Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]

Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève

Band: 23 (1970)

Heft: 1

Artikel: Étude biologique et biochimique du liquide contenu dans les fruits de deux espèces de Cola

Autor: Miège, Jacques / Miège, Marie Noëlle

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739137

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 12.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

ÉTUDE BIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DU LIQUIDE CONTENU DANS LES FRUITS DE DEUX ESPÈCES DE COLA

PAR

Jacques et Marie Noëlle MIÈGE

avec la collaboration technique de Mme Andrea RUCHTI

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 154

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES 155

A. *Caractéristiques physico-chimiques* 155

B. *Techniques chromatographiques* 155

1. Chromatographie sur couche mince 155
2. Chromatographie sur colonne 156

C. *Action sur la germination et la croissance* 156

III. CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES ET ACTION BIOLOGIQUE 157

A. *Propriétés physico-chimiques* 157

B. *Action du liquide des fruits immatures sur la germination et la croissance* 160

C. *Influence de la dilution sur l'action inhibitrice* 161

1. pH 161
2. Effet stimulateur 162
3. Dilution optimum 163
4. Comparaison *C. gigantea* — *C. chlamydantha* 163

D. *Influence de la dialyse sur l'action inhibitrice* 164

E. *Evolution des propriétés du liquide au cours de la maturation* 168

1. Modifications des propriétés biologiques 169
2. Modifications des caractères physico-chimiques 171
   a) Caractères chimiques 171
   b) Spectres 171
3. Comparaison entre maturation et conservation des liquides 173

IV. ANALYSE ET CARACTÉRISATION DU FACTEUR INHIBITEUR 175

A. *Analyse des substances dialysables* 175

1. Tests qualitatifs généraux 175
2. Propriétés générales des dialysats et adialysats de *C. gigantea* 176
3. Propriétés du dialysat concentré de *C. gigantea* 177
4. Chromatographie analytique sur couche mince du dialysat concentré 177
5. Modifications reflétées par le chromatogramme après hydrolyse acide du dialysat 180

B. *Séparation des substances du liquide de* C. gigantea *par chromatographie préparative du dialysat* 182
1. Chromatographie préparative sur couche mince du dialysat brut et hydrolysé 182
2. Chromatographie sur colonne du dialysat brut 185
a) Filtration 185
b) Spectres d'absorption en U. V. des fractions 189
c) Chromatographie analytique des fractions 189

V. CONCLUSIONS 193

RÉSUMÉ

Les fruits des deux espèces de Cola, *C. gigantea* et *C. chlamydantha*, contiennent un liquide dont les propriétés physico-chimiques et biologiques sont étudiées.

Les liquides des deux espèces ont en commun une alcalinité élevée, liée à une forte teneur en potassium. Le liquide de *C. chlamydantha* est homogène, de couleur ambrée, celui de *C. gigantea* est hétérogène et se sépare en deux phases, l'une incolore et liquide, l'autre laiteuse et gélifiée. Les liquides des deux espèces inhibent la germination des graines et la croissance des plantules d'espèces variées. A degré de maturité égale des fruits, le liquide de *C. gigantea* est plus inhibiteur que celui de *C. chlamydantha*. Pour cette espèce, un affaiblissement du pouvoir inhibiteur est constaté pour un avancement de maturation de 18 jours, alors que, dans les mêmes conditions, le pouvoir inhibiteur du liquide de *C. gigantea* n'est pas altéré. L'inhibition n'est pas due à la présence du potassium ni au pH élevé qui lui est lié.

Par dialyse, le facteur inhibiteur est totalement éliminé du liquide de *C. chlamydantha* et de la phase liquide de *C. gigantea*. Il ne peut être exclu totalement de la phase gélifiée de *C. gigantea*. Le liquide privé totalement du facteur inhibiteur par dialyse manifeste une action stimulante.

La complexité des substances dialysables est révélée par chromatographie analytique sur couche mince. Sept zones de réactivités différentes peuvent être distinguées. La plupart sont colorées par la ninhydrine, absorbent les vapeurs d'iode et certaines sont fluorescentes à 366 mμ. L'inhibition est liée à la plupart de ces zones.

La filtration sur résine permet une dissociation des matières inhibitrices et alcalinisantes. Trois catégories de substances sont ainsi séparées par poids moléculaires décroissants, avec chevauchement cependant d'une partie des deux dernières séries:

— substances inhibitrices présentant un plateau d'absorption dans l'UV à 256 mμ,
— substances inhibitrices offrant un maximum d'absorption dans l'UV à 275 mμ,
— substances alcalines n'absorbant pas.

Seule, l'hydrolyse acide altère le pouvoir inhibiteur et sépare les substances associées dans la tache principale obtenue par chromatographie sur couche mince. Neuf substances chromatographiquement distinctes résultent de l'hydrolyse.

SUMMARY

The fruits of both species of Cola, *C. gigantea* and *C. chlamydantha*, contain a liquid, the physico-chemical and biological properties of which are studied.

Liquids from both species have in common a high alcalinity, bound to a high potassium content. The liquid from *C. chlamydantha* is homogeneous, amber-coloured; the one from *C. gigantea* is heterogeneous and separates in two phases, the one a colourless liquid, the other a milky gel. The liquids from both species inhibit seed germination and growth of seedlings of varied species. At the same stage of maturation of the fruit, the liquid from *C. gigantea* is a greater inhibitor than the one from *C. chlamydantha*. For this species, a decrease of inhibitory power is noticed after eighteen days ripening, but, under the same conditions, no change can be seen about the *C. gigantea* liquid's inhibitory power. Inhibition is not bound to either potassium content or correlated high pH.

By dialysis, the inhibitory factor is wholy eliminated from the *C. chlamydantha* liquid and from the *C. gigantea* liquid phase; it cannot be entirely excluded from the *C. gigantea* gel phase. If wholly deprived of their inhibitory factor by dialysis, the liquids exhibit a stimulant action.

The complexity of dialysable substances is revealed by thin layer analytical chromatography. Seven zones, with different reactivity, can be observed. Most of them are coloured by ninhydrin, absorb iodin vapour and some of them are fluorescent at 366 mμ. Inhibition is bound to most of these zones.

Filtration through resin permits separation of inhibitory and alcaline material, allowing one to discern three series of substances according to decreasing molecular weight with, however, an overlapping of part of the two last series:

— inhibitory substances, manifesting absorption at 256 mμ,
— inhibitory substances showing an absorption maximum at 275 mμ,
— alcaline substances, manifesting no absorption in UV.

Acid hydrolysis only alters the inhibitory power and separates substances associated in the major spot of the thin layer chromatogram. Nine chromatographically distinct substances arise from hydrolysis.

Zusammenfassung

Die Früchte der beiden Arten von Cola, *C. gigantea* und *C. chlamydantha*, enthalten einen Saft, dessen physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften geprüft wurden.

Die Flüssigkeiten beider Arten haben eine hohe Alkalinität gemeinsam, die vom Gehalt an Kalium herrührt; jene von *C. chlamydantha* ist homogen und bernsteinfarbig, während die andere heterogen und in zwei Phasen teilbar ist: eine farblose, dünnflüssige und eine milchige, dickflüssige. Die Säfte beider Arten wirken keimungshemmend und verhindern das Wachstum verschiedener Pflanzenarten. Bei gleichem Reifegrad wirkt der Saft von *C. gigantea* stärker hemmend als der von *C. chlamydantha*. Bei letzterem wurde festgestellt, dass die Keimungshemmung nach 18-tägigem Fortschreiten der Reife nachlässt, während der Saft von *C. gigantea*, unter gleichen Bedingungen, seine Aktivität nicht verliert. Die Hemmung kommt weder vom Kaliumgehalt noch vom hohen pH-Wert der damit verbunden ist.

Durch Dialyse kann man den hemmenden Faktor vollständig aus dem Saft von *C. chlamydantha* und aus der flüssigen Phase jenes von *C. gigantea* entfernen. Aus der gelatineartigen Phase des *C. gigantea*-Saftes kann er dagegen nicht restlos entzogen werden. Nach vollständigem Entzug des hemmenden Faktors, wirken die Flüssigkeiten aktivierend.

Die Komplexität der dialysierbaren Substanzen wird durch analytische Dünnschichtchromatographie aufgezeigt. Mann kann 7 unterschiedlich reagierende Zonen voneinander trennen. Die meisten werden mit Ninhydrin angefärbt und absorbieren Joddämpfe; einige fluoreszieren bei 366 mμ. Die Hemmung ist an fast alle Zonen gebunden.

Durch Säulenchromatographie gelingt es, die alkalischen von den hemmenden Substanzen zu trennen. Man erkennt drei durch abnehmendes Molekulargewicht gekennzeichnete Stoffgruppen, deren zwei letztere etwas überlappen:

— Hemmende Substanzen, die UV von 256 mμ absorbieren;
— Hemmende Substanzen mit Absorptions maximum bei 275 mμ;
— Alkalische Substanzen, die im UV-Bereich keine Absorption aufweisen.

Nur die saure Hydrolyse vermag die Hemmung zu verringern und die Verbindungen im Hauptfleck des Dünnschichtchromatogramms zu trennen. Es entstehen dabei 9 chromatographisch unterscheidbare Substanzen.

I. INTRODUCTION

Ce travail a été réalisé conjointement à l'Institut de Botanique systématique et de Taxonomie expérimentale de l'Université et au laboratoire de Chimie taxonomique du Conservatoire botanique de Genève.

Le matériel a été récolté en partie par l'un de nous (J. MIÈGE), le reste fut aimablement récolté et envoyé par Mme M. A. DUGERDIL du Fonds national suisse de la Recherche scientifique, en fonction au Centre suisse de Recherche scientifique d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), et par MM. HUTTEL et CREMERS du Laboratoire de Botanique du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé. Nous leur sommes reconnaissants de nous avoir adressé, dans les meilleures conditions possibles et chaque fois avec une grande célérité, les produits de leurs récoltes.

Le genre *Cola* (Sterculiacées), originaire du continent africain, compte en Afrique occidentale une quarantaine d'espèces. Plusieurs de ses représentants se distinguent, entre autres caractères, par la présence, dans les follicules, d'un liquide abondant plus ou moins sirupeux dans lequel baignent les graines. A cette catégorie appartiennent notamment *Cola cordifolia* (Cav.) R. Br., *C. lateritia var. maclaudi* (A. Chev.) Brenan et Keay, *C. gigantea* A. Chev., *C. chlamydantha* K. Schum. Les trois premières espèces, souvent confondues, sont proches les unes des autres, la quatrième par contre offre des caractéristiques morphologiques et écologiques qui l'ont fait séparer du genre par M. Bodard. Cet auteur l'a érigée en un taxon particulier, le genre *Chlamydocola*.

Il était intéressant de déterminer les caractères physico-chimiques de ces liquides, de connaître leurs propriétés physiologiques et de rechercher, par ailleurs, si les différences de composition et d'action permettent de distinguer les deux groupes d'espèces et, par voie de conséquence, de préciser leur statut taxonomique. L'étude présente porte sur les deux espèces: *C. gigantea* et *C. chlamydantha*.

Les follicules de *C. chlamydantha* sont groupés en infrutescences de 8 à 12 fruits. Leur maturité peut être suivie et appréciée par le changement de coloration des téguments externes, des parois internes et des graines qui deviennent rouges. Les follicules ayant terminé leur croissance, qu'ils soient encore verts ou déjà mûrs, renferment 50 à 60 ml de liquide.

Les follicules de *C. gigantea* offrent également, au cours de leur maturation, des différences de coloration. La quantité du liquide, souvent épais et pouvant même former une pâte, est moins élevée: 15 à 20 ml.

Nous remercions Mme Tronchet de l'aide qu'elle nous a apportée pour la mise au point des techniques de chromatographie sur couche mince, ainsi que M. le professeur Tronchet, directeur du service de Chimie pharmaceutique de l'Université de Genève. Nous remercions également M. le professeur Huggel, directeur du service d'anatomie et physiologie comparées de l'Université de Genève d'avoir fait effectuer pour nous dans son service, par Mlle Reymond, les dosages de sodium, potassium, calcium et magnesium par photométrie de flamme. Nous sommes également reconnaissant à Mlle Schorer d'avoir effectué les tests antibiotiques.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel étudié provient de Côte d'Ivoire; les fruits de *C. chlamydantha* ont été récoltés dans la forêt du Banco, ceux de *C. gigantea* dans les galeries forestières du Bandama, au voisinage de Lamto. Expédiés par avion, ils ont été ouverts dès leur arrivée (env. 48 heures après leur cueillette). Le liquide qui emplit les cavités se trouve, dans les fruits sains, sous pression. La partie de liquide recueillie qui n'a pas été expérimentée immédiatement a été conservée soit par cryodessication, soit par mise en réserve à $-20°$ C après une congélation rapide à $-60°$ C.

A. Caractéristiques physico-chimiques

La *viscosité* fut mesurée dans le viscosimètre capillaire d'Oswald, en thermostat à $+20°$ C. Le *poids sec* fut précisé par pesée après dessication à $+110°$ C jusqu'à poids constant. Les *dialyses* furent effectuées en boyaux de viscose (Union carbide corporation Chicago), contre de l'eau déminéralisée bidistillée, à la température de $+4°$ C. L'*azote total* fut évalué, après minéralisation sulfurique en présence du catalyseur de Dumazert et Marcelet (au sélénite de mercure), par la méthode colorimétrique de Nessler. L'*azote protéique* fut apprécié par la technique de Folin modifiée par Lowry, mais aussi et plus sûrement par estimation de l'azote total après dialyse. Les *glucides totaux* furent déterminés par dosage colorimétrique à l'orcinol d'après la méthode de Sörensen et Haugaard. Les teneurs en *sodium* et *potassium* furent obtenues par photométrie de flamme, celles en *magnésium* et *calcium* par mesures au spectrophotomètre de flamme à absorption atomique (Perkin Elmer). Les *phosphates* furent déterminés par la méthode colorimétrique de Fiske et Subbarow à l'acide amino naphto sulfonique; les chlorures par la méthode de Votocek au nitrate mercurique.

Les spectres d'absorption des lumières visibles et U.V. furent établis à l'aide du spectrophotomètre Beckmann DB avec enregistreur W+W.202.

B. Techniques chromatographiques

1. *Chromatographie sur couche mince*

Les gels suivants furent essayés: Silice G. Merck, Silice HF 254+366 Merck, cellulose MN 300 (Machery-Nagel), Ecteola cellulose Bio-rad. C'est la cellulose (MN 300 et MN 300 UV 254) qui fut utilisée pour la plupart des tests; dans certains cas, les gels de silice furent également employés. Pour les tests analytiques les épaisseurs furent de 0,25 mm, pour les chromatographies préparatives de 2 mm. Après migration, les plaques furent examinées en lumière U.V. à 254 et 366 mμ (Uvis Desaga).

2. *Chromatographie sur colonne*

Les liquides furent filtrés sur colonne en chambre froide à +4° C. Quatre types de résine furent utilisés: Sephadex G-10, G-15, G-25 fine, G-50 fine.

C. Action sur la germination et la croissance

L'influence du liquide sur la germination et la croissance fut recherchée, tout d'abord, sur des graines d'espèces variées; par la suite, les essais s'adressèrent à une seule espèce, le *Raphanus sativus*. Des lots de 30 graines furent mis à gonfler 4 heures dans l'eau distillée puis égouttés et répartis en boîtes de Pétri sur papier filtre imprégné du liquide à tester, et placées alors à l'obscurité, à +30° C. Les arrosages eurent lieu régulièrement avec les liquides expérimentés afin de maintenir une humidité constante. La mesure des plantules clôturait l'expérience, généralement 4 jours après la mise en germination.

La longueur de chaque plantule fut estimée par étalement sur papier millimétré et appréciation de la distance séparant l'extrémité de la radicule de l'insertion des cotylédons.

Les témoins furent réalisés sur un double lot arrosé à l'eau distillée.

