above. This brings the two depsides metabolically nearer to one another.

On the other hand, the neochlorogenic acid [U- ^{14}C] and cryptochlorogenic acid [U- ^{14}C] recovered exhibit only lower specific radioactivities. In addition, these acids were present in the extract in lesser quantities.

COLONNA (J. P.). — Biosíntesis y renovación del ácido clorogénico y de los dépsidos cercanos en el género *Coffea*. I. Incorporación del $^{14}\text{CO}_2$ en los dépsidos de las hojas de cafetos Arabica y Robusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 2, avril-juin 1986, p. 83-92, 2 tabl., 2 fig., 76 réf.

Las hojas de cafetos Arabica y Robusta, mantenidas en atmósfera de $^{14}\text{CO}_2$ durante 72 horas, en condiciones compatibles con el funcionamiento de los procesos fotosintéticos, metabolizan el gas carbónico marcado. En el extracto total que se obtiene a partir de estas hojas, se encuentra de un ocho a un diez por ciento de la radiactividad inducida.

Por lo que respecta al cafeto Robusta, un 4,47 % de esta radiactividad del extracto total se incorpora en el ácido clorogénico. Este valor únicamente alcanza un 0,31 % al tratarse del cafeto Arabica.

En estado fresco, cada gramo de tejido foliar permite obtener :

— beim Arabica-Kaffeebaum ungefähr 2,2 mg Chlorogensäure-[U-¹⁴C] mit einer mittleren spezifischen Radioaktivität von 43 µCi/mM;

— beim Robusta-Kaffeebaum im Schnitt 3,9 mg der gleichen Verbindung mit einer spezifischen Radioaktivität von etwa 430 µCi/mM, also zehnmal höher als bei Arabica.

Dieses Experiment ergibt auch Ferulyl-Chininsäure-[U-¹⁴C] mit einer spezifischen Radioaktivität, die jener der bereits genannten Chlorogensäure-[U-¹⁴C] vergleichbar ist; dieser Umstand bringt beide Depside vom Metabolismus her einander näher.

Die ebenfalls gewonnenen Neochlorogensäure-[U-¹⁴C] und Kryptochlorogensäure-[U-¹⁴C] weisen dagegen niedrigere spezifische Radioaktivitäten auf; sie kommen übrigens in geringeren Mengen im Extrakt vor.

— en el caso del cafeto Arabica, aproximadamente 2,2 mg de ácido clorogénico-[U-¹⁴C] que presenta una radiactividad específica de 43 µCi/mM por término medio;

— al tratarse del cafeto Robusta, aproximadamente 3,9 mg del mismo compuesto, con una radiactividad específica de poco más o menos 430 µCi/mM, o sea un valor diez veces más elevado que en el caso anterior.

Esta experimentación proporciona, asimismo, el ácido ferulil-quinico-[U-¹⁴C], de radiactividad específica comparable con aquella del ácido clorogénico-[U-¹⁴C] anterior, hecho que aproxima metabólicamente estos dos dépsidos.

Los ácidos neochlorogénico-[U-¹⁴C] y criptochlorogénico-[U-¹⁴C] recuperados no acusan, en cambio, sino radiactividades específicas inferiores. Además, se encuentran presentes en el extracto en proporciones menores.