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

II. Incorporation de la radioactivité de la L-Phénylalanine-[14C] dans l'acide chlorogénique des feuilles de caféier, en présence ou non de compétiteurs isotopiques

J. P. COLONNA

Directeur de Recherches Centre ORSTOM de Dakar *

INTRODUCTION

L'étude de la biosynthèse de l'acide chlorogénique, ester entre l'acide quinique et l'acide cinnamique di-hydroxylé ou acide caféique, peut être abordée selon trois rubriques :

- biosynthèse de l'acide quinique;
- biosynthèse de l'« unité cinnamique »;
- positions respectives des deux hydroxylations de « l'unité cinnamique » et de l'estérification entre les deux molécules ci-dessus, qui constituent les étapes finales de cette biosynthèse.

En ce qui concerne l'acide quinique, on sait qu'il peut se former chez les micro-organismes par la voie de l'acide shikimique (Davis, 1955; Yoshida, 1969; Suzich et al., 1984); la condensation de phosphoénolpyruvate et d'érythrose-4-phosphate donne l'acide 3-désoxy-D-arabinoheptulosonique-7-phosphate (DAHP), qui va se cycliser en acide 5-déshydroquinique (Sado et Kosuge, 1978); ce dernier va se transformer en acide 3-déshydroshikimique puis en acide shikimique, mais peut aussi, par intervention d'une quinate-deshydrogénase (Mitsuhashi et Davis, 1954), fournir réversiblement de l'acide quinique; cette

enzyme d'oxydoréduction n'existe pourtant pas chez tous les micro-organismes et n'a été que rarement signalée chez les végétaux supérieurs (Mitsuhashi et al., 1954; Szymanski, 1962; Minamikawa, 1977); aussi la possibilité d'une autre voie de biosynthèse de l'acide quinique a-t-elle été envisagée (Boudet, 1972).

La voie métabolique de l'acide shikimique fonctionnerait aussi bien chez les végétaux supérieurs (Mitsuhashi et Davis, 1954; Yaniv et al., 1955; Weinstein et al., 1959; Hasegawa et al., 1960; Gamborg et al., 1966; Minamikawa et Uritani, 1967; Boudet, 1972) que chez les micro-organismes; elle se poursuit, à partir de l'acide shikimique, vers la biosynthèse des acides aminés aromatiques : phénylalanine et tyrosine (McCalla et Neish, 1959; Yoshida et al., 1975), qui servent d'intermédiaires dans la formation des composés phénoliques (Yoshida, 1969; Whistance et al., 1971); le passage des acides aminés aromatiques aux acides de la série cinnamique est clairement établi depuis l'isolement chez les légumineuses d'une enzyme capable de désaminer la phénylalanine en acide cinnamique (Koukol et Conn, 1961), depuis la mise en évidence de cette enzyme chez d'autres plantes et, enfin, depuis la découverte d'une tyrase,

247

^{*} Centre ORSTOM, BP 1386, Dakar-Hann, Sénégal.

transformant la tyrosine en acide p-hydroxycinnamique chez les graminées (Neish, 1961). L'acide quinique est lui-même impliqué dans cette biosynthèse et dans l'édification des structures aromatiques; en effet : d'une part, il se révèle comme un métabolite aussi actif que l'acide shikimique (Boudet et Colonna, 1968), d'autre part, des interconversions entre ces deux acides existent (Weinstein et al., 1959; Rohringer et al., 1967; Gamborg, 1967a), en particulier chez Quercus pedunculata (Boudet, 1972). Quelle que soit la voie empruntée, l'intervention de l'acide quinique dans la synthèse de l'« unité cinnamique » paraît tout aussi probable que celle de l'acide shikimique. On peut noter ici que le chêne et le caféier représentent deux cas nettement différents dans l'utilisation de l'acide quinique. Le premier accumule ce composé à l'état libre sans que l'acide chlorogénique soit jamais perceptible. Dans le genre Coffea, au contraire, l'acide quinique paraît utilisé pour la biosynthèse de l'acide chlorogénique, présent dans toutes les parties de la plante.

Le problème se pose de savoir si la partie « cinnamique » de la molécule d'acide chlorogénique est hydroxylée avant ou après sa liaison avec l'acide quinique. Trois cas apparaissent comme possibles selon que l'estérification se place avant, entre ou après les deux hydroxylations. L'étude du processus d'ensemble a été abordée principalement chez la pomme de terre (Levy et Zucker, 1960; Hanson, 1966; Gamborg, 1967b), le tabac (Runeckles, 1963;

Steck, 1968) ou la pomme (Koumba-Koumba et Macheix, 1982), à l'aide de précurseurs généralement radioactifs. La mise en évidence des enzymes d'hydroxylation impliquées dans cette chaîne réactionnelle progresse par ailleurs (Levy et Zucker, 1960; Bartlett et al., 1972; Benveniste et Drust, 1974; Alibert et al., 1977), ainsi que la mise en évidence des enzymes présidant à la formation de la liaison ester (Walton et Butt, 1970; Lindl et al., 1973; Stockigt et Zenk, 1974; Ranjeva et al., 1975; Ranjeva et Faggion, 1975; Ranjeva, 1978). Diverses transférases ont pu être étudiées (Macheix et Ibrahim, 1984; Kojima et Villegas, 1984; Shimizu et Kojima, 1984; Villegas et Kojima, 1985; Fleuriet et Macheix, 1985), qui sont impliquées dans des voies de biosynthèse de l'acide chlorogénique un peu différentes, faisant intervenir des esters du glucose.

Au cours d'une précédente série d'expériences, la capacité des tissus foliaires de caféiers à synthétiser l'acide chlorogénique et ses isomères, à partir du ¹⁴CO₂, a pu être mise en évidence (Colonna, 1986). De même, une méthode d'obtention de depsides marqués a pu être mise au point. C'est dans le but d'apporter quelques précisions sur la place respective des trois dernières étapes de la biosynthèse de l'acide chlorogénique que sera abordée, ici, avec la L-phénylalanine-[¹⁴C], précurseur plus proche des depsides, l'étude du taux de renouvellement de l'acide chlorogénique et de la séquence finale de sa biosynthèse chez le caféier.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Des feuilles de rang deux, décomptées à partir de l'extrémité libre et détachées de la tige principale de jeunes plants de caféiers Excelsa, ont été utilisées comme matériel végétal. Ce passage à un nouveau caféier par rapport à l'article précédent (Colonna, 1986) correspond à trois raisons :

- d'une part, il convenait de montrer que des espèces autres que les caféiers Arabica et Robusta pouvaient synthétiser l'acide chlorogénique à partir de divers précurseurs;
- d'autre part, les feuilles plus grandes et plus épaisses du caféier Excelsa constituent un matériel expérimental de choix, car elles présentent des teneurs conséquentes en depsides;

— enfin, les jeunes plants de caféiers Excelsa disponibles, en provenance des stations caféières de Kianjavato et d'Ilaka-Est, à Madagascar, étaient en parfait état physiologique.

