

**contribution
à l'étude des acides mono-caféyl-quiniques
et de leur biosynthèse
chez les végétaux supérieurs**

J.P. COLONNA* - A. BOUDET**

A côté de l'acide chlorogénique, le plus connu d'entre eux, les composés organiques désignés sous le nom de depsides attirent, plus particulièrement depuis une décennie, l'attention des chercheurs :

- une grande diversité et une présence assez générale de ces composés ont été récemment mises en évidence chez les plantes;
- leur inventaire chez les végétaux supérieurs doit être complété;
- leur signification biologique et leur biosynthèse posent de nombreux problèmes;
- leurs effets physiologiques sur l'organisme humain ou animal, leurs propriétés pharmacologiques, leur intervention dans la coloration de diverses productions végétales et peut-être leur implication dans les mécanismes de résistance aux agressions, leur confèrent un intérêt pratique et économique non négligeable.

Nous avons abordé ici l'étude de la biosynthèse des depsides mono-caféyl-quiniques chez le caféier, en suivant sur des feuilles entières l'incorporation dans ces composés de la radio-activité de leurs précurseurs : acides quinique et cinnamique.

Ceci a nécessité au préalable, la préparation biologique d'acide quinique marqué au laboratoire.

Les résultats tendent à prouver qu'il existe un renouvellement de l'acide chlorogénique dans les tissus foliaires du caféier "*Excelsa*".

Dans les conditions de nos expériences, l'acide quinique est incorporé directement et presque exclusivement dans la molécule d'acide chlorogénique alors que la radio-activité du précurseur cinnamique se retrouve dans plusieurs composés.

En fournissant à chaque feuille de 1,3 à 1,6 μCi de ^{14}C , sous diverses formes, nous avons obtenus, en fonction du temps, des lots d'acide chlorogénique différemment marqués; l'activité spécifique la plus élevée : 35 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ a été atteinte en 8 à 14 heures de métabolisation avec le précurseur cinnamique de haute activité spécifique : 9 000 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$.

* O.R.S.T.O.M. - Centre de Tananarive - B.P. 434 - TANANARIVE - Madagascar

** Centre de Physiologie Végétale - Faculté des Sciences - 118 Route de Narbonne, 31 - TOULOUSE - France

Selon les conditions expérimentales, les rendements maximaux de l'incorporation ont varié de 28 à 40% de la radio-activité absorbée par la feuille.

On doit souligner que si la radio-activité des précurseurs quinique et cinnamique, est incorporée dans la molécule d'acide caféyl-3 quinique (acide chlorogénique) elle l'est proportionnellement beaucoup moins dans les isomères caféyl-4 quinique (acide cryptochlorogénique) et caféyl-5 quinique (acide néochlorogénique) : la biosynthèse du depside caféyl-3 quinique est préférentielle.

INTRODUCTION, INTERET DE CES COMPOSES

STRUCTURE

L'acide chlorogénique (Fig. 1, C) ou depside mono-caféyl-quinique, découvert au siècle dernier par ROBIQUET et BOUTRON dans le grain de *Coffea arabica*, est formé par estérification entre le OH en position 3 de l'acide quinique (Fig. 1, A) et le carboxyle de la chaîne latérale de l'acide caféique (Fig. 1, B) (FREUDENBERG - 1920) (FISCHER et DANGSHAT - 1932).

Au cours de la dernière décennie, l'attention de plusieurs catégories de chercheurs fut sollicitée par ce corps et les composés du même type dont plusieurs existent chez le caféier.

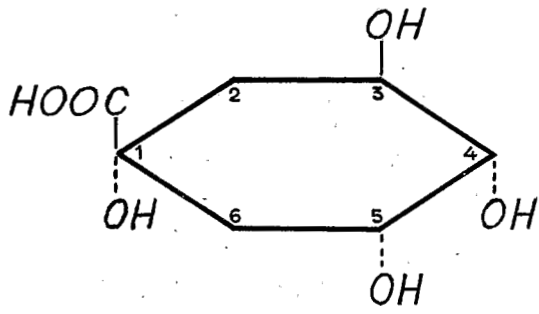
REPARTITION

Tout d'abord, SONDHEIMER en 1964, complétant les travaux de GORTER (1909), de POLIŦIS (1949) et de HERRMAN (1956), confirma la présence de cet acide chez un grand nombre de végétaux et en particulier chez des plantes alimentaires.

ISOMERES

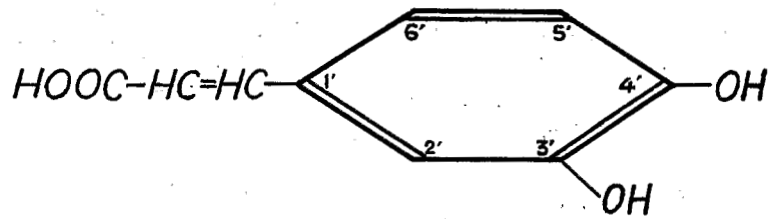
Dans le même temps, la chromatographie sur papier, sur couches minces ou sur colonne permit de séparer plusieurs autres composés du même type à partir d'extraits végétaux. Depuis les travaux de SCARPATI et ESPOSITO en 1964, on sait que l'acide néochlorogénique (CORSE - 1953) est le depside mono-caféyl-5 quinique, alors que le composé "Band 510" de SONDHEIMER (1958) n'est autre que l'acide mono-caféyl-4 quinique, appelé parfois acide cryptochlorogénique. On trouve chez l'artichaut l'acide mono-caféyl-1 quinique (NICHIFORESCO- 1970) auquel certains auteurs attribuent le nom d'acide pseudo-chlorogénique (PARIS et NISHIO - 1970).

L'estérification peut donc se faire sur les différents OH de l'acide quinique. Deux estérifications peuvent se produire sur deux OH d'une même



acide quinique

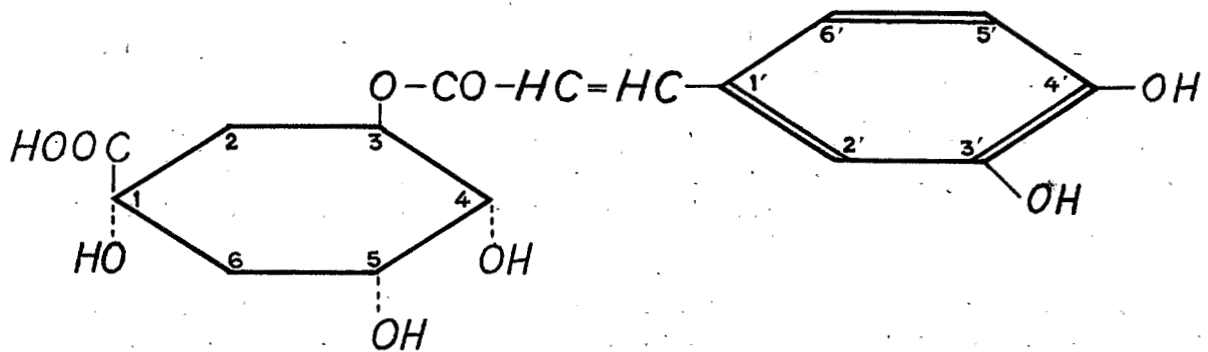
A



acide cafèique

(acide cinnamique dihydroxylè)

B



acide chlorogènique

(Exemple d'acide mono-caffèyl-quinique)

C

Fig : I

molécule d'acide quinique : c'est ainsi que l'acide "isochlorogénique" (BARNES et al. - 1950) est un mélange de depsides di-caféyl-quiniques (Fig. II) (HANSON et ZUCKER - 1963), (SCARPATI et GUISSO - 1964), (CORSE, LUNDIN et WAISS - 1964-1965), (PARIS et al. - 1970).

COMPOSES VOISINS DU MEME TYPE

Le nombre de ces composés s'accroît lorsque l'on sait que l'acide caféique, ou acide cinnamique di-hydroxylé, peut être remplacé par les divers acides et acides phénols de la série cinnamique : l'acide cinnamique lui-même, l'acide p-coumarique et l'acide férulique (Fig. III). Des depsides mono et di-cinnamyl, p-coumaryl et ferulyl-quiniques sont effectivement présents chez les végétaux et en particulier la pomme de terre (LEVY et ZUCKER - 1960), le café (LENTNER et DEATHERRAGE - 1958), (CORSE, SONDEHEIMER et LUNDIN - 1962), le tabac (RUNECKLES - 1963), (STECK - 1968), (TANGUY - 1970), etc...