Le choix du radis (*Raphanus sativus*, var. clerry belle) répondait à l'exigence d'une levée rapide et d'une taille réduite des graines, limitant le volume du liquide nécessaire à chaque expérience, qualité indispensable lorsqu'il s'agit de tester, par exemple, les fractions provenant d'une chromatographie. Le choix d'une durée de 4 jours de germination fut dicté par le résultat d'essais comparant les croissances obtenues 1 à 7 jours après la mise en germination. A 7 jours, les plantules atteignent une taille limite pour les dimensions des boîtes de Pétri utilisées. A partir de deux jours, les différences sont sensibles. Elles ne font que s'accentuer. La durée optimum, dans nos expériences, est de 4 jours.

La reproductibilité des résultats fut éprouvée par plusieurs répétitions. Le degré de signification des différences observées fut estimé par la détermination du coefficient de probabilité p à partir de l'écart réduit des moyennes t. La valeur de p sera précisée dans les tableaux chaque fois que sera observée une incertitude sur la signification de la différence entre la croissance moyenne d'un lot testé et celle du lot témoin. (Les valeurs de p ne seront pas toujours proportionnelles aux différences entre les moyennes; en effet, généralement, les lots de graines furent homogènes et les écarts observés autour de la moyenne furent relativement faibles; mais le premier lot de graines testées se montra moins homogène et les écarts plus grands autour de la moyenne diminuèrent la signification de la différence des moyennes).

III. CARACTÈRES PHYSICO-CHIMIQUES ET ACTION BIOLOGIQUE

La présence du liquide à l'intérieur d'un fruit peut être superflue pour l'économie de la plante ou au contraire jouer un rôle par l'action des substances qu'il renferme. Il était intéressant de connaître si les liquides de Cola possédaient des propriétés biologiques, la nature et les limites de ces propriétés, de les comparer d'une espèce à l'autre et enfin d'observer l'évolution de ces propriétés au cours de la maturation du fruit.

Pour orienter l'identification des facteurs biologiquement actifs que pourraient contenir les liquides, les propriétés physico-chimiques générales sont tout d'abord précisées. Parmi les caractères biologiques, la recherche d'une action sur la germination s'impose en premier lieu. D'autres propriétés étudiées se sont révélées peu significatives (propriétés enzymatiques) ou nulles (propriétés antibiotiques bactériennes); l'action sur la germination et la croissance sera donc seule étudiée ici.

A. Propriétés physico-chimiques

Les principales caractéristiques sont groupées dans le tableau 1.

Tableau 1

Principales caractéristiques des liquides des deux espèces recueillis à partir de fruits présentant une maturité analogue (fruits immatures).

Caractères	Cola chlamydantha	Cola gigantea	
		hétérogène	
Etat physique	liquide homogène	phase liquide	gel
Couleur	jaune clair puis ambré	incolore	laiteux
Viscosité	5,1	3,9	—
Densité	~1	~1	~1
Humidité	99%	98%	98%
Fluorescence 366 mμ	+	+	
Fluorescence 254 mμ	—	—	
pH	9,2	9,2	9,3
Na^+ méq/l	0	0	—
K^+	74,2	142,0	—
NH_4^+	0	0	—
Mg^{++}	6,2	7,5	—
Ca^{++}	5,6	2,7	—
Cl^-	5,2	0	—
PO_4^{---}	0	0	—
N total (γ/ml)	330,0	187,0	—
N (Folin) (γ/ml)	72,0	26,0	—
glucides totaux(γ/ml)	250,0	462,0	—

Une première différence entre les deux espèces consiste dans l'aspect physique du liquide: homogène, limpide, de couleur jaune clair puis ambrée chez *C. chla-*

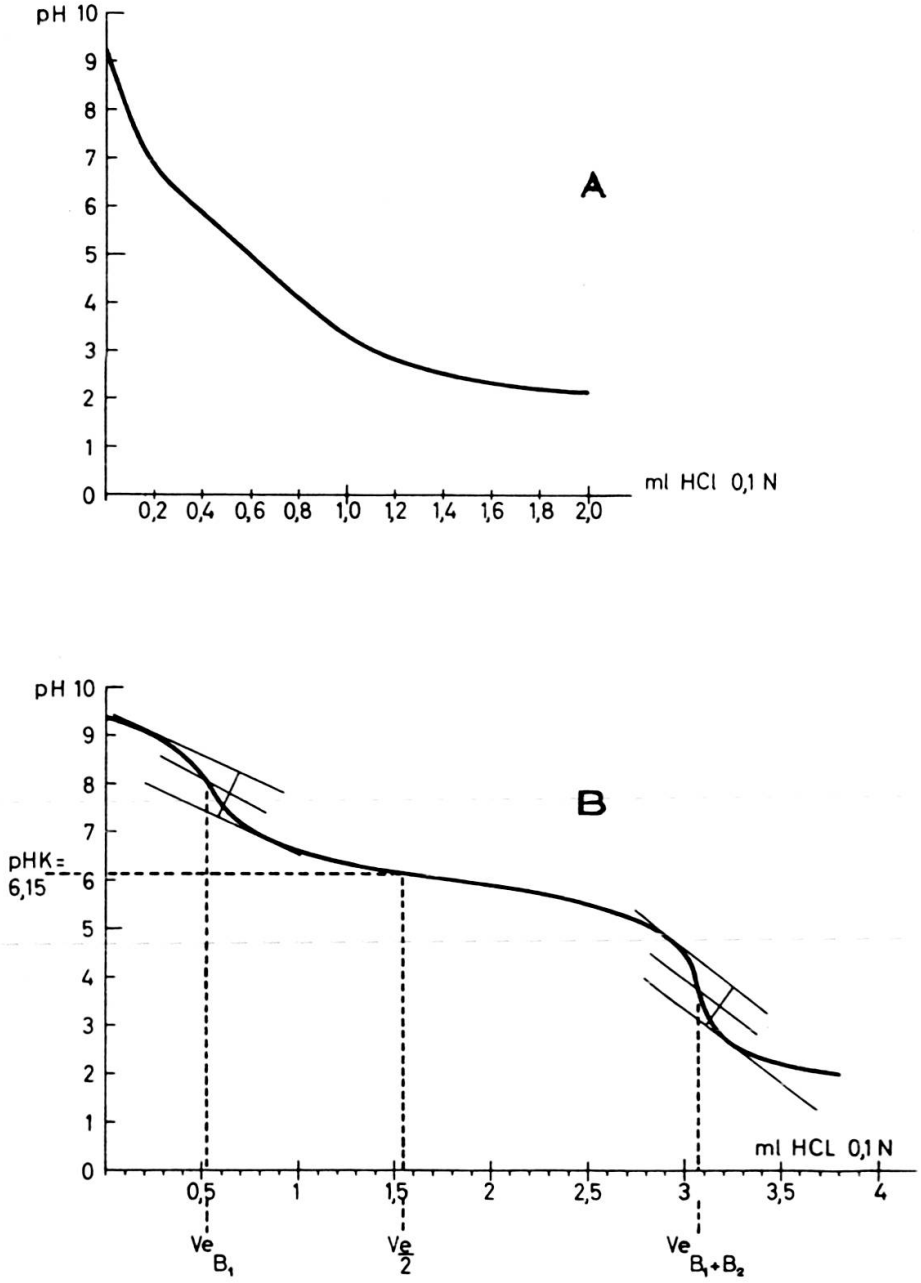


FIG. 1. — Courbes de titration des liquides de fruits immatures:
A) de *C. chlamydantha*
B) de *C. gigantea*
(titration par HCl 0,1 N de 2ml de liquide; dilution de départ d = 8).

mydantha, il présente chez *C. gigantea* deux phases, l'une liquide, claire, limpide, l'autre laiteuse et gélifiée. Leur séparation, par centrifugation du liquide frais, est

peu efficace; par contre, effectuée après congélation puis décongélation, pendant une heure à 14 000 g, elle permet d'obtenir un surnageant et un gel bien individualisés. La séparation peut être aussi aisément acquise par filtration du liquide frais à +4° C en chambre froide, par simple gravitation. La filtration sous vide n'est pas satisfaisante. Les deux phases du liquide de *C. gigantea* furent étudiées séparément mais certains essais portent sur le liquide global.

Notons la très grande viscosité des liquides, particulièrement celle du liquide total de *C. chlamydantha*, celle de la phase liquide de *C. gigantea* est plus faible quoique encore importante. Il faut cependant signaler le côté fluctuant de ce caractère. La congélation suivie de décongélation accentue la fluidité. En outre, des variations ont été remarquées selon les arrivages. Les valeurs rapportées ici correspondent aux maximums observés.

Parmi les caractéristiques chimiques, il faut noter l'absence chez l'une et l'autre espèces de sodium, d'ammonium, de phosphates; par contre, la proportion de potassium est très forte, surtout chez *C. gigantea*. En revanche, *C. chlamydantha* est beaucoup plus riche en N total.

Pratiquement tout l'azote est dialysable (les enzymes, sans doute présents, ne sont pas dosables par leur azote). La différence entre azote après dialyse et azote déterminé par la méthode de Folin indique la présence de petits peptides dialysables ou de tryptophane libre. Les glucides, entièrement macromoléculaires, ne renferment pas d'amidon.

Alcalinité. La propriété commune la plus frappante est une alcalinité élevée et comparable pour les deux espèces. Mais les courbes de neutralisation ont des allures très différentes (fig. 1). Alors que la courbe relative au liquide de *C. gigantea* présente 2 accidents correspondant à la neutralisation de 2 alcalinités, celle du liquide de *C. chlamydantha* n'en présente qu'un; la courbe ensuite s'aplanit régulièrement dénotant l'existence de systèmes tampons; on ne peut pas relever ici de coefficient tampon maximum. Pour le liquide de *C. gigantea*, la courbe fournit les caractéristiques suivantes: $pK_{b1} = 8$; $pK_{b2} = 3{,}7$; $V_{E(b1 + b2)} = 3{,}075$. La valeur du coefficient tampon maximum

$$\beta \text{ max.} = \frac{dv \text{ g eq/l}}{dpH} = 0{,}17$$

et se situe dans la zone $6{,}0 < pH < 6{,}2$.

Bien que le pH des 2 liquides soit le même, le volume équivalent de neutralisation est supérieur pour le liquide de *C. gigantea*: ainsi, pour passer de pH 9,3 à pH 7 il faudra

0,017 meq./ par ml de liquide de *C. chlamydantha*
et 0,075 meq./par ml de liquide de *C. gigantea*

B. Action du liquide de fruits immatures sur la germination et la croissance

L'influence du liquide de fruits immatures de *C. gigantea* et *C. chlamydantha* sur la levée des graines fut recherchée en testant des semences d'espèces représentant des taxons divers: *Avena sativa*, *Lavatera arborea*, *Trifolium pratense*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*, *Nasturtium officinale*.

La levée des graines de chaque espèce a été inhibée à 100%. Après 7 jours, le pourcentage de levée des graines traitées était de 0%, celui des graines témoins de 72 à 92%.

Pour établir si l'effet inhibiteur se manifeste avec autant de netteté après le déclenchement des processus germinatifs, le liquide de *C. gigantea* a été appliqué, dans de nouveaux essais, sur des plantules de radis mesurant environ 10 mm, la germination fut démarrée en employant de l'eau distillée. La croissance a été immédiatement stoppée, les radicules ont jauni et les plantules ont rapidement dépéri,

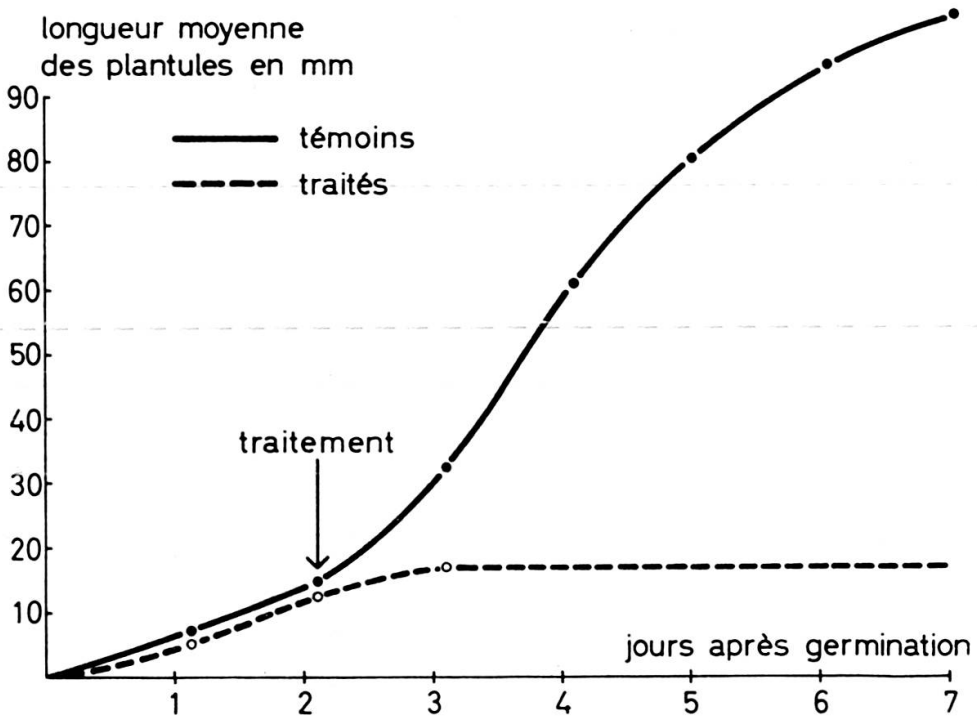


Fig. 2. — Evolution de la croissance moyenne de plantules traitées par du liquide de fruits immatures de *C. gigantea* comparativement à celle des lots non traités.

comme le montre le graphique (fig. 2) qui donne la marche des croissances moyennes de plantules traitées par du liquide de fruits immatures de *C. gigantea* comparativement à des lots non traités.

C. Influence de la dilution sur l'action inhibitrice

L'action inhibitrice des liquides est ainsi établie. Quelles en sont les limites ?

Les liquides de fruits immatures de *Cola gigantea* (liquide total hétérogène) et *Cola chlamydantha* furent appliqués à des lots de graines de *Raphanus*; l'action du liquide pur fut confrontée à celle de liquides ayant subi des dilutions de: 4, 8, 32, 126, 500 fois. Comme la dilution diminue le pH, pour éliminer l'interférence du facteur pH, les essais portèrent parallèlement sur les liquides dilués et sur des aliquotes de ces dilutions ajustées au pH du liquide pur. Les résultats obtenus, groupés dans les tableaux 2 et 3, et la figure 3, conduisent aux constatations suivantes:

1. *pH:* alors qu'il semblait possible de voir une relation entre le pH élevé et le pouvoir inhibiteur du liquide de Cola, et même de considérer cette alcalinité comme responsable de l'inhibition, l'examen du tableau 2 montre qu'il n'en est rien. Si le pH est lié à la substance inhibitrice, il est peut-être la conséquence de sa constitution, il ne peut être considéré comme la cause de l'inhibition.

Tableau 2

Action du liquide de fruits immatures de Cola chlamydantha *pur et diversément dilué sur la croissance des plantules de* Raphanus sativus *(longueur moyenne en mm).*

jours après mise en germination	2	4	7
témoin	14,5	45,7	67,4
cola pur (pH=9,2)	0,0	0,0	0,0
d = 4 (pH=9,1)	1,4	6,8	11,3
d = 8 (pH=8,9)	4,3	25,7	58,4
d = 32 (pH=7,9)	11,4	53,5	87,2 (p=0,15)
d = 32 (pH=9,2 ajusté) *	12,8	58,4	90,2
d = 128 (pH=7,5)	16,0	40,9	70,9
d = 128 (pH=9,2 ajusté)	14,6	42,9	67,8
d = 500 (pH=6,8)	11,5	38,6	72,9
d = 500 (pH=9,2 ajusté)	12,6	34,5	69,8

* L'ajustement fut réalisé avec de la potasse puisque les ions K + sont déjà présents en quantité notable. Mais des tests permirent de constater que la qualité des ions introduits dans ces conditions ne modifie pas les résultats, les liquides ajustés avec la soude donnant les mêmes résultats que ceux ajustés avec la potasse.

