

Bot. et chim. 1971

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Etude cinétique de l'incorporation des acides  $^{14}\text{C}$  quinique et  $^{14}\text{C}$  cinnamique dans la molécule d'acide chlorogénique des tissus foliaires du caféier (Coffea Dewevrei de Wild et Durand, race C. Excelsa A. Chev.). Note (\*) de MM. Jean-Paul Colonna et Alain Boudet, présentée par M. Roger Gautheret.*

En fonction du temps, la radioactivité qui disparaît du précurseur  $^{14}\text{C}$  quinique se retrouve directement et presque intégralement dans la molécule d'acide chlorogénique. Ce n'est pas le cas pour la radioactivité du précurseur  $^{14}\text{C}$  cinnamique qui est incorporée dans cet acide et dans d'autres composés. Les résultats obtenus tendent à démontrer le renouvellement de l'ester 3 caféyl-quinique chez le caféier.

Les études concernant la biosynthèse de l'acide chlorogénique, réalisées à l'aide de traceurs radioactifs, chez la pomme de terre [(1), (2), (3)] et le tabac [(4), (5)], font rarement ressortir l'évolution de ce processus métabolique en fonction du temps.

La préoccupation de préciser la cinétique d'incorporation du précurseur trans- $(\text{U } ^{14}\text{C})$  cinnamique dans les molécules caféyl-quiniques apparaît dans les travaux de Taylor [(6), (7)] sur *Xanthium*.

Dans le but de mieux apprécier les modalités de formation du depside 3 caféyl-quinique il nous a semblé utile de connaître l'évolution dans le temps de sa radioactivité dans les tissus foliaires du caféier, alimentés en acides  $^{14}\text{C}$  quinique ou  $^{14}\text{C}$  cinnamique. Les feuilles du caféier contiennent des quantités appréciables d'acide chlorogénique (8) et constituent un matériel intéressant pour l'étude de sa biosynthèse.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Nous disposions de jeunes plants de caféier *Excelsa* au stade cinq paires de feuilles (*pl.*, *fig.* A et B), obtenus en salle conditionnée, à partir de semences sélectionnées provenant de République Centrafricaine. Après germination sur sable humide et alimentation par une solution de Hoagland, les plantules furent transplantées sur terreau un mois avant cette série d'expériences.

Les incorporations portent sur les feuilles du troisième rang au-dessus des feuilles cotylédonaires. L'expérience se déroule dans une enceinte ventilée, sous un éclairage de 6 000 lx, à une température de 25-28 °C. Chaque feuille plonge par son pétiole dans un microréceptacle élargi en V contenant tout d'abord 50 à 70  $\mu\text{l}$  de solution radioactive, puis l'eau distillée de rinçage (3 fois 50  $\mu\text{l}$  environ). A la fin de la période d'absorption uniformément fixée à 2 h, on place la feuille dans une capsule contenant de l'eau distillée et on laisse la métabolisation du précurseur se poursuivre durant 3, 6, 12, 24 ou 48 h pour chaque série d'expériences.

L'acide quinique  $\text{U } ^{14}\text{C}$  (95  $\mu\text{Ci}/\text{mM}$ ) a été obtenu au laboratoire par synthèse biologique selon une technique précédemment décrite (9). L'acide cinnamique  $3\text{-}^{14}\text{C}$  (9  $\text{mCi}/\text{mM}$ ) provient du CEA (lot 1067-1068). Leur pureté radiochimique est vérifiée au moment de l'utilisation.

En raison des différences entre les activités spécifiques des deux précurseurs, les expériences de la série 3 (tableau) ont été effectuées, en abaissant par de l'acide

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

15 JUIN 1971

n° 4716

cinnamique « inerte », l'activité spécifique du composé fourni par le CEA. La faible solubilité de cet acide n'a toutefois pas permis de ramener cette activité au niveau de celle de l'acide quinique préparé biologiquement. Les précurseurs sont en solution dans un tampon carbonate-bicarbonate de sodium (séries 1 et 3) ou dans l'eau distillée (série 2).

Le dosage de l'acide chlorogénique est effectué selon une méthode connue<sup>(8)</sup>, l'éthanol étant toutefois remplacé par du méthanol pour l'extraction qui suit la fixation par l'azote liquide et la lyophilisation. Les déterminations de la radioactivité sont réalisées au compteur à circulation gazeuse SAIP modèle FCP 101 ou au spectromètre à scintillation « Packard modèle 2211 ».

TABLEAU

	Séries d'expériences		
	1	2	3
Nature du précurseur .....	Acide quinique	Acide cinnamique	Acide cinnamique
Radioactivité fournie en $\mu\text{Ci}$ .....	1,33	1,56	1,63
Masse fournie en $\mu\text{g}$ .....	2 900,0	25,7	966,0
Radioactivité spécifique en $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .	0,46	60,70	1,68
Teneur en acide chlorogénique en % du témoin .....	133	100	115

RÉSULTATS. — 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. Au contraire, l'absorption de quantités élevées d'acide cinnamique (exp. 3) ou quinique (exp. 1) active la biosynthèse de ce depside.