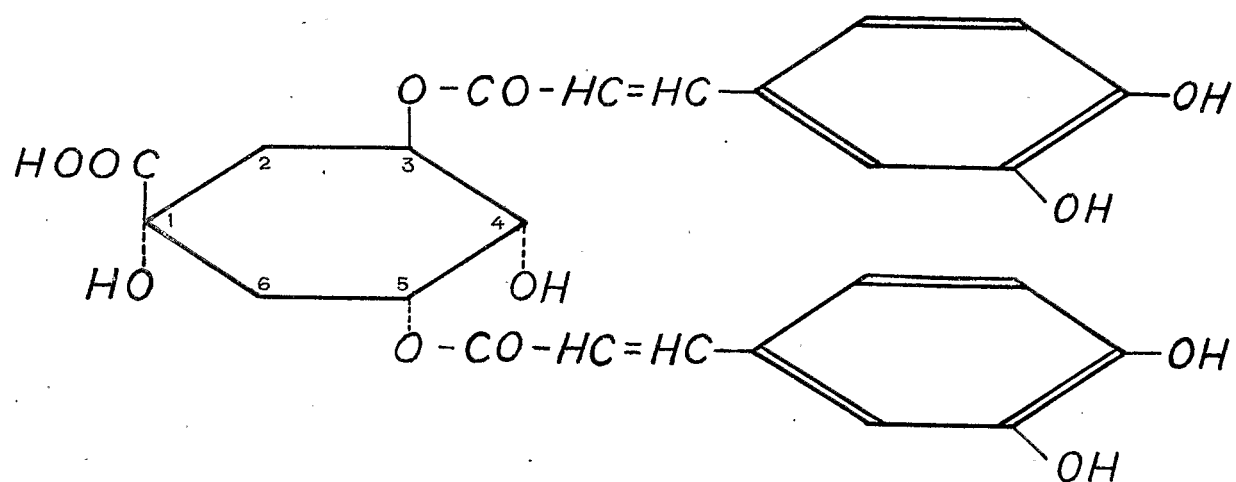
INTERET SCIENTIFIQUE, SIGNIFICATION BIOLOGIQUE (Tableau I)

La mise en évidence de la diversité de ces composés et de leur présence assez générale dans le règne végétal, aurait suffi à susciter l'attention des chercheurs, mais celle-ci fut aussi retenue par leurs propriétés et par les questions que l'on se pose quant à leur signification biologique. On peut se demander en effet, si l'acide chlorogénique ne serait pas :

1. un composé de détoxification, réalisant le blocage de l'acide caféique libre, toxique pour les tissus végétaux;
2. une matière de réserve, car sa présence est courante dans les graines (RUCKENBROD - 1954), (BUTLER - 1960);
3. une substance de croissance, ayant une action propre (VENDRIG et BUFFEL - 1961), (ZENK et MULLER - 1963) ou une action par inhibition de l'AAO-oxydase (NITSCH et al. - 1961), (THIMAN et al. - 1962), (HENDERSON et al. - 1962);
4. un composé intervenant au début des processus de lignification par libération d'acides hydroxy-cinnamiques (GOLDSCHMID et HERGERT - 1961), (HIGUCHI et BROWN - 1963).

On étudie *in vitro* ses effets sur l'activation ou l'inhibition de divers systèmes enzymatiques (HERZMAN - 1957-1959), (KROGMAN et al. - 1962), (SONDEHEIMER - 1964) et l'on devrait examiner ses éventuelles relations avec certains alcaloïdes.

Mais l'un des points les plus remarquables est son intervention, et en particulier son accumulation, chez les végétaux soumis à diverses "agressions" qu'elles soient mécaniques (JOHNSON et SCHALL - 1952), (LIEBERMAN et al. 1959), bactériennes (SEQUEIRA et KELMAN - 1962), cryptogamiques (YU et HAMPTON - 1964), virales (MARTIN - 1958), (TANGUY - 1970) ou d'ordre nutritionnel : par carence, déficience ou déséquilibre minéraux (LOCHE - 1966).

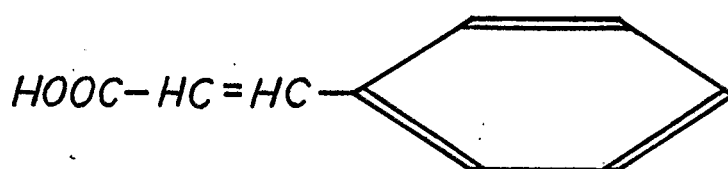


acide cafēyl - 3,5 quinique

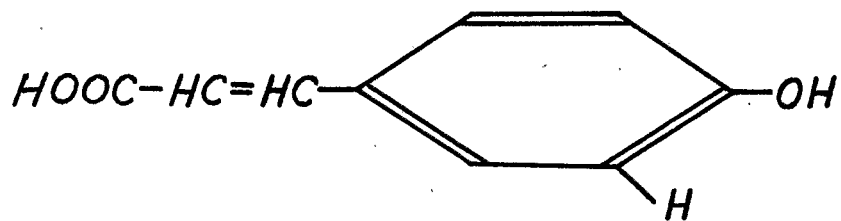
(Exemple d'acide dicafēyl - quinique)

Fig : II

A *acide cinnamique*



B *acide p-coumarique*



C *acide férulique*

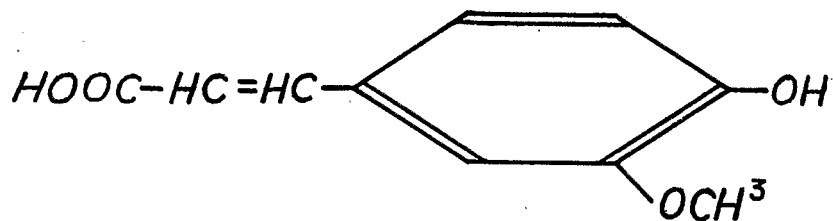
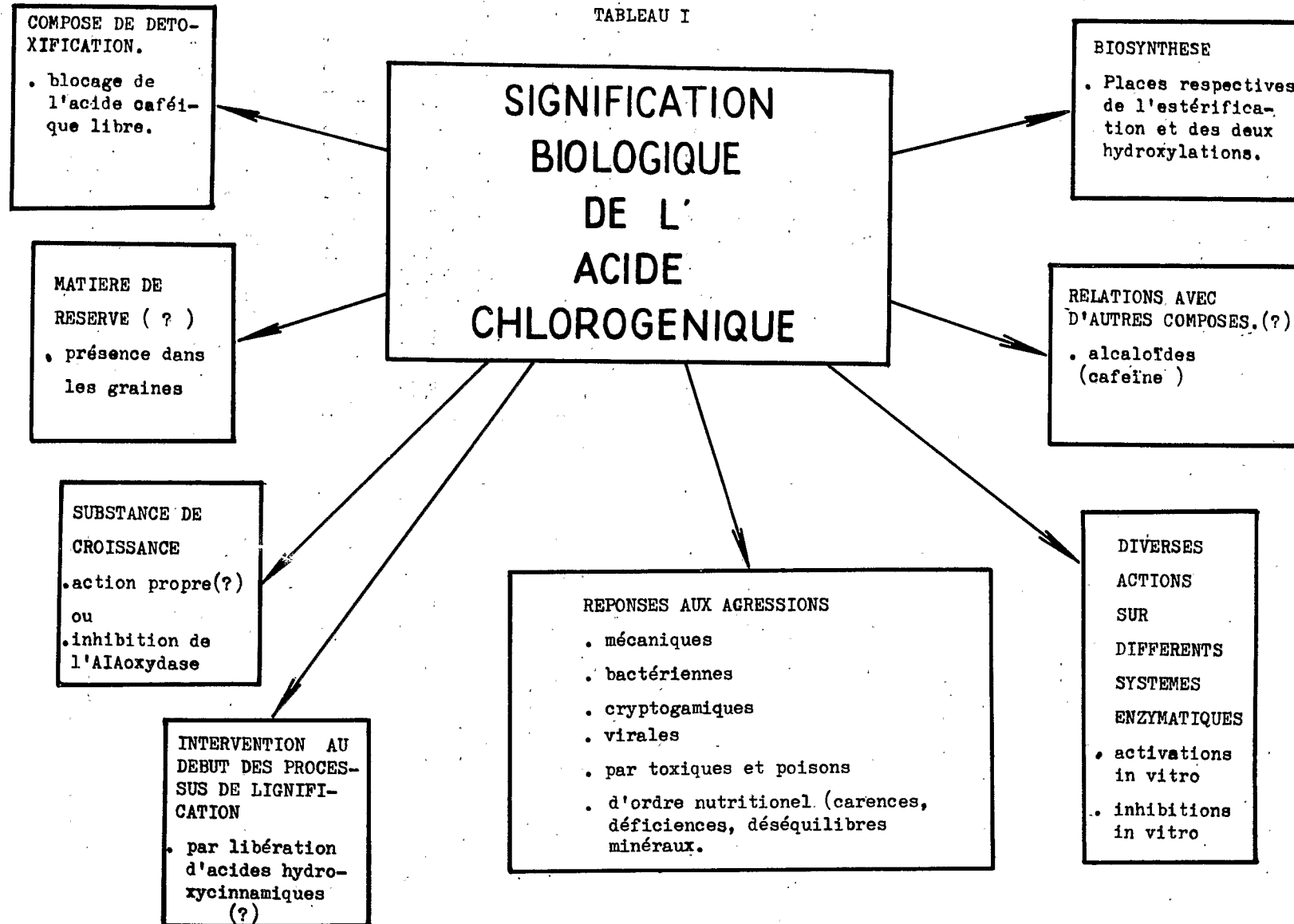


Fig: III

TABLEAU I



INTERET ECONOMIQUE ET PRATIQUE (Tableau II)

Si la préexistence d'acide chlorogénique chez un végétal confère à ce dernier une certaine immunité vis-à-vis des agressions pathogènes l'intérêt pratique de ce composé serait important, mais il semble que l'on ne puisse donner actuellement de réponse définitive sur ce sujet (URITANI - 1961).

Par contre, l'intérêt de l'acide chlorogénique pour ses effets physiologiques et ses propriétés pharmacologiques reste certain.

FREEDMAN et al. (1961) puis SONDHEIMER (1964) discutent d'un pouvoir allergène de l'acide chlorogénique. On évoque aussi une action synergique de celle de la caféine.

Des mises au point récentes (CZOK - 1965), (COLONNA - 1968-1970), (CHASSEVENT - 1969) soulignent les actions diverses de ce composé sur :

- le système respiratoire,
- le système circulatoire,
- le système nerveux central,
- le tube digestif,
- la fixation de certaines protéines.

On sait en particulier qu'il accroît la sécrétion d'acide chlorhydrique par l'estomac, la sécrétion biliaire et le péristaltisme.

VALETTE et al. (1969) et GOUNELLE de PONTANEL et al. (1970) établissent par la recherche de seuils d'électrochoc chez la souris que ce composé a une action stimulante centrale propre, dont le mécanisme serait différent de celle de la caféine.