Schéma expérimental; principe des expériences de compétition isotopique

Dans le présent travail, lors d'une première série d'expériences, une quantité donnée de phénylalanine marquée est fournie à une feuille de caféier, dans des conditions compatibles avec un fonctionnement le plus normal possible des tissus foliaires. Des feuilles homologues sont soumises à des durées de métabolisation différentes : une cinétique du niveau de radioactivité atteint par l'acide chloro-

génique extrait de la feuille peut être établie en fonction du temps de métabolisation; ceci permettra de préciser le rythme de biosynthèse et éventuellement celui de renouvellement de ce composé. Des expériences, utilisant le même précurseur marqué, ont récemment été effectuées sur des cultures cellulaires de pomme (Koumba-Koumba et Macheix, 1982).

La seconde série d'expériences se déroule exactement de la même façon, mais, au préalable, la feuille a été alimentée en acide cinnamique non radicactif; dans la troisième série d'expériences, elle 2 absorbé de l'acide p-coumarique inerte puis, dans la quatrième série, de l'acide caféique. Il s'agit donc là d'expériences de compétition isotopique entre le précurseur phénylalanine et divers composés qui pourraient constituer des étapes successives de la voie de biosynthèse conduisant de l'acide aminé aromatique à l'acide chlorogénique. Ces compétiteurs isotopiques ont parfois été appelés « substances de piégeage » par analogie avec le terme anglo-saxon de « trapping ».

Si la « substance de piégeage » se trouve sur la voie de biosynthèse menant au depside caféyl-3 quinique, l'activité spécifique de ce dernier sera abaissée en présence de cette substance, par rapport à la valeur atteinte lorsque la phénylalanine radioactive est administrée seule : en effet, il y aura alors dilution de la radioactivité de la phénylalanine dans la substance inerte fournie.

Ce schéma général reste valable lorsque l'on part de précurseurs plus proches du depside, comme l'acide quinique ou l'acide cinnamique.

Dispositif expérimental; conduite des expériences

Les expériences se déroulent sous une hotte ventilée, ce qui augmente la quantité d'eau passant au travers de la feuille et facilite l'absorption des substances dissoutes. L'éclairement est maintenu à 4 000 lux de façon continue. La température ne dépasse pas 30 °C. Pour chaque expérience, on emploie deux feuilles opposées d'un jeune plant : la première sert à la détermination de la teneur en eau, la seconde à la réalisation de l'expérience. En ce qui concerne cette dernière :

- on détermine immédiatement son poids à l'état frais (MMF);
- on la plonge très rapidement par son pétiole dans l'eau distillée du récipient qui la supportera durant le déroulement de l'expérience;
- on tranche le pétiole en biseau, sous l'eau pour éviter toute embolie gazeuse, à environ 5 mm de la naissance du limbe;
- la masse exacte de matière fraîche est déterminée en tenant compte de la partie éliminée du

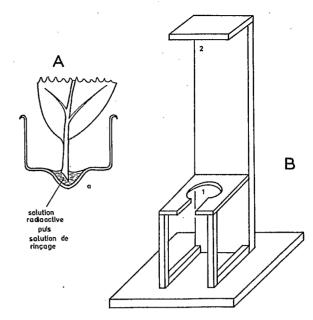


Fig. 1. — Dispositif permettant de fournir à des feuilles de caféier entières, un précurseur radioactif en solution. A = vase à métabolisation recevant dans la digitation a : la base du pétiole de la feuille, la solution radioactive, puis les solutions successives de rinçage. B = potence-support du vase A et de la feuille de caféier; le vase A prend place en 1, le sommet de la feuille est fixé en 2

pétiole; la masse de matière sèche correspondante est calculée par analogie avec la feuille opposée.

Le récipient en verre, spécialement conçu et fabriqué (fig. 1A), dans lequel plonge le pétiole de la feuille, est placé alors sur la potence-support prévue à cet effet (fig. 1B); l'extrémité supérieure de la feuille est fixée sur le haut de la potence par une languette de papier collant.

La section en biseau du pétiole doit plonger, sans adhérer aux parois, dans la digitation vers le bas que comporte le fond du récipient (fig. 1A). On réduit le volume de liquide, au minimum, à l'aide d'un papier filtre, sans que la section vienne à l'air. On introduit alors dans la digitation 1 ml de tampon contenant ou non une « substance de piégeage ». La feuille absorbe tampon et, éventuellement, « substance de piégeage » durant deux heures. Le tampon carbonate de sodium/bicarbonate de sodium 0,5 M de pH 9,75 est saturé en « substance de piégeage » (600 mg dans 50 ml); le pH final atteint 6,5 environ.

Au bout de deux heures, la feuille a absorbé de 300 à 400 µl de liquide, soit, dans le cas où une « substance de piégeage » est fournie, environ de 3,6 à 4,8 mg de cette substance. On réduit alors le volume de tampon au minimum, sans que la section du pétiole entre en contact avec l'air. On introduit immédiatement dans la digitation, au niveau de la section, la solution radioactive (40 µl) accompagnée de 100 µl du même tampon M/100.

On laisse, l'absorption et la métabolisation se poursuivre durant des temps différents. Pendant le

déroulement de l'expérience, le volume de liquide contenu dans la digitation doit rester faible, sans que toutefois la section du pétiole ne vienne jamais à l'air; chaque fois que ce fait risque de survenir, on ajoute 50 µl de liquide. La consommation d'eau par la feuille se situe entre 150 et 200 µl par heure; elle diminue avec le temps.

A la fin de l'expérience, la feuille est soulevée, son pétiole rincé à l'eau distillée par un jet de pissette. Elle est immédiatement essorée puis pesée. On détermine ainsi la perte éventuelle d'eau qu'elle a subie. La feuille est alors très rapidement fixée par l'éthanol à 80° GL bouillant, sous réfrigérant à reflux, durant 20 min.

L'eau de rinçage du pétiole a été recueillie dans le vase à métabolisation. Le contenu de ce vase, après rinçage, est concentré sous vide et sert à déterminer la radioactivité non absorbée.

Conditions spécifiques à cette série d'expériences

La phénylalanine marquée, de pureté radiochimique égale à 96 %, en solution dans HCl N/100, provenait du CEA (lot 4861) et présentait une activité spécifique de 260 mCi/mM. Après dilution, par $\rm H_2O$, 40 μl de la solution finale fournie à chaque feuille contenaient 0,609 μg de phénylalanine et 0,960 μCi .

L'ensemble des expériences comporte seize objets : d'une part, quatre durées de métabolisation : une, deux, huit et seize heures ; d'autre part, quatre modalités de métabolisation : en l'absence de « substance de piégeage » ou en présence de trois substances différentes, respectivement acides cinnamique, p-coumarique ou caféique.

Dosage et mesure de la radioactivité

Après fixation du matériel végétal en fin d'expérimentation, comme indiqué ci-dessus, on procède à un broyage des feuilles à — 20 °C, en milieu hydro-éthanolique. Le broyat est conservé à — 30 °C. A la suite d'un traitement au chloroforme, pour rompre le complexe « depside-caféine », qui a pu se former durant la période de conservation (Colonna, 1977a; 1977b), l'extraction, la séparation, la purification; l'identification et le dosage spectrophotométrique à 328 nm de l'acide chlorogénique sont effectués selon les méthodes déjà décrites (Colonna, 1969; 1978; 1986).

