

Etude comparative des liquides contenus dans les fruits de deux espèces de Cola : *C. gigantea* et *C. chlamydanta* : déductions taxonomiques

Autor(en): **Miège, Marie-Noëlle / Miège, Jacques**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Candollea : journal international de botanique systématique = international journal of systematic botany**

Band (Jahr): **25 (1970)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-880323>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Etude comparative des liquides contenus dans les fruits de deux espèces de Cola: *C. gigantea* et *C. chlamydantha*. Dédutions taxonomiques¹

MARIE-NOËLLE et JACQUES MIÈGE

RÉSUMÉ

Les liquides contenus dans les fruits de *Cola gigantea* et de *C. chlamydantha* ont en commun plusieurs caractères généraux, dont une alcalinité élevée liée à la présence d'ions potassium; toutefois, ils se distinguent par un faisceau de caractères physico-chimiques très particuliers de leurs substances dialysables.

L'analyse de ces substances a été réalisée par chromatographie sur couche mince et filtration sur résine. Les fractions individuelles ont été testées (activité biologique, pH, spectres d'absorption, fluorescence, réactivité chimique...) et les données recueillies ont été complétées par l'examen des figures d'évaporation. Les conséquences de l'hydrolyse des dialysats ont été étudiées.

Les propriétés physico-chimiques séparent nettement les deux espèces. Les différences sont renforcées par l'opposition des pouvoirs hygroscopiques des substances sèches abandonnées soit après évaporation, soit après lyophilisation. Cependant, les liquides possèdent des propriétés biologiques comparables dont la plus marquante est une inhibition de la germination et de la croissance des plantules de nombreuses espèces testées, dont les *Cola* mêmes.

Cette identité biologique, appuyée par certaines similitudes physico-chimiques, conduisent les auteurs à maintenir, provisoirement au moins, les deux espèces de *Cola* dans le même genre, en dépit de leur originalité.

SUMMARY

The liquors found in the fruits of *Cola gigantea* and *C. chlamydantha* have some general features in common, notably a strong alkalinity linked with the presence of potassium ions; they differ, however, in a sum of very particular physico-chemical characters of their dialysable components.

The individual fractions obtained by thin layer and column chromatography of these substances have been tested (biological activity, pH, absorption spectra, fluorescence, chemical reactivity...) and the results were complemented by the comparison of the aspects of the evaporation residues. The consequences of hydrolysing the dialysats have been studied.

The physico-chemical properties of the two species are quite distinct. The contrasting hygroscopic powers of the dry substances obtained through evaporation or lyophilisation underline these differences. However, the liquors have similar biological qualities: in particular, they inhibit the germination and the growth of the seedlings of all the tested species, including *Cola* itself.

Owing to this biological identity and to some physico-chemical similarities, the authors maintain, at least provisionally, the two *Cola* species within a single genus, in spite of their obvious distinctness.

¹ Travail réalisé avec la collaboration technique de M^{me} A. T. Ruchti.

ZUSAMMENFASSUNG

Die in den Früchten von *Cola gigantea* und *C. chlamydantha* enthaltenen Flüssigkeiten besitzen einige gemeinsame Grundeigenschaften, insbesondere eine an die Anwesenheit von Kali-Ionen gebundene starke Alkalinität. Sie unterscheiden sich jedoch durch eine Anzahl physikalisch-chemischer Eigenheiten ihrer dialysierbaren Komponenten.

Die einzelnen dünn- und säulenchromatographisch isolierten Fraktionen dieser Substanzen wurden untersucht (biologische Aktivität, pH, Absorptionsspektren, Fluoreszenz, chemische Reaktivität...) und die Ergebnisse durch vergleichende Betrachtung der Verdunstungsrückstände ergänzt. Die Folgen der Hydrolyse der Dialysate wurden ermittelt.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Arten sind recht verschieden. Das gegensätzliche hygroskopische Verhalten der durch Verdampfung bzw. Lyophilisation erhaltenen Trockensubstanzen unterstreicht noch diese Unterschiede. Doch zeigen beide Flüssigkeiten übereinstimmende biologische Eigenschaften, vor allem eine Inhibition der Keimung und des Keimlingswachstums bei allen getesteten Arten einschliesslich *Cola* selbst.

Aufgrund der biologischen Übereinstimmung und einiger physikalisch-chemischer Ähnlichkeiten belassen die Verfasser die beiden *Cola*-Arten, trotz ihrer markanten Eigenständigkeit, vorderhand in der selben Gattung.

I. Introduction

Le genre *Cola*, essentiellement africain, comprend un grand nombre d'espèces, environ 140, réparties en plusieurs sections. Bodard (1954, 1962) a détaché l'une de ces espèces, le *C. chlamydantha* K. Schum., petit arbre monocaule des forêts équatoriales dont l'aire de répartition s'étend de la Sierra Leone au Gabon, pour l'ériger en un genre particulier, le genre *Chlamydocola*. Les principaux caractères qui ont motivé cette séparation résident:

- dans l'existence de graines albuminées à cotylédons foliacés chez cette plante, alors que celles des autres *Cola* seraient exalbuminées et à cotylédons charnus;
- dans la germination épigée du *C. chlamydantha* face à la germination subhypogée de l'ensemble des autres espèces.

Hallé (1961, 1962) reconnaît cette distinction en deux genres, jugeant que ces caractères sont suffisants pour justifier la création d'une nouvelle entité générique. Cependant, ni Keay (1954, 1958), ni Aubréville (1959) n'admettent cette combinaison. Le caractère albuminé ou non est-il valable pour promouvoir le *C. chlamydantha* à un rang taxonomique plus élevé ? Pour s'en assurer il serait utile de suivre d'une manière précise le développement, de l'ovule fécondé à la graine mûre.

Des réserves se justifient également par les divergences d'opinion des auteurs. Ainsi l'espèce *Cola digitata* Masters, que Bodard a transformée en *Ingonia digitata* (Masters) M. Bodard, se distinguerait également, d'après cet auteur, par la présence de graines albuminées. Or, N. Hallé conteste et nie l'existence de cet albumen, se conformant en cela aux observations de Pierre.

Quant aux caractères de la plantule, des contradictions du même ordre se manifestent. Si Bodard affirme que tous les *Cola* s. str. ont des "cotylédons hypogés au cours de la germination", de la Mensbruge (1966) signale que *Cola gigantea* et *C. lateritia* sont des "espèces à germination épigée qui portent des cotylédons charnus, ceux-ci étant allongés en forme de fer de lance à base très cordée", ajoutant: "toutes les espèces sont à germination épigée sauf *Cola nitida*

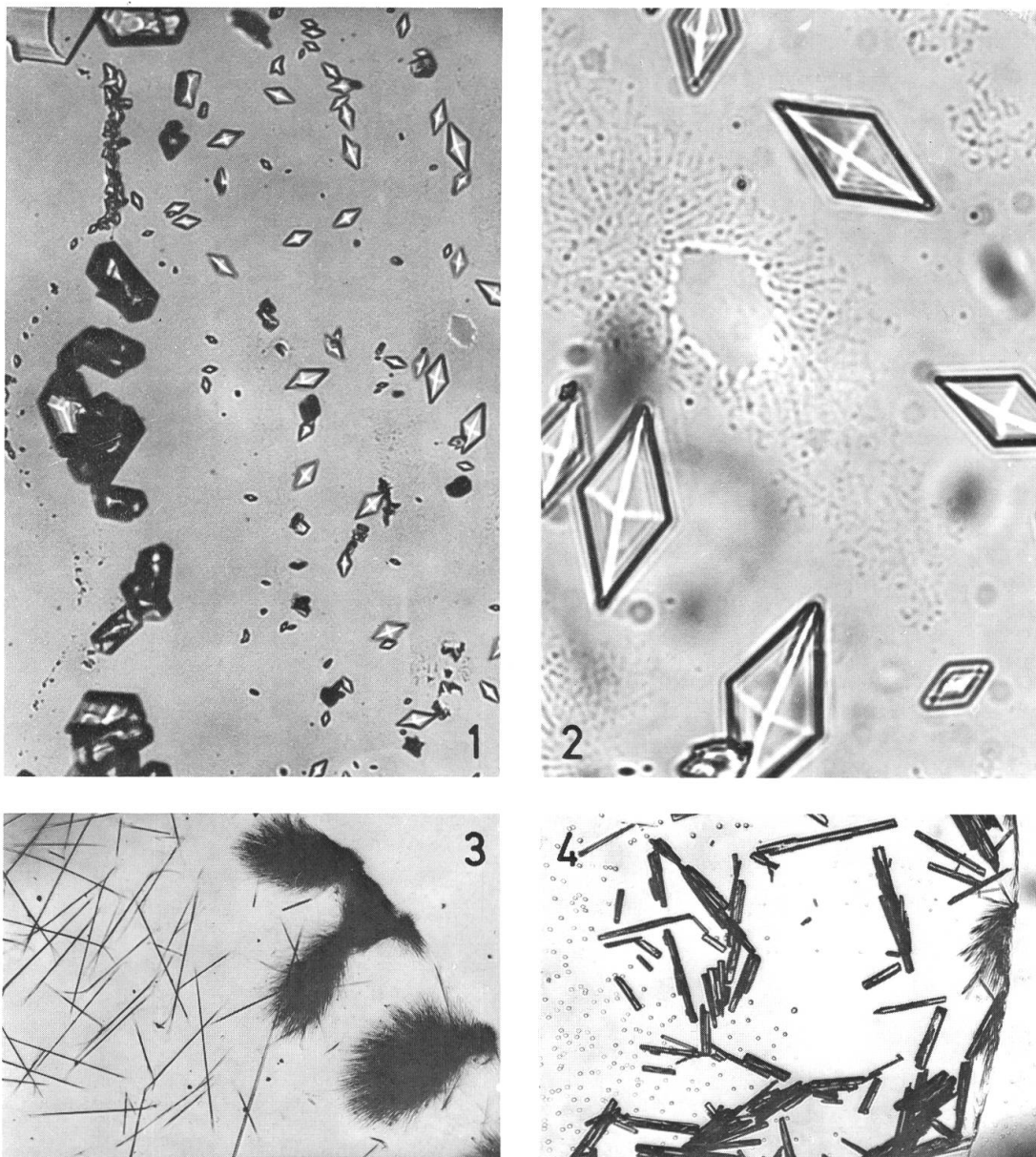


Fig. 1-4. – Figures d'évaporation de solutions aqueuses:
1-2, asparagine à 20°C; 3, tyrosine à 20°C, solution concentrée; 4, tyrosine à 60°C.

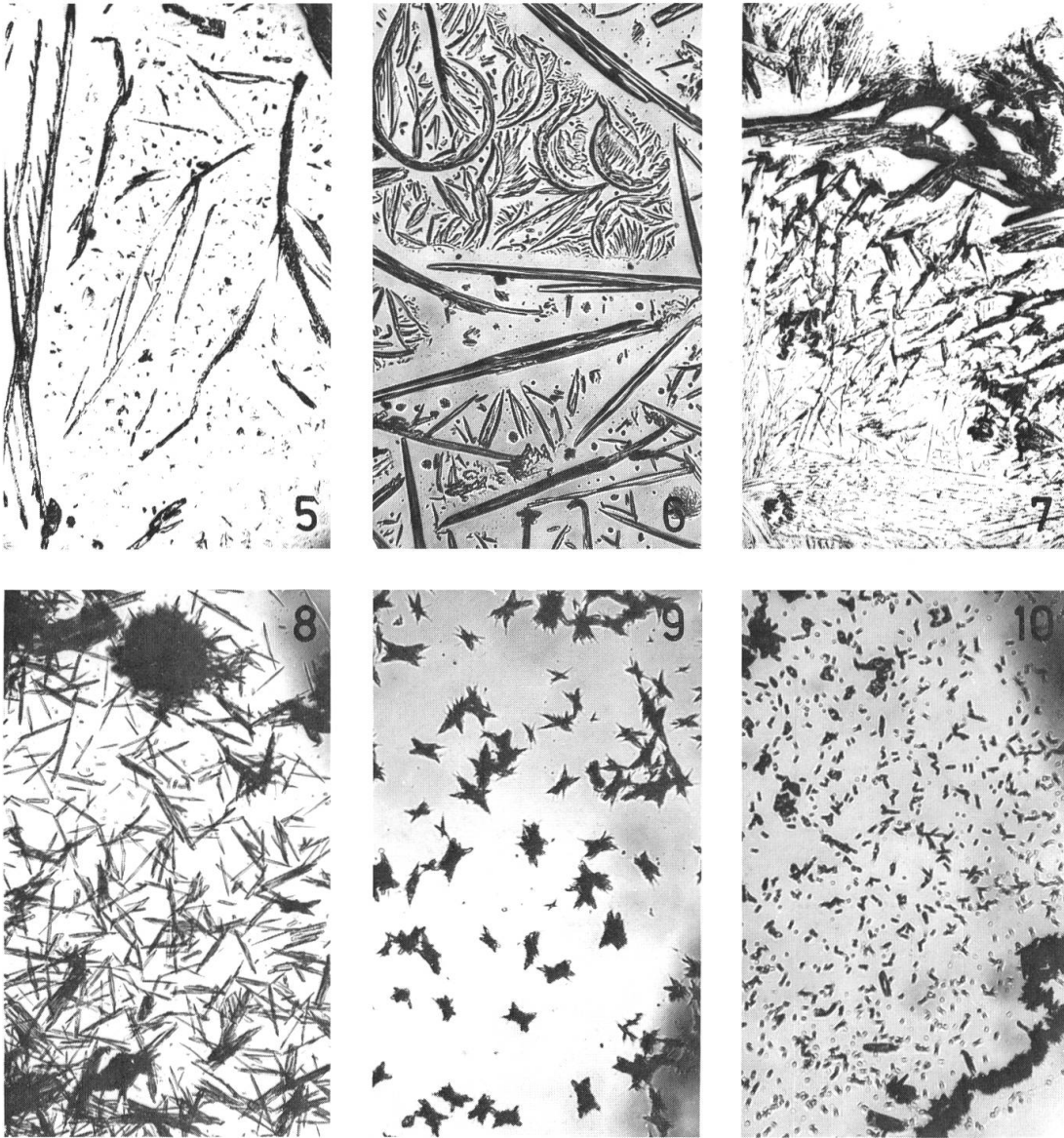


Fig. 5-10. – Figures d'évaporation de solutions aqueuses, montrant l'influence de la température et de la rapidité d'évaporation:
 5-7, glycolic à 2°C, 20°C et 60°C respectivement; 8-10, uracile évaporé à vitesse lente (milieu humide), moyenne (milieu ambiant) et rapide (milieu sec) respectivement.

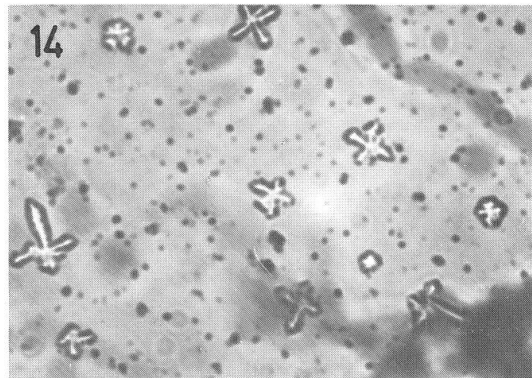
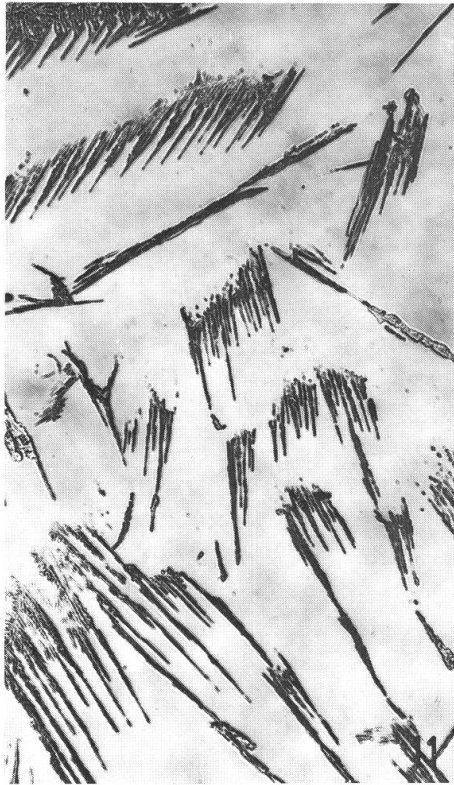


Fig. 11-12. — Figures d'évaporation de solutions d'hydroquinones dans l'eau (fig. 11) et dans l'alcool (fig. 12), montrant l'influence du solvant.