Par ailleurs, une tasse de 120 ml préparée avec 6 g de café soluble ou moulu contient de 220 à 700 mg d'acide chlorogénique (GOUNELLE de PONTANEL et al. - 1970), qui agirait à des doses de l'ordre de 3 à 4 mg par kilogramme de poids du corps.

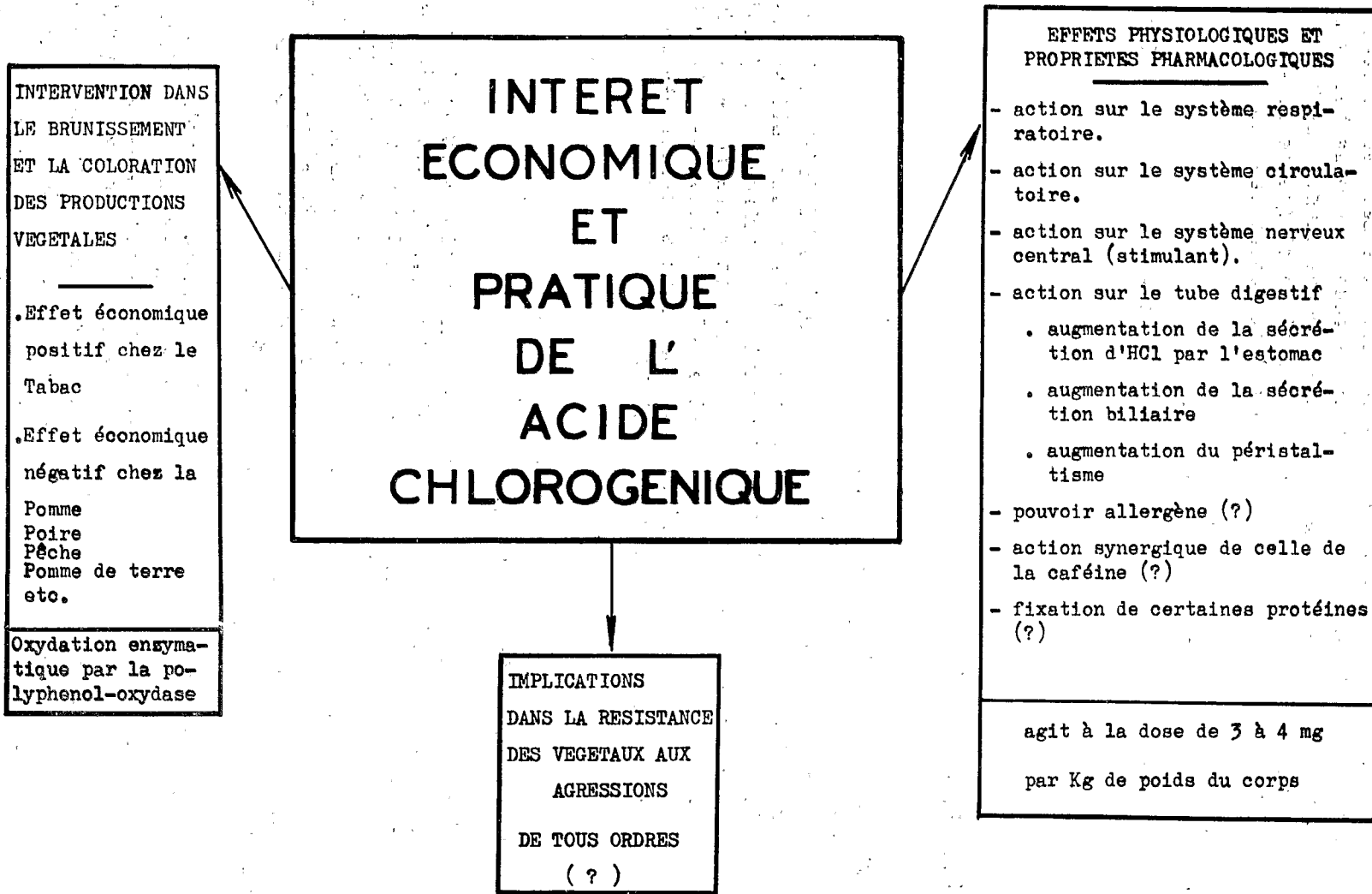
Si l'on tient compte des composés voisins et de la présence probable des depsides dans bien d'autres aliments, on conçoit que le nutritionniste se doit de garder présentes à l'esprit les propriétés physiologiques de ce composé, comme le remarque GOUNELLE de PONTANEL (1970).

La participation de l'acide chlorogénique à la coloration des productions végétales représente un autre aspect de son intérêt économique et pratique.

La coloration brune qu'acquiert le café durant la torréfaction (SONDHEIMER - 1964) ou les feuilles de thé et de tabac au cours de leur préparation, provient en partie de la dégradation de l'acide chlorogénique (ZUCKER et STINSON - 1960), (JACOBSON - 1961).

Cette intervention peut avoir une répercussion économique positive, comme chez le tabac, où la meilleure pigmentation, facteur de la qualité du produit commercial, est obtenue pour les feuilles à forte teneur en acide chlorogénique (WILKINSON et al. - 1954).

Elle peut être moins positive, dans le cas du brunissement des poires (WEURMAN et SWAIN - 1953), des pommes (HENZE - 1956), des pommes de terre



TABEAU II.

(ROGACHEV - 1960) ou des pêches (SONDHEIMER - 1964), etc... qui intervient par action de la polyphenol-oxydase sur les composés phénoliques et particulièrement sur l'acide chlorogénique.

Pour les raisons qui viennent d'être évoquées, il a paru souhaitable d'entreprendre une étude du métabolisme et de la biosynthèse de ces composés chez le caféier. Les expériences dont nous rendons compte visent à vérifier l'incorporation biosynthétique de la radio-activité de divers précurseurs marqués dans les acides mono-caféyl-quiniques des tissus foliaires du caféier. Ceci en vue :

- . d'une part, d'établir leur renouvellement,
- . d'autre part, de préparer biologiquement de l'acide chlorogénique radio-actif.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Nous avons utilisé des plants de *Coffea Dewevrei* de WILDEMAN et DURAND, race *C. excelsa* CHEVALIER. Après germination sur sable humide, alimentation par une solution de Hoagland, puis transplantation sur terreau, les jeunes caféiers atteignaient au moment des expériences le stade quatre paires de feuilles au-dessus des feuilles cotylédonnaires (Figure IV). Les incorporations et dosages concernent les feuilles de rang trois au-dessus des cotylédons, chaque expérience porte sur une feuille.

DOSAGE DES ACIDES MONO-CAFEYL-QUINIQUES

A la fin de l'expérience, on détermine le poids frais de la feuille qui est immédiatement fixée à l'azote liquide puis lyophilisée. Après détermination du poids sec, la feuille est broyée à - 20°C dans du méthanol. L'extraction est achevée, en continu, sous vide, par 200 cm³ du mélange méthanol-acétate d'éthyle (1-1 V/V) puis par 200 cm³ de méthanol seul. Les solvants d'extraction sont saturés en métabisulfite de K et en azote. L'extrait total évaporé à sec, dépigmenté par l'éther de pétrole (PE 35-50) est finalement repris par 2 ml d'éthanol à 70° GL.

A partir d'aliqotes de cette solution d'extraction, la séparation des trois isomères mono-caféyl-quiniques s'obtient dans de bonnes conditions (COLONNA - 1968) par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 3 préalablement imprégné de tampon phosphate 0,067 M de PH 7,5 (MARTIN - 1959). Les deux migrations successives, descendantes et à front perdu sont réalisées au moyen du solvant n-butanol, acide acétique, eau (4-1-5, V/V) durant 11 à 14 heures, pour la première dimension, puis du solvant méthylisobutylcétone, acide formique, eau (3-1-2, V/V) durant 5 heures, pour la deuxième dimension.

La zone utile du chromatogramme comporte quatre "spots" principaux (Fig. V). Le spot c correspond à l'acide chlorogénique, on l'identifie par

