

QUELQUES FAITS ESSENTIELS CONCERNANT LES PROPRIÉTÉS ET LA BIO-SYNTHÈSE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE

PAR

J.-P. COLONNA *

RÉSUMÉ

Cette étude bibliographique a permis de faire le point sur la nomenclature et la structure des isomères de l'acide caféyl-3 quinique (acide chlorogénique) et des depsides voisins, présents chez le Caféier.

Les principaux faits connus concernant les propriétés, les éventuels rôles physiologiques et les implications économiques de l'acide chlorogénique ont pu être dégagés. Ils tendent à montrer l'intérêt qu'il y aurait à entreprendre des recherches sur le métabolisme de ce composé chez le Caféier.

La biosynthèse de cet acide peut être étudiée selon trois rubriques :

— biosynthèse de l'acide quinique ;

— biosynthèse de « l'unité cinnamique » ;

— formation de la liaison ester entre les deux unités précédentes.

Trois possibilités existent pour la formation de cette liaison ; sur la foi des quelques travaux actuels concernant cette question on ne saurait attribuer à l'une d'entre elles un rôle préférentiel.

L'utilisation métabolique et la signification de l'acide chlorogénique dans la plante restent mal connus.

ABSTRACT

This bibliographical study has enabled us to clarify somewhat the question of the nomenclature and structure of the isomers of 3-O-caffeoyl-D-quinic acid (chlorogenic acid) and of the similar depsides which are to be found in the coffee-plant.

We found it possible to isolate the already known main facts concerning the properties, the possible physiological roles and the economic implications of chlorogenic acid. These facts tend to show that it would be interesting to undertake research on the metabolism of this compound in the coffee-plant.

* S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M., 70-74, route d'Aulnay. 93-Bondy.

The biosynthesis of this acid may be studied under three headings :

— *biosynthesis of quinic acid;*

— *biosynthesis of the « cinnamic unit »;*

— *formation of the ester bond between the two preceding units.*

There are three possible ways for this bond to form; after referring to the few studies which treat of this question we are unable to establish any order of preference for these three possible ways.

The metabolic utilisation and the meaning of chlorogenic acid in the plant remain little known.

INTRODUCTION

Les depsides, dont l'acide chlorogénique reste l'un des plus connus, résultent de la condensation du carboxyle d'un acide phénolique avec un groupement hydroxyle d'un autre acide.

Les depsides le plus couramment rencontrés dans le règne végétal sont constitués d'une part d'acides quinique ou shikimique, d'autre part d'acides cinnamique, p-coumarique, caféique, férulique ou gallique. Dans certains composés voisins interviennent les acides tartrique, malique et lactique.

GORTER (1909), POLITIS (1949), HERRMAN (1956) et SONDEIMER (1964) contribuent à préciser la répartition chez les plantes, de ces différents composés.

L'acide chlorogénique et les autres depsides caféyl-quiniques existent dans le café. L'histoire de leur découverte, de celle de leur structure et de leurs propriétés est liée à cette production végétale. Leurs rôles physiologiques encore mal expliqués, et leur importance économique non négligeable, attirent l'attention sur leurs modes de formation, d'action et de dégradation dans la plante.

I. HISTORIQUE — STRUCTURE

Découvert par ROBIQUET et BOUTRON, en 1837, dans les grains de café arabica, l'acide chlorogénique fut isolé par PAYEN (1846), puis par GORTER (1907-1908) sous forme d'un sel double de caféine et de potassium. Ce dernier auteur le cristallisa à partir de ce complexe puis établit que ces propriétés acides provenaient du groupe carboxyle de l'acide quinique.

Contestant la formule proposée par cet auteur, FREUDENBERG (1920) le considéra comme l'acide cyclohexane-carboxylique-trans-1,4,5-cis-3-tetrahydroxy-3-(3,4 dihydroxy-cinnamate) (Pl. I.F). FISCHER et DANGSCHAT confirmèrent cette structure. Plus communément appelé acide caféyl-3 quinique ou acide 3-0-caféoyl-D-quinique, il fut synthétisé par PANIZZI *et al.* en 1955.

Par la méthode iodométrique de dosage, mise au point par SLOTTA et NEISSER (1938), on put constater que ce composé représentait environ 6% du poids de café vert. Or, GORTER (1911) et d'autres chercheurs, n'isolèrent jamais que les deux tiers de cette quantité, sous forme du complexe précédent. On pensa alors à l'existence d'isomères.

BARNES et ses collaborateurs montrèrent, en 1950, que le sixième au moins de ces 6 % devait être attribué à une substance non cristallisée, extraite du grain de café par l'acétate de butyle, qu'ils appelèrent acide « isochlorogénique » et qu'ils considéraient comme l'acide caféyl-5-quinique, ou 5-0-caféoyl-D-quinique, en équilibre avec sa lactone. SONDEHEIMER et ses collaborateurs infirmèrent cette hypothèse en 1961, tandis que SCARPATI et GUISSO (1963-1964) trouvaient qu'il s'agissait d'un mélange de trois acides dicaféyl-quiniques. Ce résultat fut confirmé par HANSON et ZUCKER (1963) sur la pomme de terre, puis par CORSE, LUNDIN et WAISS (1965). Ces derniers établirent en utilisant la résonance nucléaire magnétique, que ces corps étaient les acides 3,4-3,5 et 4,5 dicaféyl-quiniques. Une substance non cristallisable, présentant des caractères voisins de la fraction « isochlorogénique » fut isolée de la patate douce par URITANI et MIYANO (1955) et reçut le nom d'acide « pseudo-chlorogénique ».

En 1953, CORSE put extraire des pêches, par l'alcool n-butylique, puis purifier par distribution à contre-courant, une substance cristalline : l'acide néochlorogénique. En 1958, SONDEHEIMER obtint, à partir des grains de café, par chromatographie sur gel de silice, un corps non cristallisable, désigné sous le nom provisoire de « Band 510 ». IMASEKI (1959) trouva une substance identique dans le genre *Viburnum*. Après les travaux de SCARPATI et ESPOSITO (1963-1964) il est admis que ces deux corps sont des isomères de l'acide caféyl-3 quinique : l'acide néochlorogénique étant le caféyl-5 quinique, le composé « Band 510 » ou acide cryptochlorogénique serait le caféyl-4 quinique.

Des depsides différents peuvent exister dans le grain de café. En effet, LENTNER et DEATHERAGE (1958), examinant des cafés verts et torréfiés, isolèrent par chromatographie sur gel de silice, quatre fractions « chlorogéniques ». La fraction n° II, traitée par chromatographie sur papier (1), renfermait quatre corps, qui, après hydrolyse, se révélèrent comme étant : un ester de l'acide caféique, deux esters de l'acide férulique et un ester de l'acide p-coumarique.

Confirmation a été donnée de l'existence de tels composés par CORSE, SONDEHEIMER et LUNDIN (1962) qui isolèrent des grains verts de café *robusta* l'acide férulyl-3 quinique.

En opposition avec la graine, les autres organes du caféier sont peu connus à ce sujet. MEIFFREN (1961) dose l'ensemble des acides chlorogéniques dans les organes végétatifs et certains tissus du caféier *robusta* ; en 1964, EL HAMIDI et WANNER constatent que l'acide chlorogénique existe dans tous les organes de jeunes caféiers *arabica* en quantité souvent supérieure à la caféine.