Fig. 13-14. — Figures d'évaporation de la phase liquide de *Cola gigantea* (fig. 13) et du liquide de *C. chlamydantha* (fig. 14).

qui donne une plantule hypogée". Sans doute cet auteur n'a-t-il étudié qu'un nombre restreint de *Cola*, mais en nombre suffisant pour faire planer un doute quant à la valeur des caractères jugés comme génériques par Bodard.

Les *Cola* sensu lato peuvent par ailleurs se répartir, d'après des observations qui demanderaient à être complétées et précisées, les renseignements manquant pour plusieurs espèces, en deux groupes:

- espèces dont les graines, n'occupant pas toute la cavité carpellaire, baignent dans un liquide plus ou moins mucilagineux;
- espèces dont les graines remplissent toute la cavité carpellaire et dont les fruits ne contiennent pas de liquide.

Au premier de ces groupes appartiennent les espèces relevant de la section *Macrocola* A. Chev. (= sous-genre *Macrocola* (A. Chev.) M. Bodard), c'est-à-dire les *C. cordifolia* (Cav.) Brenan et Keay, *C. gigantea* A. Chev., *C. lateritia* var. *maclaudii* K. Schum. ainsi que le *C. chlamydantha* K. Schum. placé par certains auteurs (Chevalier 1907, 1908, 1911) dans la section *Cheirocola* K. Schum. Cette section renfermerait également *C. buntingii* Baker f. Chez cette espèce, dans les follicules que nous avons examinés (sur des échantillons, il est vrai, immatures, récoltés dans la région de Taï dans l'ouest de la Côte-d'Ivoire), aucun liquide n'a été détecté. Il se peut cependant qu'à certains stades de développement du fruit un tel liquide existe. Il est intéressant de noter, si nous en croyons de la Mensbrugge, que tous les représentants ci-dessus du genre *Cola* auraient une germination épigée, la principale différence résidant, d'une part, dans les cotylédons charnus chez les premiers nommés et foliacés dans la dernière, d'autre part dans la forme des follicules et celle des feuilles, simples au lieu d'être composées-digitées.

Des investigations sur du matériel frais seraient nécessaires pour déterminer si, dans les espèces du deuxième groupe, qui comprend lui-même plusieurs sections, il n'existe pas d'autres représentants offrant cette même caractéristique d'un contenu intra-carpellaire. Il faudrait également, ce que nous nous proposons d'entreprendre, rechercher les sites de formation et de sécrétion du liquide et savoir aux dépens de quels tissus: parois carpellaires, placentas, graines... il se constitue.

Dans des travaux précédents (1970 a-c) nous avons étudié les propriétés physico-chimiques et biologiques particulières du liquide contenu dans les fruits de *C. gigantea* et *C. chlamydantha*. Nous nous proposons maintenant, en utilisant certaines de nos données antérieures, en approfondissant l'étude du liquide de *C. chlamydantha* qui n'avait été alors que partielle et en introduisant des caractères nouveaux, de confronter les deux espèces et en déduire de nouvelles données taxonomiques qui devraient aider à déterminer si le *Cola chlamydantha* doit demeurer dans le genre *Cola* ou en être séparé¹.

¹ Des recherches en cours nous permettront de déterminer les propriétés et les caractéristiques des liquides des fruits de *C. lateritia* var. *maclaudii*, en provenance de Côte-d'Ivoire, et de *C. cordifolia* récoltés en Côte-d'Ivoire et au Sénégal. Nous profitons de cette remarque pour remercier les personnes qui acceptent très aimablement de nous faire parvenir un matériel précieux qui complète nos propres récoltes, en particulier M^{lle} Dugerdil, MM. Huttel et Cremers.

II. Comparaison des propriétés physico-chimiques

A. Caractères divers

Un certain nombre de caractères physico-chimiques ont été établis sur les liquides de fruits, de l'une et l'autre espèce, présentant des degrés de maturité comparables. Le tableau 1 résume leurs analogies et leurs divergences.

Analogies	Différences		
		<i>C. gigantea</i>	<i>C. chlamydantha</i>
Alcalinité: pH = 9.2 Viscosité élevée Densité \approx 1	aspect physique couleur	hétérogène incolore à blanc	homogène ambré
Fluorescence à 366 m μ	fluorescence à 366 m μ	+	+seulement après concentration
Dialysabilité des substances fluorescentes	teneur en glucides	462 γ /ml	250 γ /ml
Glucides entièrement macromoléculaires	teneur en azote total	187 γ /ml	330 γ /ml
Azote presque totalement dialysable	teneur en azote par la méthode de Folin	26 γ /ml	72 γ /ml
Teneur élevée en potassium Absence de sodium	teneur en potassium volume équivalent de neutralisation	142 meq/l 75 meq/l	74.2 meq/l 17 meq/l
Absence d'ammonium			

Tableau 1. — Analogie et différences présentées par les caractéristiques physico-chimiques des liquides des deux espèces de *Cola*.

Ce qui frappe, tout d'abord, est un caractère fondamental commun, celui d'une notable alcalinité liée à une teneur élevée en ions potassium. Cependant, la teneur en cet élément est près de deux fois supérieure dans le liquide de *C. gigantea*, ce qui entraîne un équivalent de neutralisation de ce liquide également supérieur. A ceci nous pouvons rattacher la différence constatée sur les pourcentages des poids secs, le liquide de *C. gigantea* contenant en solution deux fois plus de substance sèche. On est alors tenté de relier également à ce caractère la différence de fluorescence: le liquide de *C. gigantea* est fluorescent à 366 m μ , celui de *C. chlamydantha* ne l'est pas; il en est de même de leurs dialysats. Mais après concentration de ceux-ci par lyophilisation, la fluorescence est observée pour l'un et l'autre.

De même, les teneurs en glucides des deux liquides varient dans le même sens que les teneurs en substances sèches. Il semble donc que toutes les différences mentionnées sont associées à la plus grande dilution du liquide de *C. chlamydantha*.

Cependant, d'autres données apparaissent contraires à cette observation. C'est ainsi que la teneur en azote est plus importante chez *C. chlamydantha*. La teneur en azote déterminée par la méthode de Folin y est également nettement supérieure.

Cet azote est généralement protéique. Il semble toutefois ici qu'il est en grande majorité dialysable car la quantité d'azote total dosé après minéralisation de l'adialysat est très faible.

Une autre singularité est à signaler: la maturation entraîne une augmentation du taux d'azote chez *C. gigantea* (de 187 γ /ml à 198 γ /ml) et une diminution chez *C. chlamydantha* (de 330 γ /ml à 297 γ /ml), mais elle ne modifie pas les teneurs en glucides. Parmi les modifications mineures liées à la maturation, on note une légère baisse, chez les deux espèces, du taux de potassium et un léger relèvement du taux de magnésium.

Ces diverses constatations dénotent une parenté certaine des deux liquides, manifestée particulièrement par une alcalinité élevée due aux ions potassium, parenté cependant limitée par certaines singularités propres à chacun d'eux.

B. Figures d'évaporation

Des gouttes de liquide déposées sur une lame et laissées à température ambiante, à l'abri de la poussière, jusqu'à évaporation complète, abandonnent les substances qu'elles contiennent en solution, non pas au hasard, mais selon des figures géométriques régulières; nous avons cherché à connaître la valeur qu'il est possible de leur attribuer en tant que reflet des substances déposées.

1. Détermination de la reproductibilité à partir de substances connues

Pour cela, nous avons étudié les formes d'évaporation de nombreuses substances en faisant varier successivement les paramètres suivants: dilution, température, rapidité d'évaporation, solvant.

On peut distinguer deux types de figures d'évaporation: celles formées en réseau géométrique étendu et celles en cristaux isolés. Les premières sont plus sujettes à variations que les secondes.

- La dilution exerce une influence marquée lorsqu'elle atteint des valeurs extrêmes. Une trop grande dilution ne permet pas de cristallisation caractéristique. Une très grande concentration rend compactes certaines formations et cet effet est à rapprocher de l'effet de bordure: les formations observées sur le pourtour de la goutte sont, en effet, presque toujours plus denses et agglomérées que celles du centre, comme en témoignent les figures 1, 3 et 4 relatives à l'asparagine et à la tyrosine.
- La température à laquelle s'est effectuée l'évaporation agit principalement sur les formations en réseau. D'une manière générale, les plus régulières sont obtenues à température ambiante: à + 2°C et à + 60°C, les images sont plus confuses, comme on le constate sur les figures 5 et 7 relatives au glycocole; par contre, la formation de cristaux isolés, de tyrosine par exemple (fig. 3 et 4), n'est guère affectée; la différence, dans ce cas, porte sur l'épaisseur des aiguilles, caractère soumis également à l'influence de la concentration.

- La rapidité de l'évaporation exerce une action plus ou moins nette suivant le matériel. Trois vitesses furent testées: lente, en atmosphère presque saturée d'humidité; moyenne, aux conditions ambiantes; rapide en milieu sec (P_2O_5). Les variations les plus sensibles furent observées sur l'uracile (fig. 8-10).
- Le solvant n'intervient pas de manière très importante mais, cependant, les variations observées sont sensibles dans certains cas comme celui de l'hydroquinone (fig. 11-12).

De cet ensemble d'observations il ressort que, pour comparer des figures d'évaporation de provenances différentes, il est nécessaire de les réaliser dans les mêmes conditions. En ce qui nous concerne, les évaporations seront effectuées à température ambiante. Le solvant est de l'eau de constitution pour les liquides bruts et sera de l'eau bidistillée pour les substances dialysées.

Ces conditions observées, est-il possible de tirer des renseignements sur les substances que contiennent en solution les liquides étudiés ? Non si l'on souhaite une caractérisation, par ce moyen, des substances impliquées; oui si l'on veut s'en tenir à des recherches d'analogies et de différences. En effet, d'un liquide à l'autre, le solvant est le même, la concentration ne change que dans des limites restreintes, la température est standardisée. Les différences observées seront donc vraisemblablement dues à des différences de constitution.

2. Figures d'évaporation des liquides bruts

Voyons alors si, déjà sur les liquides bruts, nous pouvons noter des similitudes ou au contraire déceler des différences.

Les figures 13 et 14 représentent les "cristallisations" observées après évaporation de la phase liquide de *C. gigantea* d'une part, du liquide de *C. chlamydantha* d'autre part. Des différences très nettes s'observent: alors que le liquide de *C. gigantea* dépose, par évaporation, une trame ramifiée linéaire, celui de *C. chlamydantha* n'abandonne que de petits cristaux épars.

III. Comparaison des pouvoirs inhibiteurs

Les liquides des deux espèces inhibent à 100 % la germination des graines de toutes les espèces que nous avons testées (*Avena sativa*, *Lavatera arborea*, *Trifolium pratense*, *Raphanus sativus*, *Sinapis alba*, *Nasturtium officinale*); dans les deux cas le facteur inhibiteur est dialysable. Mais le pouvoir d'inhibition de *C. gigantea* est supérieur à celui de *C. chlamydantha*. En effet, alors que les dialysats des deux liquides présentent le même coefficient de dilution par rapport aux liquides ($d = 4$), celui de *C. gigantea* ne permet aucune croissance, celui de *C. chlamydantha* autorise un développement égal à presque la moitié de celui du témoin, ainsi que le montre le tableau 2.

	Témoin	<i>C. gigantea</i>		<i>C. chlamydantha</i>
		Phase liquide	Phase gel	
Eau distillée	62.9			
Liquide pur (pH = 9.2)		0.0	0.0	0.3
Dialysat (pH = 9.0)		0.0	0.6	27.8 ($p = 0.01$)
Adialysat		(pH = 5.9) 66.4	(pH = 8.9) 0.3	(pH = 5.9) 91.2 ($p = 0.03$)

Tableau 2. — Influence, sur la germination et la croissance, des liquides des deux espèces de *Cola*, de leurs dialysats et adialysats.

Les chiffres représentent la longueur moyenne, en mm, des plantules correspondant à un test, provenant de 30 graines mises à germer en présence du liquide à tester. La valeur témoin est la moyenne des longueurs des plantules provenant de 60 graines mises à germer avec de l'eau distillée. Chaque plantule est mesurée de la pointe de la radicule à l'insertion des cotylédons. Les mesures ont lieu généralement 4 jours après la mise en germination (p = degré de signification de l'écart par rapport au témoin).

Ce tableau révèle encore d'autres différences: alors que le facteur inhibiteur s'élimine totalement, par dialyse, du liquide de *C. chlamydantha* et de la phase liquide de *C. gigantea*, la phase gel de cette espèce en retient une partie. Ceci est imputable certainement à la différence d'état physique des liquides, une partie des glucides macromoléculaires étant associée, chez *C. gigantea*, en réseau gelifié. Enfin, notons que seul le liquide de *C. chlamydantha* manifeste, après élimination par dialyse du facteur inhibiteur, un pouvoir stimulant ($p = 0.03$).

Réactions	Dialysats			Adialysats		
	<i>g</i> (gel)	<i>g</i> (liquide)	<i>ch</i>	<i>g</i> (gel)	<i>g</i> (liquide)	<i>ch</i>
Ninhydrine	+++	+	+	—	—	—
Permanganate	—	—	+	—	—	—
(milieu alcalin)	++	—	+++	—	—	—
(milieu neutre ou acide)	+++	+++	++	—	—	—
Absorption des vapeurs d'iode	(brun)	(brun)	(brique)			
Test de Wood	++	+++	+++	—	—	—
Nitrate d'argent ammoniacal	+++	+	—	—	—	—
				(g)		
Peroxydases				—		+++
Catalases				+		+++

Tableau 3. — Réactivités comparées des dialysats et adialysats des liquides de fruits immatures de *C. gigantea* (*g*) et de *C. chlamydantha* (*ch*). Les dialysats sont dilués 4 fois par rapport au liquide.

IV. Comparaison de la réactivité des substances dialysables et macromoléculaires

Le tableau 3 met en parallèle certaines propriétés des liquides révélées par divers tests. Des différences très nettes se remarquent. Ce qui reste du liquide après dialyse est peu réactif, sauf dans le domaine enzymatique: une nette supériorité d'activité est manifestée par le liquide de *C. chlamydantha*, mais ces premiers résultats sont fragmentaires et devront être complétés par d'autres essais enzymatiques plus variés et plus nombreux.

En ce qui concerne les dialysats, les deux types de liquides absorbent les vapeurs d'iode (on note une différence de coloration) et renferment des substances de type purine ou pyrimidine (test de Wood). On note, enfin, que le liquide de *C. gigantea* seul réagit au nitrate d'argent ammoniacal¹, avec une intensité différente selon la phase. D'une manière générale, le dialysat de la phase gel est plus réactif que celui de la phase liquide; cela tient, nous l'avons vu par ailleurs, au pouvoir d'absorption de la trame glucidique du gel, la majorité des substances absorbées s'éliminant par dialyse.

En résumé, les deux liquides absorbent les vapeurs d'iode et renferment en commun des substances aminées; celui de *C. chlamydantha* se singularise par un pouvoir réducteur beaucoup plus marqué et certaines activités enzymatiques, celui de *C. gigantea* par la présence de substances phénoliques (qui existent peut-être aussi dans le liquide de *C. chlamydantha*, mais y sont indiscernables à cette dilution). La recherche des réactivités nous conduit, comme les recherches précédentes, à constater une parenté entre les deux espèces, limitée par des particularités évidentes.

V. Analyse comparative des substances dialysables

Le facteur inhibiteur étant dialysable de même que toutes les substances ayant manifesté une réactivité autre qu'enzymatique, c'est sur les seuls dialysats que va se poursuivre notre étude. Nous examinerons successivement les spectres, les chromatogrammes, les profils d'éluion après filtrations sur résines et les produits d'hydrolyse de ces dialysats.

A. Spectres

Les spectres d'absorption en UV des dialysats (très dilués) ont une allure générale tout à fait semblable (fig. 15), caractérisée par deux maximums d'absorption situés aux mêmes longueurs d'onde (356 et 210 $m\mu$). La seule différence observable est la proportion plus forte, chez *C. chlamydantha*, des substances responsables de

¹ Indice de sucre réducteurs ou de substances phénoliques; mais il n'y a pas de glucides dans les dialysats: des substances phénoliques sont donc responsables de cette réaction.

l'absorption à 210 m μ . Signalons que ce pic disparaît rapidement lorsque le liquide est conservé après sa sortie du fruit, de même qu'au cours de la maturation.