2. *Effet stimulateur :* non seulement la dilution diminue l'action de la substance inhibitrice, mais elle semble provoquer une stimulation de la croissance puisque,

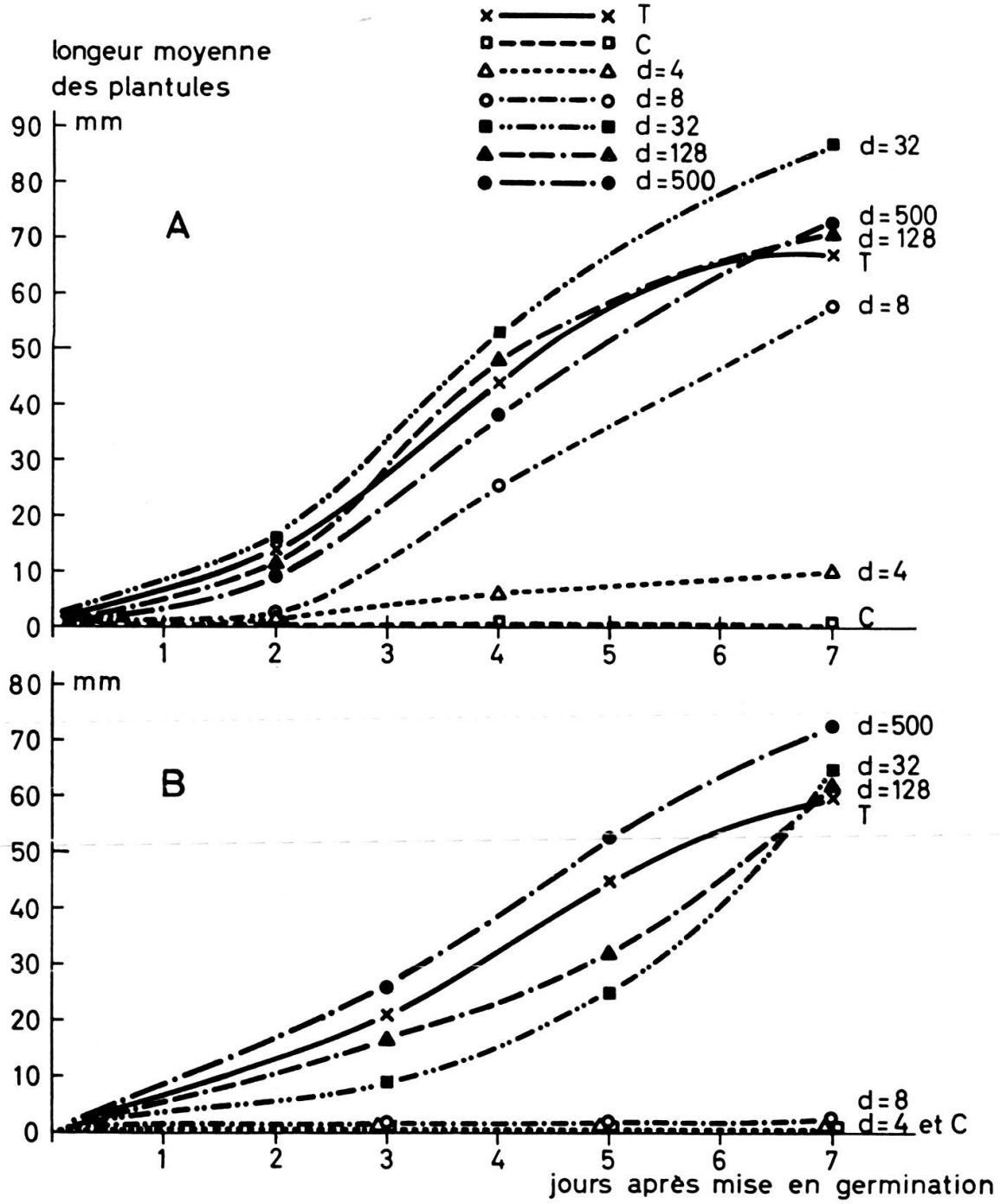


FIG. 3. — Action sur la croissance des liquides de fruits immatures progressivement dilués de:
A) *Cola chlamydantha*
B) *Cola gigantea*

avec le liquide de *C. gigantea* aussi bien qu'avec celui de *C. chlamydantha*, à certaines dilutions, la croissance observée est supérieure à celle des témoins (fig. 3 *a* et *b*).

Cependant les différences observées ne sont pas très significatives (p = 0,15 et 0,2).

3. *Dilution optimum :* on note l'existence d'une valeur optimum de la croissance obtenue pour une dilution de coefficient 32 du liquide de *C. chlamydantha.* (La différence observée n'est pas très significative p = 0,15.)

Cet optimum ne s'observe pas avec le liquide de *C. gigantea* puisque la dilution la plus élevée essayée donne la meilleure croissance. Mais ceci est peut-être lié au fait que la substance inhibitrice est plus concentrée ou plus active chez *C. gigantea.* L'effet stimulateur révélé par dilution peut s'expliquer de deux façons: ou la même substance agit comme inhibiteur ou comme stimulateur suivant sa concentration (c'est le cas par exemple de l'acide gibberellique), ou bien la substance inhibitrice voit son action diminuer et s'annuler par dilution permettant l'expression d'une substance stimulante préexistante dont l'action, qui serait peu modifiée ou même exaltée par la dilution, était masquée par le facteur inhibiteur. L'interaction peut être complexe et concerner plusieurs substances.

TABLEAU 3

Action du liquide de fruits immatures de Cola gigantea, *pur et diversément dilué, sur la croissance des plantules de* Raphanus sativus *(longueur moyenne en mm).*

jours après mise germination	3	5	7
témoins	22,0	46,5	59,8
cola pur	0,0	0,0	0,0
d = 4	0,1	0,1	0,2
d = 8	0,3	0,9	2,0
d = 32	9,0	26,2	66,0
d = 128	17,6	32,4	60,2
d = 500	25,6	53,3	73,3 (p = 0,2)

4. *Comparaison C. gigantea — C. chlamydantha :* à degré de maturité égal, le liquide de *C. gigantea* est beaucoup plus inhibiteur que celui de *C. chlamydantha*; alors qu'il suffit d'une dilution de coefficient 4 pour obtenir une levée de l'inhibition dans le cas du liquide de *C. chlamydantha,* une dilution double du liquide de *C. gigantea* ne permet, en effet, pratiquement aucune croissance.

D. Influence de la dialyse sur l'action inhibitrice

Le liquide de *Cola gigantea* qui, lors des précédents essais, a été globalement étudié, est désormais analysé phase par phase, la séparation gel-liquide étant réalisée, comme nous l'avons expliqué, par filtration. Des moyens permettant une partition des substances contenues dans les liquides selon leur taille moléculaire peuvent permettre une première caractérisation des principes actifs. Parmi les méthodes permettant une telle séparation, nous avons eu recours tout d'abord à la dialyse. Le protocole adopté, normalisé pour permettre des résultats reproductibles, fut le suivant: première dialyse d'une durée de 16 heures à +4° C contre un volume d'eau bidistillée égal à 4 fois le volume soumis à la dialyse. Le premier dialysat recueilli, la dialyse fut poursuivie 5 jours en renouvelant fréquemment l'eau bidistillée. Les dialysats autres que le premier, furent éliminés, les analyses des propriétés sur la germination de même que les spectres et le pH ayant montré qu'ils ne recueillaient que de faibles quantités de substances déjà présentes dans le premier dialysat. L'action de la dialyse fut recherchée par l'étude des propriétés du dialysat n° 1 d'une part, de l'adialysat d'autre part.

Les propriétés des liquides de *C. gigantea* et *C. chlamydantha* furent déterminées parallèlement sur le liquide brut et sur le liquide dialysé ainsi que sur la première eau de dialyse. Le liquide de *C. gigantea* fut tout d'abord testé globalement sans séparation des phases; les résultats obtenus, ainsi que ceux relatifs au liquide de *C. chlamydantha*, figurent dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4

Influence de la dialyse sur les propriétés du liquide de fruits immatures de Cola chlamydantha *(longueur moyenne en mm).*

jours après mise en germination	1	3	5
témoin	3,4	35,2	62,9
cola pur (pH 9,1)	0,0	0,2	0,3
dialysat (d=4) (pH=9,0)	1,0	18,3	27,8 (p=0,01)
adialysat (pH=5,9)	4,4	55,0	91,2*(p=0,03)

* Une particularité morphologique est à signaler au sujet de ce lot: non seulement les plantules sont plus longues mais elles se distinguent de celles des témoins et des autres lots par une pilosité de la racine notablement plus importante.

TABLEAU 5

Influence de la dialyse sur les propriétés du liquide de fruits immatures de Cola gigantea *(longueur moyenne en mm).*

jours après mise en germination		3
témoin		27,8
cola pur	pH 9,2	0,0
dialysat	pH 9,2 (normal)	0,2
	pH 7,2 (ajusté)	0,1
adialysat	pH 9,2 (ajusté)	22,7
	pH 7,2 (normal)	19,4

Tout d'abord notons, une fois de plus, l'absence de corrélation entre le pH et l'action du liquide sur la croissance.

Constatons surtout que la substance inhibitrice est de relativement petite taille puisqu'elle dialyse à travers un tube en viscose dont les pores ont 4 mμ (à titre indicatif le lysosyme a un diamètre (25 Å) inférieur à 4 mμ pour un poids moléculaire de 14 000); de plus les substances alcalinisantes, directement liées à la substance inhibitrice ou seulement concomitantes, dialysent également.

Constatons, ici encore, que le pouvoir inhibiteur du liquide de *C. gigantea* est bien supérieur à celui de *C. chlamydantha.* Le premier dialysat de la première espèce, bien que dilué 4 fois par rapport au liquide brut, inhibe pratiquement totalement la croissance alors que celui de *chlamydantha* permet, dans les mêmes conditions, une croissance qui, bien que très significativement différente ($p=0,01$, tableau 4), atteint cependant près de la moitié de celle observée chez le témoin.

Alors est démasqué le pouvoir stimulant de l'adialysat, c'est-à-dire du liquide privé des petites molécules qu'il contenait, parmi lesquelles la substance inhibitrice. Mais les deux espèces se révèlent à cet égard, bien différentes. Seul *C. chlamydantha* présente cette propriété stimulante, la croissance permise par l'adialysat de *C. chlamydantha* est, en effet, seule, significativement différente ($p=0,03$), de celle des témoins. Le produit responsable de la stimulation est-il absent du liquide de *C. gigantea* ? Ou bien la différence réside-t-elle seulement dans la concentration de cette substance dont l'action pourrait être inactive ou même inhibitrice à certaines doses et stimulante à concentration plus faible ?

Pour éprouver cette hypothèse, des comparaisons furent établies entre les influences exercées sur la germination par des adialysats diversément dilués. Mais

auparavant, il fallait s'assurer de la responsabilité propre de chacune des phases. L'adialysat hétérogène fut centrifugé (le gel, qui décante mal du liquide brut, sédimente bien après dialyse); les croissances obtenues à partir de chacune des phases sont présentées dans le tableau 6.

TABLEAU 6

Influences respectives de chacune des 2 phases de l'adialysat de fruits immatures de Cola gigantea, *séparées après dialyse (longueurs moyennes en mm)*

	témoin	liquide	gel dilué par de l'eau distillée (d = 8)
pH		5,9	8,9
$\bar{l}$	65,7	66,4	7,8

Tout de suite apparaît un nouveau phénomène: le gel retient très fortement et la substance inhibitrice et des groupes chargés cationiques, ceux-ci étant ou non liés à celle-là. Alors s'expliquent d'une nouvelle façon les différences constatées dans les croissances que permettent les adialysats de *C. chlamydantha* et *C. gigantea*. Le liquide de *C. chlamydantha*, dépourvu de gel, laisse dialyser totalement la substance inhibitrice alors que le liquide de *C. gigantea* la retient, du moins en partie, dans les mailles du gel. Mais cette rétention par le gel n'explique pas pourquoi le dialysat du liquide de *C. chlamydantha* étant moins inhibiteur que celui de *C. gigantea*, seul son adialysat stimule la croissance (tabl. 4 et 5). Il est nécessaire de préciser le rôle exercé par la concentration des substances. C'est par des dilutions expérimentales que cette influence peut être décelée.

Les 2 phases du liquide de *C. gigantea* furent soumises séparément à la dialyse. Les dialysats et adialysats furent alors dilués progressivement et leur influence sur la croissance observée. L'examen du tableau 7, qui tient compte des résultats de plusieurs répétitions, permet certaines observations.

— Tout d'abord, les propriétés fixatrices du gel sont confirmées. La substance inhibitrice reste fixée sur le gel après dialyse. Néanmoins, une partie a diffusé puisque le dialysat est, lui aussi, inhibiteur et même plus que le gel; à dilution 4, il ne permet pratiquement aucune croissance alors que l'adialysat autorise une croissance moyenne de 6 mm.

— La substance inhibitrice est répartie dans les deux phases, mais seule la phase liquide permet son élimination par dialyse.

— Cependant, comme lors des essais sur le liquide global rapportés dans le tableau 5, la croissance que permet l'adialysat de la phase liquide est inférieure à celle du témoin.

TABLEAU 7

Influence de la dilution sur les propriétés des phases séparées et dialysées du liquide de fruits immatures de Cola gigantea *(longueur moyenne en mm).*

dilution	témoin	liquide		gel	
		dialysat	adialysat	dialysat	adialysat
non dilué	60,6	—	48,1 (p=0,2)	—	0,3
d = 4		0,0	66,0	0,6	6,1
d = 20		16,9	68,0	28,4	20,3
d = 50		25,8	64,2	39,2	32,4
d = 100		38,7	70,3 (p=0,2)	54,2	48,3
d = 500		64,8	65,5	56,3	52,4
d = 2000		65,1		45,6	

— La dilution exerce une influence sur les effets inhibiteurs, aussi bien de la substance ayant dialysé que de celle retenue par le gel. Mais la croissance optimum observée nest pas très significativement différente de celle du témoin (p=0,2).

— La croissance observée avec l'adialysat non dilué de la phase liquide est inférieure à celle du témoin, peu significativement, il est vrai (p=0,2). Cependant le tableau 6 révélait pour ce même adialysat une croissance égale à celle du témoin. Cette légère inégalité peut s'expliquer par un changement d'aspect physique observé au cours de la dialyse. On constate, en effet, que le gel durcit et que la partie liquide de l'adialysat est devenue très limpide. Cette phase liquide (séparée après dialyse) du tableau 6 n'est donc pas absolument comparable à celle d'avant dialyse (tabl. 7).

On peut résumer ainsi l'action de la dialyse sur les liquides de *C. gigantea* et de *C. chlamydantha :* le liquide de *C. chlamydantha,* privé du facteur inhibiteur par dialyse, manifeste un pouvoir stimulant sur la croissance (p=0,03). L'action stimulante du liquide de *C. gigantea* n'est pas apparente, soit que les substances stimulantes en soient absentes, soit que leur effet soit masqué par des restes inhibiteurs ne s'éliminant pas totalement par dialyse. Alors que l'inhibition est liée essentiellement à des molécules dialysables chez *C. chlamydantha,* une partie du facteur inhibiteur est, chez *C. gigantea,* associé à des macromolécules.

Comparons maintenant les variations de certains caractères chimiques que la séparation des phases et leur dialyse entraînent.

On constate, par les données du tableau 8, que les glucides sont présents uniquement sous forme de macromolécules; par contre l'azote est presque totalement dialysable (les enzymes, sans doute présents, ne sont pas dosables par leur azote). D'autre part, les ions minéraux diffusent en grande majorité par dialyse, notamment le potassium, dont la teneur est remarquablement élevée; ce cation est sûrement le principal responsable de la valeur élevée du pH.