Les teneurs en acides caféique et caféyl-quiniques du grain de café sont comparées dans le tableau I avec celles d'autres organes végétaux.

II. PROPRIÉTÉS

A. Propriétés physico-chimiques

1° *Isomérisation*. — La liaison ester de l'acide chlorogénique existe entre le OH en position cis-3 de l'acide quinique et le carboxyle de la chaîne latérale de l'acide caféique. Elle se rompt facilement par hydrolyse acide, basique, ou enzymatique.

(1) Solvant : chloroforme, alcool amylique secondaire, acide acétique, eau (4, 3, 2, 4).

TABLEAU I

Les teneurs en acides caféique et caféyl-quiniques du grain de café et de quelques organes végétaux
(d'après SONDEIMER, 1958)

Les résultats sont exprimés en grammes pour 100 grammes de matière sèche
(a) ou en grammes pour 100 grammes de matière fraîche (b)

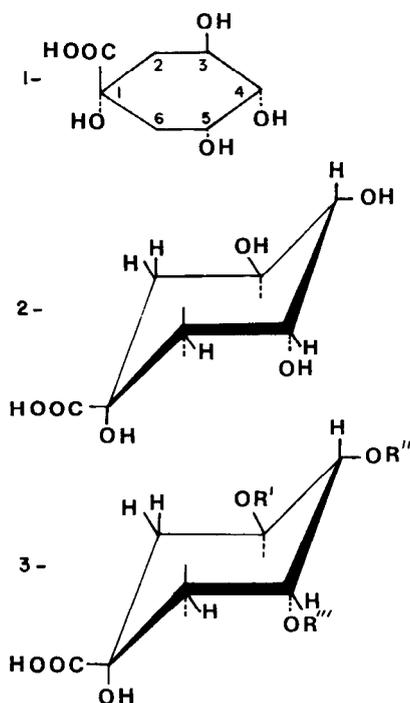
	Ac. caféique libre	Ac. caféyl-3 quinique (ac. chlorogénique)	Ac. caféyl-4 quinique (ac. cryptochlorogénique)	Ac. caféyl-5 quinique (ac. néochlorogénique)	Fraction des ac. dicaféyl-quiniques ac. isochlorogé.
Grain de café (b)	0,14	2,85	0,38	0,39	0,48
Feuilles de cassis (b)	0,04	2,80	0,36	0,14	0,20
Fruit de cassis (a)	0,00	0,19	0,02	0,01	0,02
Pomme (a)	traces	0,10	0,02	traces	traces
Poire (a)	traces	0,13	0,01	0,005	0,01
Raisin (a)	0,00	0,14	0,02	0,002	0,02
Pelures de patate douce (a)	0,01	0,33	0,05	0,05	0,60
Pêche (a)	0,00	0,03	0,00	0,04	0,005
Pruneau (a)	0,00	0,06	0,04	0,85	0,01
Prune (a)	0,00	0,02	0,01	0,04	0,01
Cerise (a)	0,00	0,005	0,03	0,09	0,002

L'un des produits de l'hydrolyse est l'acide D-quinique (GREWE et LORENSEN, 1953). La configuration prédominante de cet acide en solution correspond à la figure A 2, Planche I (SONDEIMER, 1964). Les possibilités de formation des liaisons esters sont schématisées en A 3, Planche I, dans les positions R', R'' et R'''. Elles aboutissent aux trois isomères mono-caféyl-quiniques et aux trois isomères di-caféyl-quiniques.

Le second composé est l'acide caféique (B 2, Pl. I). Il peut être remplacé par les autres acides hydroxycinnamiques ou par l'acide cinnamique lui-même (Pl. I, B, C). Le squelette de ces corps est représenté en C 2, Planche I. La double liaison, avec d'un côté le noyau aromatique et de l'autre un groupe carboxyle, aboutit à l'existence d'une isomérisation de position. Les acides cinnamiques existent plutôt sous la forme trans, thermodynamiquement plus stable.

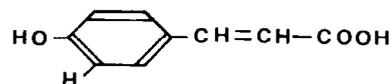
Avec divers solvants chromatographiques, on obtient une séparation des isomères cis et trans. CHALLICE et WILLIAMS (1966) montrent, qu'avec le solvant acide acétique/eau, le composé cis a des R_f plus élevés que le composé trans.

A. — Acide quinique

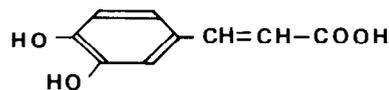


B. — Acides hydroxycinnamiques.

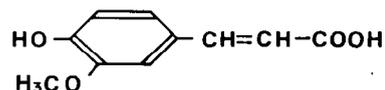
1- Acide p-coumarique



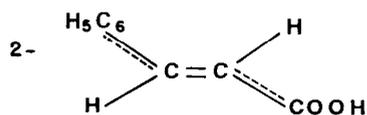
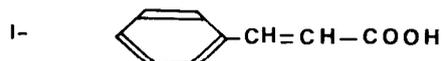
2 Acide caféique



3- Acide férulique



C. — Acide cinnamique.



D. — Depsides monocaféyl-quiniques (caf = ac. caféique).

- ac. caféyl-3 quinique ou ac. chlorogénique
- ac. caféyl-4 quinique ou ac. cryptochlorogénique
- ac. caféyl-5 quinique ou ac. néochlorogénique

R'	R''	R'''
caf	H	H
H	caf	H
H	H	caf

E. — Depsides dicaféyl-quiniques (fraction isochlorogénique)

- ac. dicaféyl-3-4 quinique
- ac. dicaféyl-3-5 quinique
- ac. dicaféyl-4-5 quinique

caf	caf	H
caf	H	caf
H	caf	caf

F. — Acide chlorogénique.

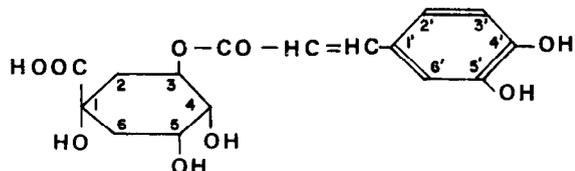


PLANCHE I. — Constituants et constitution des depsides caféyl-quiniques.

2° *Caractéristiques physicochimiques.* — Elles sont indiquées dans le tableau II.

BARNES *et al.* publièrent en 1950 les spectres infra-rouges de l'acide caféyl-3 quinique et de la fraction isochlorogénique. Le spectre d'absorption dans l'U.V., dans l'éthanol à 70 °GL présente un minimum à 267-268 m μ , un léger palier vers 305 m μ et un maximum à 326-328 m μ . L'addition de borate provoque un déplacement bathochromique de l'absorption maximale à 357 m μ (HAUSERMAN et BRANDENBERGER, 1961). L'absorption à 326 m μ augmente si l'on ajoute de l'acide ascorbique à une solution aqueuse d'acide chlorogénique (SISLER et EVANS, 1958). Le pouvoir d'absorption des isomères ayant des valeurs similaires à celui de l'acide chlorogénique, on admet généralement (SMITH, 1963) que l'on peut doser l'ensemble de ces corps, comme s'il s'agissait de ce dernier acide.