B. Substance sèche des dialysats obtenue par évaporation et lyophilisation

Les figures observées après évaporation de gouttes de liquides bruts (fig. 13-14) présentent, nous l'avons vu, un aspect différent, le liquide de *C. gigantea* formant un réseau de lignes ramifiées, celui de *C. chlamydantha* de petits éléments épars. Ces formations sont dues aux substances dialysables car celles présentées après évaporation de gouttes de dialysats sont respectivement très semblables (fig. 19-20); les éléments caractéristiques de *C. chlamydantha* ont cependant, dans les dialysats, la forme de cristaux plus réguliers.

L'importance des différences constatées entre les figures relatives à chaque espèce est peut-être cependant moins grande qu'il n'y paraît car elles sont atténuées sous l'influence de divers facteurs. En effet, une trame en réseau linéaire ramifié, absente chez *C. chlamydantha*, apparaît spontanément si le liquide a été conservé plusieurs semaines (+ 4°C) ou peut-être provoquée par évaporation sur platine chauffante du liquide frais. En outre, le degré de maturité intervient également.

De ceci, il faut rapprocher l'opposition présentée par les lyophilisats. Alors que le dialysat de *C. gigantea* abandonne une poudre blanche, très légère, abondante, ressemblant à de la neige poudreuse, celui de *C. chlamydantha* laisse sur les parois un dépôt beige, collant, rare, aggloméré, très hygroscopique. Ce dernier caractère est constant et typique du liquide de *C. chlamydantha* et de son dialysat. Cependant il s'atténue quelque peu au cours de la maturation et ce fait s'observe également lors de l'évaporation des gouttes. Le liquide de fruits tout à fait immatures, non encore alcalin, est le plus hygroscopique de tous ceux de *C. chlamydantha* et ne dépose rien du tout; à l'étuve à 28°C il abandonne quelques cristaux (fig. 61) observables quelques secondes, l'humidité ambiante les faisant vite disparaître. Après lyophilisation et reconstitution du dialysat du liquide de fruits immatures, l'évaporation sur plaque chauffante fait apparaître une trame avec quelques cristaux (fig. 62), fugaces également. Après conservation en chambre froide, des transformations se traduisent par une perte encore plus grande de la propriété hygroscopique et rapprochent les formations observées (fig. 63-64) de celles caractérisant *C. gigantea*.

Que conclure alors ? Que les deux liquides contiennent des substances dialysables sûrement apparentées et que des transformations, sans doute de même type, produites au cours de la maturation ou lors de la conservation des liquides, conduisent à rapprocher les substances de *C. chlamydantha* de celles de *C. gigantea*.

Ceci conduit à supposer que les divergences physico-chimiques observées sont, plutôt que de véritables différences, des modulations biochimiques de détail, à partir d'éléments semblables, sur un thème commun dont la finalité essentielle semble devoir être l'inhibition de la germination des graines.

C. Chromatographie sur couche mince

Les chromatogrammes sur couche mince des dialysats très concentrés, reproduits en fig. 16, apparaissent différents. Certaines taches semblent cependant se corres-

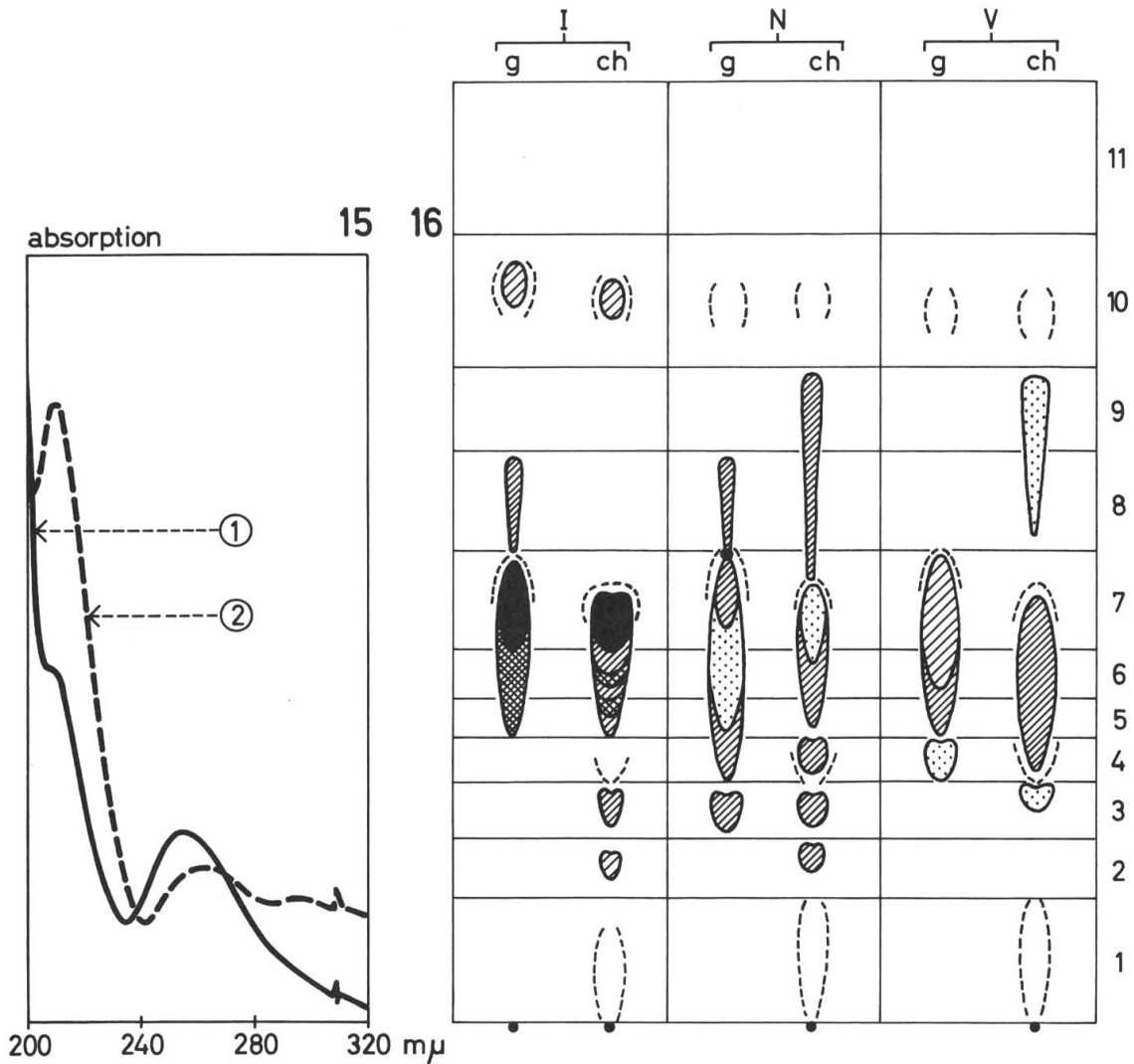


Fig. 15. — Spectres d'absorption en UV (à même pH) des dialysats des liquides de fruits immatures de *Cola gigantea* (1) et de *C. chlamydantha* (2).

Fig. 16. — Chromatogrammes comparés, en migrations parallèles, des dialysats des liquides de *Cola gigantea* (g) et de *C. chlamydantha* (ch). Migration par butanol-acide-acétique-eau (6:2:2) sur cellulose MN 300, avec révélation par fluorescence (pourtours à trait interrompu), vapeurs d'iode (I: noir = marron foncé, quadrillé = marron, hachuré = marron clair), ninhydrine (N: hachuré = violet, pointillé = jaune) et vert de bromocrésol (V: hachuré ± serré = bleu ± foncé, pointillé = jaune).

pondre. Si nous partageons le parcours chromatographique en autant de zones qu'il y a de Rf où figure une tache sur l'un quelconque des chromatogrammes, nous dénombrons 10 zones. Examinons successivement ces zones, en déterminant si les taches qui y figurent sont communes ou, au contraire, particulières à l'une ou l'autre espèce.

- Zone 1 (ch) une substance propre à *C. chlamydantha* y est décelable, uniquement par sa fluorescence.
- Zone 2 (ch) renferme une substance aminée, absorbant les vapeurs d'iode, propre à *C. chlamydantha*.
- Zone 3 (ch, g) contient une substance aminée, commune aux deux espèces; elle se distingue cependant chez *C. chlamydantha* par un pH plus bas (< 6) et par l'aptitude à fixer les vapeurs d'iode.
- Zone 4 (ch, g) contient une substance aminée absorbant les vapeurs d'iode, commune aux deux espèces avec également des particularités: elle est fluorescente à $366 \text{ m}\mu$ chez *C. chlamydantha*, et de $\text{pH} > 6$; elle n'est pas fluorescente et de $\text{pH} < 6$ chez *C. gigantea*.
- Zone 5 (ch, g) contient une substance aminée, de $\text{pH} > 6$, commune aux deux espèces, mais avec des particularités: violette à la ninhydrine chez *C. chlamydantha*, elle est jaune chez *C. gigantea*.
- Zone 6 (ch, g) correspond à une substance iminée (jaune à la ninhydrine), commune aux deux espèces.
- Zone 7 (ch, g) contient une substance iminée (jaune à la ninhydrine), fluorescente à $366 \text{ m}\mu$, de $\text{pH} > 6$, commune aux deux espèces, avec une singularité: chez *C. gigantea*, à la zone jaune se superpose une zone violette. Chez les deux espèces, elle est la plus intensément colorée par les vapeurs d'iode; autre singularité: une tache très intensément violette au sommet de cette zone, et colorée par la réaction de Wood, existe seulement chez *C. gigantea*.
- Zone 8 (ch, g) faiblement colorée en violet chez *C. gigantea*, elle l'est beaucoup plus intensément chez *C. chlamydantha*; en outre, de pH voisin de 6 chez la première espèce, elle est plus acide chez la seconde.
- Zone 9 (ch) renferme une substance aminée de $\text{pH} < 6$, propre à *C. chlamydantha*.
- Zone 10 (ch, g) commune aux deux espèces, elle contient une substance non aminée, fluorescente et absorbant faiblement les vapeurs d'iode.

Cet examen révèle de nombreuses particularités distinguant les substances dialysables des liquides de chaque espèce. Nous pouvons la résumer ainsi:

- 3 substances sont propres au *C. chlamydantha* (zones 1, 2 et 9);
- 5 substances sont présentes chez les deux espèces, non identiques mais respectivement apparentées; elles ont des réactivités voisines (zones 3, 4, 5, 7 et 8);
- 2 substances sont communes aux deux espèces (zones 6 et 10).

Il apparaît que le liquide de *C. chlamydantha* est plus complexe que celui de *C. gigantea*. A part la zone ponctuelle à fonction amino-purique qui semble particulière à *C. gigantea*, on retrouve chez *C. chlamydantha*, avec certaines variantes, toutes les zones révélées chez *C. gigantea*, auxquelles s'ajoutent les 3 zones qui lui sont propres. Cela peut surprendre si l'on se rappelle que le dialysat le plus actif biologiquement est celui de *C. gigantea*. Mais ces chromatogrammes ont été réalisés à partir de solutions reconstituées par dissolution dans un même volume d'eau de la même quantité de lyophilisat, c'est-à-dire de substance sèche. Or, nous avons constaté que le liquide de *C. gigantea* est près de deux fois plus riche en substance sèche dialysable que celui de *C. chlamydantha*. Cette différence explique la supériorité du pouvoir inhibiteur du liquide de *C. gigantea*; nous avons, en effet, vérifié qu'à teneurs en substance sèche égales, les dialysats reconstitués ont un pouvoir inhibiteur comparable.

D. Chromatographie sur colonne

1. Profils d'élution

Pour mieux démêler la nature et le rôle des substances que contiennent les dialysats, dont la complexité vient d'être révélée, leur fractionnement fut tenté par filtration sur résines Sephadex. Ce fractionnement est basé sur les différences de poids moléculaires. Sur résine G-10, les substances des deux espèces sont totalement exclues; sur G-25, elles sont retardées et le sont davantage sur G-50. Leurs poids moléculaires sont voisins, ou bien elles sont plus ou moins associées, car leur sortie est groupée. Les profils d'élution relatifs à chacune des espèces sont assez semblables comme en témoignent les figures 17 et 18 qui mettent en parallèle la filtration, sur résine G-25, des dialysats des liquides des deux espèces.

Les profils d'élution ont même allure, à la seule différence près que les fractions relatives à *C. chlamydantha* provoquent une inhibition très significative ($p < 0.01$) mais non totale comme le font celles correspondant à *C. gigantea*. Ceci est une manifestation du plus faible pouvoir inhibiteur du liquide de *C. chlamydantha*. Nous notons également que les fractions les plus alcalines relatives à cette dernière espèce ont un pH moins élevé que celles se rapportant à *C. gigantea*.

Mais une curieuse analogie se remarque. Nous avons noté que les deux plus alcalines des fractions totalement inhibitrices de *C. gigantea*, bien qu'incolores, provoquaient, sur les papiers filtres ayant supporté les graines mises à germer en leur présence, un jaunissement du papier. La constance de cette observation au cours des répétitions, aussi bien sur la résine G-25 que sur les G-10 et G-50, nous avait incités à lui prêter attention. Nous réalisons alors la première filtration sur résine du dialysat de *C. chlamydantha* et nous constatons avec surprise l'apparition

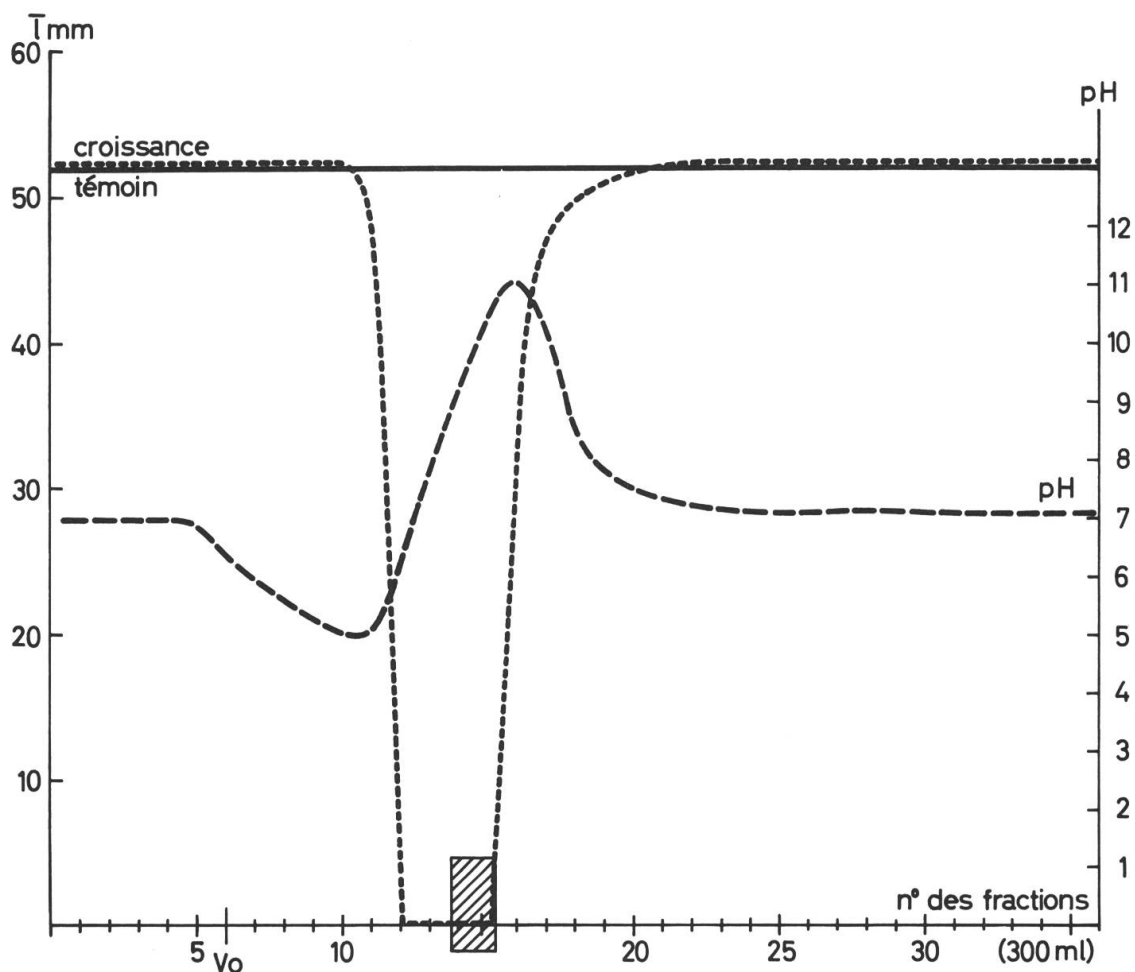


Fig. 17. — Fractionnement par filtration sur résine Sephadex G-25 du dialysat du liquide de fruits mûrs de *Cola gigantea* (Colonnes de 2.5×40 cm, 30 g de gel; échantillons correspondant à 18 ml de liquide). En hachuré, fractions provoquant le jaunissement du papier filtre.