Quelques hypothèses, finalement, peuvent être esquissées pour expliquer toutes les observations précédentes:

TABLEAU 8

Influence de la dialyse sur le pH, les teneurs en ions minéraux et glucides des liquides de C. gigantea *et* C. chlamydantha *(en meq/l de liquide de Cola).*

	C. chlamydantha		C. gigantea			
			phase liquide		phase gel	
	dialysat	adialysat	dial.	adial.	dial.	adial.
pH	9,1	5,9	9,2	5,9	8,2	9,0
Na	0	0	0	0	0	—
K	73,6	0,6	117,2	24,8	38,0	—*
Mg	5,8	0,4	6,4	1,1	3,2	—
Ca	4,6	1,0	1,7	1,0	1,4	—
Cl	5,2	0	0	0	0	—
glucides γ/ml	0	250,0	0	462,0	0	—
N total γ/ml	318	~0	178	~0	168	—

* La valeur devant figurer dans cette colonne est sûrement élevée mais le gel étant une phase solide, il est impossible de la prélever et de la diluer pour un dosage photométrique.

— Le liquide des fruits immatures des deux espèces étudiées contient un facteur inhibiteur de la croissance.

— Ce facteur est totalement dialysable chez *C. chlamydantha* et partiellement chez *C. gigantea.* Dans ce cas, la phase gélifiée le retient fortement, la phase liquide le laisse diffuser.

Le résultat de la dilution du liquide brut inciterait à penser à une association, au moins chez *C. chlamydantha,* entre facteurs inhibiteur et stimulant, la dilution favorisant la dissociation; celle-ci permettrait l'expression optimum de la stimulation pour une dilution qui serait assez grande pour favoriser la dissociation, mais pas trop pour ne pas diluer excessivement le facteur stimulant.

E. EVOLUTION DES PROPRIÉTÉS DU LIQUIDE AU COURS DE LA MATURATION

Les propriétés des liquides de cola évoluent-elles au cours de la maturation du fruit et, dans ce cas, dans quelle mesure les altérations subies peuvent-elles être reliées à des modifications des caractères physico-chimiques ? Toute précision apportée

sur ce sujet permettra de mieux comprendre les mécanismes, qui semblent mêlés, de l'inhibition et de la stimulation, et aidera, par ailleurs, à élucider le rôle de ce liquide dans le cycle biologique de la plante. Les essais suivants comparent des fruits immatures à d'autres récoltés 18 jours plus tard.

1. *Modifications des propriétés biologiques*

Les liquides bruts ont tout d'abord été expérimentés en vue de comparer, chez les deux espèces, les propriétés des liquides de fruits immatures à celles de fruits plus mûrs.

TABLEAU 9

Influence exercée sur la croissance par les liquides, purs et dilués, des fruits immatures et mûrs de Cola chlamydantha *(longueurs moyennes en mm).*

dilutions	pH	témoin	*C. chlamydantha* immature; n. jours	*C. chlamydantha* n. + 18 jours
		68,3		
liquide pur	pH = 9,2		0,3	32,4
d = 4	pH = 9,1		12,4	59,5
d = 8	pH = 8,8		58,2	97,3
d = 16	pH = 8,2			99,0
d = 32	pH = 7,6		87,2	105,1
	pH = 9,2 (ajusté)		96,2 (p = 0,08)	90,8
d = 64	pH = 7,2		68,8	90,8
	pH = 9,2 (ajusté)		69,8	84,2
d = 128	pH = 6,6		66,8	108,4
	pH = 9,2 (ajusté)		63,8	102,4

L'examen du tableau 9 permet de constater, en premier lieu, une très sensible diminution du pouvoir inhibiteur du liquide de *C. chlamydantha* consécutive à la maturation. Le liquide pur, en effet, s'il provient de fruits immatures, n'assure aucune croissance, s'il provient de fruits mûrs, permet aux plantules un développement atteignant près de la moitié de celui des graines témoins.

La dilution du liquide des fruits immatures, si elle permet de stimuler la croissance, a cependant des effets moins accentués que celle du liquide de fruits de maturité plus

avancée. La seule exception est celle de la dilution 32 pour laquelle les résultats sont sensiblement équivalents.

L'influence de la dialyse (tabl. 10) confirme ces différences.

TABLEAU 10

Influence exercée sur la croissance par les liquides des fruits immatures et mûrs de Cola chlamydantha, *avant et après dialyse (longueur moyenne en mm).*

	témoin	*C. chlamydantha* immature: n jours	*C. chlamydantha* n + 18 jours
	51,4		
Cola pur		0,2	18,9
dialysat (d = 4)		18,3	27,8
adialysat		95,0 (p = 0,06)	81,2 (p = 0,07)

Dans les deux types de fruits la substance inhibitrice dialyse, permettant au pouvoir stimulant, lié à des substances macromoléculaires, de s'exprimer. La maturation a diminué le pouvoir inhibiteur du liquide sans augmenter son pouvoir stimulant. Il faudrait toutefois un complément d'information et des analyses régulières à des stades de maturité bien contrôlés pour s'assurer du sens et de l'amplitude des transformations.

Le liquide plus fortement inhibiteur de *C. gigantea* présente-t-il les mêmes altérations ? Les effets entraînés par une différence de maturation de 18 jours peuvent être comparés dans le tableau 11.

TABLEAU 11

Influence exercée sur la croissance par les liquides bruts de fruits de C. chlamydantha *et de* C. gigantea *récoltés à 18 jours d'intervalle. (Longueur moyenne en mm ; durée de germination : 3 jours).*

témoin	*C. chlamydantha*		*C. gigantea*	
	immature: n jours	n + 18 jours	immature: n jours	n + 18 jours
38,0	0,2	18,9	0,0	0,0

Une maturation supplémentaire de 18 jours n'a pas entamé le pouvoir inhibiteur chez *C. gigantea* comme elle l'a fait chez *C. chlamydantha.* On peut penser qu'une très forte concentration du facteur en cause masque, chez *C. gigantea,* les effets d'un affaiblissement réel du pouvoir inhibiteur; toutefois, des essais complémentaires

portant sur les propriétés du dialysat dilué de liquide de fruits mûris de *C. gigantea* révèlent qu'aucun affaiblissement de ce pouvoir ne peut être décelé après ces 18 jours supplémentaires de maturation.

2. *Modification des caractères physico-chimiques*

a) *Caractères chimiques*

TABLEAU 12

Modifications de certains caractères chimiques entraînées par la maturation des fruits de C. chlamydantha *et* C. gigantea.

	C. chlamydantha				*C. gigantea* (liquide)			
	maturité de n jours		n + 18 jours		n jours		n + 18 jours	
	dialysat	adialysat	dialysat	adialysat	dialysat	adialysat	dialysat	adialysat
pH	9,2		9,1		9,2		9,2	
Na méq/ml . .	0		3,5		0		0	
K	73,6	0,6	43,9	0,4	117,2	24,8	106,0	24,2
Mg	5,8	0,4	13,4	0,9	6,4	1,1	8,6	0,6
Ca	4,6	1,0	4,8	1,1	1,7	1,0		
Cl	5,2	0,0	4,5	0,5	0,0	0,0		
PO_4	0		0		0		0	
N. total γ/ml .	330		297		187		198	
N Folin . . .	72		65		26		26	
glucides . . .	250		295		462		474	

L'examen du tableau 12 souligne quelques modifications dont la plus importante touche la teneur en ions K^+ du liquide de *C. chlamydantha*. Cette diminution sensible a eu cependant peu de répercussion sur le pH. Le même phénomène s'observe, mais plus atténué, chez *C. gigantea*. Où est passé cet élément K ? Le volume de liquide par fruit n'a guère varié, c'est donc vraisemblablement par échange entre liquide et graine ou paroi interne de fruit qu'il faut expliquer cette perte en potassium. En contre-partie, une très légère augmentation des ions Mg est à noter, tant dans l'une que dans l'autre espèce.

b) *Spectres*

Les spectres d'absorption ont été établis. Aucune absorption ne se manifeste en lumière visible (malgré la coloration ambrée de *C. chlamydantha*). Par contre, les deux liquides absorbent dans l'ultraviolet. Les substances responsables de l'inhibition étant recueillies par les dialysats c'est sur ceux-ci que nous étudierons les altérations entraînées par la maturation.

Comparons, tout d'abord, les spectres que fournissent les 2 espèces étudiées. La figure 4 permet de constater, pour chaque cas, 2 maximums d'absorption situés

sensiblement aux mêmes longueurs d'onde: l'un à 254-260 mμ, l'autre à 210 mμ. Les proportions des substances responsables de l'absorption à 260 mμ sont différentes; ce rapport est plus élevé chez *C. chlamydantha*.

La figure 5, relative à la phase liquide de fruits immatures de *C. gigantea*, montre comment les substances responsables de l'absorption se sont réparties après la dialyse. On constate que la phase liquide avant dialyse présente un plateau de 275 à 255 mμ; et que le dialysat a recueilli les substances absorbant au delà de 240 mμ.

Nous remarquons (fig. 5) la disparition du pic d'absorption à 210 mμ. Le seul facteur ayant pu varier lors de l'établissement de ces spectres est le temps écoulé,

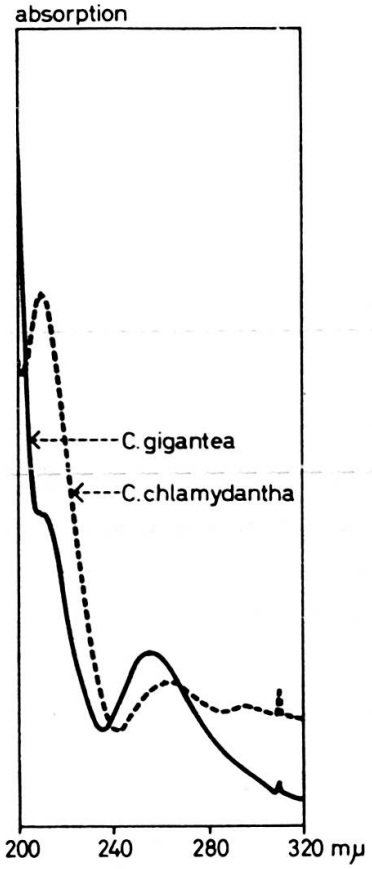


FIG. 4. — Spectres d'absorption dans l'UV du dialysat des liquides de fruits immatures de *C. chlamydantha* et *C. gigantea* (même pH)

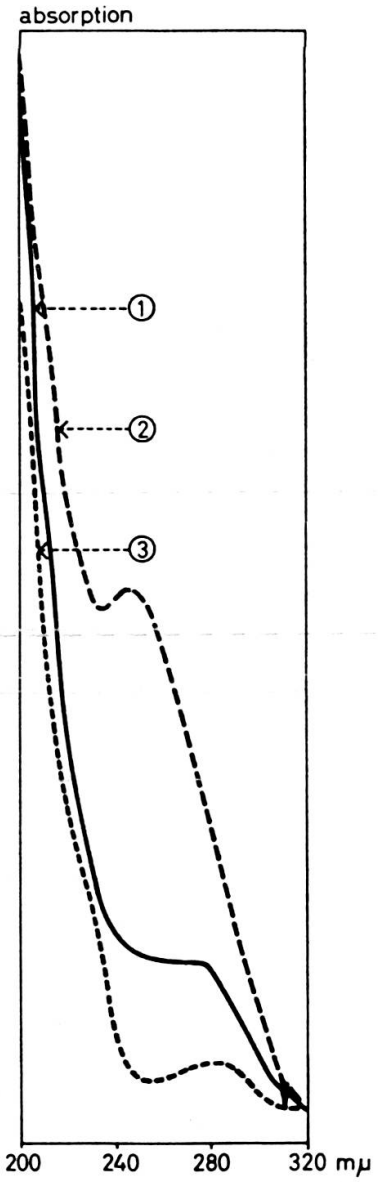


FIG. 5. — Spectres d'absorption en U.V. de la phase liquide (privée de gel) de fruits immatures de *C. gigantea* avant et après dialyse.

1. Phase liquide: pH = 8,6
2. Dialysat de la phase liquide: pH = 8,9
3. Adialysat de la phase liquide: pH = 8,6 (après ajustement)

en laboratoire, entre les différentes opérations, les spectres de la figure 4 et ceux de la figure 5 ayant été établis à quelques jours d'intervalle (la conservation des

liquides entre 2 opérations ayant été assurée à +4° C). Il devient donc nécessaire de préciser le rôle que joue la conservation des liquides.

3. *Comparaison entre maturation et conservation des liquides*

La nécessité de répéter les essais exige la mise au point de la meilleure technique de conservation des liquides. La lyophilisation présente de bonnes garanties de maintien des substances à l'état natif. La congélation rapide (−60°) et la conservation des congélats à basse température est également une technique acceptable. Les tests de comparaison portant sur les propriétés biologiques nous ont montré que celles-ci étaient effectivement préservées de ces 2 manières. Néanmoins, certains

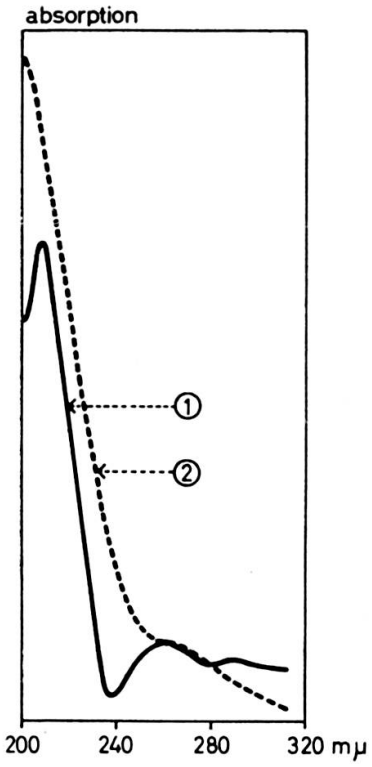


FIG. 6 *a)*

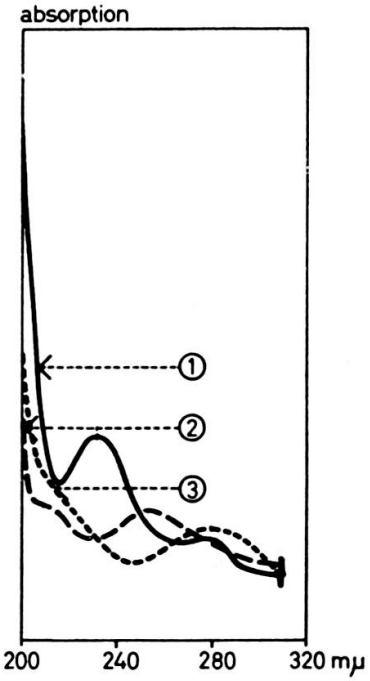


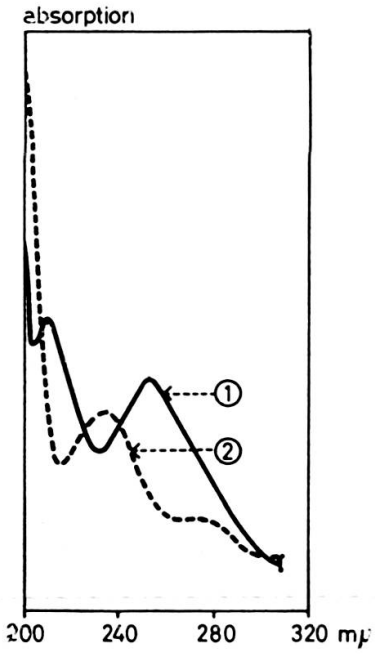
FIG. 6 *b)*

FIG. 6. — Spectres d'absorption en U.V. (établis à même pH) des dialysats de liquides frais et conservés.
a) *C. chlamydantha immature :*
1. —— Liquide frais
2. - - - - Liquide conservé
b) *C. gigantea*, fruits coupés immatures et mûris en chambre à 22° C:
1. —— Après 15 heures de dialyse
2. — — Après 15 heures de dialyse + 48 heures de conservation
3. - - - - Après 15 heures de dialyse + 6 jours de conservation

caractères physico-chimiques sont très rapidement modifiés dès que le liquide est sorti du fruit et ceci nous a conduit à préciser les transformations que la conservation entraîne. Il pouvait être intéressant de les comparer à celles qui sont liées à la maturation.

Examinons, tout d'abord, les modifications que subit le spectre puisqu'il nous faut expliquer la disparition du maximum situé à 210 mμ. La figure 6 *a* permet de comparer les spectres des dialysats des liquides de fruits immatures de *C. chlamydantha :* le fruit frais révèle 2 maximums d'absorption: à 254 et à 210 mμ. Mais nous constatons qu'après 15 jours de conservation à +4° C, ces 2 accidents ne sont plus qu'à peine marqués.