3° *Transestérifications.* — HANSON (1962), BADIN *et al.* (1962), HASLAM *et al.* (1963) signalent des réactions de transestérifications. En faisant bouillir durant 30 minutes, dans un tampon à pH 7, chacun des trois isomères monocaféylquiniques, SCARPATI et ESPOSITO (1964) aboutissent à des mélanges de quantités égales de chacun de ces trois isomères. Des artefacts pourraient se produire pendant l'extraction et la séparation de ces composés. Toutefois, SONDHEIMER (1964) considère que ces réactions se produiraient en milieu basique. La séparation de ces corps par chromatographie sur gel de silice, avec l'acide sulfurique 0,5 N comme phase stationnaire, ne donnerait lieu à aucune isomérisation.

4° *Le complexe caféine-acide chlorogénique.* — L'acide chlorogénique, ou ses isomères ainsi que l'acide caféique, se lierait à la caféine dans les solvants aqueux pour former un chlorogénate complexe de potassium et de caféine (GORTER, 1907-1908 ; SONDHEIMER, 1964 ; SCARPATI et ESPOSITO, 1964). Le noyau benzénique, la double liaison, les hydroxyles phénoliques contribueraient à sa stabilité, mais la nature des forces attractives est en réalité mal connue. La formation du complexe diminue lorsque le pH s'élève au point d'ionisation des groupes hydroxyles phénoliques ; en ajoutant un excès de soude à une solution concentrée du complexe, on précipite la caféine. D'après EL HAMIDI et WANNER (1964), ce complexe n'existerait pas dans la plante mais se formerait durant l'extraction.

B. Propriétés d'ordre biologique.

Je me bornerai à les signaler, leur étude bibliographique détaillée dépasse le cadre de cette note.

1° *Oxydation.* — Elle se produit soit en aérobose, si le milieu présente une réaction alcaline, soit enzymatiquement, par l'action des polyphénol-oxydases.

L'oxydation enzymatique montre une vitesse initiale proportionnelle à la concentration en substrat, à la pression partielle en O₂ et à l'inverse de l'activité des ions H⁺ (INGRAHAM et CORSE, 1951). Elle n'est pas sensible à la lumière et ne semble pas modifiée par l'addition de cuivre. Elle entraîne un abaissement dans l'absorption des rayonnements entre 280 et 370 m μ . Le changement de l'absorption à 326 m μ a été utilisé pour mesurer directement l'activité de l'oxydase de l'acide chlorogénique (SISLER et EVANS, 1958). L'énergie d'activation pour l'auto-oxydation est de $13,6 \pm 1$ Kcal/mole (SONDHEIMER, 1964). Les produits d'oxydation (WEURMAN et SWAIN, 1953) peuvent être réduits réversiblement par l'acide ascorbique (SISLER et EVANS, 1958), tant que le brunissement final n'est pas intervenu.

TABLEAU II

Quelques caractéristiques des depsides caféyl-quiniques

	Acide caféyl-3 quinique			Fraction « isochlorogénique »*			Acide caféyl-4 quinique			Acide caféyl-5 quinique		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Point de fusion (°C)		208 210-211 206-210	A H B		150-152 115	H B					177-179 204-206	F G
[α] D à 20 °C	C = 3%, H ₂ O	— 37	B		— 215 — 230	H B	C = 0,4, H ₂ O à 24 °C	— 55	E	Eth. 50° G. L.	— 5,4 + 3,1	F G
Poids moléculaire		354	B		345	B						
Rapport moléculaire A.Q./A.C.		1,0	K					0,8	K		1,2	K
Absorption minimale à... (m μ)	Eth.**	265	K	Eth.	265	K	Eth.	265	K	Eth.	265	K
Absorption maximale à... (m μ)	Eth.	323 324 328	B H K	Eth.	323 324 328	B H K	Eth.	328	K	Eth.	328	K
ϵ max. (coefficient d'extinction)	322 m μ , H ₂ O 324, pH 6,8 324, pH 3,5 330, n-but/chlorof. (15/85)	18 500 19 230 20 600 16 700 18 870	B D D E H		18 900	B H						
Analyses C % H %		54,3 5,1	B B									
pK ₁ (carboxyle) pK ₂ (phénol 1)		3,59 8,59	A A									
Solubilité (en grammes pour 100 ml de solution à 20 °C)	Méthanol Ethanol Eau Ether Acét. éthyle Chloroforme Benzène	15,2 6,2 0,59 0,12 0,06 0,0059 0,0033	A									

* Il s'agit d'un mélange de depsides dicaféyl-quiniques.

** Eth. = Ethanol.

1 = Conditions des déterminations.

2 = Résultats.

3 = Référence.

A. — SONDEIMER, 1964.

B. — BARNES *et al.*, 1950.

C. — TIMBERLAKE, 1959.

D. — VOIGHT, 1960.

E. — SONDEIMER, 1958.

F. — CORSE, 1953.

G. — SCARPATI et ESPOSITO, 1963-1964.

H. — HAUSERMAN et BRANDENBERGER, 1961.

K. — HANSON et ZUCKER, 1963.

2° *Activation et inhibition des enzymes in vitro.* — Le rôle activateur est signalé au sujet de la phosphorylation photo-synthétique dans les chloroplastes d'épinards (KROGMAN *et al.*, 1962), de l'oxydation de l'adrénaline par la peroxydase du raifort, ou de celle de la 3-4-dihydroxy phénylalanine par un enzyme des feuilles de haricots (HERZMAN, 1957-1959).

L'effet inhibiteur s'exerce sur des transaminases, décarboxylases ou phosphorylases nécessitant le pyridoxal phosphate comme coenzyme (SONDHEIMER, 1964).

L'acide chlorogénique freine l'activité des peroxydases, en particulier celle de l'AIA (1)-oxydase, comme les autres ortho ou para dihydroxyphénols qui s'oxydent facilement en quinones. Au contraire, les phénols qui ne peuvent s'oxyder facilement en quinone, comme l'acide p-coumarique, sont des activateurs obligatoires de ce système réactionnel qui nécessite par ailleurs la présence d'ions Mn^{++} et d' H_2O_2 (GORTNER et KENT, 1958 ; SONDHEIMER et GRIFFIN, 1960 ; GAMBORG *et al.*, 1961).

III. ROLES PHYSIOLOGIQUES

A. Matière de réserve.

L'intervention de ce depside comme substance de réserve est suggérée par sa présence dans les graines d'un certain nombre de plantes. Son utilisation lors de la germination n'est toutefois pas clairement prouvée : RUCKENBROD (1954) signale sa disparition au début de la germination à l'obscurité du tournesol, par contre BUTLER (1960) ne constate ni variation ni transport le concernant pendant la germination des graines de laitues. Chez le caféier, on sait seulement qu'il participe à l'exosmose qui surviendrait durant la longue période d'imbibition de la graine.

Ses transformations au cours de la vie du fruit ne sont pas mieux connues, bien que les teneurs semblent décroître avec l'âge du fruit (ULRICH et THALER, 1957 ; MACHEIX, 1967, etc.).

Les acides hydroxycinnamiques participent à la lignification (HIGUCHI et BROWN, 1963), mais malgré les recherches de GOLDSCHMID et HERGERT (1961) chez les conifères, aucun fait ne permet de dire s'ils peuvent provenir de l'acide chlorogénique ou des depsides voisins.