très nette, sur la colonne, de deux zones rapidement distinctes, l'une bleue, l'autre jaune, cette dernière étant la première éluée. Mentionnons que le dialysat du liquide de *C. gigantea* est incolore et que celui du liquide de *C. chlamydantha* est jaune pâle; ceci peut justifier la zone jaune mais laisse intrigante la zone bleue. Les fractions ayant recueillies la zone d'éluéon jaune sont figurées sur le diagramme (zone hachurée) et nous constatons que la position de ces fractions coïncide exactement avec celles signalées sur le diagramme relatif à *C. gigantea*, comme provoquant le jaunissement du papier filtre. Il est donc tout à fait raisonnable de penser qu'un lien existe entre ce jaunissement provoqué par des fractions tout à fait incolores de *C. gigantea* et la coloration des fractions correspondantes de *C. chlamydantha*. Une substance est éluée à ce niveau, sans doute présente en très

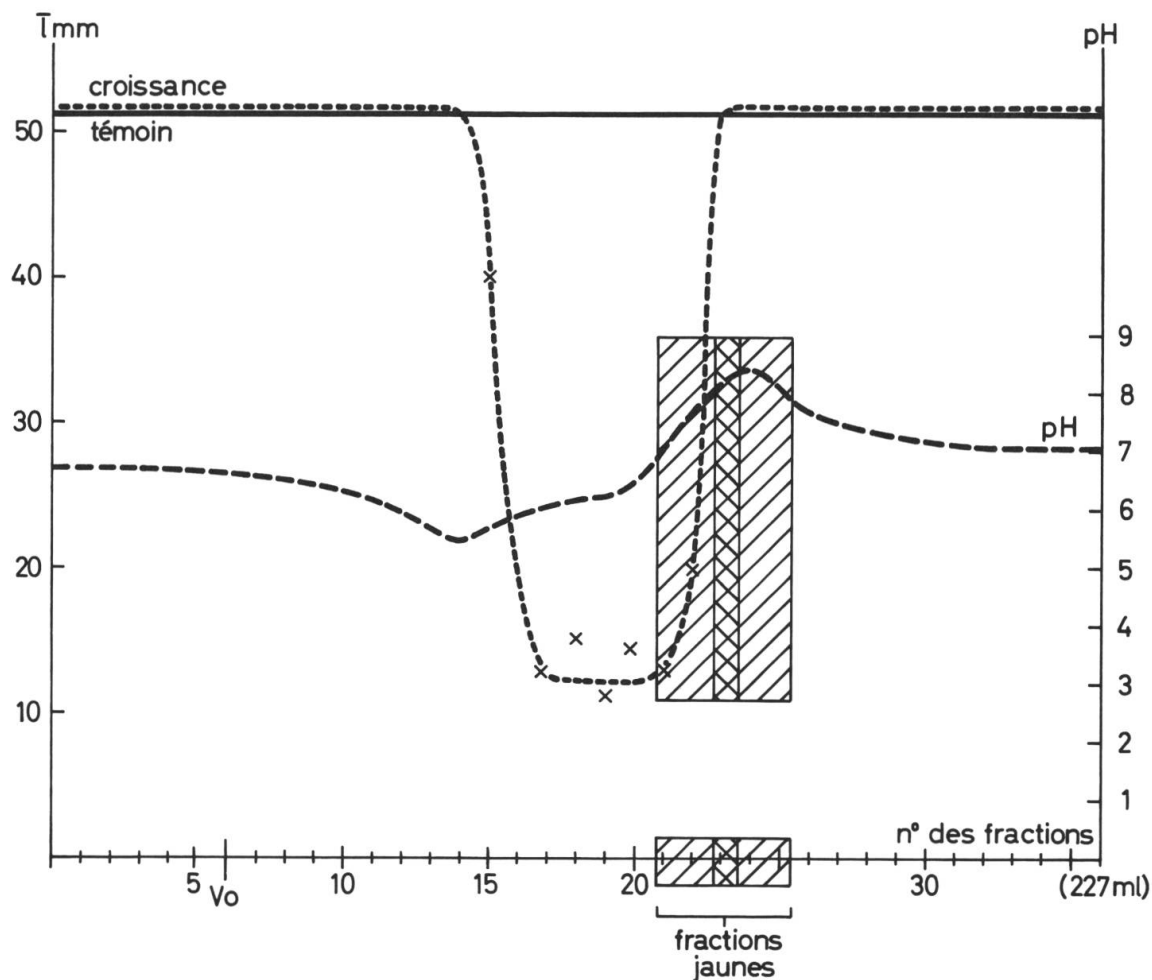


Fig. 18. — Fractionnement par filtration sur résine Sephadex G-25 du dialysat du liquide de fruits mûrs de *Cola chlamydantha* (mêmes conditions que fig. 17).

faible quantité chez *C. gigantea* et en proportion plus abondante ou sous une forme modifiée chez *C. chlamydantha*. Notons que les fractions aussi bien jaunes que bleues n'absorbent pas dans le visible; mais, sans doute, l'extrême dilution empêche-t-elle la manifestation d'une éventuelle absorption: en effet, si les zones sont nettes sur la colonne, les substances sont très diluées dans les fractions qui ne sont que faiblement teintées.

Il semble, d'autre part, que la substance jaune qui, sur les deux profils, correspond à la fraction précédant juste les plus alcalines, s'est davantage dissociée des substances inhibitrices dans la filtration relative à *C. chlamydantha* que dans celle correspondant à *C. gigantea*. En effet, pour cette fraction, dans le cas de *C. chlamydantha*, la croissance est redevenue normale alors que, dans le cas de *C. gigantea*, elle est

encore inhibitrice. Cette désolidarisation des maximums d'inhibition et de pH a pu être observée pour les dialysats de liquide de *C. gigantea*, mais en filtrant sur résine plus poreuse, la Sephadex G-50.

En ce qui concerne l'absorption en UV; les fractions 23 et 24 de *C. chlamydantha* et 15 et surtout 16 de *C. gigantea* manifestent un très net maximum à 275 $m\mu$, se distinguant par là des fractions précédentes inhibitrices qui présentent un plateau à 256 $m\mu$. Ce maximum à 275 $m\mu$ correspond aux fractions les plus alcalines. Ceci est une manifestation supplémentaire de l'indépendance des deux caractères: inhibition et alcalinité.

Pour conclure, constatons que les profils d'élution révèlent, comme les autres caractères, une parenté fondamentale mais atténuée par des singularités que l'on peut résumer ainsi:

Analogies:

- allure générale semblable du profil d'élution, aussi bien de la courbe des pH que de la courbe de croissance;
- sortie sensiblement parallèle des substances inhibitrices et alcalines;
- manifestation plus ou moins directe de coloration jaune liée aux fractions inhibitrices les plus alcalines;
- identité des spectres d'absorption en UV.

Singularités:

- pouvoir inhibiteur plus puissant des fractions relatives à *C. gigantea*;
- pigmentation jaune de certaines fractions de *C. chlamydantha*;
- meilleure séparation des substances alcalines et inhibitrices chez *C. chlamydantha*.

2. Figures d'évaporation des fractions recueillies: Cola gigantea

Les figures 21-23, relatives au profil d'élution du dialysat de la phase liquide de *C. gigantea*, montrent que très peu de substances sont recueillies dans la fraction acidifiée précédant l'inhibition (fig. 21). Les formations en fig. 21 ne sont, croyons-nous, pas très typiques car nous avons pu les observer également dans la fraction 18 de pH neutre et de croissance normale. Par contre, celles provenant de la fraction la plus inhibitrice sont sûrement caractéristiques (fig. 22). La densité de substance déposée est grande. Par dilution, les mêmes formations en balais intriqués se retrouvent. La fraction 16 enfin (fig. 23), la plus alcaline, contient moins de substances; leur arrangement en lignes ne semble pas très caractéristique.

Une filtration sur résine G-50 permet de mieux séparer les substances de ce dialysat (fig. 24-30). Caractérisées par leur spectre, leur pH, leur pouvoir inhibiteur et leur figures d'évaporations, trois séries de substances peuvent être distinguées:

- la 1^{re} série (fractions n^{os} 26 à 30) groupe les substances inhibitrices les premières éluées, qui se distinguent par une absorption à 256 m μ ; elles ne sont pas alcalines et agissent à très faibles doses, car la densité de substance sèche des évaporats est très faible; les figures laissées par ces substances se présentent sous forme de fougères ramifiées courtes;
- la 2^e série (fractions n^{os} 31 à 36) comprend les substances inhibitrices les dernières éluées, caractérisées par un maximum d'absorption très net à 275 m μ ; elles sont beaucoup plus abondantes; les figures d'évaporation forment le dense réseau de balais intriqués que nous avons déjà représenté précédemment; (la substance responsable de l'absorption à 275 m μ était recueillie dans une seule fraction – n^o 16 de pH maximum – lors de la filtration sur résine G-25);
- la 3^e série (fractions n^{os} 34 à 47) est celle des substances alcalines non inhibitrices; elles sont peu abondantes et laissent des figures d'évaporation en lignes courbes plus ou moins rassemblées en bouquets. Le passage progressif des substances inhibitrices recueillies à peu près pures dans le tube 32 aux substances alcalines recueillies pures dans un tube 37 peut être suivi sur les figures des fractions 33 et 36 qui révèlent un mélange des deux substances avec prédominance de l'une ou l'autre formation suivant la position dans la série d'éluition.

Nous avons alors voulu éclairer par ce procédé les différences manifestées entre deux fractions successives issues de la filtration sur Sephadex G-50 du dialysat de la phase gel de *C. gigantea* (fig. 31-35). Ce dialysat présente, en effet, certaines particularités qui le distinguent de celui de la phase liquide. Inhibiteur, de même pH, il est, nous l'avons vu (tableau 3), plus riche en substances aminées. Par chromatographie analytique sur couche mince, les diagrammes sont sensiblement identiques. On peut cependant distinguer une coloration un peu plus soutenue de la zone 8 (même zone que celle représentée en figure 16) pour une coloration de même intensité du reste du chromatogramme. Les résultats des tests sur la germination, réalisés à partir d'éluats lors de chromatographies préparatives sur couche mince, révèlent que cette zone 8, qui ne manifeste pas de pouvoir inhibiteur lorsqu'elle provient du dialysat de la phase liquide, est nettement inhibitrice ($p = 0.01$) lorsqu'elle provient de la phase gel. Il était intéressant de repérer sa sortie après filtration sur résine; la chromatographie analytique permit de déceler cette zone 8 dans les fractions 19 et 20 (figure 34). Les fractions 20 et 21, qui ont des chromatogrammes nettement distincts, manifestent toutes deux une inhibition totale, mais la fraction 21 appartient à la série pour laquelle on observe un jaunissement des papiers filtres. On doit donc s'attendre à constater des différences dans les figures d'évaporation, et c'est bien ce qui se produit; les figures des fractions 20 et 21 sont, en effet, fort différentes, la première en forme de lignes courbes, la seconde en lignes droites épaisses. La fraction suivante, de pH plus alcalin, appartenant à la série jaune totalement inhibitrice, permet de retrouver le réseau en balais intriqués déjà signalé.

Ces observations permettent de compléter la caractérisation des substances recueillies par filtration sur résine du dialysat du liquide, considéré globalement, de *C. gigantea*. Quatre catégories de substances peuvent être distinguées:

- une, renfermant la fraction aminée la plus mobile, inhibitrice, non alcaline, est présente principalement dans la phase gélifiée du liquide (fractions 19 et 20, figure 35); elle agit à très faibles doses, absorbe à 256 $m\mu$ et donne, par évaporation, des lignes courbes peu ramifiées et banales;
- une, renfermant des substances plus alcalines, beaucoup plus abondantes, inhibitrices, absorbant à 256 $m\mu$, jaunissant le papier filtre, donne à l'évaporation, des lignes droites épaisses en balais intriqués (fractions n^{os} 31-32, fig. 30; n^{os} 21-23, fig. 35);
- une, renfermant des substances inhibitrices plus des substances alcalines, manifeste un très net maximum d'absorption à 275 $m\mu$; elle est également abondante (fractions n^{os} 33-36 en fig. 30, 24 et 25 en fig. 35);
- une, enfin, renfermant les substances alcalines non inhibitrices, peu abondantes, n'absorbant pas, fournit à l'évaporation des bouquets de lignes courbes (fractions n^{os} 37 et suiv. en fig. 30, 26 et suiv. en fig. 35).

Nous avons vu que la comparaison des figures d'évaporation des dialysats des liquides bruts des deux espèces faisait ressortir des différences; les figures des fractions, provenant de la filtration représentée en figure 19, vont maintenant permettre de préciser et de donner une plus grande signification à ces différences (fig. 36-44). Nous constatons que les fractions n^{os} 16-20, les plus inhibitrices, précédant les fractions jaunes, contiennent peu de substances. La densité des dépôts est la plus faible de celles des fractions qui abandonnent quelque chose à l'évaporation. Les figures observées sont caractéristiques: ce sont des cristaux polygonaux réguliers. Ces formations ne diffèrent guère de celles de la fraction suivante, n^o 21, qui marque le début de la série jaune, que par la densité de substance sèche déposée qui paraît deux fois plus grande.

La fraction n^o 22 marque un changement; l'inhibition est moins forte, le pH plus élevé. Les cristaux observés sont de formes beaucoup moins régulières, plus ou moins lobés.

La fraction n^o 23, la plus jaune, la plus alcaline, contient la plus grande densité de substance, mais elle n'est plus inhibitrice. Les figures observées sont nouvelles; on retrouve encore quelques cristaux mais surtout des formations linéaires ramifiées. Là où il y a un cristal, il forme généralement le centre d'une formation étoilée.

De toutes ces observations que peut-on conclure ? Tout d'abord que l'examen des figures d'évaporation facilite l'interprétation des chromatographies sur colonne et leur donne une signification plus grande. Il permet une caractérisation supplémentaire des substances éluées. En outre, par ce moyen très simple, très rapide et qui n'utilise qu'une quantité infime de chaque éluat, une indication précieuse est fournie pour détecter les fractions qui contiennent quelque chose. En effet, lors

de recherches de propriétés biologiques, il est inutile souvent de tester systématiquement chaque fraction. Celles qui ne laissent aucune trace après évaporation ne contiennent vraisemblablement rien et peuvent être éliminées. En ce qui nous concerne, nous avons appliqué ce principe lors des répétitions mais nous avons, pour chaque première filtration, testé tout de même toutes les fractions par prudence, pour ne pas risquer de négliger des fractions contenant éventuellement des oligo-substances actives. Mais nous avons constaté que chaque manifestation biologique était accompagnée d'un dépôt visible à l'œil nu, parfois très faible, mais jamais nul.

Les conclusions que nous avons pu tirer pour mieux caractériser les deux espèces sont les suivantes:

- Chez *C. gigantea*, à l'alcalinité sont liés une densité de matériel moyenne à faible et un réseau géométrique selon des lignes directrices droites ou incurvées; à l'inhibition sont liées deux séries de substances: l'une très peu abondante, donnant des figures assez banales; l'autre très abondante, donnant des figures caractéristiques en réseau très dense de lignes ayant l'apparence de balais intriqués.
- Chez *C. chlamydantha*, à l'alcalinité sont liés une forte densité de matière et un réseau en fougères courtes plus ou moins ramifiés; à l'inhibition sont liés des cristaux polygonaux plus ou moins réguliers, surtout bien formés dans les fractions à forte inhibition, non alcalines, non jaunes.

Une coloration bleue fut démasquée, dans certaines circonstances, à la fois chez *C. chlamydantha* et chez *C. gigantea*.

- Chez *C. chlamydantha* nous avons vu que, par chromatographie sur colonne, deux zones se séparent, visibles pendant la filtration, une jaune précédant une bleue.
- Chez *C. gigantea*, au cours de chromatographies préparatives sur gel de silice¹, après isolement des zones à éluer, le gel est blanc, uniformément; au moment de l'introduction de l'eau bidistillée sur le gel sec correspondant aux zones 4, 7 et 8 et surtout 5 et 6 de la figure 16, on observe un bleuissement du gel. Après filtration, le filtrat est clair, incolore, le gel reste bleuté; le pouvoir absorbant du gel de silice retient la substance colorée.

¹ Il ne fut malheureusement pas possible de tester le pouvoir inhibiteur des zones éluées après chromatographie sur gel de silice car une partie du butanol reste également absorbée par le gel et, malgré une évaporation prolongée, il ne fut pas possible de se débarrasser des dernières traces de butanol. Un tel inconvénient n'existe pas avec les gels de cellulose; signalons qu'avec ceux-ci aucune coloration bleue n'apparaît, dans les conditions que nous venons de décrire.