*Cinétique de l'incorporation de l'acide  $^{14}\text{C}$  quinique.* — Au bout de 50 h la surcharge d'acide quinique n'est pas entièrement métabolisée mais elle décroît régulièrement comme le montre l'abaissement de la radioactivité de la fraction quinique (fig. 1, b). Inversement les radioactivités totale et spécifique de l'acide chlorogénique croissent linéairement (fig. 1, a). La somme des radioactivités des deux composés égale approximativement, durant toute l'expérience, la radioactivité totale de l'extrait méthanolique (fig. 1, c). Aucun autre composé radioactif important n'apparaît sur les chromatogrammes<sup>(8)</sup> autoradiographiés de cet extrait (pl., fig. C).

## EXPLICATION DE LA PLANCHE

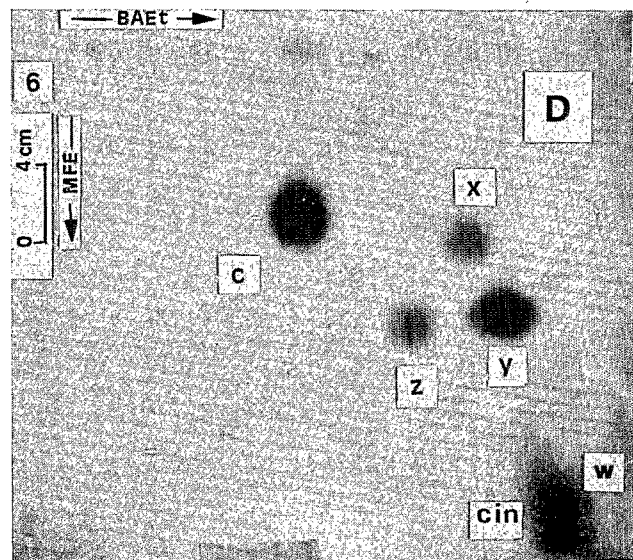
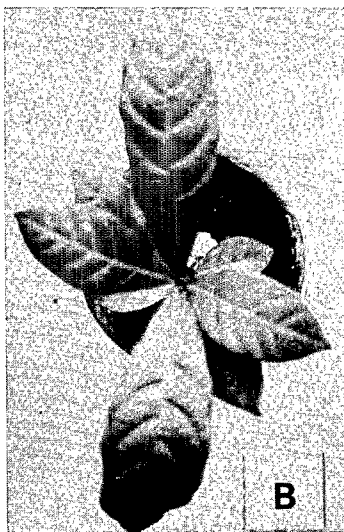
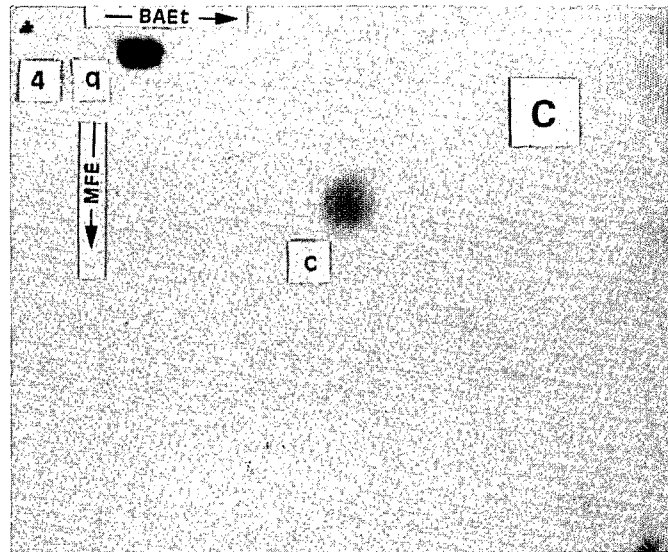
Fig. A et B. — Jeunes caféiers « *Excelsa* » ayant servi à l'expérience.

Fig. C. — Incorporation du précurseur  $^{14}\text{C}$  quinique ; q, acide quinique ; c, acide chlorogénique.