B. Substance de croissance.

SONDHEIMER (1964) conteste le rôle de régulateur important de la croissance que lui attribuent VENDRIG et BUFFEL (1961) ou ZENK et MULLER (1963). Il est toutefois clairement établi, que l'acide chlorogénique exalte l'élongation du premier entrenœud et du coléoptile d'avoine, en présence d'un apport d'AIA exogène (NITSCH *et al.*, 1961 ; THIMAN *et al.*, 1962 ; HENDERSON *et al.*, 1962). Cet effet synergique peut s'expliquer par l'inhibition qu'exercent l'acide chlorogénique, les di-hydroxy-phénols ou leurs produits d'oxydation partielle sur l'AIA oxydase. Cette explication paraît d'autant plus vraisemblable que les phénols favorisant cette activité oxydasique, comme l'acide p-coumarique, inhibent l'élongation du coléoptile d'avoine produite par l'AIA exogène.

(1) Acide β indolyl acétique.

C. Résistance aux agents pathogènes.

La préexistence d'acide chlorogénique chez un végétal confère-t-elle à ce dernier une immunité vis-à-vis des attaques bactériennes, cryptogamiques ou virales ? La réponse semble affirmative pour quelques variétés d'oignons ou de pomme de terre, mais ne peut actuellement être érigée en règle générale (URITANI, 1961). Chez le caféier, MEIFFREN (1961) parle d'une corrélation positive entre la résistance à la trachéomycose et la teneur en acide chlorogénique du bois de la tige.

L'accumulation d'acide chlorogénique, et d'autres substances phénoliques, dans les tissus végétaux infestés, ou dans les zones proximales, représente un autre aspect de cette intervention. Observée chez la patate douce, les pommes de terre ou les feuilles de riz, elle est aussi induite par des métabolites toxiques (piricularine), des poisons chimiques (chlorure mercurique, trichloracétate, etc.) ou un simple traitement mécanique. Si elle apparaît chez les variétés résistantes, elle peut aussi exister chez les variétés sensibles.

L'effet antibiotique de l'acide chlorogénique relève de sa toxicité pour certains agents pathogènes, ou de ses possibilités de neutraliser, par combinaison, les substances nocives (1) excrétées par le champignon. Par ailleurs, il inhibe les enzymes pectolytiques libérés dans la plante par le parasite, qui contribuent au développement de la maladie. Enfin, il s'oxyde facilement en quinones ; or, celles-ci, par condensation entre elles (substances comparables aux lignines), avec des aminoacides (mélanines) ou avec des protéines (complexes coagulés), forment des composés, qui, en adhérant aux parois cellulaires, constituent une barrière physique (URITANI, 1961).

L'accumulation des polyphénols, impliqués dans la résistance aux maladies, paraît liée à un fonctionnement plus intense du métabolisme des hydrates de carbone et des processus respiratoires. Cela correspondrait à un besoin accru en ATP et en énergie.

IV. IMPORTANCE ÉCONOMIQUE

L'implication de l'acide chlorogénique dans la résistance aux agents pathogènes pourrait présenter un intérêt économique. Ses propriétés pharmacologiques et sa participation au brunissement des produits industriels ou alimentaires ont une importance certaine dans ce domaine.

A. Propriétés pharmacologiques.

D'après SONDHEIMER (1964), la poussière des grains de café non torréfiés provoque-rait : asthme bronchique, rhinite et dermatite chez les sujets sensibilisés. FREEDMAN *et al.* (1961) attribuent ces manifestations d'allergie à la présence d'acide chlorogénique.

L'administration de ce corps dans la nourriture entraîne chez l'homme une sécrétion accrue d'acide chlorhydrique par l'estomac (2) ; chez les souris et les rats, une excitabilité plus grande du système nerveux central, une augmentation de la sécrétion biliaire et

(1) Cas de la piricularine ($C_{18}H_{11}N_2O_9$) qui arrête la croissance des plantules de riz.

(2) L'acide caféique a le même effet à un degré moindre.

du péristaltisme (CZOK, 1965). Les acides chlorogéniques représentent 2 à 3 % du café-boisson, leur efficacité biologique se manifestant à des doses de 3 à 4 mg par kilogramme de poids du corps, leur rôle dans les effets du café est vraisemblable.

B. Intervention dans la coloration des produits végétaux.

La coloration brune qu'acquiert le café durant la torréfaction (SONDHEIMER, 1964) ou les feuilles de tabac au cours de leur préparation, provient en partie de la dégradation de l'acide chlorogénique (ZUCKER et STINSON, 1960 ; JACOBSON, 1961). Les feuilles de tabac à forte teneur en acide chlorogénique atteignent la meilleure pigmentation pour le produit commercial (WILKINSON *et al.*, 1954).

L'action de la polyphénol-oxydase sur ce corps participe à l'apparition du brunissement qui peut intervenir chez les pommes (HENZE, 1956), les poires (WEURMAN et SWAIN, 1953), les feuilles de thé, les pêches (SONDHEIMER, 1964) et les pommes de terre (ROGACHEV, 1960).

V. BIOSYNTHÈSE

Les propriétés de l'acide chlorogénique, ses interventions dans la physiologie de la plante, ses implications économiques, entraînent des recherches plus précises sur son métabolisme.

La biosynthèse de ce composé peut être abordée selon trois rubriques :

- synthèse de l'acide quinique,
- synthèse de « l'unité cinnamique »,
- formation de la liaison ester.

A. Synthèse de l'acide quinique.

Chez certains microorganismes comme *Aerobacter*, l'acide quinique apparaît à partir de l'acide 5-déhydroquinique, par action réversible d'une quinique déshydrogénase (MITSUHASHI et DAVIS, 1954). Sa synthèse et son utilisation passeraient par cet enzyme ; il semblerait servir de réserve sur la voie de l'acide shikimique (Pl. II).

Malgré un certain nombre de travaux (MITSUHASHI *et al.*, 1954 ; SZYMANSKI, 1962), cet enzyme n'a été trouvé chez les végétaux supérieurs que dans des cultures cellulaires de *Phaseolus aureus* (GAMBORG, 1966). Il n'est donc pas prouvé, pour le moment, que la formation d'acide quinique suive des voies exactement semblables chez les végétaux supérieurs et les microorganismes. La recherche d'une voie de formation ne passant pas par le stade « déhydroquinique » pourrait être envisagée.

B. Synthèse de « l'unité cinnamique ».

1° *La voie de l'acide shikimique.* — Les étapes de la synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine chez les microorganismes furent établis par DAVIS (1953-1955), (Pl. II). L'acide shikimique y joue un rôle important.