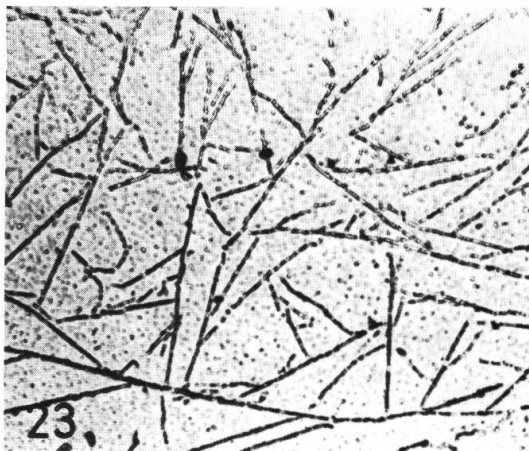
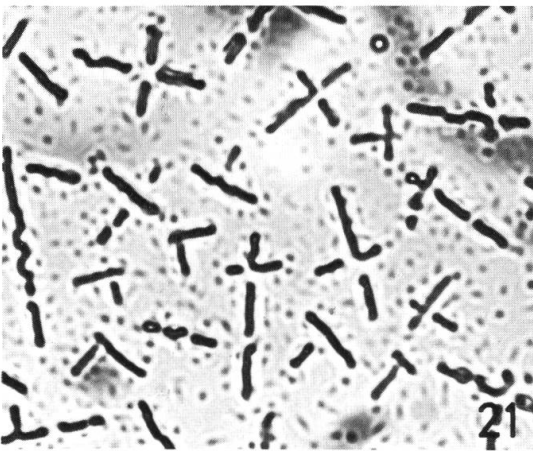
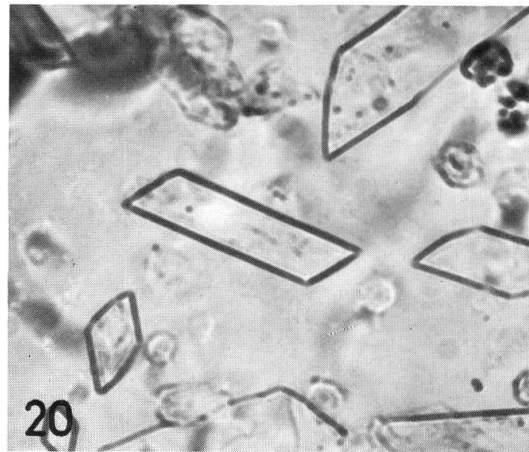
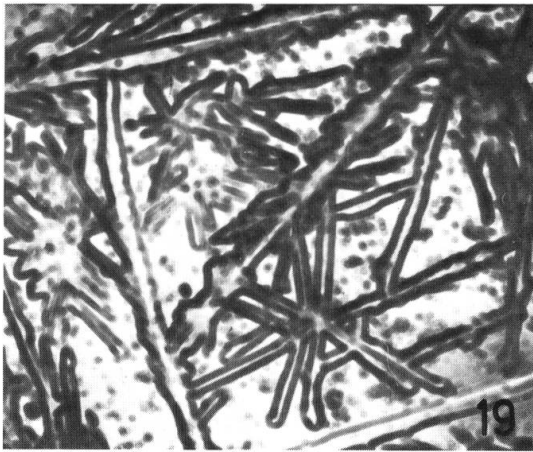
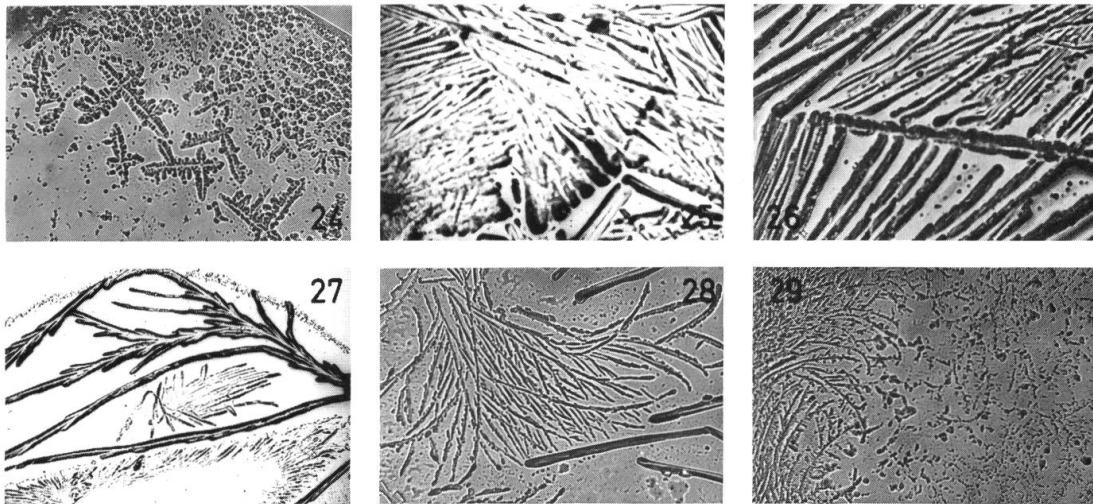


Fig. 19-20. — Figures d'évaporation des dialysats des liquides de *Cola gigantea* (fig. 19) et de *C. chlamydantha* (fig. 20).

Fig. 21-23. — Figures d'évaporation de fractions issues de la filtration sur résine Sephadex G-25 du dialysat du liquide de *Cola gigantea* (voir fig. 17):

21, fraction n° 11, non inhibitrice, à pH faible; 22, fraction n° 14, totalement inhibitrice, à pH plus élevé mais non maximum et à plateau d'absorption à 256 m μ ; 23, fraction n° 16, peu inhibitrice, à pH maximum et à maximum d'absorption à 275 m μ .



30

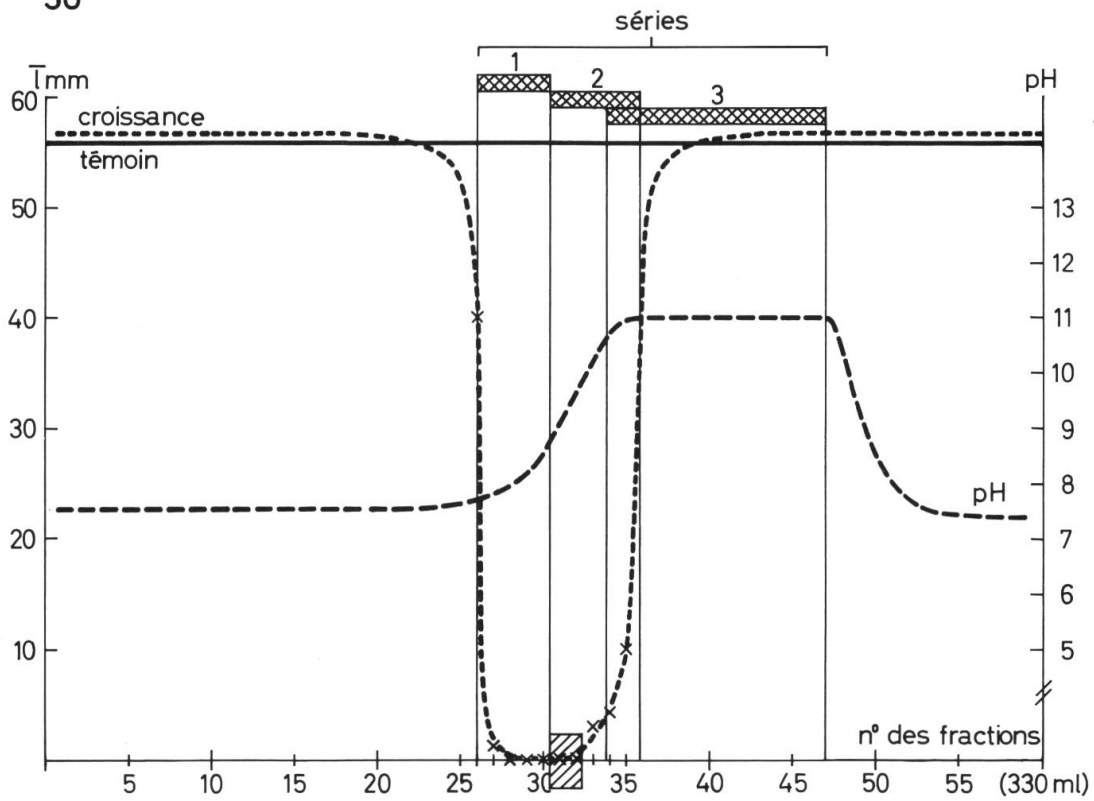


Fig. 24-30. – Filtration sur résine Sephadex G-50 du dialysat du liquide de *Cola gigantea* (colonne de 2.5x40 cm, 30 g de gel):
24-29, figures d'évaporation des fractions n^{os} 27, 31, 32, 33, 36 et 37, dans l'ordre; 30, profil d'éluion (en hachuré les fractions provoquant le jaunissement du papier filtre).

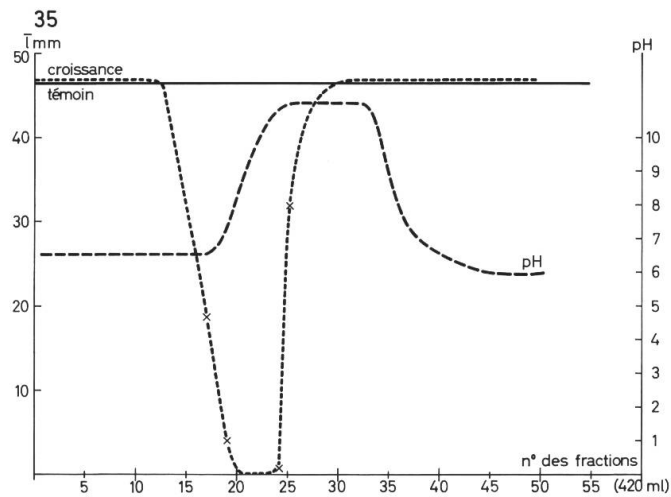
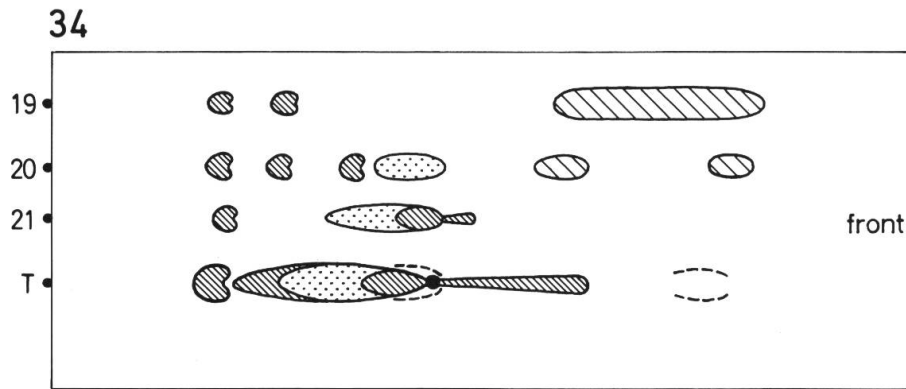
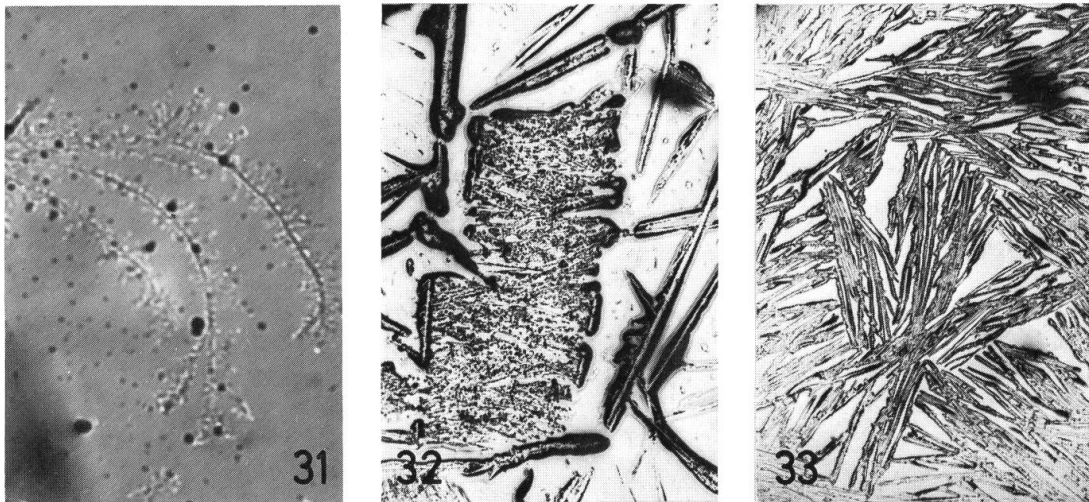


Fig. 31-35. – Filtration sur résine Sephadex G-50 du dialysat de la phase gel du liquide de *Cola gigantea* (conditions habituelles):
 31-33, figures d'évaporation des fractions n^{os} 20, 21 et 23, dans l'ordre; 34, chromatogramme comparé, sur couche mince, des fractions n^{os} 19, 20 et 21 et du dialysat total (T); 35, profil d'éluion.

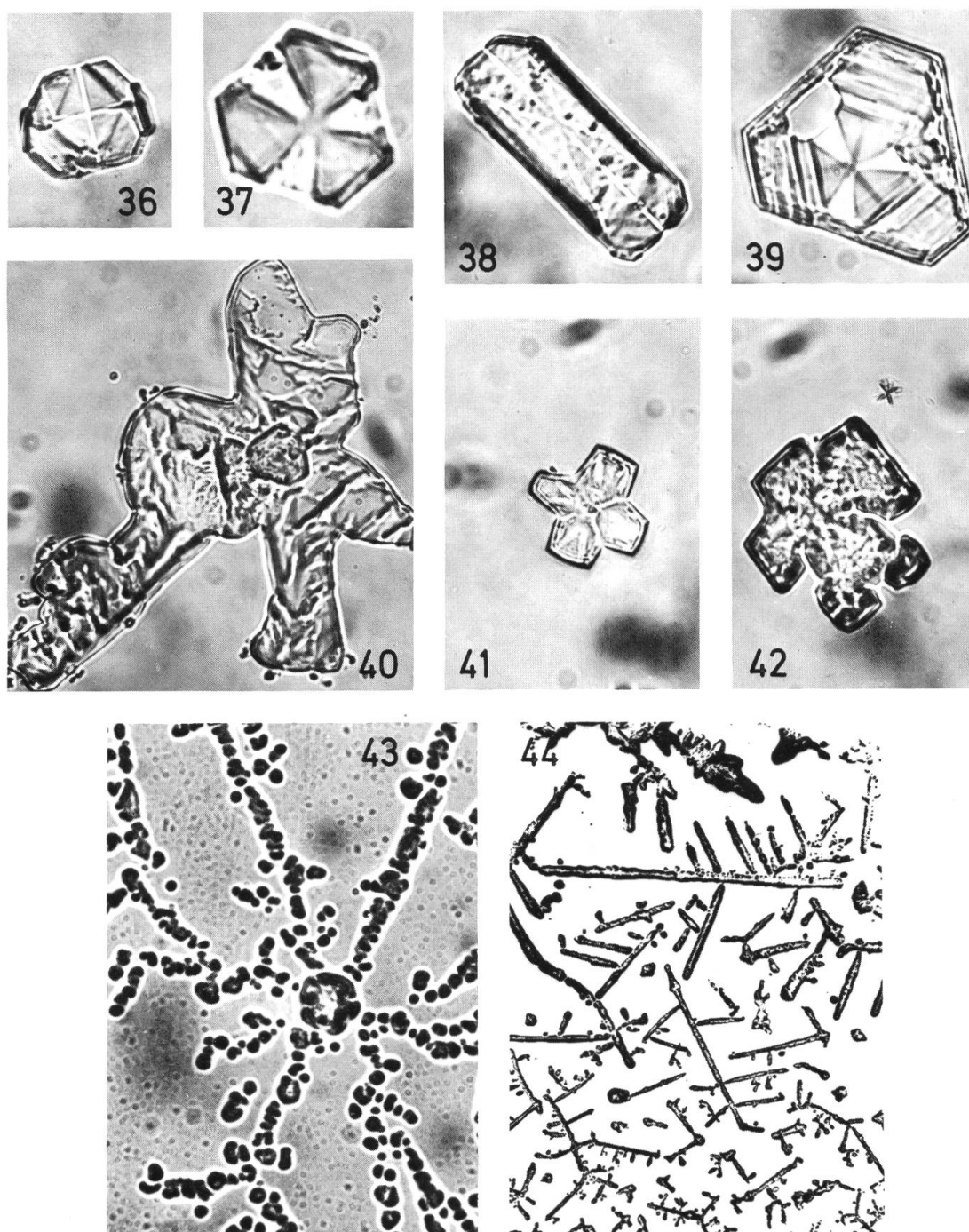


Fig. 36-44. — Figures d'évaporation de fractions issues de la filtration sur résine Sephadex G-25 du dialysat du liquide de *Cola chlamydantha* (voir fig. 18):
 36-37, fraction n° 20, pH = 6.2, inhibition maximum et faible densité de substances; 38-39, fraction n° 21, pH = 7.2, inhibition maximum (début de la série jaune) et forte densité de substances; 40-42, fraction n° 22, pH = 7.7, inhibition plus faible et très forte densité de substances; 43-44, fraction n° 23, pH = 8.5 (maximum), inhibition nulle et très forte densité de substances.