Les mesures de radioactivité de l'extrait total et de l'éluat hydro-éthanolique d'acide chlorogénique purifié, aliquote de l'éluat ayant servi au dosage, sont réalisées au compteur à scintillation (carbotrimètre Intertechnique SL 30) dans l'instagel. 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 incolore; la seconde tient compte des effets ajoutés de l'éthanol et de la coloration des extraits éthanoliques totaux. Dans les conditions de ces expériences le « quenching » demeure faible; le rendement des comptages est de l'ordre de 90 %.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

A l'issue de chaque durée d'expérimentation, le tissu foliaire reste convenablement hydraté, même pour la plus longue durée qui est de seize heures; ceci paraît compatible avec un fonctionnement métabolique se rapprochant de la normale. La surcharge en acide caféique conduit toutefois à une diminution de la teneur en eau largement perceptible, mais inférieure à 20 % de la valeur initiale.

La masse de matière fraîche respective des feuilles utilisées ici se trouve proche de 1 g. Chaque feuille contient en moyenne 7,5 mg d'acide chlorogénique, avec un demi-intervalle de confiance de 16 %. Ceci traduit une variabilité tout à fait normale pour des « seedlings ».

Part absorbée de la radioactivité fournie

Compte tenu de la méthode utilisée, l'absorption de la phénylalanine radioactive est rapide et assez complète; elle atteint 70 % de la radioactivité fournie au bout d'une heure et se situe en moyenne vers 84 % pour la série d'expériences ne recevant pas de « substance de piégeage »; la faible masse de phénylalanine qui porte cette radioactivité constitue vraisemblablement un facteur de ce bon niveau d'absorption.

La fourniture en quantité conséquente de « substances de piégeage », préalable à l'apport radioactif, freine le rythme de l'absorption et le rend plus irrégulier; le taux moyen d'absorption ne s'élève qu'à 68 % en présence d'acide cinnamique de piégeage, à 64 % avec l'acide p-coumarique et à 72 % dans le cas de l'acide caféique.

Evolution de l'activité spécifique de l'acide chlorogénique avec la durée de métabolisation et la nature du compétiteur isotopique

On considérera d'abord la série d'expériences pour laquelle chaque feuille de caféier Excelsa a reçu 0,609 µg de phénylalanine, amenant une radioactivité de 0,960 µCi, en l'absence de « substance de piégeage » (fig. 2, I).

- Au bout d'une heure de métabolisation, près de 6 % de la radioactivité absorbée se retrouvent dans l'acide chlorogénique de la feuille; l'activité spécifique de ce composé se situe à environ 1,0 μCi/mM.
- Après deux heures de métabolisation, 12,7 % de la radioactivité absorbée sont passés dans le « pool » chlorogénique de la feuille; la radioactivité spécifique s'élève à 2,1 μ Ci/mM, on passe alors par un maximum, qui, d'après le tracé obtenu, atteindrait au moins 2,4 μ Ci/mM et se situerait vers quatre heures de métabolisation.
- Pour huit heures de métabolisation, le depside chlorogénique ne renferme plus que 11 % de la

radioactivité absorbée et sa radioactivité spécifique redescend à 2,0 μCi/mM, pour s'abaisser à 1,7 μCi/mM au bout de seize heures.

— Par rapport au maximum de radioactivité du depside, c'est-à-dire par rapport aux valeurs atteintes pour quatre heures de métabolisation, la perte de radioactivité se situe, après seize heures, à 0,7 μCi/mM, soit 30 % environ.

En présence d'acide cinnamique de piégeage (fig. 2, II), on constate tout d'abord que l'incorporation de la radioactivité de la phénylalanine dans la molécule d'acide chlorogénique est retardée; le maximum d'activité spécifique n'est atteint qu'un peu avant huit heures de métabolisation, bien après quatre heures en tout cas. Une seconde constatation s'impose : les activités spécifiques de l'acide chlorogénique, pour les diverses durées de métabolisation, sont inférieures aux valeurs précédentes. Elles se situent à moins de la moitié de ces valeurs, sans dépasser 1,1 μCi/mM. De huit à seize heures, la perte de radioactivité est de l'ordre de 0,3 μCi/mM.

Les mêmes faits apparaissent lorsque la feuille a reçu une surcharge d'acide p-coumarique inerte avant l'apport de phénylalanine marquée. L'incorporation de la radioactivité se trouve retardée; le maximum d'activité spécifique n'est atteint vraisemblablement qu'un peu avant huit heures de métabolisation. Le niveau de cette radioactivité

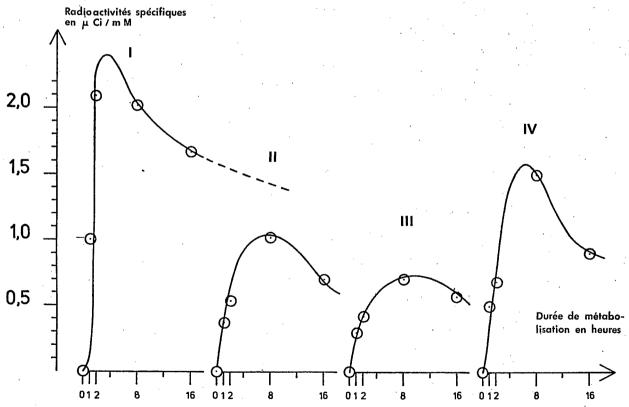


Fig. 2. — Evolution de la radioactivité spécifique de l'acide chlorogénique des feuilles de caféier, après absorption pétiolaire de phénylalanine ¹⁴C, en fonction de la durée de métabolisation et de la nature du compétiteur isotopique. I = incorporation de la radioactivité de la phénylalanine dans le « pool » chlorogénique de la feuille de caféier en l'absence de compétiteur isotopique; II = en présence d'acide cinnamique de « piégeage »; III = en présence d'acide para-coumarique; IV = en présence d'acide caféique

spécifique est nettement plus bas que lors de l'incorporation directe de phénylalanine marquée (fig. 2, III); il se situe même au-dessous de ce que l'on enregistre en présence d'acide cinnamique de piégeage; ce dernier point paraît compatible avec le fait que l'acide cinnamique puis l'acide p-coumarique constitueraient deux étapes successives de la voie de biosynthèse conduisant de la phénylalanine à l'acide chlorogénique.

Enfin, si l'acide caféique constitue la substance de surcharge, des observations du même genre peuvent être formulées : d'une part, il y a retard de l'incorporation, d'autre part, les niveaux d'activités spécifiques demeurent moins élevés que dans le cas d'incorporation de phénylalanine radioactive en l'absence de toute substance de piégeage. Ces niveaux restent toutefois supérieurs à ceux des deux cas immédiatement précédents (fig. 2, II et III). Ainsi, après huit heures de métabolisation, la radioactivité spécifique du depside caféyl-3 quinique est de l'ordre de 1,5 μCi/mM dans ce cas (fig. 2, IV). Entre huit et seize heures, 40 % de la radioactivité disparaissent de l'acide chlorogénique.