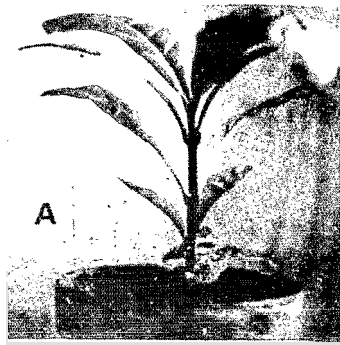


Fig.IV : Jeunes caféiers "excelsa" utilisés
pour ces expériences

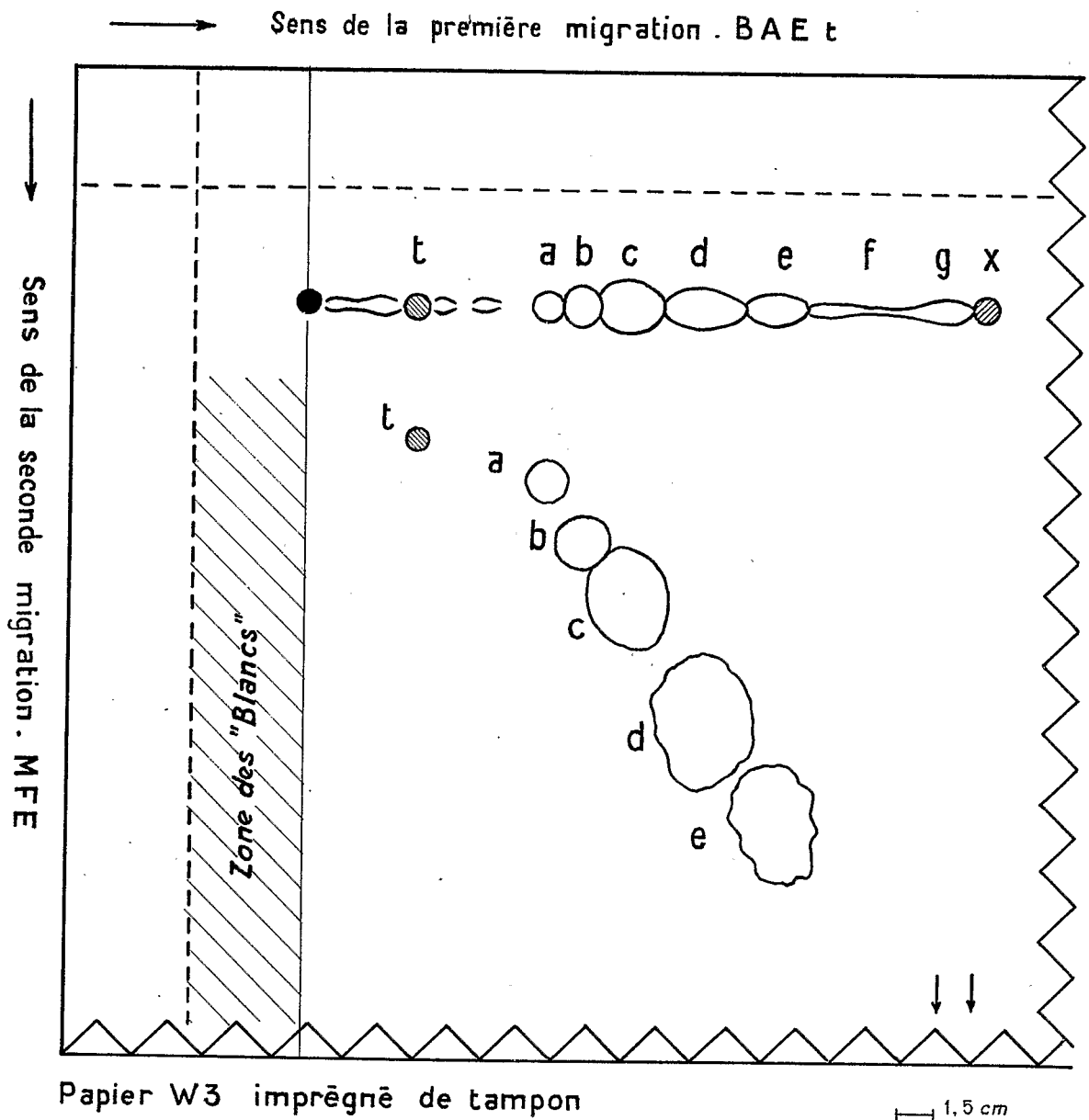


FIG. V - CARTE CHROMATOGRAPHIQUE PARTIELLE DES COMPOSES FLUORESCENTS OU REVELES EN LUMIERE U.V. CONTENUS DANS UN EXTRAIT ALCOOLIQUE DE FEUILLES DE CAFEIER.

- 0 : dépôt initial
- t : trigonelline
- a : ac. néochlorogénique
- b : ac. cryptochlorogénique
- c : ac. chlorogénique
- d : ac. férulyl-quinique
- x : caféine

rapport à un témoin du commerce (Fluka), par sa fluorescence bleue-pâle caractéristique en lumière de 350-366 m μ , par son spectre d'absorption dans l'UV (Figure VI), par les produits que l'on obtient après hydrolyse basique sous azote : à savoir, l'acide quinique et l'acide caféique.

Les spots a et b présentent les mêmes caractéristiques (Figure VI) que le composé c, mais des R_f inférieurs (*); la comparaison de ces R_f avec les résultats d'autres auteurs (JEAN et REID - 1959), (MARTIN - 1959), (LOCHE - 1966) permet d'identifier le composé a à l'acide néochlorogénique (depside caféyl-5 quinique) et le composé b à l'acide crytochlorogénique (depside caféyl-4 quinique). L'hydrolyse basique de ces composés libère aussi de l'acide quinique et de l'acide caféique établissant qu'il s'agit bien de depsides caféyl-quiniques.

Le "spot" d correspond à un composé ferulyl-quinique.

Le dosage s'effectue ici par spectrophotométrie dans l'U.V. à 328 m μ . Cinquante ou cent microlitres de l'extrait végétal sont déposés, sur papier Whatman n° 3 tamponné, à l'aide d'une micropipette de Marburg. Après séparation chromatographique, séchage et découpage des "spots" correspondant aux acides mono-caféyl-quiniques, repéré en lumière de 350 à 366 m μ , on procède à l'éluat par l'éthanol à 70° GL. On effectue la détermination de la densité optique (D.O.) sur une aliquote de cet éluat, après filtration rapide sur laine de verre et par rapport à un blanc élué du chromatogramme. Le dosage est alors réalisé par référence à une courbe étalon établie à partir d'acide chlorogénique pur du commerce, traité comme précédemment. La relation entre la D.O. et la concentration en acide chlorogénique est linéaire entre 0 et 20 μ g/ml (Loi de Beer-Lambert) (Figure VII).

PRECURSEURS RADIO-ACTIFS

L'acide cinnamique 3-¹⁴C (9 mCi/mM) provient du CEA (lot 1067-1068).

L'acide quinique U-¹⁴C (95 μ Ci/mM) a été obtenu au laboratoire par synthèse biologique selon la technique dont nous rendons compte ci-après au chapitre "Résultats" (BOUDET - 1967).

CONDITIONS DES INCORPORATIONS - MESURES DE LA RADIO-ACTIVITE

Chacune des incorporations se déroule dans une enceinte ventilée, sous un éclairage de 6 000 lux, à une température de 25 à 28°C. Chaque feuille plonge par son pétiole dans un microréceptacle élargi en V, contenant tout d'abord 50 à 70 μ l de solution radio-active, puis l'eau distillée de rinçage (3 fois 50 μ l environ). A la fin de la période d'absorption uniformément

(*) Pour le calcul des R_f, les migrations ne se font pas à front perdu, et durant moins longtemps que lors des séparations en vue du dosage.

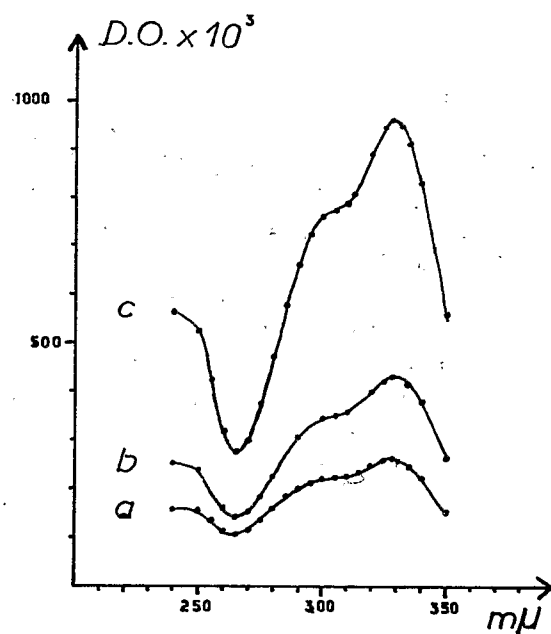


Fig.VI : Spectres U.V. des composés a, b et c dans les proportions approximatives où ils sont présents dans les grains et les feuilles de caféier (a : acide néochlorogénique, b : acide cryptochlorogénique, c : acide chlorogénique)

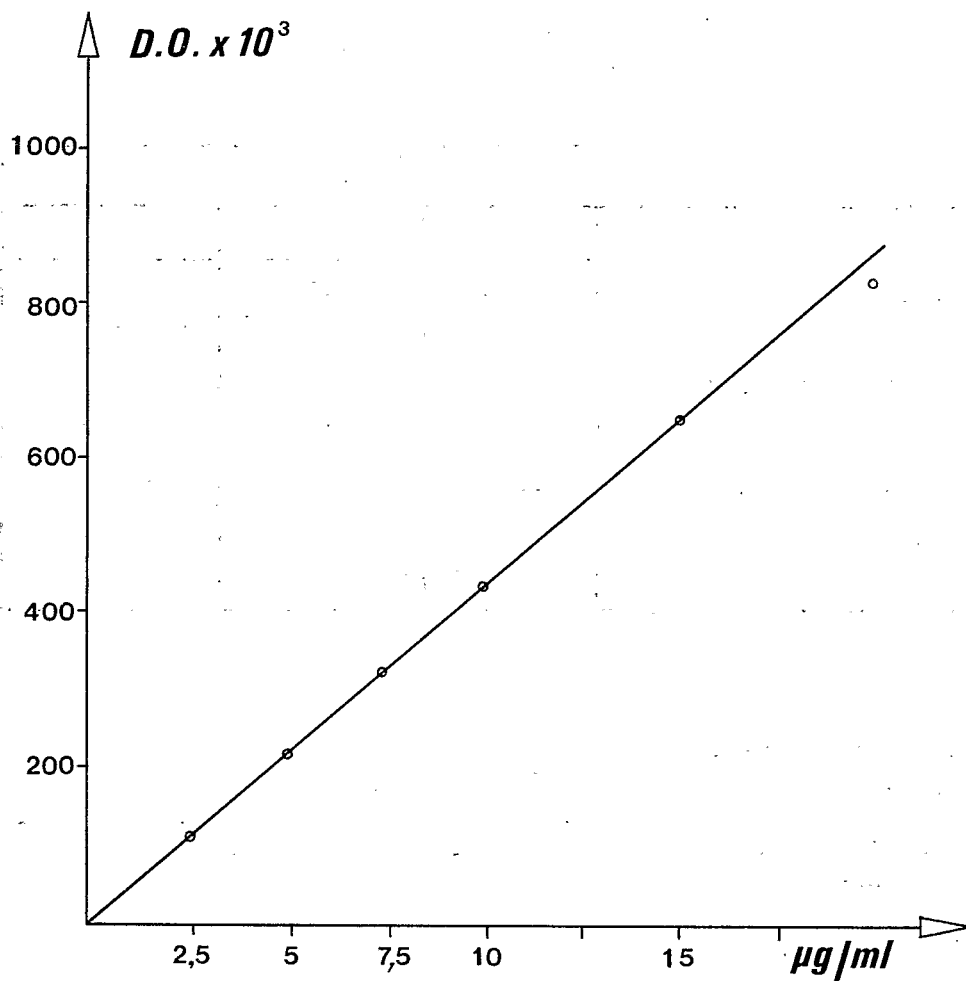


Fig.VII : Droite de référence pour le dosage spectrophotométrique des acides mono-catéyl-quiniques

fixée à 2 heures, on place la feuille dans une capsule contenant de l'eau distillée et on laisse la métabolisation du précurseur radio-actif absorbé se poursuivre, dans les tissus foliaires, durant 3-6-12-24 ou 48 heures pour chaque série d'expériences.