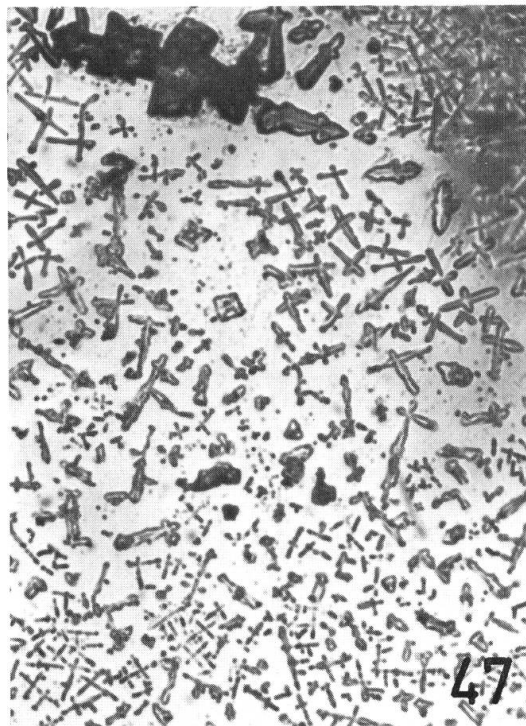
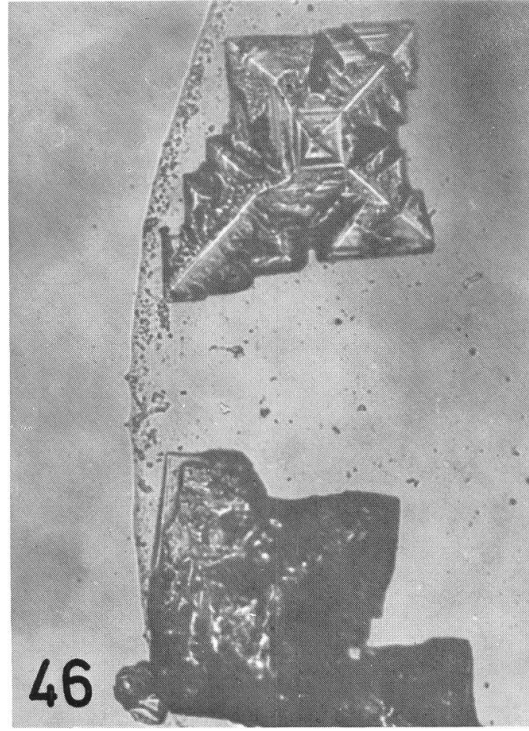
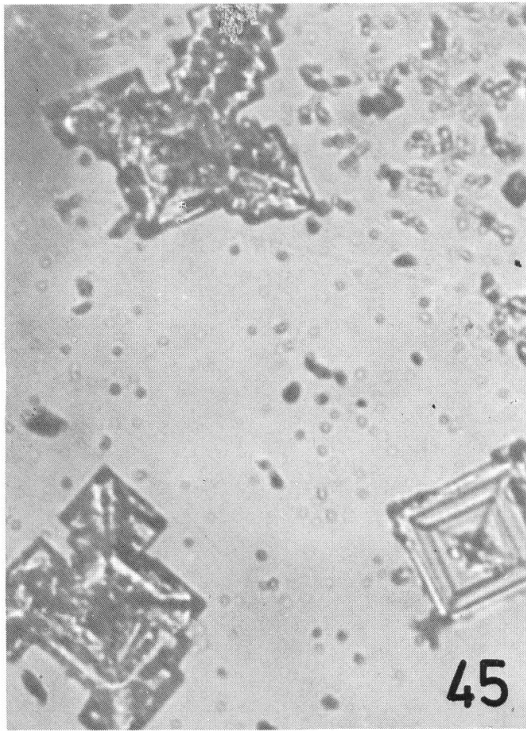


Fig. 45-48. — Figures d'évaporation des dialysats hydrolysés des liquides de *Cola gigantea*, en solution concentrée (fig. 45-46), et de *C. chlamydantha*, en solution moyennement concentrée (fig. 47) et concentrée (fig. 48).

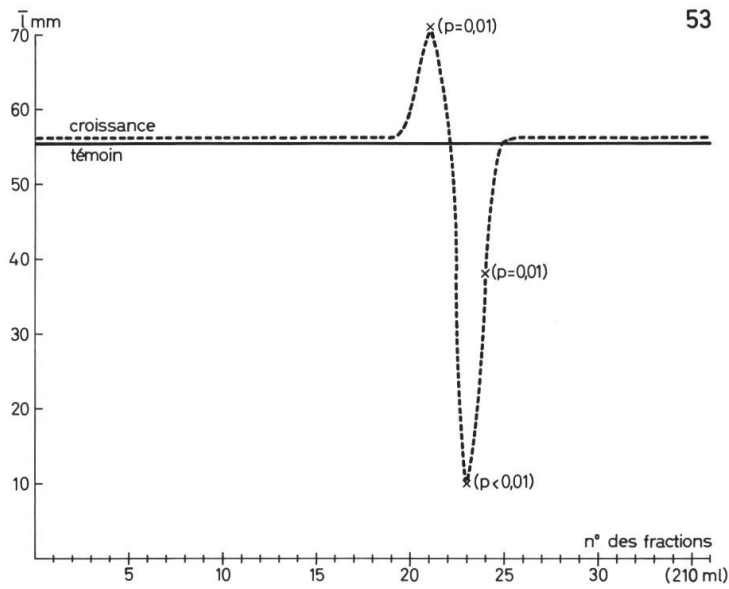
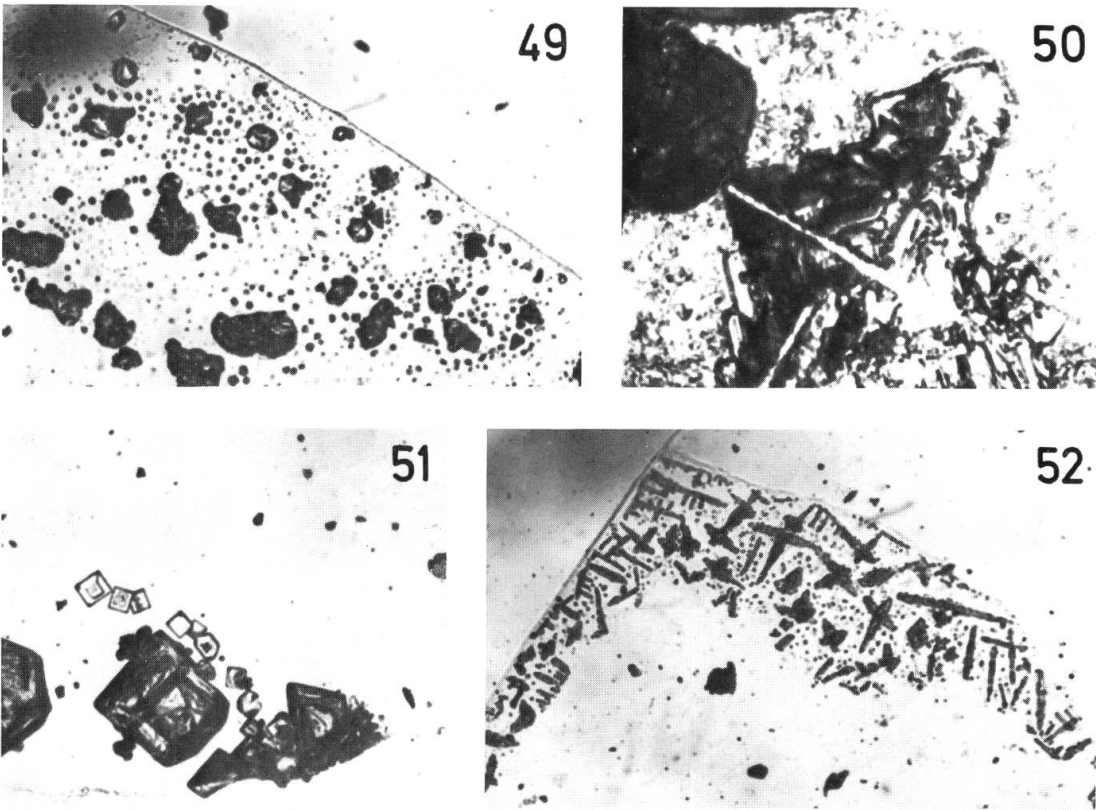


Fig. 49-53. — Filtration sur résine Sephadex G-50 du dialysat hydrolysé du liquide de *Cola gigantea* (conditions habituelles): 49-52, figures d'évaporation des fractions n^{os} 21, 23, 25 et 27, dans l'ordre; 53, profil d'éluion.

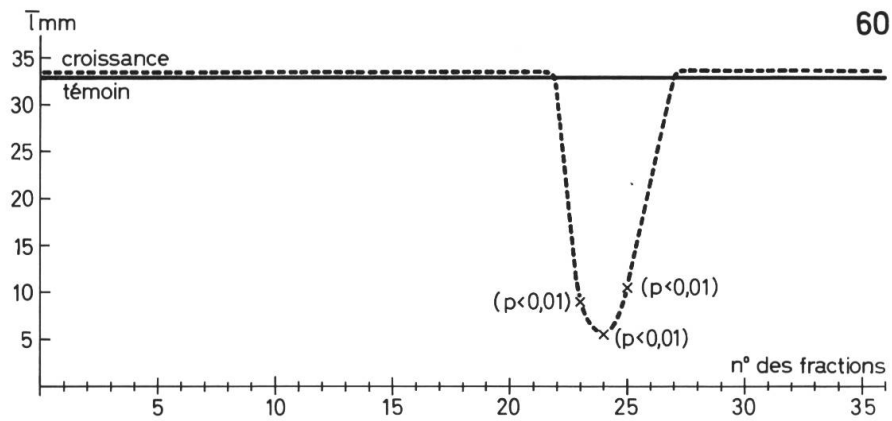
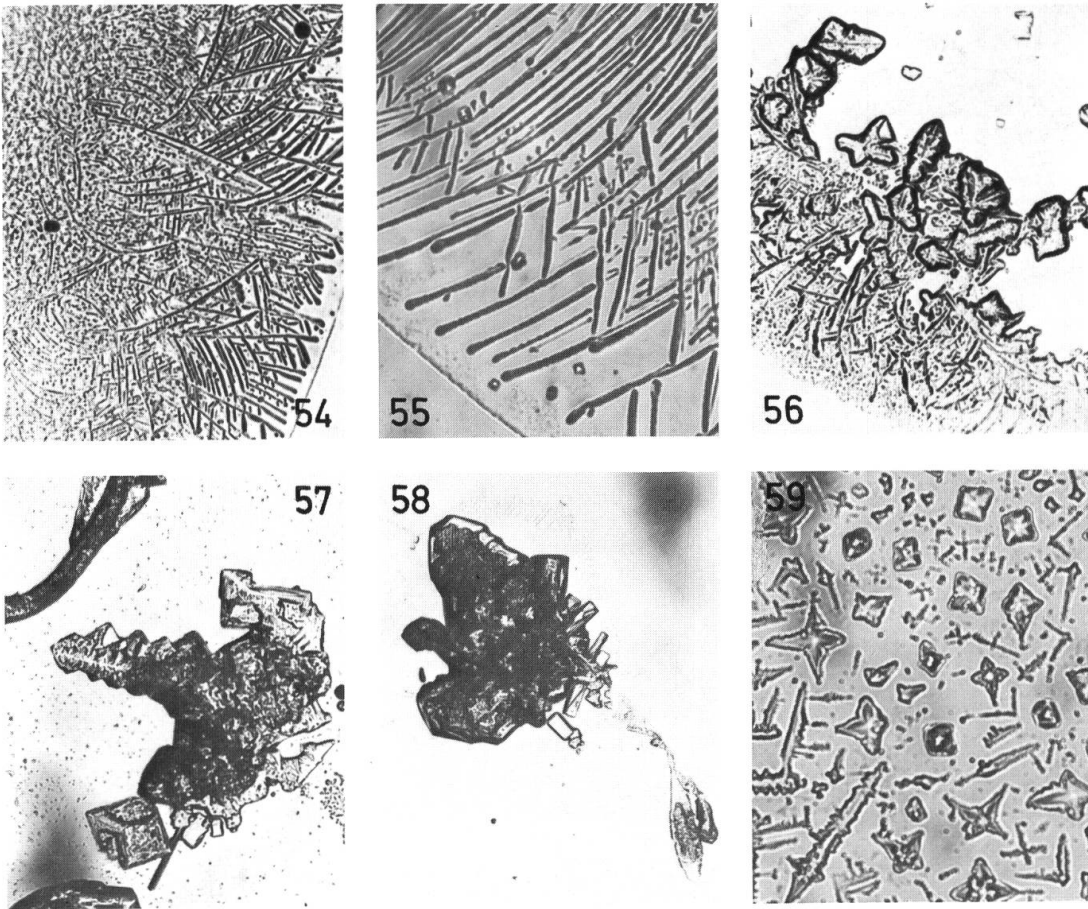


Fig. 54-60. – Filtration sur résine Sephadex G-50 du dialysat hydrolysé du liquide de *Cola chlamydantha* (conditions habituelles):
 54-59, figures d'évaporation des fractions n^{os} 23 (2 figures), 24, 25, 26 et 28, dans l'ordre;
 60, profil d'éluion.