Les observations effectuées à partir de dialysats de liquides de fruits de *C. gigantea* (fig. 6 *b*) sont encore plus significatives.



On remarque tout d'abord une fluctuation dans la position des maximums. Le pic principal passe de 256 à 235 par maturation (fig. 7) et de 235 à 260 par conservation. (fig. 6 *b*) Il semblerait donc que la conservation des liquides entraîne certaines transformations inverses de celles produites au cours de la maturation. Toutefois la disparition du pic à 210 mμ est une conséquence aussi bien de la maturation que de la conservation (fig. 6 *b* et 7).

FIG. 7. — Spectres d'absorption en U.V. (établis à même pH) des dialysats de fruits de *C. gigantea* présentant une différence de maturation de 15 jours:

1. —— Fruits immatures
2. - - - - Fruits mûrs

Il reste à préciser (tabl. 13) le retentissement, sur les propriétés des liquides, de leur conservation.

TABLEAU 13

Influence de la conservation à +4° C sur l'action des liquides bruts de C. chlamydantha *et de* C. gigantea, *provenant de fruits immatures et mûrs, sur la croissance (longueur moyenne en mm).*

		C. chlamydantha		C. gigantea	
	témoin	immature	mûr	immature	mûr
liquide frais	37,0	0,0	18,9	0,0	0,0
liquide conservé 30 jours à 4° C	38,1	13,7	31,8	4,4	6,2

Il est très intéressant de constater une diminution spectaculaire du pouvoir inhibiteur allant presque, pour les fruits mûrs de *C. chlamydantha* jusqu'à son annulation. De ce point de vue, la conservation va dans le même sens, du moins en ce qui concerne *C. chlamydantha*, mais encore plus loin que la maturation. On observe également une diminution du pH, plus légère que celle due à la maturation en ce qui concerne le liquide brut.

Il est difficile pour l'instant, d'établir un parallélisme entre manifestation du pouvoir inhibiteur et maximum d'absorption. Le liquide présentant la levée d'inhibition presque totale est celui de *C. chlamydantha* mûr conservé; or le spectre lui correspondant ne montre plus de maximum. Le seul rapprochement que l'on peut faire actuellement est une concordance entre le fort pouvoir inhibiteur des dialysats de liquides de fruits immatures de *C. gigantea* et les pics d'absorption à 210 et 256 mμ. Après conservation du dialysat le maximum situé à 210 mμ disparaît, celui à 256 subsiste et le pouvoir inhibiteur est toujours très grand. C'est donc à ce maximum que semble être spécialement liée l'inhibition.

IV. ANALYSE ET CARACTÉRISATION DU FACTEUR INHIBITEUR

Le liquide des fruits de *Cola gigantea* étant, nous l'avons vu, le plus fortement inhibiteur, c'est cette espèce qui nous fournira le matériel à partir duquel nous allons tenter d'analyser et de caractériser le facteur responsable. Les analyses seront réalisées sur les dialysats du liquide. Bien que l'inhibition soit totale avec des dialysats présentant une dilution de 4 fois le liquide brut, à partir de telles solutions peu de tests qualitatifs sont révélateurs, notamment celui à la ninhydrine; il faut opérer sur des solutions beaucoup plus concentrées. La concentration des dialysats fut obtenue par lyophilisation.

A. Analyse des substances dialysables

1. *Tests qualitatifs généraux*

Les tests suivants furent effectués:

— permanganate en milieu acide, dénote le pouvoir réducteur;

— ninhydrine en milieu neutre, indique la présence de groupes aminés (acides aminés sauf proline et hydroxyproline, et peptides);

— Iode:

  — vapeurs: la plupart des substances azotées donnent une coloration jaune ou brune;

— solution iodo-iodurée: une coloration bleue révèle l'amidon, rouge du glycogène ou des érythrodextrines; une décoloration indique une réduction ($I^o \rightarrow I^-$);

— Fluorescence en lumière UV (254 et 366 mμ): certaines substances excitées par des radiations ultra-violettes émettent une lumière visible;

— Vert de bromocrésol: révèle en bleu les substances alcalines, en jaune les substances acides;

— Test de Wood: (nitrate d'argent+bleu de bromophénol après neutralisation par les vapeurs d'ammoniaque) révèle, avec une très grande sensibilité, les composés à fonction imidazol ou comportant au moins une fonction aminée sur un noyau pyrimidique.

Ces tests ont été appliqués pour différencier et caractériser les substances séparées par migration de solvants sur couches minces. Pour la recherche de propriétés globales des dialysats, d'autres tests ont en outre été utilisés: tests de Draggendorf (alcaloïdes), de Sakagouchi (fonction guanidique monosubstituée), de Procharska et d'Ehrlich (fonction indol), de Pauli (fonction phénol simple).

2. *Propriétés générales des dialysats et adialysats de liquide de* C. gigantea

Les données recueillies après la réalisation des tests sur les adialysats non concentrés et les dialysats de même dilution (4 fois celle du liquide pur), conduisent aux conclusions suivantes:

— Les adialysats ne réagissent pas à la ninhydrine; ceci ne nous étonne pas étant donné le taux pratiquement nul d'azote restant après dialyse.

— Les dialysats, en revanche, qui contiennent de l'azote, sont susceptibles de renfermer des acides et peptides alpha aminés. Seul cependant, le dialysat de la phase gélifiée du liquide de *C. gigantea* donne une réaction très positive. Le dialysat de la phase liquide de la même espèce donne une réaction très faiblement positive et les dialysats de liquide de *C. chlamydantha* ne réagissent pratiquement pas. Si l'on se rappelle les propriétés inhibitrices de ces liquides, on constate un parallélisme entre concentration en substances ninhydrine + et inhibition.

— Aucun adialysat ne fixe les vapeurs d'iode. En revanche, tous les dialysats se colorent, coloration dont sont, sans doute, responsables les corps azotés présents; après pulvérisation de solution iodo-iodurée sur spots ou réaction en tube, on peut conclure que les macromolécules de glucides qui constituent l'adialysat ne renferment ni amidon, ni erythrodextrines.

— Les tests au permanganate, en milieu neutre ou acide, confirment l'absence de pouvoir réducteur de tous les adialysats. Parmi les dialysats, on remarque une différence, là encore, entre les dialysats des 2 phases de *C. gigantea:* seul le dialysat

de la phase gel est très nettement réducteur, celui de la phase liquide ne réduit le permanganate que lorsqu'il est concentré.

— Les tests de Wood sont positifs pour tous les dialysats.

— Le dialysat de *C. gigantea* présente une fluorescence blanc-jaune à 366 mμ.

Quelles constatations générales peut-on dégager de toutes ces observations ?

Les substances macromoléculaires qui constituent le liquide de cola après dialyse sont, nous l'avions vu par les dosages, presque exclusivement des glucides à côté desquels figurent sans doute des enzymes. La germination et la croissance de plantules est favorisée soit par cette trame macromoléculaire glucidique, soit par la présence d'autres molécules. Les glucides macromoléculaires existent chez les deux espèces de cola, mais leur arrangement en réseau plus serré conduit, chez *C. gigantea*, à la séparation d'une phase gélifiée retenant, par adsorption, nombre de petites molécules: amino-acides, bases puriques et pyrimidiques, molécules réductrices dont les doubles liaisons jouent un rôle important dans les réactions et dont la présence est manifestée par une absorption en UV. C'est parmi ces substances de petite dimension, qu'il faut chercher le facteur inhibiteur dont les effets sont modifiés par le temps et par la maturation, modifications liées à des variations de l'absorption en UV.

3. *Propriétés du dialysat concentré de liquide de* C. gigantea

Après concentration, des fonctions, qui n'avaient pas été décelées, apparaissent. D'une manière générale, les réactifs donnant une coloration de fond sont décolorés (rhodamine, bleu de prusse..). Les résultats des divers tests réalisés sont condensés dans le tableau 14.

On constate que le dialysat renferme des substances aminées, fluorescentes à 366 mμ mais non à 254, absorbant les vapeurs d'iode et réductrices. La présence dans ces substances de fonctions phénol et imidazol ou de constituants possédant au moins une fonction aminée sur un noyau pyrimidine (telle les purines) est possible ainsi que celle d'acides polyéniques.

4. *Chromatographie analytique sur couche mince du dialysat concentré*

Ne connaissant pas la nature des substances dialysées, nous avons essayé divers milieux pour choisir celui qui donnerait les meilleures séparations. Toutefois, ces substances étant hydrosolubles et le facteur inhibiteur insoluble dans l'éther et le chloroforme, ces deux solvants ont été éliminés; des solvants polaires ont, en revanche, été utilisés; les meilleures résolutions furent obtenues avec le mélange solvant butanol-acide acétique-eau (6:2:2), que nous avons adopté. Outre le gel de cellulose, les gels de silice G et H ont été employés. Les séparations ne sont pas meilleures mais ils ont l'avantage de permettre la révélation par les réactifs corrosifs, aussi furent-ils utilisés pour les tests au chlorure d'antimoine; en outre, ils permettent d'obtenir, avec la

TABLEAU 14

Résultats de tests colorés spécifiques appliqués pour mettre en évidence les groupes fonctionnels présents dans les molécules dialysables du liquide de Cola gigantea

Fonction révélée		test	coloration spécifique	résultat
Substances phénoliques	phénols simples	Pauli		—
		Bleu solide BB		—
		Cl_3Fe + ferrocyanure	bleu foncé sur fond bleu pâle	blanc sur fond bleu (pouvoir décolorant)
	phénols catéchols crésols a.p-h-benzoique a.gentisique	Cl_3Fe	violet vert violet bleu rouge bleu	orangé
	hydroxyphénols mono di	Millon	 rouge orangé	 orangé fugace
Phénols, terpènes et leurs esters		Cl_5Sb		—
Stéroïdes, caroténoïdes, vitamine A		Cl_3Sb		—
Alcaloïdes		Draggendorff		—
Indols		Ehrlich		—
		Procharska		—
Fonction guanidique monosubstituée		Sakagouchi		—
Lipoïdes	lipoïdes saturés ou non	dichlor-fluoresceine	pas de coloration, fluorescence jaune vert en U.V.	rose rouge, pas de fluorescence
	lipides	rhodamine 0,25%	violet sur fond rouge et fluorescence rouge	blanc sur fond rouge (pouvoir décolorant) pas de fluorescence
	acides polyéniques ou monoglycerides	vert de bromothymol	jaune sur fond bleu	+

ninhydrine des couleurs beaucoup plus nuancées. La plupart des chromatographies furent donc réalisées sur cellulose MN 300, quelques-unes le furent sur silice HR ainsi que cellulose MN 300 UV 254 et silice HF 254 afin de repérer les substances absorbant à cette longueur d'onde.

Après développement des chromatogrammes, les propriétés des zones séparées furent mises en évidence parallèlement par action des 6 révélateurs suivants: ninhydrine, fluorescence, absorption de vapeurs d'iode, vert de bromocrésol, permanganate en milieu neutre ou acide. La figure 8 reproduit le chromatogramme obtenu. Nous y distinguons 7 zones se différenciant par leur réactivité vis-à-vis des révélateurs indiqués ci-dessus (voir tabl. 15, première partie).

Le plus mobile des composants est révélé par fluorescence et absorption d'iode, mais n'est pas coloré par la ninhydrine. Il présente, en outre, la particularité de n'être pas réducteur. Les zones les plus manifestement réductrices sont celles de la tache principale 3, 4, 5. Cette tache, qui groupe quantitativement la majorité des constituants, est homogènement alcaline. Elle absorbe d'une manière compacte l'iode à l'exclusion de la moitié supérieure de la zone 5. Elle est hétérogène par révélation à la ninhydrine et par fluorescence.

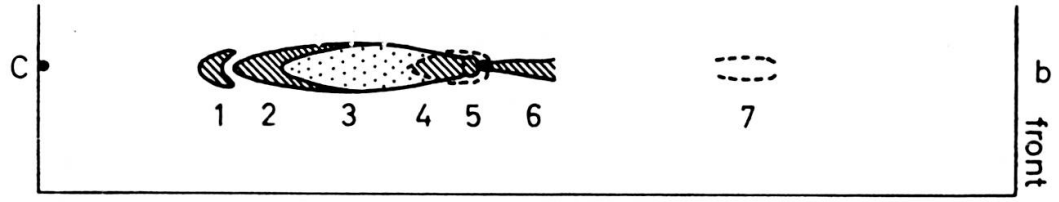


FIG. 8. — Chromatographie sur couche mince du dialysat du liquide de fruits de *C. gigantea* (cellulose MN 300, 250 μ, 13 cm butanol-acide acétique-eau 6:2:2, révélation: ninhydrine et fluorescence) Contours pointillés = fluorescence à 366 mμ.
Zones hachurées = violettes ou rouges à la ninhydrine
Zone pointillée = jaune à la ninhydrine

La zone 5, très fluorescente, se subdivise, en effet, en deux parties par son comportement, non seulement vis-à-vis de l'absorption d'iode, mais aussi vis-à-vis de la ninhydrine; la moitié inférieure est colorée en violet rouge, la moitié supérieure apparaît ramassée presque ponctuelle, colorée en violet. Après le test de Wood, ce site donne la réaction la plus positive.

La zone 3 n'est pas fluorescente et se particularise par sa coloration en jaune à la ninhydrine. Des tests de migration parallèle, utilisant la proline et l'hydroxyproline comme témoins, ont montré que le Rf de cette zone se situait entre celui de chacun de ces acides aminés.

Les deux zones les moins mobiles, 1 et 2, ne sont pas fluorescentes, n'absorbent pas l'iode, ont une réaction acide et sont colorées en violet par la ninhydrine. Ce pourraient être des aminoacides à plusieurs fonctions acides tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique. Le Rf de l'acide glutamique est trop élevé (il correspond à l'emplacement de la moitié inférieure de la zone 3) mais celui de l'acide aspartique concorde avec celui de la zone 2.

Signalons enfin que, si les zones positives au test de Wood sont susceptibles de contenir des fonctions aminées sur noyau pyrimidique, ces fonctions ne sont pas

imputables aux bases puriques et pyrimidiques nucléiques; le Rf de ces bases utilisées comme témoin ne concorde pas avec ces zones.

5. *Modifications reflétées par le chromatogramme après hydrolyse acide du dialysat*

Bien que la majorité des constituants du dialysat soient aminés, les liaisons qui peuvent unir certains d'entre eux pour former la substance inhibitrice ne sont pas peptidiques. En effet, l'action de la trypsine n'altère pas l'inhibition et ne modifie pas sensiblement le chromatogramme; on note toutefois quelques changements mineurs dans les proportions des zones les unes par rapport aux autres; les zones les plus mobiles sont plus intensément colorées au léger détriment de la tache principale. En revanche, l'hydrolyse acide altère très nettement le pouvoir inhibiteur, sans cependant le supprimer totalement; il est réduit de 8 fois environ, c'est-à-dire qu'il faut utiliser l'hydrolysat à des doses 8 fois plus concentrées pour obtenir une inhibition totale. Huit heures d'hydrolyse suffisent pour provoquer toutes les modifications observées: une hydrolyse de 24 heure. n'entraîne aucune transformation supplémentaire tans de l'inhibition que du diagramme chromatographiquet

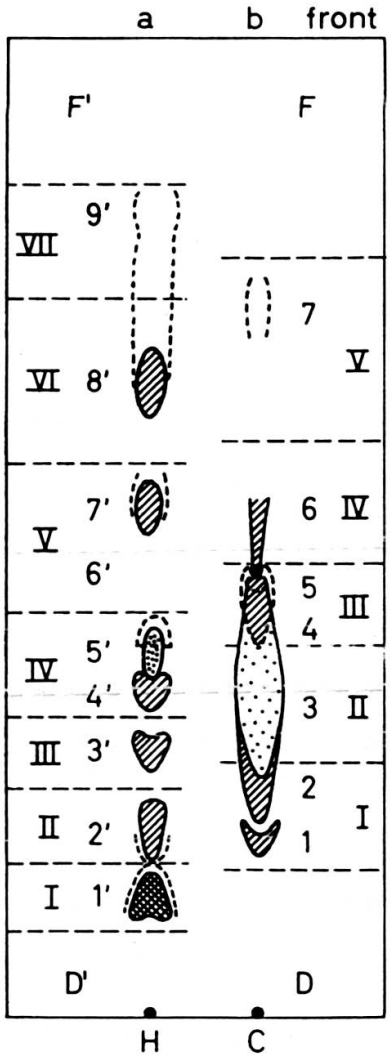


FIG. 9. — Schémas de chromatographies simultanées:
a) De l'hydrolysat du dialysat de liquide de *Cola gigantea* (H)
b) Du dialysat brut (C)
(cellulose MN 300, 250 mμ, 13 cm; butanol-acide acétique-eau 6:2:2; révélation: ninhydrine et fluorescence)
Contours en tirets = fluorescence à 366 mμ
Zones hachurées = violettes ou rouges à la ninhydrine
Zone pointillée = jaune à la ninhydrine
(Les chiffres romains désignent les zones éluées en chromatographie préparative.)