Orientation privilégiée de la phénylalanine vers la biosynthèse d'acide chlorogénique

En l'absence de substance de piégeage et dans les conditions de cette expérimentation, la feuille de caféier Excelsa absorbe en moyenne 84 % de la L-phénylalanine-[14C] fournie, correspondant, ici, à une radioactivité absorbée de 806 mµCi environ. Au bout de deux heures de métabolisation, 12,7 % de ces 806 mµCi se trouvent incorporés dans la masse d'acide chlorogénique renfermée par la feuille.

Un huitième au moins de la masse de phénylalanine présente dans la feuille sert donc à la biosynthèse de l'acide chlorogénique. Les quantités restantes de phénylalanine sont probablement orientées vers d'autres voies métaboliques ou non encore utilisées. Si Levy et Zucker (1960) semblent avoir établi, sur des disques de pomme de terre, qu'une surcharge en phénylalanine provoque la stimulation de la synthèse de l'acide chlorogénique, c'est ici la première fois qu'une précision est apportée sur la proportion de phénylalanine engagée dans la genèse du depside chlorogénique chez le caféier. Cette proportion indique évidemment que la biosynthèse de l'acide chlorogénique ne constitue pas la seule destination de ce précurseur, mais représente bien une de ses orientations privi-

Notons que, d'après la courbe I de la figure 2, l'incorporation maximale se situerait vers quatre heures, ou entre deux et quatre heures de métabolisation; elle dépasse certainement 15 %. En réalité,

ce pourcentage peut être beaucoup plus élevé, car le sommet de cette courbe ne constitue qu'une extrapolation minimale.

Rapidité de la biosynthèse d'acide chlorogénique à partir de la phénylalanine

En l'absence de toute « substance de piégeage », deux à quatre heures sont nécessaires pour que l'incorporation de la radioactivité du précurseur phénylalanine dans la molécule d'acide chlorogénique soit maximale.

D'une part, se pose un problème de transport; entre la pénétration de la phénylalanine dans la feuille par le pétiole et l'arrivée de ce composé sur le site de la biosynthèse, un certain temps doit s'écouler.

D'autre part, cette phénylalanine ne constitue pas le précurseur le plus immédiat du depside; si l'on s'en tient au schéma logique de cette biosynthèse, il devrait d'abord y avoir formation d'acide cinnamique, puis surviendraient, dans un ordre à préciser, deux hydroxylations et une estérification; le franchissement de ces diverses étapes s'étend donc sur une certaine durée.

Eu égard à ces considérations, la vitesse de cette biosynthèse, telle qu'elle peut se percevoir ici, paraît élevée.

Renouvellement de l'acide chlorogénique

Le taux de renouvellement du depside semble, lui aussi, conséquent. Toujours dans le premier cas d'incorporation de la phénylalanine radioactive en l'absence de « substance de piégeage », si l'on considère l'allure générale de la partie descendante de la courbe de radioactivité spécifique du depside chlorogénique et son extrapolation (fig. 2, 1), on peut en déduire que la moitié de la radioactivité maximale de l'acide chlorogénique aura disparu en quarante heures à peu près. Il paraît donc possible de suggérer que la demi-vie de l'acide chlorogénique dans les feuilles de caféiers serait normalement de l'ordre d'une quarantaine d'heures.

L'acide cinnamique se trouve sur la voie de biosynthèse allant de la phénylalanine à l'acide chlorogénique

Le tableau I et la figure 2 (I et II) font ressortir qu'entre le cas nº I (incorporation de L-phénylalanine-[¹⁴C] en l'absence de « substance de piégeage ») et le cas nº II (incorporation de L-phénylalanine-[¹⁴C] en présence d'acide cinnamique de « piégeage »), le déficit d'absorption de la phénylalanine marquée, précurseur fourni de l'acide chlorogénique, est de 20 %. Ce fait est normal : la feuille surchargée en acide cinnamique inerte, dans le cas

TABLEAU I

Absorption de la radioactivité de la phénylalanine par les feuilles de caféier Excelsa et radioactivités spécifiques de l'acide chlorogénique résultant, en présence ou non de diverses « substances de piégeage »

Substances fournies à la feuille de caféier	Cas n°I Phénylalanine-{ ¹⁴ C}	Cas n°II Phénylalanine-{14C}	Cas n°III Phénylalanine-{ ¹⁴ C}	Cas n°IV Phénylalanine-{14C}
	aucune substance de "piégeage"	Ac. cinnamique de "piégeage"	Ac. p-coumarique de "piégeage"	Ac. caféique de "piégeage"
1 Pourcentage absorbé de la radioactivité fournie	84	68	64	72
2 Radioactivité absorbée par la feuille en % de la radioactivité absorbée dans le cas n°I	100	80	76	86
3 Déficit de l'absorption de la radioactivité (en %)	-	20	24	. 16
4 Radioactivité spécifique maximale de l'acide chlo- rogénique final en µCi/mM	2,4 (au moins)	1,0	0,6	1,6
5 Radioactivité spécifique maximale de l'acide chlo- rogénique final exprimée en % du cas n°I	100	41	25	67
6 Déficit de la radioactivité spécifique maximale de l'acide chlorogénique par rapport au cas n°I (en %)	- -	59	75	33
7 Déficit de la radioactivité spécifique maximale de l'acide chlorogénique final dû à la dilution du précur- seur dans la substance de piégeage (6-3) (en %)	0	39	51	17

nº II, absorbe moins facilement le précurseur fourni. Par contre, le déficit d'activité spécifique du « pool » d'acide chlorogénique atteint 59 %; on peut penser que ce dernier déficit est dû, dans la proportion de 20/59, soit 1/3, à la quantité moins importante de précurseur radioactif présent dans la feuille, mais pour 39/59, soit 2/3, il doit être attribué à une autre cause.

Cette cause, c'est la dilution de la radioactivité de la phénylalanine marquée dans l'acide cinnamique de « piégeage », préalablement incorporé au tissu foliaire. S'il y a dilution, c'est que la phénylalanine se transforme effectivement en acide cinnamique avant d'aboutir à l'acide chlorogénique : l'acide cinnamique se trouve donc bien sur la voie de biosynthèse allant de la phénylalanine à l'acide chlorogénique. Ce résultat est compatible avec la mise en évidence (Koukol et Conn, 1961) d'une enzyme capable de désaminer la phénylalanine en acide cinnamique.