En raison des différences entre les activités spécifiques des deux précurseurs, les expériences de la série 3 (Tableau III), ont été effectuées, en abaissant par de l'acide cinnamique "inerte", l'activité spécifique du composé fourni par le CEA. La faible solubilité relative de cet acide n'a toutefois pas permis de ramener cette activité au niveau de celle de l'acide quinique préparé biologiquement.

TABLEAU III
PRECURSEURS RADIO-ACTIFS UTILISES

	Séries d'expériences		
	1	2	3
Nature du précurseur	Acide quinique	Acide cinnamique	Acide cinnamique
Radio-activité fournie en μCi	1,33	1,56	1,63
Masse fournie en μg	2900,0	25,7	966,0
Radio-activité spécifique en $\mu\text{Ci}/\text{mg}$	0,46	60,70	1,68

Les déterminations de la radio-activité sont réalisées au compteur à circulation gazeuse SAIP modèle FCP 101 ou au spectromètre à scintillation Packard modèle 2211. On détermine la radio-activité des acides mono-caféyl-quiniques séparés, sur une aliquote des éluats à partir desquels ont été réalisés les dosages.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

SYNTHESE BIOLOGIQUE D'ACIDE QUINIQUE ^{14}C UNIFORMEMENT MARQUE

L'acide quinique ^{14}C uniformément marqué a été synthétisé en exposant à la lumière, en présence de $^{14}\text{CO}_2$, des jeunes feuilles de *Quercus pedunculata* Ehrh, espèce chez laquelle nous avons relevé la présence de quantités importantes d'acide quinique.

La fixation photosynthétique du $^{14}\text{CO}_2$ est réalisée selon le dispositif de la figure VIII, nous avons dans un premier temps recherché au bout de quelle période dans les conditions de l'expérience, l'acide quinique présentait une activité spécifique maximale. Ces déterminations préliminaires ont conduit à retenir une durée d'expérimentation de 87 heures.

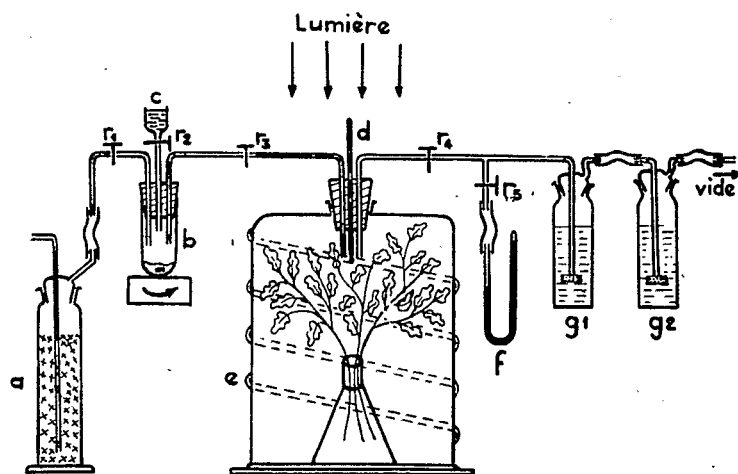


Fig. VIII : Dispositif utilisé pour l'expérience de photosynthèse en présence de $^{14}\text{CO}_2$.

- a - Piège à CO_2 contenant de la potasse solide
- b - Tube générateur de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$
- c - Acide lactique 4N
- d - Thermomètre
- e - Circulation de méthanol à -10°C
- f - Manomètre à mercure
- g₁, g₂ - Barboteurs à soude
- r₁, r₂, r₃, r₄, r₅ - Robinets.

Dans l'expérience définitive, on met en jeu 10 μCi de $^{14}\text{CO}_2$, les feuilles (60 g de matériel frais) sont fixées par l'azote liquide, broyées à l'homogénéiseur "Buhler" dans l'alcool à 90° GL, puis les composés solubles extraits par l'alcool à 80° GL. Après évaporation sous vide à 35°C, on filtre, on défèque par l'acétate de plomb, puis on purifie la solution par passage sur une résine cationique Dowex 50 (H^+). On fixe la fraction acide organique sur résine Dowex 2 (CO_3^{--}), après élution des acides par le carbonate d'ammonium l'acide quinique est séparé sur une colonne de résine Dowex 1 x 8 200-400 mesh (CH_3COO^-) selon la méthode de HULME et WOOLVERTON (1958).

L'acide radio-actif est enfin soumis à une purification supplémentaire par chromatographie préparative sur papier épais dans le solvant : butanol I - acide formique - H_2O , 4-1-5 (V/V).

On obtient finalement 543 mg d'acide quinique d'activité spécifique 95 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, radiochromatographiquement pur, l'activité totale est de 260 μCi soit 2,8 % du $^{14}\text{CO}_2$ utilisé.

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DES ACIDES ^{14}C QUINIQUE ET ^{14}C CINNAMIQUE DANS LA MOLECULE D'ACIDE CHLOROGENIQUE DES TISSUS FOLIAIRES DU CAFEIER

L'absorption par la feuille d'une faible quantité d'acide cinnamique (exp. 2) ne modifie pas d'une façon perceptible sa teneur normale en acide chlorogénique.

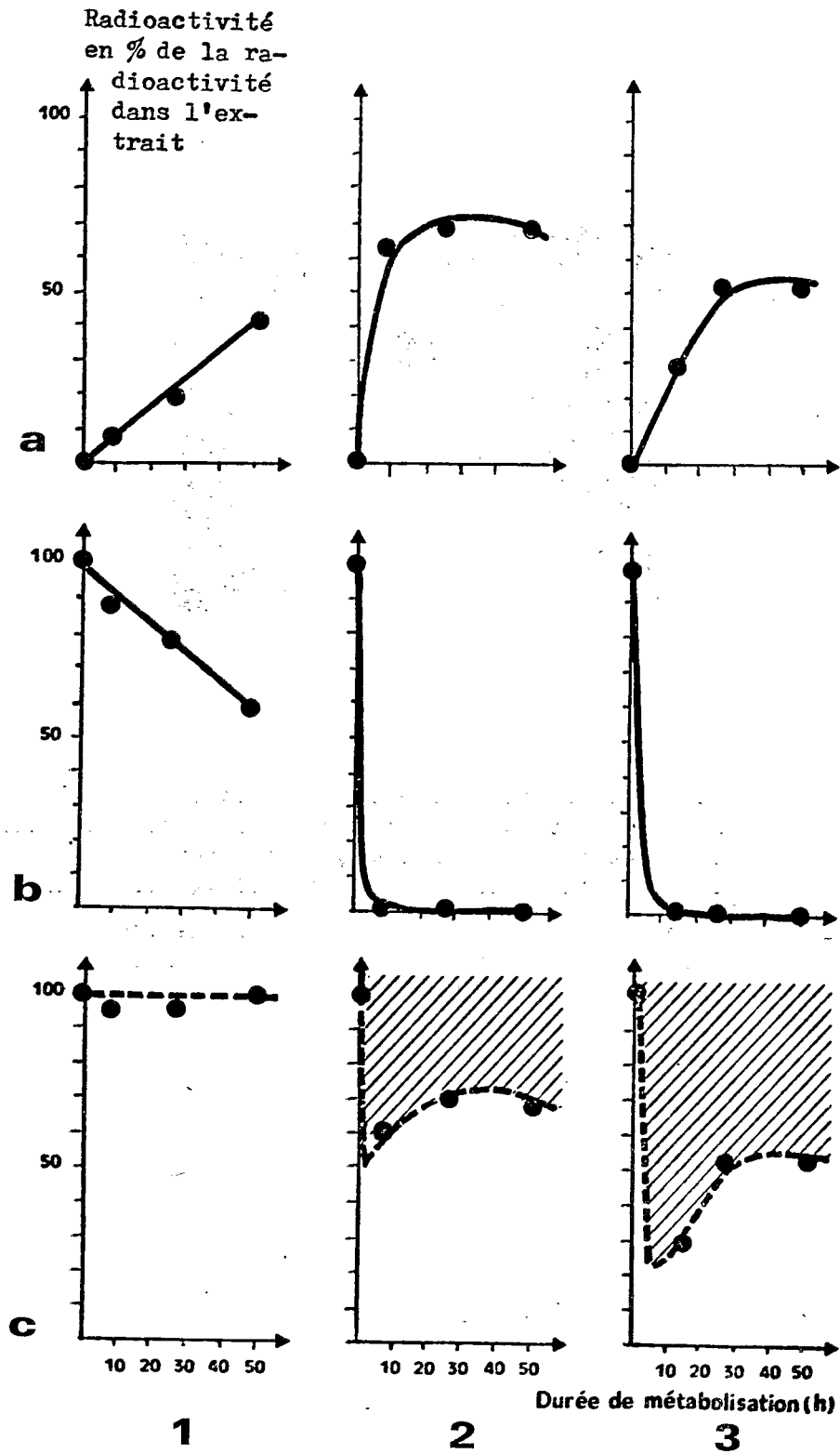
Si l'on prend pour base 100 cette teneur témoin, on constate que l'augmentation atteint 15 % dans les expériences 3 où l'on fournit une masse 37 fois plus élevée d'acide cinnamique. Elle atteint 33 % dans les expériences 1 où l'on fournit à la feuille une masse encore plus importante d'acide quinique. Il semble donc que la surcharge en précurseur active la biosynthèse du depside.