Les modifications constatées sur le chromatogramme reflètent la libération de substances engagées auparavant dans un édifice moléculaire complexe. Les schémas de la figure 9 permettent d'apprécier les transformations subies: après hydrolyse, les zones révélées sont plus nombreuses, nettement séparées les unes des autres et de réactivité modifiée comme en témoigne le tableau 15.

Les changements les plus frappants concernent la tache principale 3, 4, 5. La zone fluorescente 4, 5 s'est scindée en trois. L'une, 5′, garde le même Rf, mais n'a plus de groupe aminé et n'absorbe plus l'iode; les autres, 1′ et 2′, ont un Rf très faible, et sont colorées en rouge par la ninhydrine, coloration à rapprocher de celle de la moitié inférieure de la zone 5 avant hydrolyse; en outre, elles fixent l'iode de façon singulière: la zone 2′ ne fixe l'iode qu'après une exposition aux vapeurs de

TABLEAU 15

Réactivité des substances révélées sur les chromatogrammes figures 8 et 9.

n° des zones	Dialysat non hydrolysé — Réactions						n° des zones	dialysat hydrolysé — Réactions					
	F	N	I	V	W	Mn		F	N	I	V	W	Mn
1	—	+(v)	—	+(j)	—	—	1′	++	+(r)	+++(b)	+(b)	++	+
2	—	+(v)	—	+(j)	—	—	2′	+	+(r)	+	+(j)	+	—
3	—	+(j)	+ +	++(b)	—	+	3′	—	+(v)	+	+(j)	—	—
4	+	+(v)	+++	++(b)	—	+	4′	—	+(v)	+(j)	+(j)	—	—
5½< ½>	++ +++	+(r) +(v)	+ —	+(b) —	+ ++	+ +	5′	++	—	— —	+(j)	—	+
6	—	+(v)	+	—	—	—	6′	—	— —	— —	—	—	+
7	+	—	+	—	—	—	7′	+	+(v)	+	—	—	+
							8′	+	+(v)	+	—	—	+
							9′	+	—	+	—	—	+

Abréviations : F = fluorescence à 366 mμ, N = ninhydrine, I = absorption de vapeurs d'iode, V = vert de bromocresol, W = test de Wood, Mn = permanganate en milieu acide.
Pour la ninhydrine : v = violet, r = rouge, j = jaune ou brun violet virant au jaune;
Pour l'Iode : le fond est jaune; les zones — — décolorent le fond, les — n'absorbent pas, les + absorbent en brun sauf celles précisées (j) qui sont jaune d'or et (b) qui sont bleu violet;
Pour le vert de bromocresol : b = bleu indiquant un pH > 6, j = jaune indiquant un pH < 6.

longue durée (au minimum 10 heures) et seulement en sa partie centrale; la zone 1′, au contraire absorbe l'iode très rapidement (15 minutes) et très intensément, se colorant singulièrement en bleu violet alors que toutes les autres zones absorbant l'iode se colorent généralement en brun, parfois en jaune.

Une autre modification est à remarquer: le fond du chromatogramme, coloré en jaune pâle par l'iode, est décoloré à l'emplacement des zones 5′ et 6′. Les zones 1

et 2 avant hydrolyse se signalaient par un fond un peu plus clair à leur niveau, mais aucune zone avant hydrolyse ne se signalait par une décoloration aussi complète du fond.

B. Séparation des substances du liquide de *Cola gigantea* par chromatographie préparative du dialysat

1. *Chromatographie préparative sur couche mince du dialysat brut et hydrolysé*

Les zones individualisées sur les chromatogrammes après migration sont séparées, éluées et testées. Les chromatographies furent réalisées sur couches de cellulose d'épaisseur supérieure à celle utilisée en chromatographie analytique: les dimensions furent ici 20 cm × 20 cm × 2 mm. Un volume de 0,5 ml d'une solution très concentrée du dialysat brut ou hydrolysé fut déposé sur une ligne de départ de 14 cm de long; sur la même ligne, 2 cm plus loin, un spot témoin était destiné à la révélation à la ninhydrine après grattage des zones à éluer; ces zones furent dessinées, après migration et séchage, avec une pointe sèche en prenant comme référence les zones fluorescentes. Après évaporation complète des solvants (3 heures en courant d'air tiède + une nuit à l'ambiance), les zones dessinées furent grattées, recueillies en béchers et laissées encore à évaporer une nuit; après quoi 10 ml d'eau bidistillée furent ajoutées à chaque bécher, laissés en contact, puis filtrés. Dix ml supplémentaires complétèrent l'extraction; ces 10 ml ne furent pas mélangés aux premiers, mais conservés pour compléter, si besoin était, l'arrosage des graines en boîte de Pétri, la mise en germination étant effectuée avec le premier extrait plus concentré. Les zones d'élution sont figurées en chiffres romains sur le schéma des chromatogrammes figure 9.

Un premier résultat, relatif à la chromatographie du dialysat de la phase liquide de *C. gigantea*, éluée selon le schéma fig. 9 (C), montre (tabl. 16) que les zones éluées sont diversement actives sur la germination.

Seules les croissances permises par les éluats II et III sont significativement différentes de celles des témoins ($p < 0{,}01$). La zone la plus inhibitrice est la zone jaune à la ninhydrine. Aucune indication n'est fournie par les valeurs du pH de chaque zone, ni par les données de leur spectre d'absorption en UV; les pH, en effet, sont très voisins entre eux et proches de la neutralité, les spectres ne révèlent aucune distinction marquante. Le contact avec les solvants semble avoir uniformisé les particularités dans ce domaine. La zone frontale est inhibitrice mais n'est pas mentionnée tabl. 16 en raison de sa fluorescence et de sa réaction positive et diffuse avec la ninhydrine et l'iode, conséquence, pensions nous, de l'accumulation, en cette zone, des impuretés hydrosolubles contenues dans la cellulose. La com-

TABLEAU 16

Croissance des plantules de radis mises à germer en présence des éluats des zones chromatographiques figure 9 (C). (Les témoins correspondent respectivement à la zone située entre le front et le bord supérieur (sans solvant), à celle qui s'étend du bord inférieur à la ligne de départ, et à une bande prélevée verticalement sur un bord latéral avant la ligne de dépôt).

zones éluées	T1	T2	T3	I	II	III	IV	V
$\bar{l}$ mm	50,2	55,1	47,9	45,3	0	10,8	39,8	37,5

paraison avec des chromatographies réalisées sur gel de silice confirme que ces impuretés proviennent bien de la cellulose. Le front d'un chromatogramme en gel de silice est, en effet, à peine coloré par l'iode et pas du tout par la ninhydrine, contrairement à ce que l'on observe sur la cellulose. Cette comparaison permet de conclure à l'existence d'une substance de Rf $\sim$ 1, fluorescente, inhibitrice, non aminée. Malheureusement, le gel de silice retient très fortement le butanol dont on ne parvient pas à se débarrasser totalement, ce qui rend impossible la réalisation de tests biologiques. Aussi est-il nécessaire, pour la bonne interprétation des tests sur la croissance réalisés à partir des chromatographies sur cellulose, de contrôler l'influence de telles impuretés sur la croissance. Pour cela, une migration à blanc fut réalisée afin d'obtenir des témoins correspondant à divers niveaux de migration; chaque éluat fut éprouvé quant à son action sur la germination des graines; son pH fut mesuré et son spectre d'absorption en UV établi. Parallèlement furent réalisés sur même cellulose (MN 300) des chromatographies de dialysat brut et de dialysat hydrolysé. La correspondance entre chaque zone d'élution de ces chromatogrammes (y compris la zone de départ D et la zone frontale F) est figurée dans le tableau 17 qui rend compte de la croissance des plantules de graines mises à germer en présence des éluats.

Remarquons tout d'abord que les impuretés qui peuvent être accumulées dans, la zone frontale, si elles perturbent l'interprétation des colorations fournies par l'action de l'iode et de la ninhydrine, n'agissent pas sur la croissance; alors, se trouvent localisées, dans cette zone, des substances inhibitrices imputables au dialysat. A ce niveau, en effet, la croissance permise par le témoin est normale, celle permise par l'hydrolysat également; l'hydrolyse a donc altéré cette fraction inhibitrice du dialysat.

Nous constatons, en outre, que de nombreuses zones du dialysat sont inhibitrices. Les seules qui ne le soient pas, sont les deux moins mobiles. Lors des premiers essais (tabl. 16) les éluats IV et V n'étaient pas significativement différents des témoins; les différences se sont accentuées et sont devenues significatives; la seule différence qui distingue les deux séries d'essais est une plus grande concentration des dépôts [1], la dilution des substances présentes dans les éluats de la première série était trop grande pour permettre l'expression de leurs propriétés inhibitrices.

[1] Nous n'avons pas précisé ici les données quantitatives relatives aux dépôts, ces essais ayant pour but la comparaison des fractions entre elles.

TABLEAU 17

Influence sur la croissance des substances localisées dans chacune des zones révélées par chromatographie du dialysat brut et hydrolysé, comparativement à chaque zone témoin correspondante.

zones éluées		dialysat														
		brut						hydrolysé								
	D	I	II	III	IV	V	F	D'	I'	II'	III'	IV'	V'	VI'	VII'	F'
zones correspondantes chromatographiques	—	1 2	3	4 5	6	7	—	—	1'	2'	3'	4' 5'	6' 7'	8'	9'	—
témoins $\bar{I}$ mm	52,6	45,6	30,5	43,5		39,3	44,7	52,6	45,6		30,5		43,5	39,3		44,7
éluats $\bar{I}$ mm	42,7	38,8	0	10,8	12,5	13,8	0	42,8	37,3	50,7	47,7	36,2	49,8	44,1	47,2	41,0
témoins à l'eau = 58,3																

Enfin, notons qu'aucune zone de l'hydrolysat n'est significativement différente des témoins. Cependant, les hydrolysats, testés avant chromatographie, étaient encore inhibiteurs mais beaucoup plus faiblement que les dialysats bruts: alors que le dialysat est totalement inhibiteur lorsque sa dilution est 4 fois celle du liquide de cola, (d = 4), l'hydrolysat ne l'est totalement que s'il est 2 fois plus concentré (d=0,5).

Toutefois, un fait tout à fait singulier fut observé lors de chaque répétition: alors que la longueur totale des plantules ne permet pas de distinguer une action inhibitrice de l'hydrolysat, on constate sur les graines mises à germer en présence de l'un des éluats, toujours le même (II'), que la radicule des plantules est complètement avortée, seule la tigelle s'est développée et même fort bien puisqu'elle représente la longueur totale et que cette longueur n'est pas plus faible que celle des plantules normales. Aucune autre zone éluée ne présente une telle particularité, qu'elle provienne de l'hydrolysat ou du dialysat brut. Avec le dialysat, en effet, lorsqu'une inhibition se manifeste, la tige et la racine sont également affectées. Il semble donc que l'hydrolyse dissocie un édifice complexe inhibiteur et que, parmi les substances libérées, l'une, encore active, agit différemment.

Nous avons constaté également que l'hydrolysat possédait un pouvoir stimulant, qui ne se manifestait qu'après dilution. En effet, lors de chaque répétition, les dilutions correspondant à 4 et 8 fois celle du liquide de cola pur, permettaient son expression (tabl. 18).

TABLEAU 18

Influence sur la croissance du dialysat hydrolysé utilisé à une concentration 2 fois supérieure à celle du liquide de cola pur (d=0,5), à une concentration égale et à des dilutions de 4,8 et 16 fois ce liquide.

dilution	$\bar{l}$ mm
témoin	44,7
d = 0,5	0
d = 1	49,6
d = 4	76,3 (p=0,01)
d = 8	71,7
d = 16	60,8

2. *Chromatographie sur colonne du dialysat brut*

a) *Filtration*

Un autre mode de fractionnement fut mis en œuvre pour isoler le principe actif: le tamisage moléculaire des substances dialysables par filtration sur gel Sephadex. La séparation ici n'est plus basée sur l'affinité des substances pour tel ou tel solvant mais uniquement sur leur taille moléculaire.

Puisque les substances à fractionner sont dialysables, leur poids moléculaire est relativement petit et ne peut excéder 30 à 40.000. Les gels qui permettent une séparation dans le domaine des poids moléculaires de 0 à 30 000 sont des gels fortement réticulés. Les quatre types de gels sephadex suivants, de réticulation décroissante, (donc de porosité croissante) ont été utilisés: G-10 retardant les substances de poids moléculaire inférieur à 700, G-15 celles de poids inférieur à 1500, G-25 fractionnant dans le domaine de 1000 à 5000 et G-50 de 1500 à 30 000.

Par filtration sur gels G-10 et G-15, le facteur inhibiteur est totalement exclu. Son poids moléculaire est donc supérieur à 1500. Sur gels G-25 et G-50, il est retardé; sa sortie est observée, sur G-25, lorsqu'un volume (V-V_o) de 60 ml s'est écoulé; sur G-50, ce volume d'élution atteint 95 ml. On peut alors évaluer son poids moléculaire comme étant de l'ordre de 3 à 5000.

Le pH de chaque fraction a été mesuré, son spectre d'absorption en UV établi et son influence sur la croissance recherchée. Les diagrammes exprimant les résultats obtenus sont représentés par les figures 10, 11 et 12. Pour alléger les figures, l'ordonnée d'un point expérimental de la courbe de croissance fut assimilée à celle du témoin chaque fois que sa valeur n'en était pas significativement différente. L'examen et la comparaison de ces figures permettent plusieurs constatations.

— Ces diagrammes offrent une similitude générale manifestée par une sortie groupée des substances inhibitrices et une forte alcalinisation d'un certain nombre de fractions consécutives.