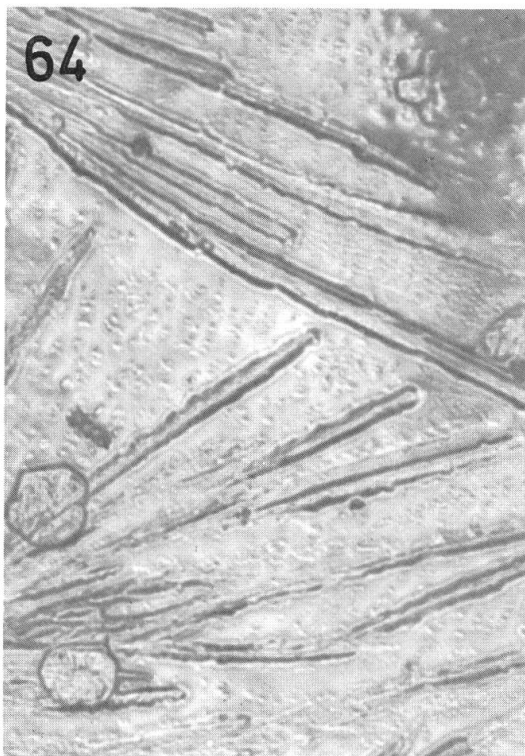
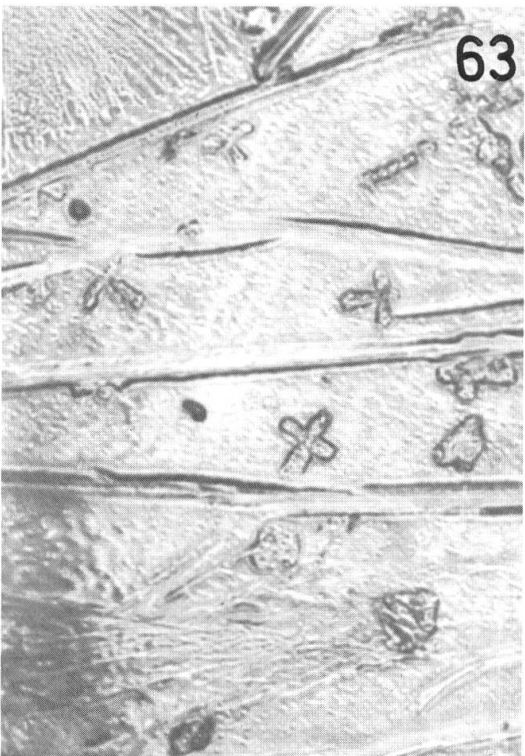
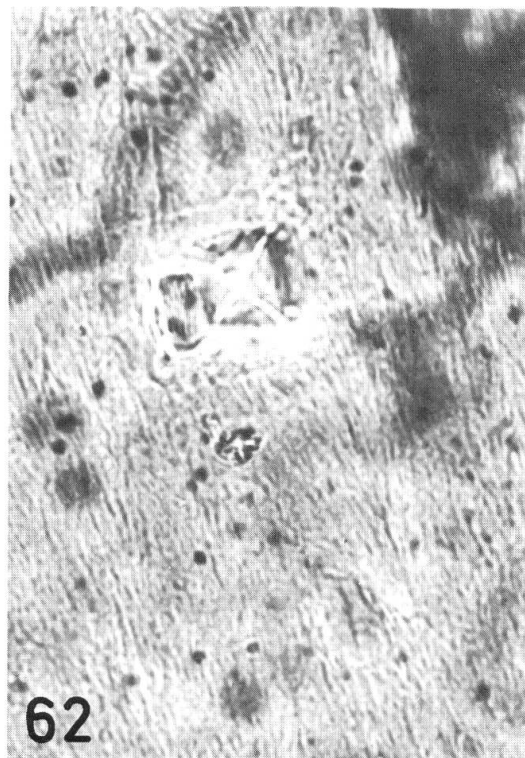
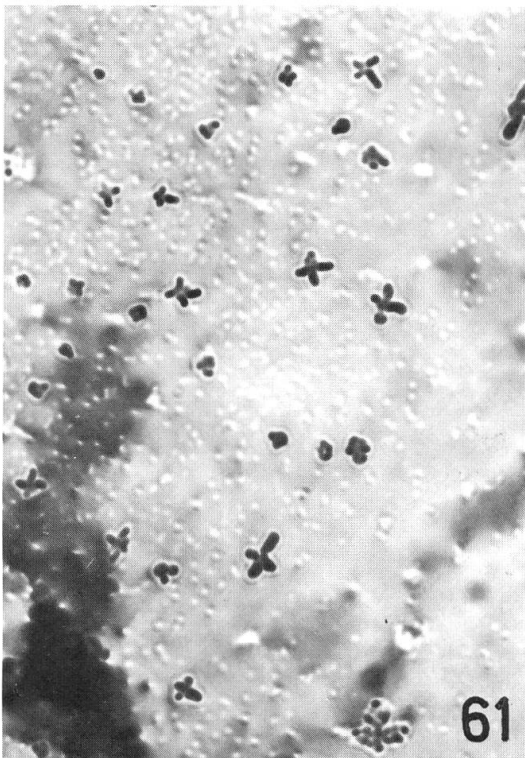


Fig. 61-64. – Modifications des figures d'évaporation du dialysat du liquide de *Cola chlamydantha* sous diverses influences:
61, liquide frais; 62, dialysat frais reconstitué après lyophilisation, évaporé sur plaque chauffante;
63-64; liquide conservé 8 semaines à 4°C.

Là encore nous constatons l'existence commune d'une substance colorée, mais une grande différence dans l'expression de cette présence. Que la coloration soit jaune ou bleue, sa manifestation est beaucoup plus évidente chez *C. chlamydantha*.

VI. Comparaison des substances dialysables libérées par hydrolyse

A. Chromatographie sur couche mince

Les dialysats des liquides des deux espèces contiennent, nous l'avons indiqué, de nombreuses substances, plus ou moins associées, la plupart aminées. Les liens qui unissent ces substances ne sont pas peptidiques car l'hydrolyse enzymatique ne modifie pas sensiblement les chromatogrammes. En revanche, l'hydrolyse acide libère chacune des substances, notamment celles qui étaient associées dans la tache principale, comme le révèle la figure 65.

Les constatations générales qui ressortent de l'examen de ces chromatogrammes se résument ainsi: les constituants dialysables du liquide de *C. chlamydantha*, libérés par hydrolyse, sont moins mobiles, plus fluorescents, plus avides de vapeurs d'iode que ceux provenant de *C. gigantea*. Ils se distinguent, en outre, par la fluorescence bleue d'un constituant, contrastant avec la lumière jaune émise par tous ceux des autres composants de l'une et l'autre espèce qui sont fluorescents à 366 m μ .

La comparaison des zones permet de détailler les résultats. Les constituants qui y figurent se caractérisent ainsi:

Zone 1 (g) une substance de *C. gigantea* absorbe les vapeurs d'iode, n'est pas aminée et présente une particularité: non fluorescente à 366 m μ , elle absorbe nettement à 254 m μ . C'est là le seul des constituants, chez les deux espèces, à absorber nettement à cette longueur d'onde.

Zone 2 (ch, g) une substance de *C. chlamydantha* et une de *C. gigantea* ont même R_f et sont aminées. Mais d'autres caractères les distinguent nettement: celle provenant de *C. gigantea* absorbe l'iode fortement donnant une coloration bleu-violet; elle est, en outre, très fluorescente à 366 m μ ; c'est d'ailleurs le seul constituant de l'hydrolysate de *C. gigantea* à absorber fortement les vapeurs d'iode. Celle relative à *C. chlamydantha* n'est pas fluorescente et donne avec l'iode une tache marron ne se distinguant pas de toutes les autres taches dont l'ensemble fournit une zone marron assez continue.

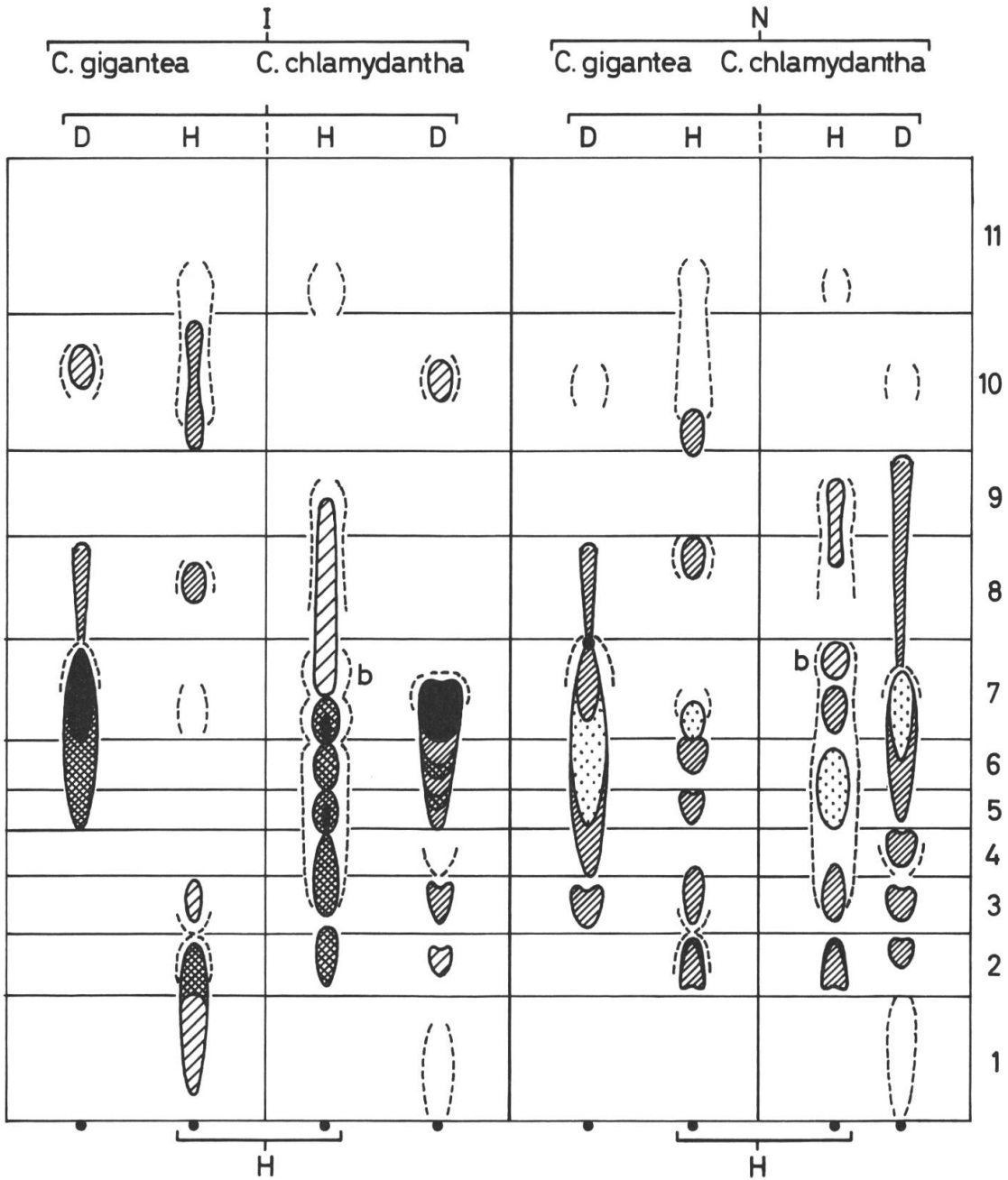


Fig. 65. – Chromatogrammes comparés, sur couche mince, des dialysats (D), et de leurs hydrolysats (H), des liquides des deux espèces de *Cola*. Révélation par fluorescence (pourtours à trait interrompu), vapeurs d'iode (I) et ninhydrine (N). Pour les couleurs, voir la légende de la fig. 16.

- Zone 3 (ch, g) une substance de *C. chlamydantha* et une de *C. gigantea* ont même Rf, sont aminées et fluorescentes à 366 m μ . Cependant, celle provenant de *C. gigantea* n'absorbe que très faiblement les vapeurs d'iode.
- Zone 4 (ch) une substance propre à *C. chlamydantha* n'est révélée que par la fluorescence et l'absorption de vapeurs d'iode.
- Zone 5 (ch, g) une substance de *C. chlamydantha* et une de *C. gigantea* ont même Rf, mais celle de *C. gigantea*, aminée, n'absorbe pas les vapeurs d'iode alors que celle de *C. chlamydantha* est colorée en jaune orangé par la ninhydrine et absorbe les vapeurs d'iode.
- Zone 6 (ch, g) une substance de *C. gigantea* et une de *C. chlamydantha* ont même Rf, mais celle de *C. gigantea*, aminée, n'absorbe pas les vapeurs d'iode alors que celle de *C. chlamydantha* les absorbe et se colore en jaune orangé par la ninhydrine.
- Zone 7a (ch, g) une substance de *C. gigantea* et une de *C. chlamydantha*, de même Rf, sont fluorescentes. Mais celle de *C. gigantea* n'absorbe pas les vapeurs d'iode et même décolore le fond, alors que celle de *C. chlamydantha*, aminée, absorbe fortement les vapeurs d'iode.
- Zone 7b (ch) une substance singulière est propre à *C. chlamydantha*: aminée, absorbant légèrement les vapeurs d'iode, elle présente une belle fluorescence bleue à 366 m μ .
- Zone 8 (g) une substance semble propre à *C. gigantea*: aminée, fluorescente à 366 m μ , elle absorbe légèrement les vapeurs d'iode.
- Zone 9 (ch) des traces d'une substance de *C. chlamydantha* sont perçues par sa fluorescence, sa fonction aminée et l'absorption de vapeurs d'iode.
- Zone 10a (g) une substance paraît encore propre à *C. gigantea*: aminée, absorbant légèrement les vapeurs d'iode, elle n'est pas fluorescente mais est contiguë et même recouvre légèrement une zone fluorescente, peu réactive par ailleurs.
- Zone 10b (g) une substance fluorescente de *C. gigantea*, non aminée, absorbe très légèrement les vapeurs d'iode.
- Zone 11 (ch, g) une substance de *C. gigantea* et une de *C. chlamydantha*, de même Rf, ne sont révélées que par leur fluorescence.

En résumé, nous voyons que dix constituants sont révélés dans le dialysat hydrolysé du liquide de *C. gigantea* et neuf dans celui de *C. chlamydantha*. Aucune de ces substances ne semble être totalement commune aux deux espèces. Celle qui

offre le plus de caractères communs est celle de la zone 2. Celles qui sont les plus différentes sont, provenant de *C. gigantea*, celles des zones 1, 8, 10 et, provenant de *C. chlamydantha*, celles des zones 4, 9 et surtout 7b.

Notons que les chromatogrammes des dialysats non hydrolysés révèlent, semble-t-il, une plus grande complexité des constituants de *C. chlamydantha*, alors qu'après hydrolyse on dénombre une substance de plus dans le dialysat de *C. gigantea*.

Finalement, cette comparaison des substances dialysables libérées par hydrolyse révèle beaucoup plus de différences que de similitudes.

Ainsi, des variantes dans la composition chimique des substances dialysables donnent aux liquides de *C. gigantea* et *C. chlamydantha* une originalité propre qui caractérise chacun d'eux; cependant ces variantes n'altèrent pas les propriétés inhibitrices des liquides, caractère qui leur confère une unité de fonction à défaut d'unité de constitution.

B. Pouvoir inhibiteur et figures d'évaporation des hydrolysats

Les hydrolysats se présentent, après les traitements suivants: évaporation sous vide de l'acide chlorhydrique, reprise par l'eau suivie d'évaporation (5 fois) puis séjour en dessiccateur en présence de potasse, sous forme de poudres, brune pour *C. chlamydantha* et jaune pour *C. gigantea*. A partir de ces poudres, des solutions furent réalisées de telle manière qu'elles aient une teneur en matière sèche proportionnelle à celle de la phase liquide de *C. gigantea* en substances dialysables dans les rapports respectivement de 2, 1, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ et $\frac{1}{16}$. Nous savons que la teneur en substance sèche du liquide de *C. chlamydantha* est plus faible que celle du liquide de *C. gigantea*, mais nous avons vu par ailleurs que, à teneur en substance sèche égale, les dialysats des deux espèces avaient un pouvoir inhibiteur à peu près équivalent; aussi avons-nous comparé le pouvoir inhibiteur des hydrolysats à teneur égale en matière sèche en prenant une référence unique (ici la teneur du liquide de *C. gigantea* en substances dialysables).

Nous constatons (tableau 4) que les deux hydrolysats se comportent de façons tout à fait comparables. Ils sont encore inhibiteurs, mais seulement si leur teneur en substance sèche est 8 fois plus forte que celle des dialysats non hydrolysés ($d = 0.5$); il y a donc, par hydrolyse, un affaiblissement important du pouvoir

Dilution	Témoin	<i>C. gigantea</i>	<i>C. chlamydantha</i>
	44.7		
d = 0.5		0.0	8.5
d = 1		49.6	42.0
d = 4		76.3 ($p = 0.01$)	59.5 ($p = 0.05$)
d = 8		71.7	56.7
d = 16		60.8	40.5

Tableau 4. — Influence sur la croissance des hydrolysats des dialysats relatifs aux deux espèces de Cola (la dilution 1 correspond au liquide de *Cola gigantea*).

inhibiteur. Nous constatons, en outre, chez les deux espèces, un pouvoir stimulant manifesté pour les mêmes dilutions des hydrolysats ($d = 4$ et $d = 8$). Nous sommes frappés de constater, une fois de plus, l'analogie du comportement biologique des liquides dont les constituants révèlent d'évidentes particularités chimiques. On pouvait penser que l'hydrolyse aplanirait les différences de constitution des dialysats, celles-ci pouvant être dues à des arrangements divergents à partir de substances de base assez semblables. Il n'en est rien. Il n'en reste pas moins que ces éléments constitutifs singuliers chimiquement concourent à des effets biologiques identiques chez l'une et l'autre espèce.

L'examen des figures d'évaporation des hydrolysats d'abord (fig. 45-48), des fractions recueillies après filtrations sur résine ensuite (fig. 49-52, 54-59) nous permettra de compléter la comparaison des éléments constitutifs des liquides.

Une première différence se manifeste dans le mode d'étalement des substances après évaporation: alors que le dépôt a lieu uniformément sur toute la surface de la goutte, chez *C. chlamydantha*, il est exclusivement massé sur le pourtour chez *C. gigantea*; les figures que l'on observe ne sont pas, elles-mêmes, identiques: chez *C. gigantea* (fig. 45-46) ce sont de gros cristaux ou amas de cristaux; certains ont la forme caractéristique de beaucoup de sels de potassium, ce qui n'est pas surprenant; chez *C. chlamydantha*, en solution de concentration moyenne (fig. 47), on note peu de gros cristaux mais de nombreuses formations en croix plus ou moins épaisses; en solution concentrée (fig. 48), à côté des mêmes formations en croix, de plus gros cristaux plus ou moins étoilés sont présents. Les différences, en fait, ne sont pas bien nettes et l'observation des figures des fractions recueillies après filtration sur résine sera sûrement plus instructive.