L'acide p-coumarique se trouve aussi sur la même voie de biosynthèse : la première hydroxylation précède l'estérification

Le tableau I et la figure 2 (I et III) montrent, qu'entre le cas nº I et le cas nº III (incorporation de L-phénylalanine-[14C] en présence d'acide p-

coumarique de « piégeage »), le déficit d'absorption de la phénylalanine marquée se situe à 24 % alors que le déficit d'activité spécifique, entre les deux mêmes cas, est de l'ordre de 75 %. En présence d'acide p-coumarique de « piégeage », l'activité spécifique du « pool » final d'acide chlorogénique diminue des trois quarts; la dilution de la Lphénylalanine-[14C] dans l'acide p-coumarique de « piégeage » est plus forte que précédemment : la phénylalanine radioactive, absorbée par la feuille de caféier, après s'être transformée en acide cinnamique va être hydroxylée en acide p-coumarique; la radioactivité se retrouvant dans ce dernier est fortement diluée dans l'acide p-coumarique inerte de «piégeage» préalablement absorbé par la feuille. Ici aussi, la dilution est responsable des deux tiers (50/75) de cette baisse d'activité spécifique, le déficit d'absorption intervenant pour un tiers (25/75). L'acide p-coumarique se trouve donc sur la voie de biosynthèse conduisant de la phénylalanine et de l'acide cinnamique à l'acide chlorogénique. La première hydroxylation de la fraction cinnamique de la molécule de depside mono-caféyl-3 quinique (ou acide chlorogénique) se situe avant l'estérification avec sa partie quinique. Contrairement au schéma de Levy et Zucker (1960), nos résultats sur le caféier, en ce qui concerne la position de cette première hydroxylation, s'accordent avec ceux obtenus par Hanson et al. (1963) sur des disques de parenchyme foliaire de tabac ou par Steck (1968) sur des feuilles isolées de la même plante.

L'acide caféique libre ne se situe généralement pas sur la voie de biosynthèse allant de la phénylalanine à l'acide chlorogénique : l'estérification succède préférentiellement à la première hydroxylation

Lorsque l'acide caféique constitue la « substance de piégeage » (cas nº IV), la radioactivité spécifique finale de l'acide chlorogénique se trouve aussi diminuée, mais beaucoup moins que dans les cas II et III précédents.

Le déficit de cette radioactivité spécifique, par rapport à l'incorporation de phénylalanine marquée en l'absence de « substance de piégeage » (cas n° I), n'est que de 33 %, au lieu de 59 % (cas n° II) et 75 % (cas n° III) (fig. 2, tableau I); il est dû pour moitié au déficit de l'absorption du précurseur (-16 %) et pour moitié à une éventuelle dilution (-17 %) de la radioactivité absorbée dans l'acide caféique inerte préalablement incorporé à la feuille.

La part de déficit de la radioactivité spécifique de l'acide chlorogénique due à la dilution de la radioactivité du précurseur marqué dans l'acide cinnamique inerte de « piégeage » peut être évaluée à 39 %, celle correspondant à l'acide p-coumarique inerte de « piégeage », serait de 51 % (tableau I); si le précurseur L-phénylalanine-[14C], après s'être transformé en acide cinnamique puis en acide p-coumarique, passait entièrement par la molécule d'acide caféique, avant d'être incorporée dans la molécule d'acide chlorogénique, la part de ce déficit devrait encore augmenter vraisemblablement jusque vers 63 % et devrait, en tout cas, dépasser 51 %; or elle n'est égale qu'à 17 %.

On peut conclure de ces faits que seule une fraction de la radioactivité fournie passe par l'étape de l'acide caféique; ces résultats suggèrent alors que la dernière étape de la formation de l'acide chlorogénique chez le caféier peut se produire selon deux modalités :

- a) La première, court-circuitant l'acide caféique, passe par le depside p-coumaryl-quinique, puis donne le depside caféyl-3 quinique ou acide chlorogénique, il y a estérification avant la deuxième hydroxylation; l'acide caféique libre ne se trouve pas alors sur la voie de biosynthèse conduisant à l'acide chlorogénique, sa présence en tant que « substance de piégeage » ne diminue pas la radioactivité spécifique finale du depside chlorogénique.
- b) La seconde passe, au contraire, par l'acide caféique; il y a hydroxylation de l'acide p-coumarique en acide caféique, puis estérification de ce dernier avec l'acide quinique; dans ce cas, la surcharge en acide caféique inerte provoque une dilution de la radioactivité de la phénylalanine; les activités spécifiques de l'acide chlorogénique, pour les diverses durées de métabolisation, diminuent et se situent vraisemblablement à des niveaux comparables ou un peu inférieurs à ceux des deux cas précédents (fig. 2, II et III).

Les radioactivités spécifiques terminales du depside chlorogénique, que l'on enregistre réellement ici (fig. 2, IV; tableau I), correspondent au mélange des acides chlorogéniques provenant de ces deux modes de production. Les deux modalités décrites ci-dessus paraissent donc fonctionnelles et concurrentielles chez le caféier; toutefois, les radioactivités spécifiques finales du cas nº IV se rapprochant de celles du cas nº I, la voie de biosynthèse ne passant pas par l'acide caféique serait probablement préférentielle.

Notons par ailleurs que les radioactivités spécifiques de l'acide férulyl-quinique, déterminées dans une autre expérience (Colonna, 1986), se rapprochent de celles de l'acide chlorogénique; on peut admettre, comme hypothèse de travail, que la biosynthèse de ce dernier composé se fait par méthylation de l'acide chlorogénique et non par estérification de l'acide férulique avec l'acide quinique.

CONCLUSION

Cette série d'expériences met en évidence plusieurs faits.

- Les tissus foliaires du caféier synthétisent l'acide chlorogénique à partir de la phénylalanine; cette biosynthèse représente une orientation privilégiée de cet acide aminé aromatique.
 - Le rythme de cette biosynthèse paraît rapide.
 - Il y a renouvellement actif du depside chlo-

rogénique, dont la demi-vie dans la feuille de caféier peut être estimée à environ une quarantaine d'heures.

- Les acides cinnamique et p-coumarique se succèdent comme précurseurs de l'acide chlorogénique, se situant entre la phénylalanine et ce composé:
 - La première hydroxylation de la «fraction

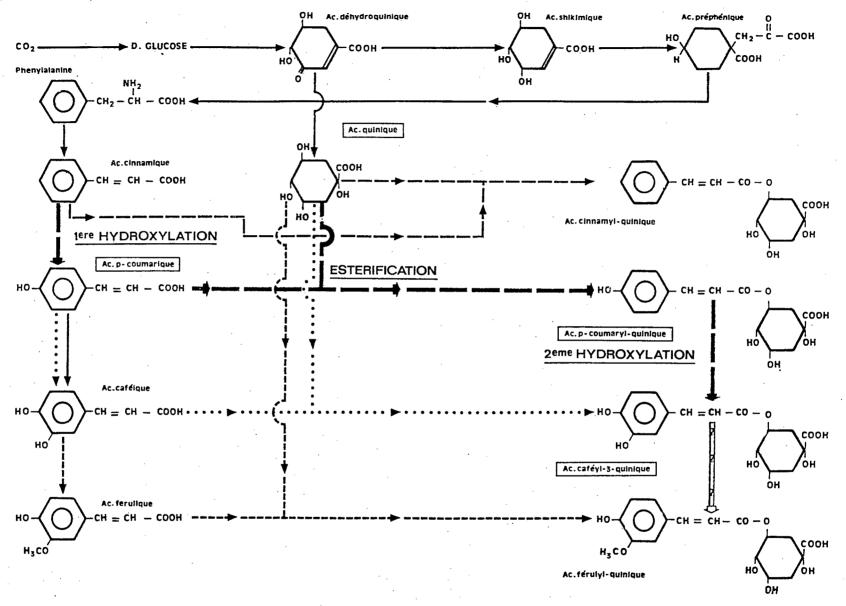


Fig. 3. — Schéma rendant compte de la biosynthèse de l'acide chlorogénique dans les tissus foliaires du caféier Excelsa. — voie connue; — voie fonctionnelle et préférentielle chez le caféier; — voie existant vraisemblablement chez le caféier; — voie hypothétiques

cinnamique » du depside précède l'estérification avec la partie quinique.