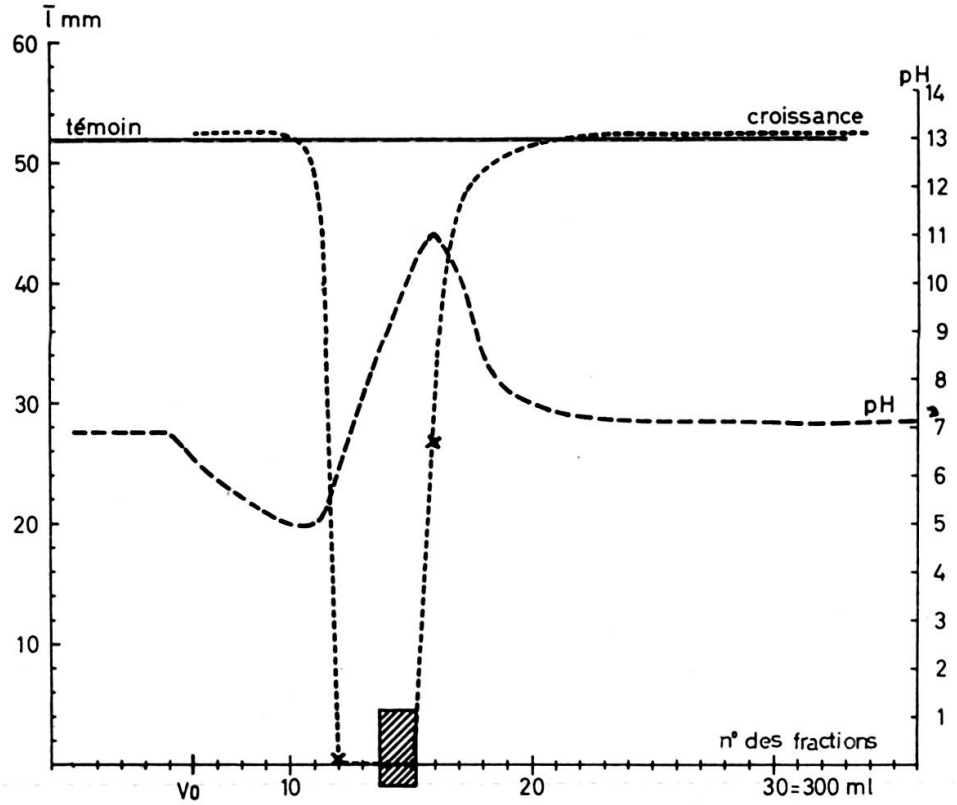


FIG. 10. — Fractionnement du dialysat du liquide de fruits mûrs de *Cola gigantea* sur résine Sephadex G-25:
Colonne 2,5 × 40 cm (30 g de gel)
Echantillon 400 mg lyophilisat dans 4 ml d'eau correspondant à 18 ml de liquide
Volume d'élution 350 ml par fractions de 10 ml (élution par l'eau bidistillée).

— En ce qui concerne les deux phases du liquide de *C. gigantea*, on ne relève aucune différence entre les profils d'élution après filtration dans des conditions identiques (figs. 11 et 12).

— Par contre, la filtration du dialysat de la phase liquide sur deux gels différents conduit à des profils d'élution semblables d'allure mais s'écartant par certains détails, ainsi, l'acidification observée sur les fractions précédant immédiatement les fractions alcalines lors de la filtration sur G-25 ne se retrouve pas en filtrant sur G-50.

— Il est intéressant de noter la désolidarisation des deux maximums, celui d'inhibition et celui du pH. Le décalage est particulièrement sensible lors des chromatographies sur G-50, la croissance est depuis longtemps redevenue normale que les fractions affirment encore un pH égal à 11. Ainsi, s'il était besoin de montrer une fois de plus que le pH ne joue aucun rôle causal dans l'inhibition, le diagramme de la figure 11 en fournirait la preuve définitive.

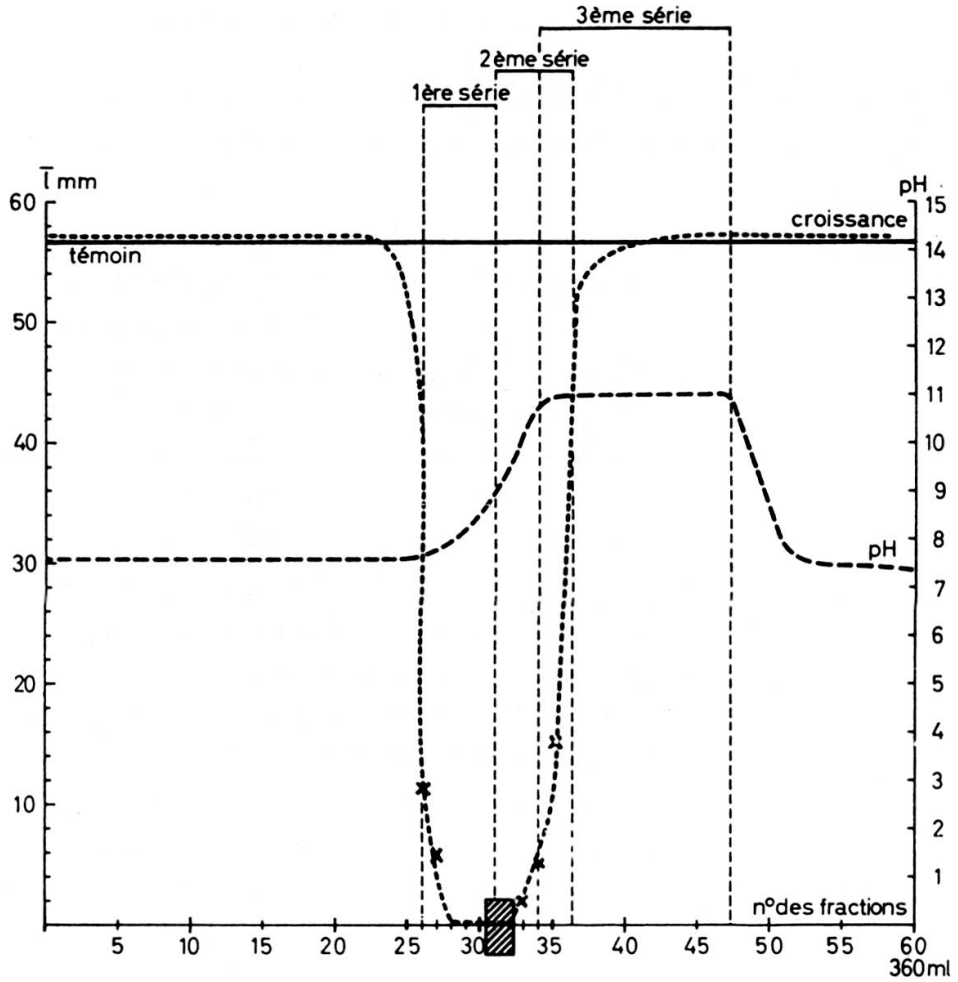


FIG. 11. — Fractionnement du dialysat de la phase liquide de fruits mûrs de *Cola gigantea* sur résine Sephadex G-50:
Colonne 2,5 × 40 cm (30 g de gel)
Echantillon 400 mg de lyophilisat dans 4 ml d'eau (= 48 ml liquide de Cola)
Volume d'élution: 360 ml par fractions de 6 ml (élution par l'eau bidistillée).

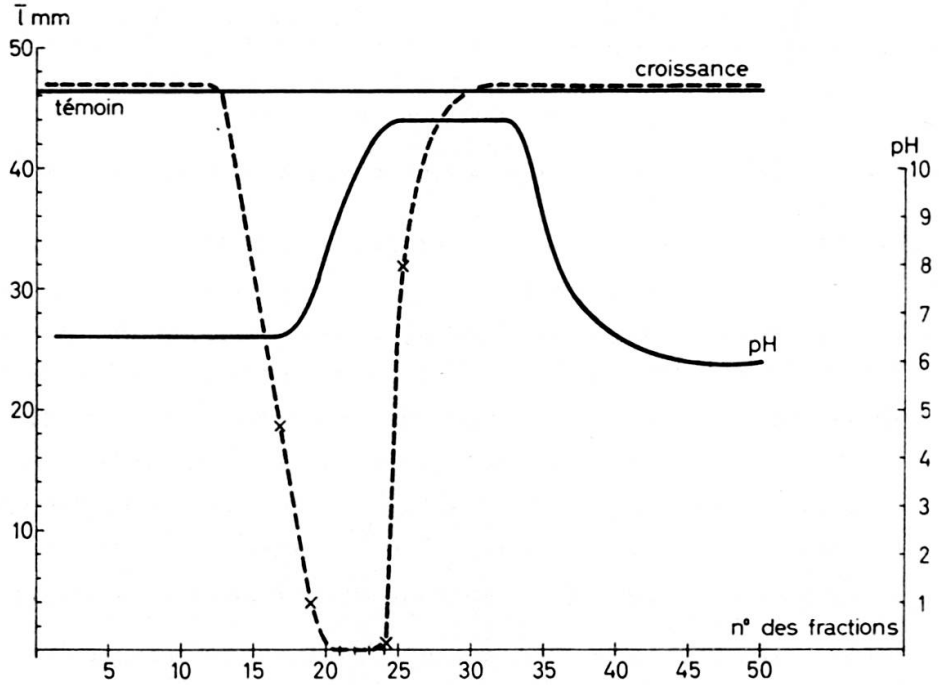
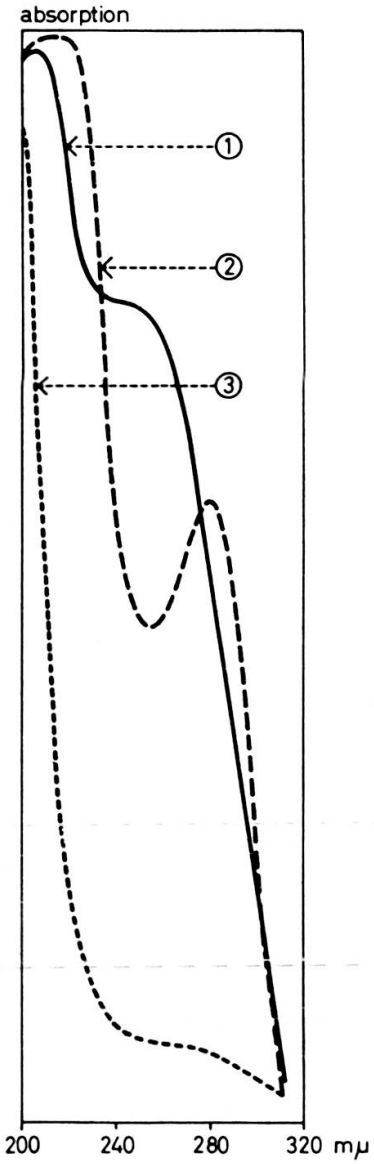


FIG. 12. — Fractionnement du dialysat de la phase gel des fruits de *Cola gigantea* sur résine Sephadex G-50:
Colonne 2,5 × 40 cm (30 g de gel)
Echantillon: 400 mg de lyophilisat dans 4 ml d'eau (= 48 ml de Cola)
Volume d'élution: 425 ml par fraction de 8,5 ml (élution par l'eau bidistillée)

— Parmi les fractions inhibitrices, celles qui présentent l'inhibition la plus forte ont été déterminées par dilution. Pour la chromatographie de la figure 10, ce sont les fractions 13 et 14 de pH 8 et 8, 5.



— Sur les diagrammes-figures 10, 11 et 12, on note deux fractions encadrées (14 et 15, fig. 10, 32 et 33, fig. 11, 23, 24 fig. 12*). Ce cadre signale qu'un jaunissement des papiers filtres se produit chaque fois que les graines sont mises à germer en utilisant ces fractions. Cette observation peut n'avoir aucune signification en rapport avec la constitution du liquide de Cola, toutefois sa constance au cours de toutes les répétitions nous incite à la considérer comme importante. Ce sont, en effet, toujours les fractions inhibitrices les dernières éluées qui réagissent ainsi. Sur G-25, ce jaunissement correspond au pH le plus élevé. Cette pigmentation nous a paru digne d'attention en raison de certaines coïncidences: après hydrolyse, le dialysat du liquide de *C. gigantea*, d'incolore vire au jaune; en outre, rappelons que, si le liquide des fruits de *C. gigantea* est incolore, celui de *C. chlamydantha* est jaune ambré; il est donc possible que des liens existent entre ce jaunissement et les substances éluées.

FIG. 13. — Spectre d'absorption en U.V. des fractions séparées par filtration sur gel Sephadex; l'ordre des séries correspond aux poids moléculaires décroissants:

1re série: fractions inhibitrices,
2e série: fractions inhibitrices,
3e série: fractions non inhibitrices alcalines.

— Lors de la filtration sur gel G-50, on remarque, en même temps que l'uniformisation de la portion de courbe des pH précédant l'alcalinisation, l'étalement de la portion de courbe de pH élevé, tandis que la courbe de croissance garde la même allure que celle observée sur G-25. Les substances influençant le pH sortent plus tard tout comme les substances inhibitrices, mais elles sont plus lentement éluées (il faut 50 ml pour éluer les substances inhibitrices sur G-25 et 72 sur G-50, mais alors que 60 ml éluent les substances alcalines sur G-25, il en faut 120 sur G-50). On est ainsi conduit à supposer l'existence de 2 séries de substances, l'une influençant le pH, l'autre portant l'inhibition. La première série aurait un poids moléculaire un peu plus

* Par omission accidentelle, cet encadrement n'est pas figuré sur la figure 12.

faible que la seconde, elle serait plus retardée mais aussi plus étalée par filtration sur G-50 qu'elle ne l'était sur G-25. Le chevauchement des deux séries, plus ou moins décalé suivant le gel, pourrait expliquer la légère différence d'allure présentée par les courbes des pH.

b) *Spectre d'absorption en UV des fractions*

Le spectre d'absorption en UV a été établi pour chacune des fractions. De la confrontation de tous les spectres obtenus, reproductibles lors des répétitions, il ressort que les fractions inhibitrices se séparent en 2 catégories: la première groupe les fractions 19 à 21 de la figure 12, 28 à 31 de la figure 11 et 12 à 14 de la figure 10, ces fractions absorbent les radiations U.V. avec une intensité croissant rapidement lorsque la longueur d'onde diminue, avec un plateau à 256 mμ; la seconde catégorie groupe les fractions 22 à 25 de la figure 12, 32 à 36 de la figure 11 et 15 à 16 de la figure 10, dont l'intensité d'absorption augmente également rapidement lorsque la longueur d'onde diminue à partir de 320 mμ mais elles présentent un maximum bien marqué à 275 mμ. On remarque que les pH de la première série sont plus faibles que ceux de la seconde, mais des ajustements respectifs permettant de comparer les spectres à même pH, ont montré que ces caractéristiques étaient maintenues.

Ainsi la filtration sur gel permet de séparer, non plus comme nous le croyions deux catégories de substances, mais trois, énoncées par poids moléculaires décroissants [1] et dont les spectres sont reproduits figure 13.

1°. substances inhibitrices présentant un plateau d'absorption à 256 mμ.
2°. substances inhibitrices, offrant un maximum d'absorption à 275 mμ.
3°. substances alcalines n'absorbant pas.