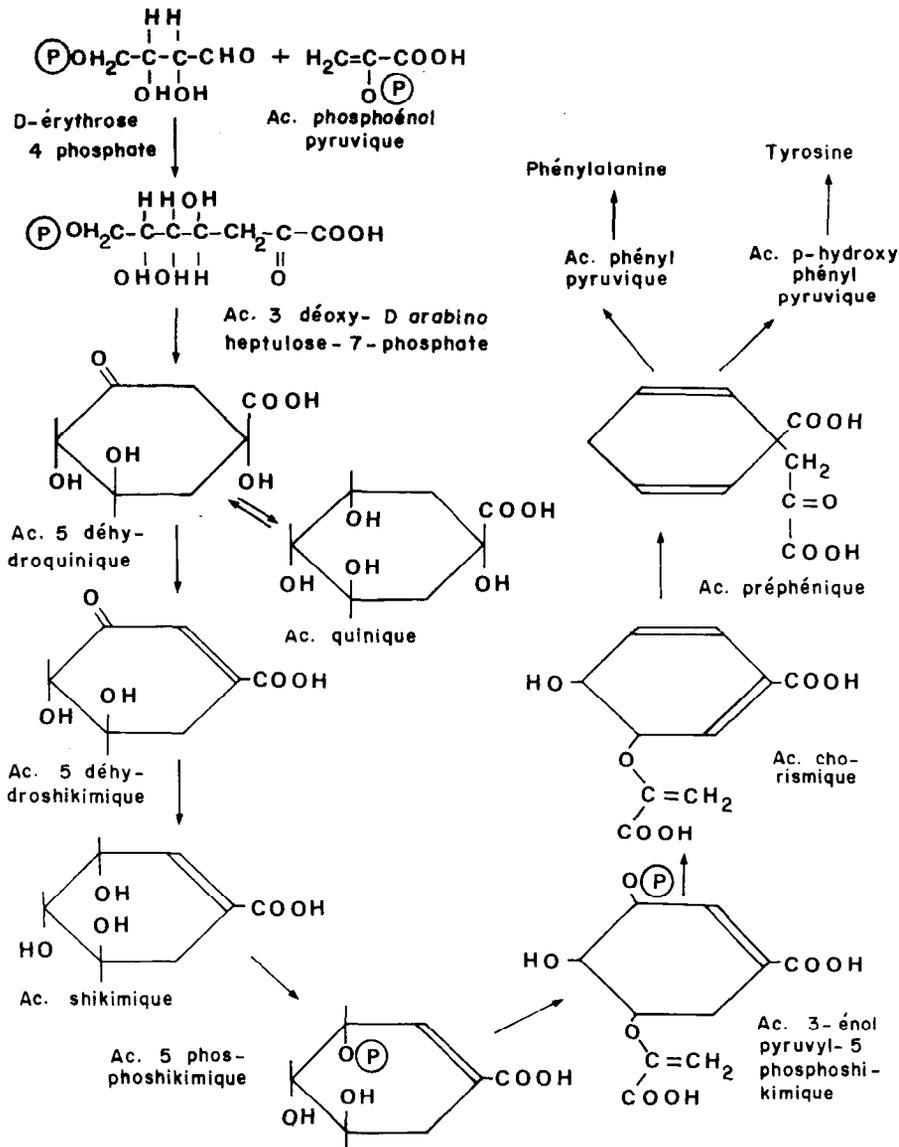


PLANCHE II. — Synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine chez les micro-organismes (schéma de Davis, 1953-1955).

L'existence de divers enzymes impliqués dans le schéma de cet auteur (MITSUHASHI et DAVIS, 1954 ; YANIV *et al.*, 1955), puis les résultats obtenus par l'utilisation de pré-curseurs radioactifs (WEINSTEIN *et al.*, 1959), tendent à prouver un fonctionnement identique chez les végétaux supérieurs.

Le mode d'utilisation des deux acides aminés aromatiques chez ces plantes est connu depuis l'isolement chez les légumineuses, d'un enzyme capable de désaminer la phénylalanine en acide cinnamique (KOUKOL et CONN, 1961), depuis la mise en évidence

de cet enzyme chez d'autres plantes et enfin, depuis la découverte d'une tyrase transformant la tyrosine en acide p-hydroxycinnamique (acide p-coumarique) chez les graminées (NEISH, 1961).

L'hydroxylation de ces deux composés cinnamiques en acide caféique a été constatée chez les végétaux, en particulier chez *Slavia splendens* (Mc CALLA et NEISH, 1959). NAIR et WINING (1965), signalent chez l'épinard un enzyme catalysant l'hydroxylation de l'acide cinnamique en acide coumarique. Aucun des enzymes intervenant dans ces réactions n'a été recherché chez le caféier.

2° *Intervention de l'acide quinique.* — L'acide quinique, qui entre par ailleurs dans la molécule d'acide chlorogénique, est impliqué plus ou moins directement dans la formation des molécules d'acide cinnamique et d'acide caféique.

Dans le schéma de DAVIS (Pl. II), à partir de sa position latérale, il pourrait redonner l'acide déhydroquinique, par action d'une quinique déshydrogénase, puis aboutir à l'unité cinnamique par l'intermédiaire de l'acide shikimique. Les interconversions entre ces deux composés sont d'ailleurs établies d'une façon certaine, par des expériences utilisant des traceurs radioactifs (WEINSTEIN *et al.*, 1961 ; GOLDSCHEID et QUIMBY, 1964 ; ROHRINGER *et al.*, 1967 ; BOUDET *et al.*, 1968).

Toutefois, sur de jeunes rameaux de chênes, soumis à une période de photosynthèse en atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$, BOUDET et COLONNA (1968) montrent que l'activité métabolique de l'acide quinique n'est pas inférieure à celle de l'acide shikimique. Ce caractère de métabolite actif, à vitesse de renouvellement assez rapide ne semble pas concorder avec cette position latérale, un peu en réserve, qui lui est attribuée.

La recherche d'autres voies, plus directes, entre l'acide quinique et « l'unité cinnamique » devient alors nécessaire. Deux voies nouvelles sont suggérées actuellement.

Tout d'abord, l'interconversion acide quinique-acide shikimique pourrait être soumise à l'action d'une quinique déshydratase (NEISH, 1964 ; BOUDET et COLONNA, 1968) ; elle serait alors plus directe que dans le schéma de DAVIS, les stades déhydroquinique et déhydroshikimique n'intervenant pas.

Par ailleurs, WEINSTEIN (1961) suggère que, chez la rose, l'acide shikimique ne serait pas l'intermédiaire obligatoire entre l'acide quinique et la phénylalanine ou la tyrosine.

Ainsi, trois voies, dont l'une est bien connue, pourraient être fonctionnelles chez les végétaux supérieurs, en ce qui concerne le passage de l'acide quinique aux composés aromatiques.

Le chêne et le caféier représentent deux cas nettement différents dans l'utilisation de l'acide quinique. Le premier accumule ce composé à l'état libre sans que l'acide chlorogénique soit jamais perceptible. Dans le genre *Coffea*, au contraire, l'acide quinique n'a que peu été signalé à l'état libre et paraît totalement utilisé dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique, présent dans presque tous les organes.

C. Formation de la liaison ester.

Le problème se pose de savoir si la partie « cinnamique » de la molécule d'acide chlorogénique est hydroxylée avant ou après sa liaison avec l'acide quinique. Trois cas apparaissent comme possibles, selon que l'estérification se place, avant, entre ou après les deux hydroxylations. L'étude du processus d'ensemble a été abordée chez la pomme de terre et chez le tabac à l'aide principalement de précurseurs radioactifs. La mise en évidence des enzymes impliqués dans cette chaîne réactionnelle débute à peine.