- L'estérification a lieu entre l'acide p-coumarique et l'acide quinique, elle donne transitoirement le depside p-coumaryl quinique.
- Ce dernier composé est hydroxylé ensuite en depside caféyl-quinique, c'est-à-dire en acide chlorogénique.

Cette voie de biosynthèse, où l'estérification prend place entre les deux hydroxylations lors des étapes finales de la biosynthèse de l'acide chlorogénique, est fonctionnelle et paraît préférentielle chez le caféier (fig. 3, p. 255).

- Une seconde voie, passant par l'acide caféique, est probablement aussi fonctionnelle mais secondaire chez cette plante : l'estérification y succède aux deux hydroxylations.
- La voie au cours de laquelle l'estérification en acide cinnamyl-quinique précéderait les deux hydroxylations n'existe normalement pas chez le caféier.

BIBLIOGRAPHIE

ALIBERT (G.), RANJEVA (R.), BOUDET (A. M.). — Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 15, nº 2, 1977, p. 279-301

nº 2, 1977, p. 279-301.

BARTLETT (D.), POULTON (J. E.), BUTT (V. S.). —

Hydroxylation of p-coumaric acid by illuminated chloroplasts from spinach beet leaves. FEBS Letters (Amsterdam), 23, 1972, p. 265-267.

BENVENISTE (I.), DURST (F.). — Mise en évidence dans les

BENVENISTE (I.), DURST (F.). — Mise en évidence dans les tissus de tubercules de topinambour (Helianthus tuberosus L., var. blanc commun) d'une enzyme à cytochrome p-450, l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase (= CAH). Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris), 278, 1974, p. 1487-1490.

BOUDET (A. M.). — Les acides quinique et shikimique et leur métabolisme chez les végétaux supérieurs. Thèse de Doctorat d'Etat-ès-Sciences, Université de Toulouse, 1972, 276 p.

1972, 276 p.

BOUDET (A. M.), COLONNA (J. P.). — Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations nycthémérales et synthèse à partir de ¹⁴CO₂ des acides quinique et shikimique dans les feuilles de Quercus pedunculata Ehrh. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris), vol. 266, 1968, p. 2256-2259.

COLONNA (J. P.). — Sur une méthode de séparation et de

COLONNA (J. P.). — Sur une méthode de séparation et de dosage des acides monocaféoyl-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.). — Sur la formation d'un complexe « depsides-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, nº 3, 1977a, p. 253-256.

COLONNA (J. P.). — Transestérifications et condensations

COLONNA (J. P.). — Transestérifications et condensations concernant les depsides; le complexe « depsidescaféine »; implications méthodologiques pour l'étude des depsides des caféiers. Annales de l'Université de Madagascar, Série Sciences de la Nature et Mathématiques (Tananarive), 14, 1977b, p. 239-251.

tiques (Tananarive), 14, 1977b, 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 (Distribution, Variations, Biosynthèse). Thèse de Doctorat d'Etat-ès-Sciences (spécialité biologie et physiologie végétale-biochimie et biologie appliquée), Université Paul Sabatier, Toulouse, 20 oct. 1978, 173 p. et Travaux et Documents de l'ORSTOM (Paris), nº 102, 1979, 210 p.

COLONNA (J. P.). — Biosynthèse et renouvellement de l'acide chlorogénique et des depsides voisins dans le genre Coffea. I. Incorporation du ¹⁴CO₂ dans les depsides des feuilles de caféiers Arabica et Robusta. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXX, n°.2, avril-juin 1986, p. 83-92.

DAVIS (B. D.). — Intermediates in aminoacid biosynthesis.

Advances in Enzymology (New York), 16, 1955, p. 247-312

FLEURIET (A.), MACHEIX (J.-J.). — Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 24, no 5, 1985, p. 929-932.

GAMBORG (O. L.). — Aromatic metabolism in plants. IV. The interconversion of shikimic acid and quinic acid by enzymes from plant cell cultures. *Phytochemistry* (Oxford), 6, 1967a, p. 1067-1073.
 GAMBORG (O. L.). — Aromatic metabolism in plants. V. The

GAMBORG (O. L.). — Aromatic metabolism in plants. V. The biosynthesis of chlorogenic acid and lignin in potato cell cultures. Canadian Journal of Biochemistry (Ottawa), 45, 1967b, p. 1451-1457.
 GAMBORG (O. L.), KEELEY (F. W.). — Aromatic metabo-

GAMBORG (O. L.), KEELEY (F. W.). — Aromatic metabolism in plants. I. A study of the prephenate dehydrogenase from bean plants. *Biochimica et Biophysica Acta* (Amsterdam), 115, 1966, p. 65-72.

HANSON (K. R.). — Chlorogenic acid biosynthesis. Chemical synthesis and properties of the mono-cinnamoyl-quinic acids. Biochemistry (Washington), vol. 4, nº 12, 1965, p. 2719-2730.
HANSON (K. R.). — Chlorogenic acid biosynthesis. Relation-

HANSON (K. R.). — Chlorogenic acid biosynthesis. Relationship between the chemical structure of cinnamoyl and hydroxy-cinnamoyl conjugates and Rcg values from gradients chromatography. *Biochemistry* (Washington), vol. 4, no 12, 1965, p. 2731-2735.

HANSON (K. R.). — Chlorogenic acid biosynthesis. Incorporation of ¹⁴C-cinnamic acid into the cinnamoyl and hydroxy-cinnamoyl conjugates of the potato tuber. *Phytochemistry* (Oxford), vol. 5, 1966, p. 491-499. HANSON (K. R.), ZUCKER (M.). — The biosynthesis of

HANSON (K. R.), ZUCKER (M.). — The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. Chromatographic separation and characterization. The Journal of Biological Chemistry (Baltimore), vol. 238, no 3, 1963, p. 1105-1115.

HASEGAWA (M.), HIGUCHI (T.), ISHIKAWA (H.). — Formation of lignin in tissue culture of *Pinus strobus*. *Plant and Cell Physiology* (Tokyo), 1, 1960, p. 173-182.

Plant and Cell Physiology (Tokyo), 1, 1960, p. 173-182.
KOJIMA (M.), VILLEGAS (R. J. A.). — Detection of enzyme in sweet potato root which catalyzes trans-esterification between 1-0-p-coumaroyl D-glucose and D-quinic acid. Agricultural and Biological Chemistry (Tokyo), vol. 48, no 9, 1984, p. 2397-2399.