Il y a recouvrement entre fin d'élution des substances de la deuxième série et début d'élution de celles de la troisième. La position de ces trois séries de substances est délimitée sur la figure 11.

c) *Chromatographie analytique des fractions*

Pour préciser la nature des substances éluées, des chromatographies analytiques furent réalisées pour chacune des fractions d'une filtration. Deux méthodes furent appliquées. L'une soumit à la chromatographie analytique sur couche mince, selon la technique habituelle, ce qui restait des fractions d'une filtration après établissement d'un diagramme du type de celui de la figure 11; le volume restant après les tests de germination est, dans ce cas, évidemment restreint à quelques millilitres; cette faible quantité de liquide était alors laissée à évaporer en chambre froide jusqu'à réduction à 1 à 2 gouttes avec lesquelles la chromatographie était réalisée. L'autre méthode permit de travailler sur des volumes plus importants en supprimant la

[1] Cette distinction des poids moléculaires en fonction de leur volume d'élution est théorique. En pratique, deux substances de même taille moléculaire peuvent sortir séparément de la colonne si l'une est plus absorbée que l'autre.

recherche de l'influence des fractions sur la croissance; seule la courbe des pH et les spectres des fractions furent établis et la catégorisation des tubes déterminée en

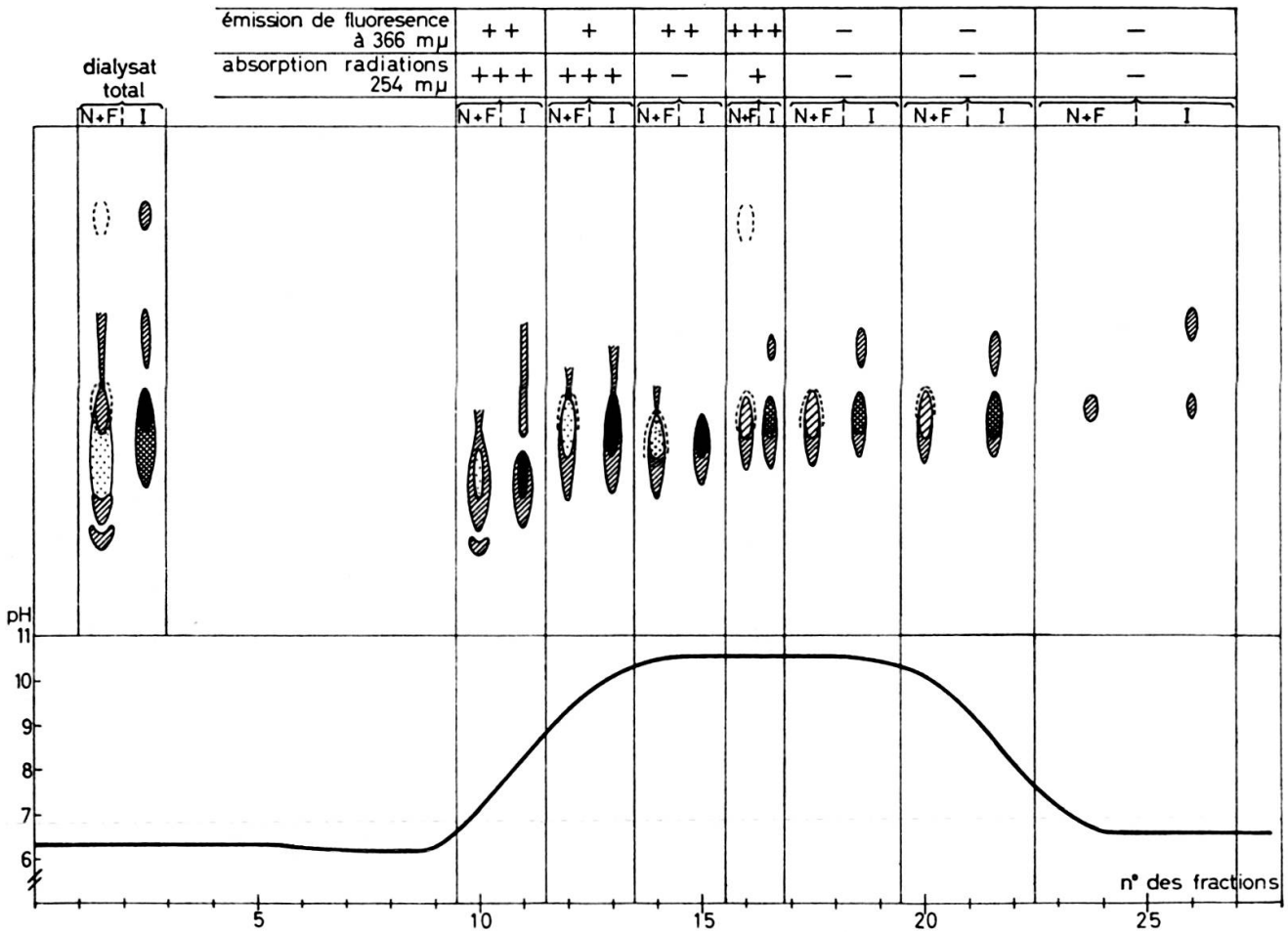


FIG. 14. — Chromatographie analytique des fractions recueillies à diverses phases de l'élution au cours d'une filtration sur gel Sephadex G-50 du dialysat du liquide total de *C. gigantea*. Après établissement de la courbe des pH, le volume global des fractions de chaque zone représentée sur la figure fut lyophilisé puis dissous dans 1 ml d'eau pour analyse sur couche mince:

RÉVÉLATION: *Ninhydrine (N)* zones hachurées = rouge à violet
zones pointillées = jaune
Iode (I) zones noires = brun foncé
zones quadrillées = brun
zones hachurées = brun pâle.

Fluorescence : par excitation avec les radiations U.V. 366 mμ

Absorption des radiations U.V. 254 mμ déterminée par examen des chromatogrammes sur cellulose MN 300 U.V. 254 et silice HF 254.

référence à ces données. Les volumes à chromatographier étaient alors assez importants pour être concentrés par lyophilisation. Les résultats obtenus sont schématisés figure 14.

Les différences qu'exprime cette figure se résument ainsi:

— Originalité des fractions 10 et 11 qui recueillent la majorité des constituants les moins mobiles. Ces substances sont à la fois fluorescentes à 366 mμ et absorbent

les radiations à 254 mμ. Or, nous avons vu, figure 11, que ces fractions se distinguent précisément par un plateau d'absorption à 256 mμ. Par ailleurs, avec les fractions 12 à 15, elles sont totalemnt inhibitrices.

— Les fractions suivantes, 12 et 13, absorbent également à 254 mμ. Elles sont moins fluorescentes, et ne contiennent pas la partie la moins mobile.

— Les fractions 14 et 15 ne diffèrent guère de 12 et 13.

— La fraction 16 est singulière; elle est très fluorescente et apparaît être la seule à contenir la substance très mobile révélable sur diagramme total par sa fluorescence; non colorable par la ninhydrine, elle absorbe peu intensément les vapeurs d'iode. Cette fraction 16 absorbe légèrement à 254 mμ.

— Les autres fractions n'absorbent plus à 254 mμ, ne se colorent plus en jaune par la ninhydrine, ne sont plus fluorescentes et semblent renfermer cependant une partie des substances déjà éluées.

En résumé, les substances inhibitrices sont éluées les premières, ne sont pas les plus alcalines, absorbent à 254 mμ, sont fluorescentes à 366 mμ. Les substances alcalines qui ne sont plus inhibitrices, n'absorbent pas à 254 mμ, ne sont pas fluorescentes, ne se colorent pas en jaune par la ninhydrine.

Ces chromatographies sont relatives au dialysat du liquide total de *C. gigantea*. Si maintenant nous analysons sur couche mince les fractions provenant des filtrations sur résine des dialysats des phases séparées (fig. 11 et 12), nous constatons quelques différences entre certaines fractions homologues suivant qu'elles proviennent de la phase gel ou de la phase liquide.

Les chromatogrammes (fig. 15) des fractions 19 et surtout 20 relatives à la phase gel (fig. 12) sont tout à fait singuliers.

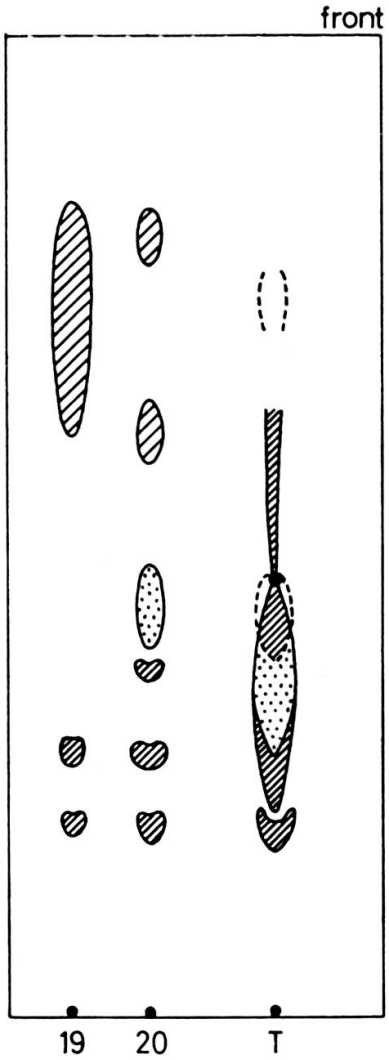


FIG. 15. — Chromatographie sur couche mince (cellulose MN 300, butanol-acide acétique-eau 6:2:2) des fractions 19 et 20 provenant de la filtration sur résine Sephadex G-50 du dialysat de la phase gel du liquide de *C. gigantea* représentée figure 12. (T = dialysat total de la phase gel, 19 et 20 = n° des fractions.)

L'abondance des taches mobiles est déconcertante car elle ne figure pas sur le témoin. La répétition de cette figure, avec les fractions correspondant au même

volume d'élution lors de répétitions, exclut l'hypothèse d'impuretés. Cette différence entre témoin et fractions 19 et 20 ne peut s'expliquer que par une différence de concentration; ces substances mobiles seraient relativement plus concentrées dans les fractions 19 et 20 que dans le dialysat total. Par ailleurs, la filtration sur résine G-50 du dialysat de la phase liquide ne permet pas de retrouver des fractions analogues aux fractions 19 et 20. Ainsi, le gel retiendrait sélectivement les substances figurées à ce niveau, substances quantitativement mineures, mais peut-être importantes en ce qui concerne l'inhibition.

Pour vérifier cette hypothèse, des chromatographies préparatives ont été reprises, identiques à celles rapportées dans les tableaux 16 et 17, mais en testant parallèlement et comparativement les dialysats de la phase liquide et de la phase gel. Les résultats sont groupés dans le tableau 19.

TABLEAU 19

Influence comparée sur la croissance des zones chromatographiques relatives aux dialysats de la phase liquide et de la phase gel du liquide de C. gigantea.

zones éluées	D	I	II	III	IV	V	F
témoins, $\bar{1}$ mm	52,6	45,6	43,5	30,5	43,5	39,3	44,7
dial. phase gel, $\bar{1}$ mm	51,3	38,9	1,3	25,2	1,0	0	0
dial. phase liquide, $\bar{1}$ mm	44,5	36,1	9,5	24,6	17,5	19,5	0

Les zones IV et V inhibent, en effet, la croissance si elles sont relatives à la phase gel, celles de la phase liquide permettent une croissance peu significativement différente de celle des témoins.

Par ailleurs, la zone front renferme une substance activement inhibitrice quelle que soit la phase considérée; cette substane est, nous l'avons vu, fluorescente à 366 mμ, absorbe les vapeurs d'iode mais ne réagit pas avec la ninhydrine.

En conclusion, le facteur inhibiteur est un édifice moléculaire complexe dont le poids moléculaire est de l'ordre de 3 à 5000. Cet arrangement moléculaire résulte de la combinaison de plusieurs substances plus ou moins associées par des liaisons non peptidiques en grande partie détruites par hydrolyse acide. Ces substances seraient au nombre de 7: 4 principales associées et 3 de beaucoup moindre importance quantitative et libres; les fonctions qui les caractérisent respectivement sont résumées dans le tableau 20.

Pour les substances libres: celle qui migre avec le front (zone F) est présente dans les dialysats des deux phases du liquide de *C. gigantea*. Elle est altérée par l'hydrolyse acide.

TABLEAU 20

Caractéristiques des substances responsables du pouvoir inhibiteur du liquide de fruits de C. gigantea

	substance	zone correspondante du chromatogramme figure 8	degré d'inhibition	propriétés et fonctions
associées	1	3	+ + +	non fluorescente fonction iminée (jaune à la ninhydrine) absorption des vapeurs d'iode pH > 6 réductrice
	2	4	+ +	fluorescente à 366 mμ fonction aminée (violet à la ninhydrine) absorption de vapeurs d'iode pH > 6 réductrice
	3	5, ½ <	+ +	fluorescente à 336 mμ fonction aminée (rouge à la ninhydrine) pH > 6 réductrice
	4	5, ½ >	+ +	très fluorescente à 366 mμ fonction aminée (violette à la ninhydrine) n'absorbe pas l'iode pH voisin de 6 réductrice fonction aminée sur noyau pyrimidique
libres	5	6	+	non fluorescente à 366 mμ fonction aminée (violette à la ninhydrine) absorbe les vapeurs d'iode pH voisin de 6 retenue par la phase gel
	6	7	+	fluorescente à 366 mμ absorbe les vapeurs d'iode pH voisin de 6 retenue par la phase gel
	7	zone frontale	+ + +	absorbe les vapeurs d'iode pas de fonction aminée pH voisin de 6

Les substances des deux zones chromatographiques 5 et 6 sont également inhibitrices, mais à un degré moindre et paraissent être sélectivement retenues par le gel lors de la séparation des deux phases, mais non lors de la dialyse.

Parmi les substances associées celle qui se colore en jaune à la ninhydrine est la plus inhibitrice.

Ces substances associées sont dissociées par hydrolyse acide. Les substances fluorescentes en particulier se séparent en 3 dont l'une réagit singulièrement avec l'iode.

V. CONCLUSIONS

Propriétés physico-chimiques et biologiques des liquides

Les deux espèces *Cola chlamydantha* et *Cola gigantea* contiennent dans leurs fruits des quantités appréciables d'un liquide qui inhibe la germination des graines et stoppe la croissance des plantules des diverses espèces testées. Le liquide de *C. gigantea* est plus actif que celui de *C. chlamydantha*. La maturation des fruits diminue l'activité du liquide du second mais n'entame pas celle du premier, au moins dans les limites des degrés de maturité observés. Les deux liquides sont alcalins, riches en ions potassium. Le facteur inhibiteur et les substances responsables de l'alcalinité des liquides sont dialysables. Le liquide de *C. chlamydantha* est homogène, celui de *C. gigantea* se sépare en 2 phases, l'une liquide, l'autre gélifiée.

Par dialyse, le facteur inhibiteur est totalement éliminé du liquide de *C. chlamydantha* et de la phase liquide de *C. gigantea*. Il ne peut être exclu totalement de la phase gel de *C. gigantea* qui reste inhibitrice après dialyse alors que les autres liquides, après dialyse, non seulement ne sont plus inhibiteurs mais révèlent une action stimulante.

L'alcalinité est liée aux ions potassium; elle n'est pas responsable de l'inhibition.

Analyse et fractionnement du facteur inhibiteur du liquide de *Cola gigantea*

Par chromatographie analytique, l'hétérogénéité des substances dialysables est révélée. Sept zones de réactivités différentes peuvent être distinguées. La plupart réagissent positivement avec la ninhydrine, absorbent les vapeurs d'iode; certaines sont fluorescentes à 366 mμ.

Par chromatographie préparative sur couche mince, le pouvoir inhibiteur a pu être attribué à plusieurs des zones révélées; l'une d'entre elles contient plusieurs

substances associées que l'on ne peut fractionner que par hydrolyse acide. L'inhibition est également liée à deux substances aminées libres, de Rf élevé, plus abondantes dans la phase gélifiée que dans la phase liquide, ainsi qu'à une substance non aminée située au niveau du front.

Par filtration sur gel Sephadex, le facteur inhibiteur est élué dans plusieurs fractions consécutives groupées. La filtration sur gel G-50 permet une dissociation des produits inhibiteurs et alcalinisants. Trois catégories de substances sont ainsi séparées, qui se classent, par poids moléculaires décroissants, de la façon suivante:

1. Substances inhibitrices présentant un plateau d'absorption dans l'U.V.à 256 mμ,
2. Substances inhibitrices, offrant un maximum d'absorption à 275 mμ,
3. Substances alcalines, n'absorbant pas.

Les deux substances aminées libres, de pH voisin de 6, les plus mobiles par développement à l'aide du mélange butanol-acide acétique-eau 6:2:2, appartiennent à la première série et sont surtout décelables dans les fractions relatives à la phase gel. Les substances associées, les plus importantes quantitativement, appartiennent à la deuxième série. Une partie de ces substances, hormis celle qui réagit par une coloration jaune avec la ninhydrine, se retrouve dans la troisième série.

Par hydrolyse acide, le chromatogramme est modifié et le pouvoir inhibiteur est amoindri mais non détruit. Une inhibition totale peut encore être obtenue mais seulement avec des concentrations 8 fois plus fortes. L'inhibition, imputable à une zone chromatographique de faible Rf, se manifeste de façon très particulière, elle provoque un avortement complet des radicules mais permet le développement normal de la tige. Le dialysat brut altérait la croissance de chaque partie de la plantule.

D'autre part, une certaine stimulation avait été observée par dilution des dialysats, cette stimulation existe toujours après hydrolyse et se manifeste même plus nettement puisque la différence est très significative entre la croissance moyenne des témoins et celles relatives aux hydrolysats dilués 4 et 8 fois par rapport au liquide de cola.

* * *

Les résultats des essais relatés dans ce travail nous incitent à poursuivre les recherches dans cette voie pour approfondir certains résultats et en préciser d'autres; ainsi, certains essais seront repris sur les fruits de la prochaine récolte afin de suivre avec une grande précision les étapes de la maturation. Par ailleurs, nous établissons, dans un travail à paraître dans «Candollea» (1er numéro de 1970), un parallèle plus complet et plus détaillé entre les 2 espèces *Cola gigantea* et *Cola chlamydantha ;* une bibliographie globale sera fournie également dans ce prochain article.