1° Travaux faisant intervenir des précurseurs radioactifs, ou non, in vivo.

a. SUR *Solanum tuberosum*.

a.1. Utilisant des disques de pomme de terre alimentés artificiellement par des précurseurs radioactifs, ou non, LEVY et ZUCKER (1960) apportent quelques arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'estérification précéderait les deux hydroxylations (Pl. III).

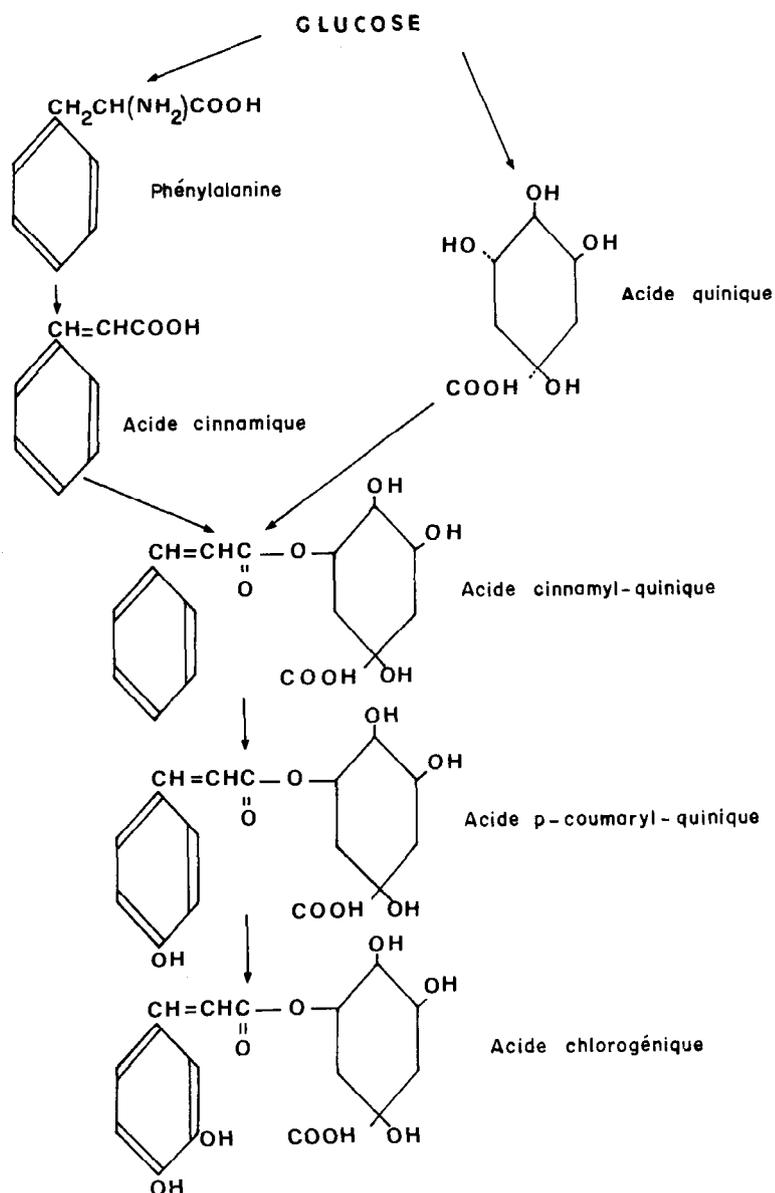


PLANCHE III. — Première hypothèse concernant la biosynthèse de l'acide chlorogénique (l'estérification précéderait les deux hydroxylations).

La L-phénylalanine et l'acide trans-cinnamique, non radioactifs, stimulent la biosynthèse de l'acide chlorogénique et provoquent l'apparition, ou l'augmentation de deux composés, identifiés respectivement aux acides cinnamyl-quinique (traces) et p-coumaryl-quinique (traces). Cette double apparition, lors de l'augmentation de la synthèse du depside caféyl-3 quinique, suggère que l'estérification se place avant les deux hydroxylations. Ceci s'oppose quelque peu aux hypothèses de Mac CALLA et NEISH (1959) qui envisagent, chez *Salvia*, la formation des acides phénoliques à partir de l'acide cinnamique, par hydroxylations successives en acides p-coumarique puis caféique libres, avant toute estérification.

La thèse de LEVY et ZUCKER se trouve renforcée par les constatations ci-après : l'acide p-coumarique, même fourni à des concentrations élevées (0,05 M), ne provoque aucune augmentation de la formation d'acide chlorogénique ; par contre, cette formation est doublée lorsque le milieu de culture contient de l'acide p-coumaryl-quinique, même à faible dose (0,0017 M). Le passage de l'ester coumarique à l'ester caféique, ainsi démontré *in vivo*, intervient enzymatiquement *in vitro*.

Lorsque ces deux auteurs emploient de la phénylalanine C¹⁴ dans leurs expériences, ils retrouvent la radioactivité fournie dans les esters coumaryl et caféyl-quiniques. Les activités spécifiques de ces deux esters sont toujours du même ordre, ce qui confirmerait un passage direct de l'un à l'autre.

De plus, l'apport d'acide cinnamique inerte en présence de phénylalanine marquée, entraîne un abaissement de ces deux activités spécifiques. Ceci suggère que l'acide cinnamique est un précurseur des deux esters et un concurrent de la phénylalanine marquée pour leur formation. Par contre, l'apport d'acide quinique inerte dans les mêmes conditions, n'amène aucune dilution de l'activité spécifique des deux depsides ci-dessus ; l'acide quinique n'est donc pas un précurseur de la partie aromatique de la molécule d'acide chlorogénique.

Enfin, la baisse substantielle de l'activité spécifique des deux esters lorsqu'on fournit de l'acide quinique et de l'acide cinnamique en même temps que la phénylalanine radioactive est interprétée par LEVY et ZUCKER (1960) comme une preuve de l'intervention du depside cinnamyl-quinique et donc de l'estérification précédant les hydroxylations : en effet, la présence d'acide quinique préformé accroîtrait le taux d'estérification de l'acide cinnamique en depside cinnamyl-quinique non radioactif, lequel serait utilisé plus rapidement et aux dépens de la phénylalanine marquée.

On doit noter que dans ces expériences il n'apparaît pas de mesures de la radioactivité du depside cinnamyl-quinique.

a.2. Reprenant des expériences du même ordre, avec des disques de pomme de terre d'une autre variété, maintenus à l'obscurité sur des solutions d'acide cinnamyl-quinique contenant de l'acide cinnamique ou de la phénylalanine radioactifs, HANSON (1966) constate les phénomènes suivants :

— la radioactivité se retrouve dans les depsides p-coumaryl et caféyl-quiniques extraits des disques de pomme de terre et présentant des activités spécifiques comparables ;

— l'incorporation de cette radioactivité se révèle très faible dans l'acide cinnamyl-quinique.

Ce dernier composé semble donc ne pas intervenir dans la formation de la molécule p-coumaryl-quinique qui affiche une activité spécifique significativement plus élevée. Ce résultat d'ensemble se retrouve pour les esters homologues de l'acide shikimique et du glucose.

Par ailleurs, l'apport d'acide cinnamique en quantités plus importantes, s'il provoque l'apparition de composés nouveaux en particulier des esters phénoliques du glucose, n'entraîne jamais ici, la détection du depside cinnamyl-quinique.