La surcharge en acide quinique (exp. 1) n'est pas entièrement métabolisée en 50 heures, mais elle décroît régulièrement comme le montre l'abaissement de la radio-activité de la fraction quinique (Figure IX, 1, b). Inversement, les radio-activités totale (Figure IX, 1, a) et spécifique de l'acide chlorogénique croissent linéairement. La somme des radio-activités des deux composés égale approximativement, pour cette série d'expérience, la radio-activité totale de l'extrait (Figure IX, 1, c).

Aucun autre composé radio-actif important n'apparaît sur les chromatogrammes autoradiographiés de cet extrait (Figure X).

En 2 heures, la faible quantité d'acide cinnamique de haute activité spécifique fourni dans les expériences 2 est métabolisée à plus de 90 % (Figure IX, 2, b). La radio-activité se trouve très rapidement incorporée dans l'acide chlorogénique, un palier est atteint en 26 heures environ (Figure IX, 2, a). La somme des radio-activités du précurseur et de l'acide chlorogénique n'égale jamais la radio-activité totale de l'extrait alcoolique (Figure IX, 2, c). Ce déficit correspond à la présence d'autres substances radio-actives visibles sur les autoradiogrammes après chromatographie bidimensionnelle (Figure XI). Trois de ces composés, x, y, z, qui ne peuvent être identifiés aux isomères mono-caféyl-quiniques, ni aux acides de la série cinnamique, voient leur radio-activité diminuer en fonction du temps.

Fig.IX : Incorporation de la radioactivité des précurseurs marqués dans l'acide chlorogénique en fonction du temps de métabolisation (a : acide chlorogénique, b : précurseurs, c : somme des deux. 1, 2, 3 : séries d'expériences correspondant au tableau III)



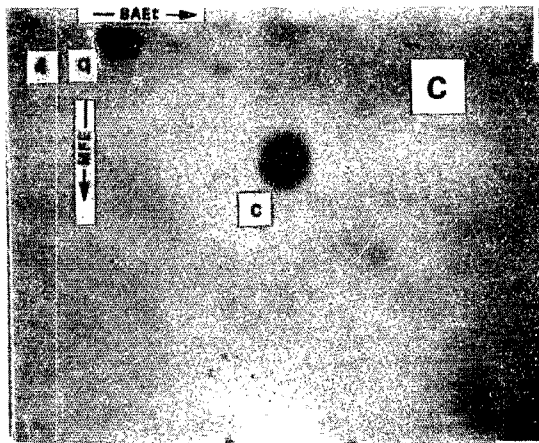


Fig.X : Autoradiogramme montrant l'incorporation de la radioactivité du précurseur quinique dans l'acide chlorogénique. q = acide quinique radioactif non encore métabolisé, c = acide chlorogénique marqué. (L'acide quinique et l'acide chlorogénique sont les deux seuls composés nettement radioactifs).

...

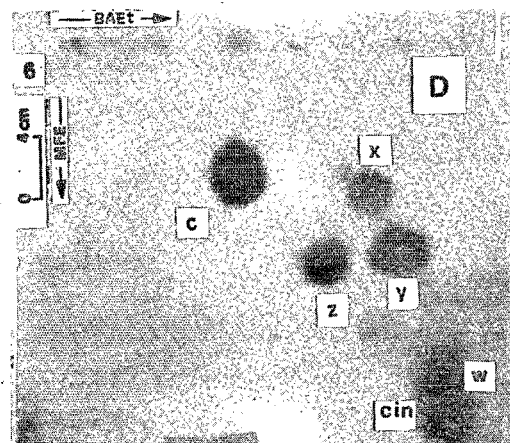


Fig.XI : Autoradiogramme montrant l'incorporation de la radioactivité du précurseur cinnamique dans l'acide chlorogénique.

cin. = acide cinnamique radioactif
 c = acide chlorogénique marqué
 x,y,z,w = composés marqués à identifier

(L'acide cinnamique et l'acide chlorogénique ne sont pas les seuls composés radioactifs)

On aboutit à des constatations du même ordre, avec un décalage dans le temps et un palier moins élevé (Figure IX, 3) lorsque, dans la série d'expériences 3, l'on utilise comme précurseur des quantités plus importantes d'acide ^{14}C cinnamique de faible radio-activité spécifique. Ceci tendrait à prouver que le phénomène d'incorporation n'est pas fondamentalement modifié lorsque la surcharge en précurseur devient plus conséquente.

On doit remarquer que dans les conditions de ces expériences :

- l'acide quinique est mobilisé presque exclusivement dans la synthèse de la molécule chlorogénique; ce fait souligne l'orientation du métabolisme de ce composé chez le caféier où il existe essentiellement à l'état combiné, sous forme de depsides, alors qu'il est présent, en quantités parfois importantes, à l'état libre (BOUDET et al. - 1967) chez d'autres plantes;

- au contraire, la radio-activité de l'acide cinnamique est incorporée dans l'acide chlorogénique et dans divers autres composés. On doit se demander si ceux-ci représentent des éléments de la séquence biosynthétique conduisant à l'acide chlorogénique ou s'ils reflètent seulement la pluralité éventuelle des destinations métaboliques de l'acide cinnamique.

Les résultats obtenus tendent à démontrer le renouvellement de l'ester caféyl-3 quinique chez le caféier. Malgré son abondance chez ce végétal, ce composé ne représenterait pas un produit d'accumulation inerte mais pourrait avoir un rôle métabolique actif.

OBTENTION DE LOTS D'ACIDE CHLOROGENIQUE DIFFEREMMENT MARQUES

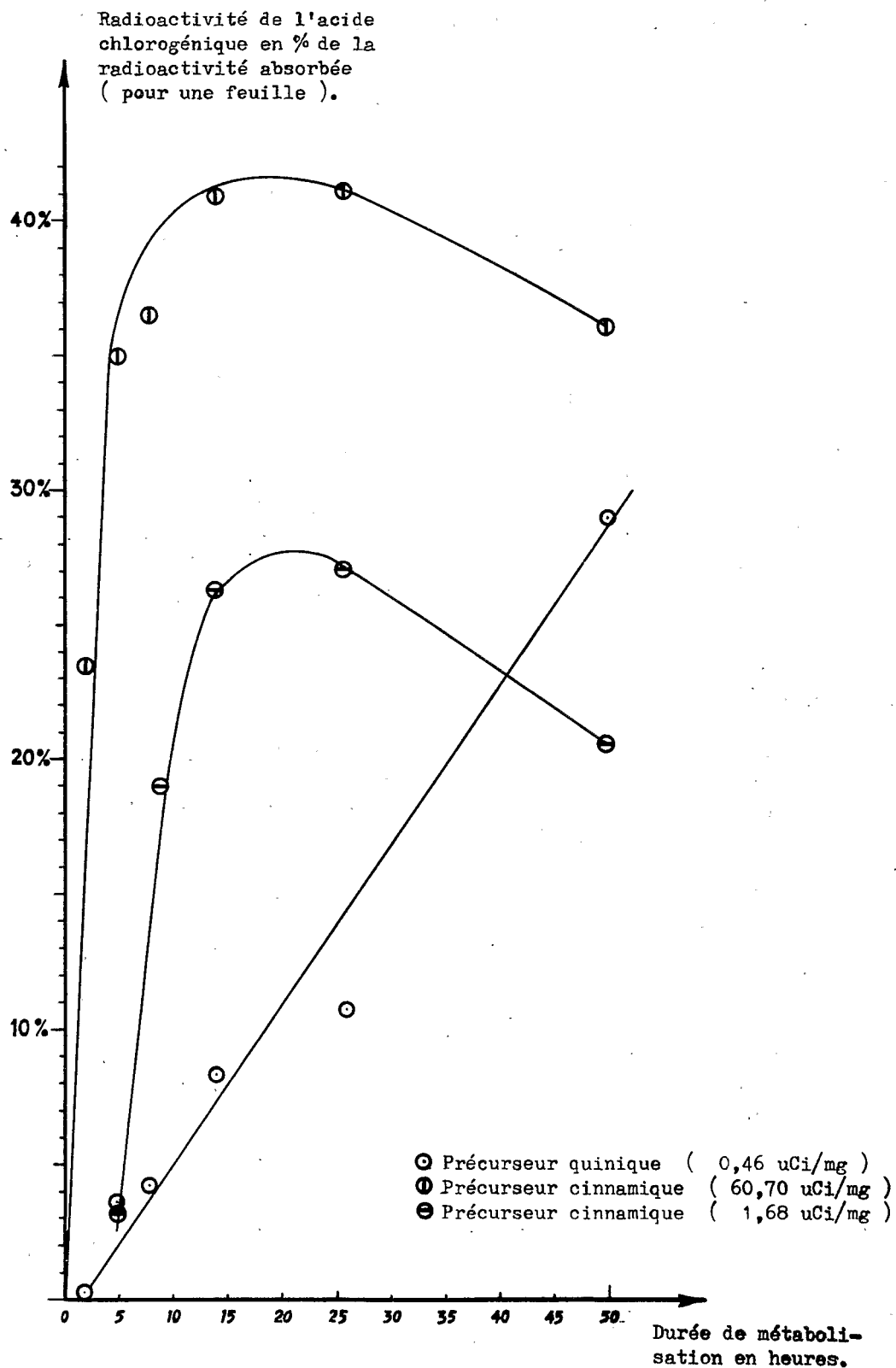
L'utilisation du précurseur quinique radio-actif aboutit à la biosynthèse d'acide chlorogénique plus fortement marqué sur sa partie quinique, de même l'emploi du précurseur cinnamique radio-actif produit un acide chlorogénique marqué sur sa partie caféique.