KOUKOL (J.), CONN (E. E.). — The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum*

vulgare. The Journal of Biological Chemistry (Baltimore), 236, 1961, p. 2692-2698.

KOUMBA-KOUMBA (D.), MACHEIX (J.-J.). — Biosynthesis of hydroxy-cinnamic derivatives in apple fruit cell suspension culture. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 20, nº 2, 1982, p. 137-142. LEVY (C. C.), ZUCKER (M.). — Cinnamyl and p-coumaryl

esters as intermediates in the biosynthesis of chloro-

genic acid. *The Journal of Biological Chemistry* (Baltimore), 235, 1960, p. 2418-2425. (T.), KREUZALER (F.), HAHLBROCK (K.).— Synthesis of p-coumaroyl coenzyme A with a partially purified p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of soybean (Glycine max). Biochemica et Biophysica Acta (Amsterdam), 302, 1973, p. 457-464.

McCALLA (D. R.), NEISH (A. C.). — Metabolism of phenylpropanoid compounds in Salvia I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology (Ottawa), 37, 1959, p. 531-

MACHEIX (J.-J.), IBRAHIM (R. K.). — The O-methyltransferase system of apple fruit cell suspension culture. Biochemie und Physiologie der Pflanzen (Iéna), vol. 179,

Biochemie und Physiologie der Pjunzen (1611a), vol. 172, 1984, p. 659-664.

MINAMIKAWA (T.). — Quinate: NAD oxidoreductase of germinating Phaseolus mungo seeds: partial purification and some properties. Plant and Cell Physiology (Tokyo), 18, 1977, p. 743-752.

MINAMIKAWA (T.), URITANI (I.). — 3-deoxy-D-arabinoheptulosonic-acid-7-phosphate-synthase in sweet potato roots. Journal of Biochemistry (Tokyo), 61, 1967, p. 367, 372 p. 367-372. MITSUHASHI (S.), DAVIS (B. D.). — Aromatic biosynthe-

sis. XIII: conversion of quinic acid to 5-dehydroquinic acid by quinic dehydrogenase. Biochimica et Biophysica Acta (Amsterdam), 15, 1954, p. 268-280.

NEISH (A. C.). — Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. Phytochemistry (Oxford), vol. 1, 1961,

RANJEVA (R.). - La biosynthèse des dérivés hydrocinnamiques chez Petunia hydrida: un exemple de diversification biochimique. Thèse de Doctorat d'Etat-ès-Sciences, Université Paul Sabatier, Toulouse, 1978,

RANJEVA (R.), FAGGION (R.). - Métabolisme des composés phénoliques des tissus de pétunia. III. Mise en évidence des étapes enzymatiques conduisant à partir de la phénylalanine à un des monomères primaires des lignines: l'alcool coniferylique. *Physiologie Végétale* (Paris), vol. 13, nº 4, 1975, p. 735-742. RANJEVA (R.), FAGGION (R.), BOUDET (A. M.). — Méta-

bolisme des composés phénoliques des tissus de pétunia. II. Etude du système enzymatique d'activation des acides cinnamiques. Mise en évidence de deux formes de la « cinnamoyl-coenzyme A ligase ». Phy-

siologie Végétale (Paris), vol. 13, nº 4, 1975, p. 725-734.
ROHRINGER (R.), FUCHS (A.), LUNDERSTADT (J.),
SAMBORSKI (D. J.). — Metabolism of aromatic

COLONNA (J. P.). — Biosynthèse et renouvellement de l'acide chlorogénique et des depsides voisins dans le genre Coffea. II. Incorporation de la radioactivité de la L-phénylalanine-[14C] dans l'acide chlorogénique des feuilles de caféier, en présence ou non de compétiteurs isotopiques. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXX, nº 4, oct.-déc. 1986, p. 247-258, 3 fig., 1 tabl., 49 réf.

La biosynthèse de l'acide chlorogénique constitue une destination privilégiée de la L-phénylalanine-[14C] dans les tissus foliaires du caféier Excelsa, puisque plus de douze parties pour cent de cet acide aminé aromatique se trouvent incorporées dans le depside en 2 à 4 h. Ce dernier point souligne d'ailleurs le rythme rapide de l'incorporation.

compounds in healthy and rust infected primary leaves wheat. I. Studies with ¹⁴CO₂, quinate U¹⁴C and shikimate U¹⁴C as precursors. Canadian Journal of Botany (Ottawa), 45, 1967, p. 863-889.

RUNECKLES (V. C.). — Tobacco polyphenols. II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. Canadian Journal

of Biochemistry and Physiology (Ottawa), 41, 1963,

p. 2249-2258.
SADO (R.), KOSUGE (T.). — The conversion of 3-Deoxyara-binoheptulosonate-7-Phosphate to 3-Dehydroquinate by Sorghum seedling preparations. Phytochemistry (Oxford), 17, 1978, p. 223-225.

SHIMIZU (T.), KOJIMA (M.). — Partial purification and characterization of UDPG: t-cinnamate glucosyltransferase in the root of sweet potato Ipomæa batatas Lam. Journal of Biochemistry (Tokyo), 95, 1984, p. 205-212.

STECK (W.). — Metabolism of cinnamic acid in plants : chlorogenic acid formation. Phytochemistry (Oxford), vol. 7,

1968, p. 1711-1717. STOCKIGT (J.), ZENK (M. H.). — Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. FEBS Letters (Amsterdam), vol. 42, no 2, 1974, p. 131-134.

SUZICH (J. A.), RANJEVA (R.), HASEGAWA (P. M.), HERR-MANN (K. M.). -- Regulation of the shikimate pathway of carrot cells in suspension culture. Plant Physiology (New York), 75, 1984, p. 369-371

SZYMANSKI (C. D.). — I. Some studies of the chlorogenic acids. II. An attempt to detect quinic dehydrogenase in quinic acid containing plants. Ph. D. Thesis, State Univ. Syracuse, 1962.

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, no 1, 1985, p. 263-265.

WALTON (E.), BUTT (V. S.). — The activation of cinnamate by an enzyme from leaves of spinach beet (Beta vulgaris

by an enzyme from leaves of spinach beet (Beta vulgaris L. ssp. vulgaris). Journal of Experimental Botany (Londres), vol. 21, no 69, 1970, p. 887-891.

WEINSTEIN (L. H.), PORTER (C. A.), LAURENCOT Jr (H. 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.

WHISTANCE (G. R.), THRELFALL (D. R.). — Incorporation of shikimic acid into isoprenoid quinones and chromanols by maize shoots. Phytochemistry (Oxford), 10, 1971, p. 1533-1538

1971, p. 1533-1538.

YANIV (H.), GILVARG (C.). — Aromatic biosynthesis. XIV. 5-dehydroshikimic reductase. The Journal of Biological Chemistry (Baltimore), 213, 1955, p. 787-795.

- Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plants. Annual Review of Plant Physio-

logy (Palo Alto), 20, 1969, p. 41-62. YOSHIDA (S.), TAZAKI (T.), MINAMIKAWA (T.). — Occurence of shikimic and quinic acids in Angiosperms. Phytochemistry (Oxford), 14, 1975, p. 195-197.