Ainsi, les deux premières étapes du schéma de LEVY et ZUCKER ne semblent pas être confirmées par ces expériences ; aussi l'auteur reprend-il une hypothèse déjà formulée (EL BASYOUNI, 1964) ou envisage-t-il une nouvelle hypothèse au sujet des stades métaboliques qui conduiraient à la molécule p-coumaryl-quinique. Par contre, le fait que les activités spécifiques des esters caféiques soient du même ordre, et en général, un peu plus faibles que celles des esters p-coumariques renforce la vraisemblance du schéma de LEVY et ZUCKER dans sa dernière étape, qui serait bien une hydroxylation.

a.3. Plus récemment, GAMBORG (1967) travaillant sur des cultures de cellules de pomme de terre, établit que l'acide caféique constitue un précurseur de l'acide chlorogénique aussi efficace que la phénylalanine ou l'acide cinnamique. Il situe donc l'estérification (Pl. IV) au niveau de l'acide caféique libre, après les deux hydroxylations.

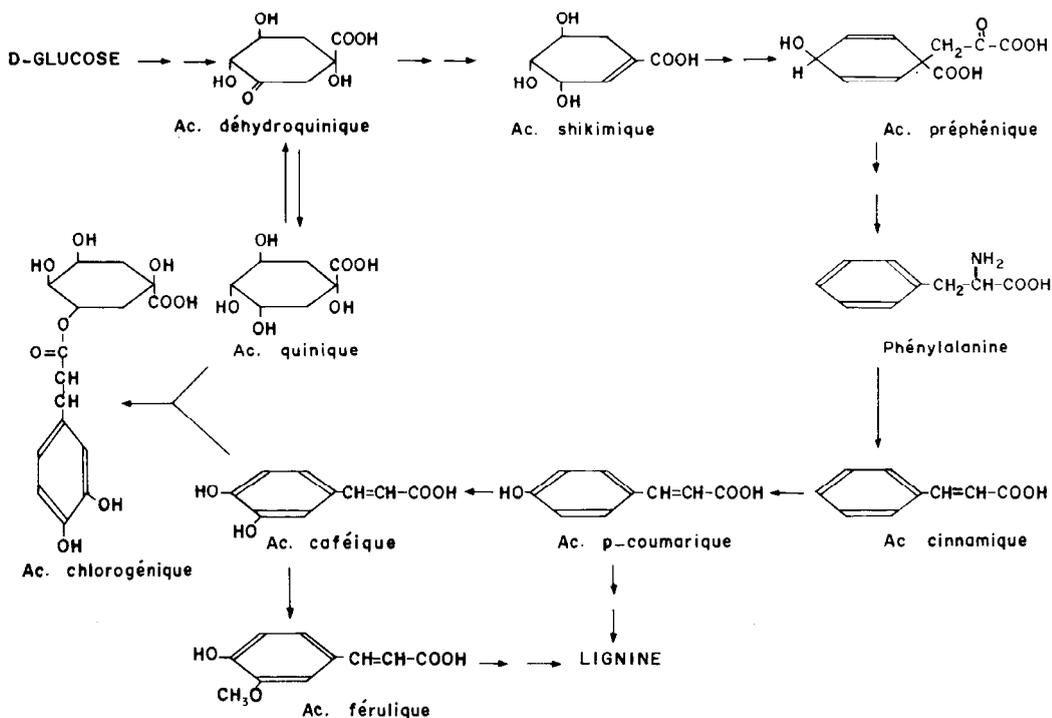


PLANCHE IV. — Seconde hypothèse concernant la biosynthèse de l'acide chlorogénique (l'estérification succéderait aux deux hydroxylations).

On doit remarquer que l'absence de résultats concernant la conversion en acide chlorogénique des autres précurseurs possibles, dans les conditions de cette expérience, et que le mode d'expérimentation ne faisant intervenir aucune substance de « piégeage », empêchent d'affirmer, ici, qu'une autre voie de biosynthèse ne serait pas possible ou même préférentielle.

a.4. Ainsi, les résultats de ces trois séries d'essais aboutissent à des interprétations contradictoires. On pourrait en conclure que diverses modalités existent pour la formation de l'acide chlorogénique dans les cellules des tubercules de pomme de terre. Toutefois, les relations entre les différentes conditions d'expérience et l'une ou l'autre de ces modalités apparaissent mal. De plus, des compléments aux expérimentations ci-dessus pourraient être envisagés.

b. SUR *Nicotiana tabacum*.

b.1. D'après RUNECKLES (1963), les disques de parenchyme foliaire synthétisent les esters phénoliques de l'acide quinique ou du glucose à partir des acides aromatiques libres comme substrat ou à partir d'autres précurseurs. Les meilleurs précurseurs de l'acide chlorogénique sont, dans l'ordre décroissant, le 1-p-coumaryl-glucose, l'acide p-coumaryl-quinique, l'acide p-coumarique, le 1-cinnamyl-glucose, l'acide cinnamique et très loin derrière, l'acide caféique. Il est donc peu vraisemblable que l'estérification se produise généralement au niveau du composé cinnamique dihydroxylé (ac. caféique), par contre, elle se ferait préférentiellement avec l'acide p-hydroxycinnamique (ac. p-coumarique).

b.2. Employant des feuilles, entières ou découpées en disques, STECK (1968) montre que l'apport d'acides cinnamique, p-coumarique ou caféique marqués amène la formation d'acide chlorogénique radioactif. Deux expériences de « piégeage » au cours desquelles l'acide cinnamique radioactif est absorbé par les tissus, en présence d'acides p-coumarique ou caféique inertes paraissent assez démonstratives. La radioactivité de l'acide $2\text{-}^{14}\text{C}$ cinnamique se retrouve presque entièrement dans l'acide p-coumarique de « piégeage », indiquant qu'une hydroxylation précède l'estérification. La radioactivité du cinnamate ne passe qu'en faible partie dans l'acide caféique de piégeage mais se retrouve dans l'acide chlorogénique : l'activité spécifique de ce dernier composé est plus élevée que celle de l'acide caféique, ceci n'est possible, du moins au début que si l'acide caféique n'est pas sur la voie de formation principale de l'acide chlorogénique.

c. CONCLUSION

A la suite de ces travaux, il semble que la biosynthèse de l'acide chlorogénique se produise préférentiellement par estérification entre l'acide quinique et l'acide cinnamique monohydroxylé en para (acide p-coumarique). L'estérification serait aussi possible, à un degré moindre avec l'acide caféique et peut-être l'acide cinnamique. Toutefois, les facteurs commandant éventuellement le passage par l'une ou l'autre de ces voies n'étant pas connus, on ne peut dire si les acides caféiques et p-coumaryl-quinique sont, l'un ou l'autre, les précurseurs directs du depside caféyl-quinique dans tous les systèmes de biosynthèse. On ne peut même pas affirmer, comme le fait remarquer STECK (1968), qu'il en soit ainsi chez le tabac aux différents stades de la croissance et du développement.