C. Chromatographie sur colonne

Les hydrolysats furent soumis à une filtration sur résine dans des conditions tout à fait identiques. Les fractions furent testées quant à leurs figures d'évaporation, leur pouvoir inhibiteur et leur spectre.

Les courbes de croissance (fig. 53 et 60) ont une allure générale semblable dont le point marquant est une inhibition très significative manifestée pour un même volume d'évolution (138 à 144 ml). Mais l'hydrolysate du liquide de *C. gigantea* se distingue par une stimulation précédant l'inhibition, stimulation qui ne s'observe pas dans le cas de *C. chlamydantha*. Reportons-nous alors au tableau 4 et constatons que la stimulation provoquée par l'hydrolysate de *C. gigantea* était plus significative que celle due à celui de *C. chlamydantha*. Ce dernier contiendrait alors peut-être la substance stimulante concernée mais à trop faible dose pour permettre sa manifestation.

Les spectres (fig. 66-67) confirment ces différences. La fraction 21 relative à *C. gigantea*, stimulante, offre un spectre différent de celui des autres fractions avec un plateau de 270 à 255 $m\mu$. Les fractions 22 à 25 (inhibitrices) présentent un net maximum à 272 $m\mu$, les autres fractions absorbent peu ou pas. Nous avons vérifié que des variations modérées de pH ne modifiaient pas ces spectres: en effet, après élimination de l'acide chlorhydrique, les hydrolysats ont un pH d'environ 5.5, mais de légères variations ont été observées d'une filtration à l'autre.

Les spectres de *C. chlamydantha* relatifs aux fractions 21 à 25 (inhibitrices) révèlent une absorption croissante sans accident bien net; celui de la fraction 26 marque

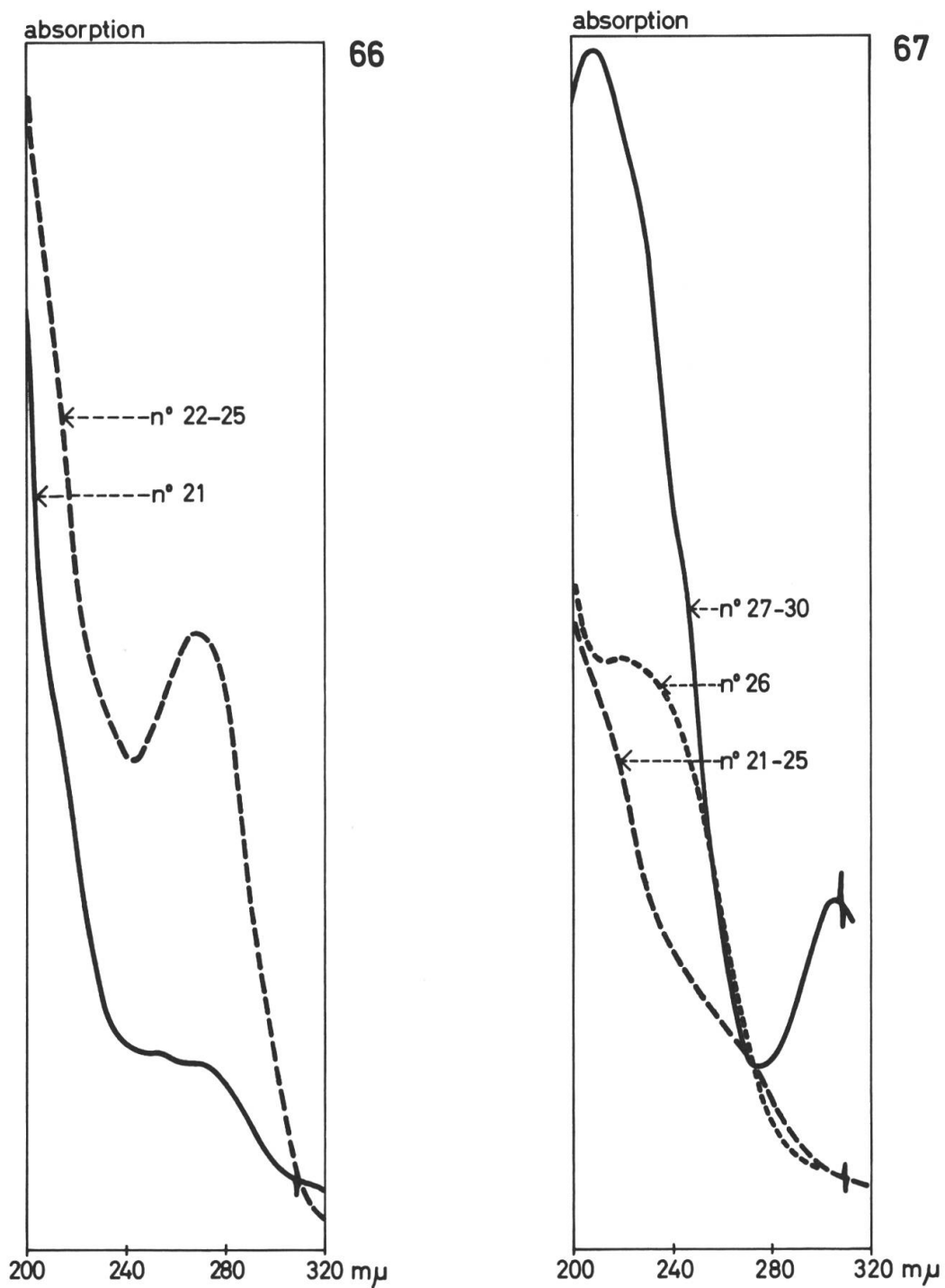


Fig. 66-67. — Spectres d'absorption en UV de différentes fractions issues de la filtration sur résine Sephadex G-50 des dialysats hydrolysés des liquides de *Cola gigantea* et de *C. chlamydantha*. Voir les profils d'éluion correspondants en fig. 53 et 60.

un plateau vers 230 $m\mu$; ceux des fractions 27 à 30 montrent un maximum très marqué à une longueur d'onde (304 $m\mu$) où, jusqu'alors, aucun accident ne fut jamais constaté lors des analyses portant aussi bien sur *C. chlamydantha* que sur *C. gigantea*.

Que révèlent alors les figures d'évaporation au niveau de ces fractions singulières ? Le n° 21 de *C. gigantea*, stimulant, a une faible densité de substance et dépose des figures isolées peu typiques (fig. 49); les n°s 23 et 24 abandonnent des cristaux réguliers, isolés à très agglomérés (fig. 50); la densité de substance y est la plus forte. Les figures concernant *C. chlamydantha* sont plus variées et plus caractéristiques. Ceci nous rappelle que le dialysat du liquide de cette espèce s'était révélé, bien avant l'hydrolyse, plus complexe que celui de l'autre espèce. La fraction n° 23, inhibitrice, absorbant dans l'UV mais sans accident, se distingue par une très forte densité de substance disposée en trame géométrique régulière (fig. 54-55); les n°s 24 et 25 (fig. 56-57) déposent sous la même forme que les fractions correspondantes de *C. gigantea*; enfin le n° 28, appartenant à la série qui offre le singulier maximum à 304 $m\mu$, montre une quantité de substances encore assez importante, bien que plus faible que dans les fractions précédentes, substances qui se déposent sous forme d'éléments isolés en étoile ou courtement ramifiés (fig. 59). Ce sont donc les fractions n°s 23 et 27 à 30 qui distinguent *C. chlamydantha* de *C. gigantea*.

VII. Conclusions

Les liquides contenus dans les fruits des deux espèces de Cola, *C. gigantea* et *C. chlamydantha*, ont en commun un caractère de base qui est une alcalinité élevée liée à la présence d'ions potassium. Mais ils se distinguent par un faisceau de caractères physico-chimiques très particuliers des substances dialysables qu'ils renferment. Voici les principaux:

- Allure différente des diagrammes obtenus par chromatographie sur couche mince des dialysats, différences modifiées mais non amoindries après libération par hydrolyse des substances constitutives de ces dialysats.
- Différences dans l'absorption des radiations ultraviolettes et l'émission de fluorescence, par excitation à 366 $m\mu$, des substances dialysables libérées par hydrolyse.
- Aspects distincts des figures d'évaporation obtenues avant et après hydrolyse.
- Différence d'aspect physique frappante présentée par les substances dialysables obtenues sèches par lyophilisation. Alors que le dialysat de *C. gigantea* fournit une poudre blanche, très légère, abondante, ressemblant à de la neige poudreuse, celui de *C. chlamydantha* abandonne sur les parois un dépôt beige, collant, rare, dense, aggloméré, très hygroscopique.

Ces caractères différencient très nettement les deux liquides qui manifestent ainsi, l'un par rapport à l'autre, une originalité certaine. Cependant, toutes ces divergences ne les empêchent pas de posséder des propriétés comparables sur la germination et la croissance.

Ces caractères biologiques communs, dûs à des substances dialysables, se résument ainsi:

- Inhibition de la germination et de la croissance; inhibition du même ordre de grandeur, plus faible cependant pour le dialysat de *C. chlamydantha*, même s'il est concentré de manière à contenir le même taux de substance sèche que celui de *C. gigantea*.
- Affaiblissement considérable du pouvoir inhibiteur après libération, par hydrolyse acide, des substances associées dans les dialysats; ce pouvoir est diminué d'environ 8 fois.
- Présence d'une substance stimulante parmi les substances libérées par hydrolyse.

Il faut cependant se garder d'accorder aux différences physico-chimiques observées une importance excessive. Certaines oppositions de caractères physiques, entre les liquides, se sont trouvées en effet atténuées soit par la maturation, soit par des transformations spontanées au sein des liquides abandonnés à 4°C plusieurs semaines.

En outre, les liquides proviennent de fruits récoltés dans la nature sur plusieurs arbres. Une variabilité des caractères est, de ce fait, à envisager. Nous avons pu néanmoins vérifier la reproductibilité absolue de certaines propriétés biologiques importantes tel le pouvoir inhibiteur. Pour les caractères fluctuants, nous effectuons actuellement des répétitions avec des fruits présentant des degrés de maturité précis et variés, récoltés sur des arbres différents, choisis dans des situations écologiques diverses, afin de déterminer l'amplitude et les circonstances de ces variations. Ainsi, déjà nous savons que le pH peut varier considérablement au cours de la maturation. Chez *C. chlamydantha*, proche de la neutralité (6.6) dans les fruits très jeunes, il augmente pour se stabiliser assez vite aux alentours de 9 bien avant la maturation. (Les liquides neutres des fruits très jeunes, soit dit en passant, sont déjà inhibiteurs). Les résultats de ces essais supplémentaires seront exposés ultérieurement.

Pour conclure, nous constaterons que la nature a doté les fruits de certaines espèces de *Cola* du pouvoir de fabriquer un liquide destiné à jouer un rôle très précis: celui d'empêcher la germination précoce des graines. Le même but est atteint chez les deux espèces étudiées ici, mais avec des modulations en ce qui concerne la composition des substances impliquées dans cette action.

Bien que les recherches que nous entreprenons maintenant pour préciser le rôle et le mode d'action des liquides n'en soient qu'à leur début, nous pouvons cependant apporter une précision en relatant une constatation que nous avons faite: un fruit de *C. chlamydantha*, cueilli sur une branche où les autres fruits étaient immatures et remplis de liquide, s'est révélé après ouverture, et pour une raison que nous ignorons, privé de liquide. Que la cause de cette absence ait été pathologique, parasitaire ou mécanique (quoique nous n'ayons remarqué aucun défaut

d'étanchéité dans le fruit), le résultat fut une germination générale des graines à l'intérieur du fruit fermé: germination qui ne pouvait conduire à la formation d'une nouvelle plante faute de libération des graines, donc gaspillage et atteinte à la propagation de l'espèce. Le rôle du liquide semble donc bien être d'empêcher une germination précoce, les graines arrivant peut-être à maturité avant que le fruit ne soit prêt à s'ouvrir. Nous entreprenons des essais pour préciser cette action et ses modalités. Nous cherchons notamment à préciser l'action sur l'anatomie et la cytologie de la plantule.

Sur le plan taxonomique, cette étude fait ressortir, par la confrontation des caractères des liquides de *C. chlamydantha* et de *C. gigantea*, des dissemblances et des analogies.

Les analogies concernent la présence de liquides; leur rôle inhibiteur très semblable; une certaine identité dans les caractères physico-chimiques (forte alcalinité, émission de fluorescence à 366 m μ , spectres d'absorption globalement comparables, etc.); et la manifestation, dans certaines circonstances, d'un pouvoir stimulant.

Les divergences portent principalement sur les caractères chimiques. Différents dans le détail, ils présentent néanmoins des analogies globales: par exemple, la présence majoritaire de substances aminées et iminées, produits absorbant pour la plupart les vapeurs d'iode.

Ainsi, sur un fond commun, des modulations s'observent, révélées par chromatographie sur couche mince et sur colonne. Des différences se manifestent également dans les propriétés physiques des liquides et de leurs substances dialysables, différences confirmées par les aspects dissemblables des figures d'évaporation.

Pour être assuré des affinités existant entre les deux espèces, il sera nécessaire de pousser plus loin les investigations et de les étendre aux autres espèces proches dont la parenté est reconnue. Nous pouvons cependant, pour l'instant, maintenir, à cause surtout des identités biologiques plus importantes que les divergences physico-chimiques, les deux espèces dans le même genre. Mais ce n'est peut-être qu'un statut provisoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Aubréville, A. (1959) In: *La flore forestière de la Côte-d'Ivoire*, ed. 2, 2: 278-294. Centre technique forestier tropical, Nogent-sur-Marne.
- Bodard, M. (1954) Note sur quelques kolatiers africains. *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 1: 312-316.
- (1962) Contribution à l'étude systématique du genre Cola en Afrique occidentale. *Ann. Fac. Sci. Dakar* 7: 1-187.
- Chevalier, A. (1907) Notes sur les kola dans la forêt de la Côte-d'Ivoire. *Agric. Pays Chauds* 1907: 253-256.
- (1908) Sterculiacées. In: *Les végétaux utiles de l'Afrique tropicale française*. Vol. 5: 247-257. Challamel, Paris.
- & E. Perrot (1911) Les kolatiers et les noix de kola. *Végétaux utiles de l'Afrique tropicale française*. Vol. 6. Challamel, Paris.

- Feigl, F. (1966) *Spot tests in organic analysis*. Ed. 7. Elsevier, London & New York.
- Hallé, N. (1961) Sterculiacées. In A. Aubréville (ed.): *Flore du Gabon*. Vol. 2. Muséum national d'histoire naturelle, Paris.
- (1962) Sur les Cola et Chlamydocola (Stercul.). Remarques, additions et divisions sous-génériques nouvelles. *Compt. Rend. IV^e Réun. Plén. Ass. Etude. Tax. Fl. Afrique Trop.*: 371-380.
- Keay, R. W. J. (1954) Revision of the “Flora of West Tropical Africa” – VI. *Kew. Bull.* 1954: 263-276.
- (1958) 15. Cola Schott & Endl. In J. Hutchinson & J. M. Dalziel: *Flora of West Tropical Africa*. Ed. 2, vol. 1: 321-332. Crown Agents for Oversea Governments and Administrations, London.
- Lederer, E. (1959 & 1960) *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Vol. 1 & 2. Masson, Paris.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mensbrugé, G. de la (1966) Sterculiaceae. In: *La germination et les plantules des essences arborées de la forêt dense humide de la Côte-d'Ivoire*. Centre technique forestier tropical, Nogent-sur-Marne.
- Miège, J. & M.-N. Miège (1970a) Caractères physico-chimiques et action biologique du liquide des fruits de Cola gigantea. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 270: 485-488.
- Miège, M.-N. & J. Miège (1970b) Analyse des facteurs inhibiteurs contenus dans le liquide des fruits de Cola gigantea. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 270: 611-614.
- & J. Miège (1970c) Etude biologique et biochimique du liquide contenu dans les fruits de deux espèces de Cola. *Arch. Sci.* 22: (sub praelo).
- Randerath, K. (1964) *Chromatographie sur couche mince*. Gauthier-Villars, Paris.
- Stahl, E. (1967) *Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch*. Ed. 2. Springer, Berlin.
- Staub, A. M. (1963) Extraction, identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens. In J. Loiseleur: *Techniques de laboratoire*. Vol. 1: 1309-1366. Masson, Paris.