En fournissant à la plante ces acides, marqués différemment, il devient possible d'étudier le devenir métabolique, chez le caféier, de chaque partie de la molécule chlorogénique.

Par ailleurs, ces expériences nous ont conduit à obtenir, en solution alcoolique, de l'acide chlorogénique de diverses activités spécifiques. Au bout de 50 heures de métabolisation dans les conditions de la série d'expériences n° 1 (Tableau III), l'acide quinique marqué (95 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$) fournit un acide chlorogénique dont la radio-activité spécifique atteint 17,5 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$. Dans la série d'expériences 2 (Tableau III), en partant d'acide cinnamique à haute activité spécifique (9000 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$), nous obtenons une radio-activité spécifique du depside caféyl-3 quinique de l'ordre de 35 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, en 8 à 14 heures de métabolisation. Cette activité spécifique ne dépasse pas 6 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ si l'on part d'acide cinnamique moins radio-actif (249 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$).

La Figure XII met en évidence le rendement de la biosynthèse, c'est-à-dire le pourcentage de la radio-activité absorbée par la feuille, se retrouvant dans le "pool" d'acide chlorogénique en fonction du temps. Le rendement est de 30 % au bout de 50 heures pour l'acide quinique, de 40 % au bout de 14 heures pour l'acide cinnamique fortement radio-actif et de 28 % au bout de 14 heures pour l'acide cinnamique moins radio-actif. Le renouvellement de la partie cinnamique apparaît nettement.

Fig. XII : Rendements de l'incorporation pour les différentes séries d'expériences en fonction de la durée de métabolisation.



INCORPORATION DANS LES ISOMERES MONO-CAFEYL-QUINIQUES

La comparaison de la Figure V avec les autoradiogrammes des Figures X et XI montre que dans ces expériences, les composés a et b, soit les acides caféyl-5 quinique et caféyl-4 quinique, ne sont pas suffisamment marqués pour impressionner le film radiographique.

Leur activité spécifique est très faible : la radio-activité des pré-curseurs passe préférentiellement dans l'acide caféyl-3 quinique.

Ce fait assez remarquable doit être établi d'une façon plus générale sur le caféier avant que l'on puisse en donner une interprétation. Toutefois, il indiquerait :

- soit que les isomères de l'acide chlorogénique se forment par des voies différentes de ce dernier, ce qui est assez improbable;
- soit qu'ils sont biosynthétisés par la même voie, mais plus lentement;
- soit enfin qu'ils sont formés à partir du depside caféyl-3 quinique par transestérification lente.

Ce fait prouve en tout cas, que les isomères caféyl-4 quinique et caféyl-5 quinique ne sont pas des artéfacts d'extraction.

Notons que le depside caféyl-1 quinique n'a jamais été signalé chez le caféier et que les proportions relatives des trois autres isomères dans les feuilles de rang 3 des plantules de caféier "*excelsa*" sont de 80 % pour l'acide chlorogénique, 11 % pour l'acide cryptochlorogénique et 8 % pour l'acide néo-chlorogénique, la teneur en acides mono-caféyl quiniques totaux étant de l'ordre de 4,1 % de la masse de matière sèche (COLONNA - 1969).

CONCLUSIONS

L'étude de la cinétique d'incorporation dans l'acide chlorogénique de précurseurs marqués, dont l'un a été préparé biologiquement au laboratoire, tend à prouver qu'il existe un renouvellement de cet acide dans les tissus foliaires du caféier "*excelsa*".

Dans les conditions des expériences que nous avons réalisées, l'acide quinique est incorporé directement et presque exclusivement dans la molécule d'acide chlorogénique alors que la radio-activité du précurseur cinnamique se retrouve dans plusieurs composés.

Toujours pour ces mêmes conditions expérimentales, la fourniture à des feuilles de caféier de 1,3 à 1,6 μCi de ^{14}C sous diverses formes aboutit, en fonction du temps de métabolisation, à des lots d'acide chlorogénique différemment marqués :

- en partant d'acide quinique (95 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$) une activité spécifique de 17,5 $\mu\text{Ci}/\text{m}$ est obtenue au bout de 50 heures de métabolisation;
- à partir d'acide cinnamique marqué à 9000 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$, l'activité spécifique de l'acide chlorogénique atteint 35 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ en 14 heures, puis décroît si l'on prolonge le temps de métabolisation;
- avec un acide cinnamique moins radio-actif (249 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$) le maximum se situe aux environs de 6 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ en 14 heures.

Dans les trois cas précédents, le rendement de l'incorporation est de 30 %, 40 % et 28 % de la radio-activité absorbée.

On doit remarquer que si la radio-activité des précurseurs quinique et cinnamique est incorporée dans la molécule d'acide caféyl-3 quinique ou acide chlorogénique, elle l'est beaucoup moins dans les isomères caféyl-4 quinique et caféyl-5 quinique : la biosynthèse du depside caféyl-3 quinique serait préférentielle.

BIBLIOGRAPHIE

- BARNES (M.H.), FELDMAN (J.R.) : Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. J. am. Chem. Soc., 72, 4178-4182.
- WHITE (W.V.) - 1950
- BOUDET (A.) - 1968 : Synthèse biologique d'acide quinique ¹⁴C uniformément marqué. J. Labell. Comp., IV, 2, 139-146.
- BOUDET (A.), MARIGO (G.), ALIBERT (G.) - 1967 : Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations des teneurs en acides quinique et shikimique dans les feuilles de *Quercus pedunculata*. Ehrh. au cours d'une année de végétation. C.R.H. Acad. Sci. Paris, t. 265, 209-212.
- BUTLER (W.L.) - 1960 : Chlorogenic acid of lettuce seeds. Nature, 185, 856-857.
- CHASSEVENT (F.) - 1969 : L'acide chlorogénique, ses activités physiologiques et pharmacologiques. Ann. Nutr. Alim., 1969, 23, 1.
- COLONNA (J.P.) - 1968 : L'acide chlorogénique chez les végétaux. Cas du caféier. Rapport de D.E.A., Toulouse, 35 p.
- COLONNA (J.P.) - 1969 : Sur une méthode de séparation et de dosage des acides mono-caféyl-D-quiniques du caféier. Applications. C.R.H. Acad. Sci. Paris, t. 269, 1969, 1770-1773.
- COLONNA (J.P.) - 1970 : Quelques faits essentiels concernant les propriétés et la biosynthèse de l'acide chlorogénique. Cah. ORSTOM, sér. Biol., n° 13, 3-24.
- CORSE (J.) - 1953 : A new isomer of chlorogenic acid from Peaches. Nature, 172, 771-772.
- CORSE (J.), LUNDIN (R.E.), WAISS (A.C., Jr.) - 1965 : Identification of several components of isochlorogenic acid. Phytochemistry, 4, 527-529.
- CORSE (J.W.), SONDEIMER (E.) : 3-Feruloylquinic acid; a 3'-methyl ether of chlorogenic acid. Tetrahedron letters, 18, 1207-1210.
- LUNDIN (R.E.) - 1962

- CZOK (G.) - 1965 : On the question of the share of chlorogenic acid, trigonelline and coffee oil in the physiological effects of coffee beverages. I.F.C.C. Second colloque international sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 3-7 mai 1965, 235-246.
- FISCHER (H.O.L.), DANGSCHAT (G.) - 1932 : Konstitution der chlorogensäure. Ber., 65-B, 1037-1040.
- FREEDMAN (S.O.), KRUPY (J.), SEHON (A.H.) - 1961 : Chlorogenic acid allergen in green coffee beans. Nature, 192, 241-243.
- FREUDENBERG (K.) - 1920 : Ueber gerbstoffe. III. Chlorogensäure der Gerlestoffartige Bestandteile der Kaffeebohnen. Ber., 53, 232-239.
- GOLDSCHMID (O.), HERGERT (M.L.) - 1961 : Examination of western hemlock for lignin precursors. Tappi. 44, 858-870.
- GORTER (K.) - 1909 : Ueber die verbreitung der chlorogensäure in der Natur. Arch. Pharmaz., 247, 184-188.
- GOUELLE de PONTANEL (M.), DUMAS-ASTIER (M.) - 1970 : La place du café en diététique. Prod. Prob. Pharm., vol. 25, n° 12, 958-966.
- HANSON (R.R.), ZUCKER (M.) - 1963 : The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. J. Biol. Chem., 238, n° 3, 1105-1115.
- HENDERSON (J.H.M.), NITSCH (J.P.) - 1962 : Effect of certain phenolic acids on the elongation of Avena first internodes in the presence of auxins and tryptophan. Nature, 195, 780-782.
- HENZE (R.E.) - 1956 : Inhibition of enzymic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. Science, 123, 1174-1175.
- HERRMAN (K.) - 1956 : Ueber das vorkommen von Kaffesäure und Chlorogenic in Obst und Gemüse. Naturwiss., 43, n° 5, 109.
- HERZMAN (H.) - 1957 : Ueber die aktivierung der Peroxydase. Naturwissenschaften. Dtsch., 44, n° 13, 377.
- HERZMAN (H.) - 1959 : Ueber die oxydation der Adrenalins. Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Dtsch., 315, 285-287.
- HIGUCHI (T.), BROWN (S.A.) - 1963 : Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenyl propanoic system in lignification. Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 621-628.