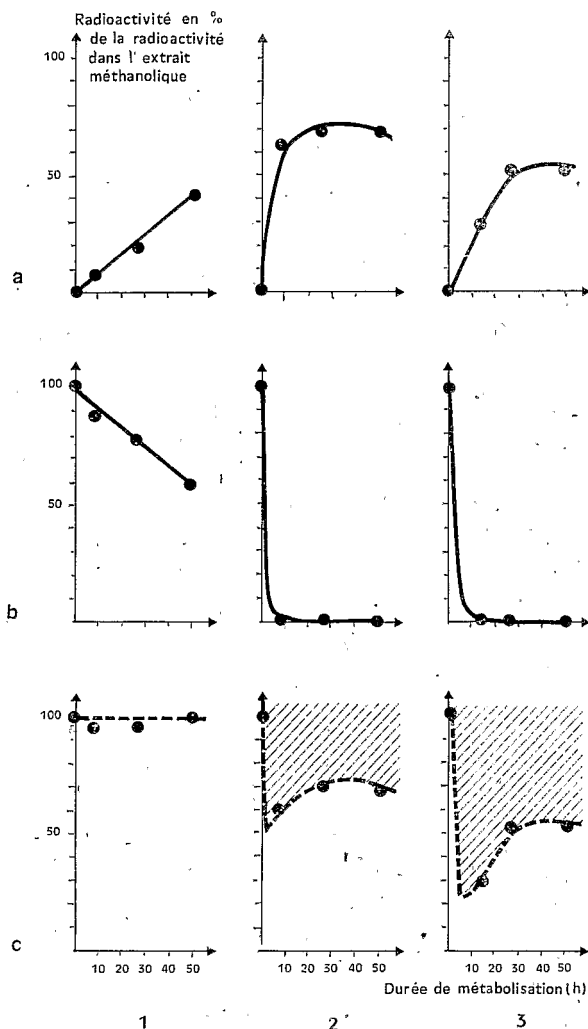
Fig. D. — Incorporation du précurseur  $^{14}\text{C}$  cinnamique ; cin, acide cinnamique ; c, acide chlorogénique ; w, x, y, z, composés à identifier.

BAEt : butanol, acide acétique, eau (4-1-5 v/v) sur papier Whatman 3 tamponné.

MFE : méthylisobutylcétone, acide formique, eau (3-1-2 v/v).



*Cinétique de l'incorporation de l'acide  $^{14}\text{C}$  cinnamique.* — L'acide cinnamique de haute activité spécifique est métabolisé à plus de 90 % en 2 h (*fig. 2, b*) ; la radioactivité se trouve très rapidement incorporée dans l'acide chlorogénique mais un palier est atteint en 26 h (*fig. 2, a*). La somme des radioactivités du précurseur et de l'acide chlorogénique n'égale jamais la radioactivité totale de l'extrait méthano-



Incorporation de la radioactivité des précurseurs radioactifs 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 (*cf.* tableau).

nolique (*fig. 2, c*). Ce déficit correspond à la présence d'autres substances radioactives visibles sur les autoradiogrammes après chromatographie bidimensionnelle (*pl., fig. D*). Trois de ces composés *x, y, z*, qui ne peuvent être identifiés aux isomères monocaféylquiniques, ni aux acides phénoliques de la série cinnamique, voient leur radioactivité diminuer en fonction du temps.

On aboutit aux mêmes constatations, avec un décalage dans le temps et un palier moins élevé (*fig. 3*), lorsque l'on utilise de l'acide  $^{14}\text{C}$  cinnamique de faible radioactivité spécifique.

L'excès d'acide cinnamique introduit dans les feuilles au cours de la série d'expériences 3 ne semble pas modifier fondamentalement le phénomène d'incorporation par rapport à la série d'expériences 2, où le précurseur fortement radioactif est fourni en très petite quantité.

DISCUSSION. CONCLUSION. — Dans les conditions de l'expérience :

— 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 <sup>(10)</sup> chez d'autres plantes.

— Au contraire, la radioactivité 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 3 caféylquinique 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.

(\*) Séance du 1<sup>er</sup> février 1971.

(1) C. C. LEVY et M. ZUCKER, *J. Biol. Chem.*, 235, 1960, p. 2418.

(2) K. R. HANSON, *Phytochem.*, 5, 1966, p. 491.

(3) C. L. GAMBORG, *Can. J. Biol. Chem.*, 45, 1967, p. 1451.

(4) V. C. RUNECKLES, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41, 1963, p. 2249.

(5) W. STECK, *Phytochem.*, 7, 1968, p. 1711.

(6) A. O. TAYLOR et M. ZUCKER, *Plant Physiol.*, 41, 1966, p. 1350.

(7) A. O. TAYLOR, *Phytochem.*, 7, 1968, p. 63.

(8) J.-P. COLONNA, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 1770.

(9) A. BOUDET, *J. Labelled Compounds*, 4, 2, 1967, p. 139.

(10) A. BOUDET, G. MARIGO et G. ALIBERT, *Comptes rendus*, 265, Série D, 1967, p. 209.

(Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer 70,  
74, route d'Aulnay, 93-Bondy, Seine-Saint-Denis ;  
Centre de Physiologie Végétale,  
118, route de Narbonne, 31-Toulouse, Haute-Garonne.)