COLONNA (J. P.). — Biosynthesis and renewal of chlorogenic acid and related depsides in the genus Coffea. II. Incorporation of the radioactivity of L-phenylalanine-[14C] in the chlorogenic acid of coffee tree leaves in the presence or absence of isotopic competitors. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXX, nº 4, oct.-déc. 1986, p. 247-258, 3 fig., 1 tabl., 49 réf.

The biosynthesis of chlorogenic acid is one of the favoured destination of L-phenylalanine-[14C] in the foliar tissues of the Excelsa coffee tree since more than a dozen parts per cent of this aromatic amino-acid are incorporated in the depside in two to four hours. This latter point moreover underlines its rapid incorporation Il faut une période d'environ 96 h, soit quatre jours, pour renouveler entièrement le « pool » chlorogénique de la feuille de caféier : ceci confirme la rapidité de la biosynthèse et de l'utilisation de ce composé ainsi que sa participation active au métabolisme.

L'emploi de compétiteurs isotopiques inertes de la phénylalanine marquée montre que les dernières étapes de cette biosynthèse se poursuivent préférentiellement chez le caféier de la façon indiquée ci-après:

— la phénylalanine est désaminée en acide cinna-

mique;

- l'acide cinnamique est hydroxylé en acide p-cou-

marique (Première hydroxylation);

— l'acide p-coumarique s'estérifie avec l'acide quinique pour donner le depside p-coumaryl-quinique (Estérification);

— ce dernier est ensuite hydroxylé en acide cafèyl-3 quinique ou depside chlorogénique (Deuxième hydroxy-

ation).

Une voie secondaire existe vraisemblablement chez le caséier au cours de laquelle les deux hydroxylations successives de l'acide cinnamique en acide p-coumarique puis en acide caséique précéderaient l'estérissication entre l'« unité cinnamique » et l'acide quinique.

COLONNA (J. P.). — Biosynthese und Erneuerung der Chlorogensäure und verwandter Depside in der Spezies Coffea. II. Einbringung der Radioaktivität von L-Phenylalanin-[14C] in die Chlorogensäure der Kaffeebaumblätter in Gegenwart isotoper Konkurrenten beziehungsweise ohne dieselben. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXX, no 4, oct.-déc. 1986, p. 247-258, 3 fig., 1 tabl., 49 réf.

Die Biosynthese der Chlorogensäure ist eine bevorzugte Endstation von L-Phenylalanin-[14C] im Blattgewebe des Kaffeebaums Excelsa, da mehr als zwölf Prozentteile der genannten, aromatischen Aminosäure innerhalb von zwei bis vier Stunden in das Depsid eingearbeitet werden. Dies ist Beweis für die Geschwindigkeit des Einarbeitungsprozesses.

Zur vollständigen Erneuerung der Chlorogenreserve des Kaffeebaumblatts sind ungefähr 96 Stunden beziehungsweise vier Tage notwendig, was die rasche Biosynthese und Verwertung sowie aktive Beteiligung der

Komponente am Stoffwechsel bestätigt.

Der Einsatz inerter, isotoper Konkurrenten des markierten Phenylalanins ist Beweis dafür, dass die letzten Stadien der Biosynthese beim Kaffeebaum vorzugsweise wie folgt verlaufen:

- Phenylalanin wird zu Zimtsäure desaminiert:

 Zimtsäure wird zu p-Kumarinsäure hydroxyliert (Erste Hydroxylierung);

- p-Kumarinsäure verestert mit Chininsäure und ergibt Chinin-p-Kumaryl-Depsid (Veresterung);

 letzteres wird in der Folge zu Cafeyl-3-Chininsäure oder Chlorogen-Depsid hydroxyliert (Zweite Hydroxylierung).

Beim Kaffeebaum gibt es wahrscheinlich einen zweiten Weg, auf dem die beiden aufeinanderfolgenden Hydroxylierungen der Zimtsäure zu p-Kumarinsäure und Kaffeesäure der Veresterung der «Zimteinheit» mit Chininsäure vorausgehen.

About 96 hours, that is four days, are required for the complete renewal of the chlorogenic « pool » of the coffee tree leaf, which confirms the rapidity of the biosynthesis and the utilisation of this compound, as well as its active participation in metabolism.

The utilisation of inert isotopic competitors of labelled phenylalanine shows that the last stages of this biosynthesis in the coffee tree preferentially take place as

follows:

- the phenylalanine is disaminated into cinnamic acid;

- the cinnamic acid is hydroxylated into p-coumaric acid (First hydroxylation);

— the p-coumaric acid is esterified with the quinic acid yielding p-coumaryl-quinic depside (Esterification);

— this latter compound is then hydroxylated into 3-cafeyl-quinic acid or chlorogenic depside (Second hydroxylation).

A secondary pathway probably exists in the coffee tree during which the two successive hydroxylations of cinnamic acid into p-coumaric acid and then cafeic acid might precede the esterification between the « cinnamic unit » and the quinic acid.

COLONNA (J. P.). — Biosíntesis y renovación del ácido clorogénico y de los dépsidos cercanos en el género Coffea. II. Incorporación de la radiactividad de la Lfenilalanina-[14C] en el ácido clorogénico de las hojas del cafeto, en presencia o no de competidores isotópicos. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXX, nº 4, oct.-déc. 1986, p. 247-258, 3 fig., 1 tabl., 49 réf.

La biosíntesis del ácido clorogénico constituye un destino privilegiado de la L-fenilalanina-[14C] en los tejidos foliares del cafeto Excelsa, puesto que más de doce partes por ciento de este ácido aminado aromático se encuentran incorporadas en el dépsido en un lapso de dos a cuatro horas. Este último punto permite hacer resaltar, por otra parte, el ritmo rápido de la incorporación.

Es preciso que transcurra un periodo de unas 96 h, o sea, cuatro días para renovar totalmente el « pool » clorogénico de la hoja de cafeto : esto viene a confirmar la rapidez de la biosíntesis y de la utilización de este compuesto, así como su participación activa en el metabolismo.

El empleo de competidores isotópicos inertes de la fenilalanina marcada muestra que las últimas etapas de esta biosíntesis se prosiguen de forma preferente en el cafeto, según la forma que se indica a continuación:

la fenilalanina se desamina en ácido cinámico;
— el ácido cinámico se hidroxila en forma de ácido

p-cumárico (Primera hidroxilación);

— el ácido p-cumárico se esterifica con el ácido quínico para dar el dépsido p-cumaril-quínico (Esterificación);

— acto seguido este último se hidroxila en forma de ácido cafeil-3-quínico o dépsido clorogénico (Segunda hidroxilación).

Existe, verosímilmente, una vía secundaria en el caso del cafeto, durante el transcurso de la cual las dos hidroxilaciones sucesivas del ácido cinámico en ácido pcumárico y a continuación en ácido cafeíco parecen anteponerse a la esterificación entre la « unidad cinámica » y el ácido quínico.