- HULME (A.C.), WOOLVERTON (L.S.C.) - 1950 : Determination and isolation of the non volatile acids of pome fruits and a study of acid changes in apple during storage. J. Sci. Food Agr., 9, 150-158.
- JACOBSON (J.B.) - 1961 : The brown pigments of autolyzed tobacco leaves. I. Isolation and characterization. II. Incorporation of labelled rutin and chlorogenic acid. Arch. Biochem. Biophys., 93, 58-597.
- JEAN (J.), REID (W.W.) - 1959 : The chlorogenic acids of tobacco. Chem. Ind., 655-656.
- JOHNSON (G.), SCHALL (L.A.) - 1952 : Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. Science, 115, 627-629.
- KROGMAN (D.W.), STILLER (M.L.) - 1962 : Naturally occurring cofactor for photo-synthetic phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 46-49.
- LENTNER (C.), DEATHERAGE (F.E.) - 1958 : Phenolic acids in coffee. Chem. and Industry (London), 1331-1332.
- LEVY (C.C.), ZUCKER (M.) - 1960 : Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. J. Biol. Chem., 235, 2418-2425.
- LIEBERMAN (M.), CRAFT (C.C.) - 1959 : Effect chilling on the chlorogenic acid and ascorbic content of Porto-Rico sweet potatoes. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci., 74, 642-648.
- LOCHE (J.) - 1966 : Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac. These Doc. Ing., Toulouse, 159 p.
- MARTIN (C.) - 1958 : Etude de quelques déviations du métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus. Thèse Doct. Etat, Paris, 73 p.
- NICHIFORESCO (E.) - 1970 : Sur la composition des dérivés caféylquiniques des feuilles d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Plantes médicinales et phytothérapie. 1970, tome IV, n° 1, 56-62.
- NITSH (J.P.), NITSH (C.) - 1961 : Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. Bull. Soc. Bot. Fr., 108, 349-362.
- PARIS (R.R.), MOTOHIRO NISHIO : Sur la séparation des acides chlorogéniques du café vert : *Coffea robusta* Lind. C.R.H. Acad. Sci. Paris, t. 270, D, 1465-1467.

- POLITIS (J.) - 1949 : Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la famille des composés et dans les organes de ces plantes. C.R.H. Séances Acad. Sci. Paris, 228, 265-266.
- ROBIQUET et BOUTRON - 1837 : Ann. Chemie und Pharmacie, 23, 93.
- ROGACHEV (V.I.) et al. - 1960 : "Darkening of potato tuber tissues on sterilisation by ionizing radiations" Konserv. i. ovoshchsusil. Prom., 15, 11-15 Chem. Abs., 55, 3868, 1961.
- RUCKENBROD (H.) - 1954 : The conversions of chlorogenic acid in higher plants. Planta, 46, 19-45.
- RUNECKLES (V.C.) - 1963 : Tobacco polyphenols. II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. Canad. J. Biochem. Physiol., 41, 2249.
- SCARPATI (M.L.), ESPOSITO (P) : Neochlorogenic acid and "Band 510" structure. Tetrahedron letters, 18, 1147-1150. (Aussi dans : Ann. Chim. (Rome), 53, (1-2), 35-50, 1964).
- SCARPATI (M.), GUIISO (M.) - 1964 : Structure of the three dicaffeoyl-quinic acids of coffee. Tetrahedron letters, 39-40, 2851-2853.
- SEQUEIRA (L.), KELMAN (A.) - 1962 : The accumulation of growth substances in plants infected by *Pseudomonas Solanacearum*. Phytopathology, 52, 439-448.
- SONDHEIMER (E.) - 1958 : On the distribution of caffeic acid and chlorogenic acid isomers in plants. Arch. Biochem. Biophys., 74, 131-138.
- SONDHEIMER (E.) - 1964 : Chlorogenic acid and related depsides. Bot. Review., 30, 667-711.
- STECK (W.) - 1968 : Metabolism of cinnamic acid in plants : chlorogenic acid formation. Phytochemistry, 7, 1711-1717.
- TANGUY (J.) - 1970 : Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du Tabac souche commune. Thèse Doct. Etat, ORSTOM Paris, 136 p.
- THIMANN (K.W.), TOMASZEWSKI (M.), PORTER (W.L.) - 1962 : Growth promoting activity of caffeic acid. Nature, 193, 1203.

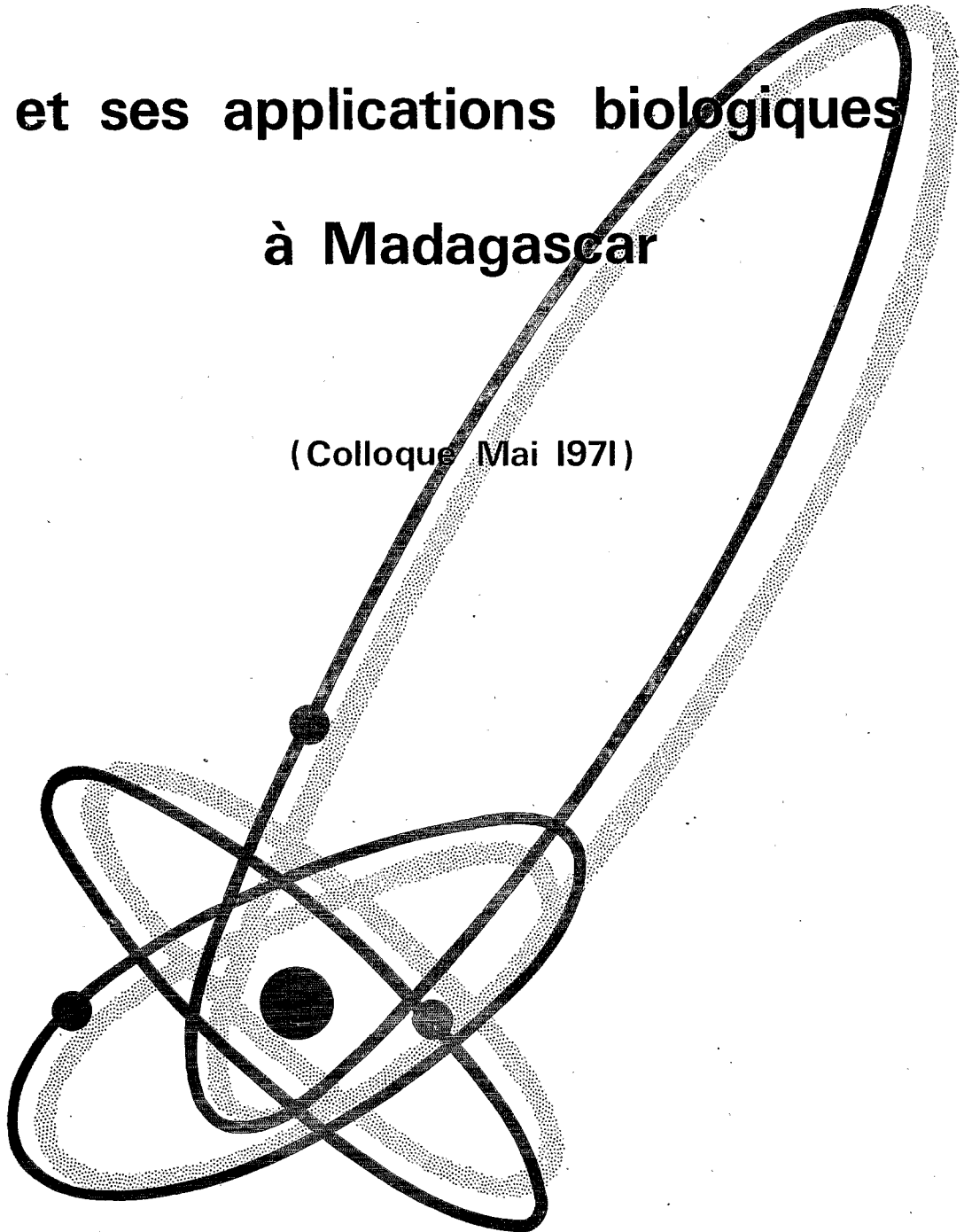
- URITANI (I.) - 1961 : The role of plant phenolics in disease resistance and immunity. Symposium on Biochemistry of plant phenolic substances. Colorado state University, 98-118.
- VALETTE (G.), MORIN (M.) 1969 : Contribution à l'étude des effets pharmacologiques de l'acide chlorogénique. 4ème Colloque International sur la chimie des cafés. Amsterdam, 1969.
- VENDRIG (J.C.), BUFFEL (K.) 1961 : Growth stimulating activity of trans caffeic acid isolated from *Coleus rehneltanus*. *Nature*, 192, 276-277.
- WEURMAN (E.), SWAIN (T.) 1953 : Chlorogenic acid and the enzymic browning of apples and pears. *Nature*, 172, 678.
- WILKINSON (F.B.), PHILIPPS (M.), BAGOT (A.M.) - 1954 : Chlorogenic and caffeic acids in the U.S. Type 12 tobacco. *J. Ass. of Agric. Chemists*, 37, 1004-1012.
- YU (L.M.), HAMPTON (R.E.) 1964: Biochemical changes in tobacco infected with *Colletotrichum destructivum* and some associated enzymes. *Phytochem.*, 3, 269-272.
- ZENK (M.H.), MULLER (G.) 1963 : In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid influenced by naturally occurring phenolic acids. *Nature*, 200, 761-763.
- ZUCKER (M.), STINSON (H.T., Jr) 1960 : The rôle of chlorogenic acid and plastid pigments in the browning of variegated tobacco leaves. *Tobacco. Sci.*, 1, 229-233.

UNIVERSITE DE MADAGASCAR

Laboratoire de Radio Isotopes

L'ENERGIE NUCLEAIRE
et ses applications biologiques
à Madagascar

(Colloque Mai 1971)



Collection **TERRE MALGACHE** Spécial Numéro 12

4 JUL. 1972
O. R. S. T. O. M.

Ecole Nationale Supérieure Agronomique

Collection de Références

5530 Boh et
Bial