2° *Etudes enzymatiques in vitro.*

Les enzymes impliqués dans la chaîne métabolique précédente restent imparfaitement connus.

a. L'hydroxylation de l'acide cinnamique en acide p-coumarique est réalisée par

une hydroxylase extraite d'une poudre acétonique de feuilles d'épinards (NAIR et WINING, 1965). Le pH d'action optimal se situe à 4,6, un donneur d'électron externe est indispensable ainsi que l'acide tétrahydrofolique. L'enzyme instable ne peut être purifié, il serait comparable à la phényl-alanine-hydroxylase du foie de mammifères. La préparation enzymatique se montre capable de convertir la L-phénylalanine en tyrosine, l'addition de L-phénylalanine inhibe l'hydroxylation de l'acide cinnamique.

Chez de jeunes plantules de pois, RUSSELL et CONN (1967), constatent l'existence d'une hydroxylase catalysant la même réaction en présence d'acide tétrahydrofolique et de NADPH. La préparation enzymatique perd son activité rapidement et le pH optimal à 7,5 diffère notablement du précédent.

b. La transformation de l'ester coumaryl-quinique en acide chlorogénique, *in vitro*, a été obtenue par LEVY et ZUCKER (1960). Par ailleurs, la conversion de l'acide p-coumarique en acide caféique par une phénolase (polyphénoloxydase) de la pomme a été rapportée par WALKER (1964). SATO (1966) obtient cette même conversion à partir de chloroplastes de *Saxifraga stolonifera*, puis d'autres plantes. Ces enzymes n'ont pas été étudiés plus avant.

c. Le ou les systèmes enzymatiques qui catalyseraient l'estérification, aux différents niveaux, n'ont pas fait l'objet, à notre connaissance, d'études, *in vitro*, à partir d'un extrait végétal.

3° Remarques.

Du bilan de ces travaux récents, il ressort qu'il importe de mieux établir l'existence des voies métaboliques évoquées ci-dessus, d'une part en les recherchant chez d'autres plantes aux différents stades de la croissance et du développement, d'autre part en s'efforçant de déterminer les conditions d'action des enzymes qui assurent leur fonctionnement.

VI. CONCLUSION

Divers chercheurs se sont penchés, au cours des dernières années, sur la biosynthèse de l'acide chlorogénique. De nombreux problèmes restent à résoudre dans ce domaine et une expérimentation utilisant comme matériel végétal le caféier, où ce composé est abondant, pourrait contribuer en partie à leur solution.

L'existence de composés voisins chez cette plante permettrait d'aborder l'étude des relations de l'acide chlorogénique avec ses isomères : ceux-ci sont-ils synthétisés individuellement ou formés par transestérifications ?

Enfin, on serait conduit à considérer l'utilisation métabolique de ce composé (TAYLOR, 1968 ; STECK, 1968) actuellement peu connue. L'acide caféique libre étant toxique pour les tissus végétaux, il importe de savoir si les depsides caféyl-quiniques ne seraient pas des composés de détoxification.

Manuscrit reçu le 7 mai 1969.

BIBLIOGRAPHIE

- BADIN (P.), DEULOFEU (V.), GALMARINI (O. L.) — 1962 — Chlorogenic acid and chlorogenic like acids in « mate » (*Ilex paraguariensis*, St. Hl.). *Chem. and Industry*, 257.
- BARNES (M. H.), FELDMAN (J. R.), WHITE (W. V.) — 1950 — Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. *J. amer. Chem. Soc.*, **72**, 4178-4182.
- BOUDET (A.), COLONNA (J.-P.) — 1968 — Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Variations nycthémerales et synthèse à partir de $^{14}\text{CO}_2$ des acides quinique et shikimique dans les feuilles de *Quercus pedunculata* Ehrh. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. **266**, p. 2256.
- BUTLER (W. L.) — 1960 — Chlorogenic acid of lettuce seeds. *Nature*, **185**, 856-857.
- CHALLICE (J. S.), WILLIAMS (A. H.) — 1966 — Paper chromatographic separation and behaviour of the cis and trans isomers of cinnamic acid derivatives. *J. Chromatogr.*, **21**, 353-362.
- CORSE (J.) — 1953 — A new isomer of chlorogenic acid from Peaches. *Nature*, **172**, 771-772.
- CORSE (J.), LUNDIN (R. E.), WAISS (A. C., Jr.) — 1965 — Identification of several components of isochlorogenic acid. *Phytochemistry*, **4**, 527-529.
- CORSE (J. W.), SONDEIMER (E.), LUNDIN (R. E.) — 1962 — 3-Feruloylquinic acid; a 3'-methyl ether of chlorogenic acid. *Tetrahedron*, **18**, 1207-1210.
- CZOK (G.) — 1965 — On the question of the share of chlorogenic acid, trigonelline and coffee oil in the physiological effects of coffee beverages. I.F.C.C. Second colloque international sur la Chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés, Paris, 3-7 mai 1965, 239-246.
- DAVIS (B. D.), WEISS (V.) — 1953 — Aromatic biosynthesis. VII. The roles of 5-dehydroquinic acid and quinic acid. *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. Naunyn, Schmedeberg's*, **220**, 1-15.
- DAVIS (B. D.) — 1955 — Biosynthesis of the aromatic amino acids; in « A symposium on amino acid metabolism » Johns Hopkins Press, Baltimore, 799-811.
- EL HAMIDI (A.), WANNER (H.) — 1964 — The distribution pattern of chlorogenic acid and caffeine in *Coffea arabica*. *Planta*, **61**, (1), 90-96.
- EL BASYOUNI (S. Z.), NEISH (A. C.), TOWERS (G. H. N.) — 1964 — The phenolic acids in wheat. III. Insoluble derivatives of cinnamic acids as natural intermediates in lignin biosynthesis. *Phytochemistry*, **3**, 627.
- FISCHER (H. O. L.), DANGSCHAT (G.) — 1932 — Konstitution der chlorogensäure. *Ber.*, **65 B**, 1037-1040.
- FREEDMAN (S. O.), KRUPPEY (J.), SEHON (A. H.) — 1961 — Chlorogenic acid allergen in green coffee beans. *Nature*, **192**, 241-243.
- FREUDENBERG (K.) — 1920 — Heber gerbstoffe. III. Chlorogensäure der Gerbstoffartige Bestandteil der Kaffeebohnen. *Ber.*, **53**, 232-239.
- GAMBORG (O. L.) — 1966 — Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells. *Canad. J. Biochem.*, **44**, 791.
- GAMBORG (O. L.) — 1967 — Aromatic metabolism in plants. V. The biosynthesis of chlorogenic acid and lignin in potato cell cultures. *Canad. J. Biochem.*, **45**, 1451-57.
- GAMBORG (O. L.), WETTER (L. R.), NEISH (A. C.) — 1961 — The role of plant phenolic compounds in the oxidation of reduced diphosphopyridine nucleotide by peroxidase. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1113-1124.
- GOLDSCHMID (O.), HERGERT (M. L.) — 1961 — Examination of western hemlock for lignin precursors. *Tappi*. **44**, 858-870.

- GOLDSCHMID (O.), QUIMBY (G. R.) — 1964 — Lignin precursors : the role of quinic acid. *Tappi*, **47**, 528-533.
- GORTER (K.) — 1907 — Contribution to our knowledge of coffee. I. *Amer. Chem.* **358**, 327-348.
- GORTER (K.) — 1908 — Chemistry of coffee. *Amer. Chem.*, **359**, 217-242.
- GORTER (K.) — 1909 — Ueber die verbreitung der chlorogensäure in der Natur. *Arch. Pharmaz.* **247**, 184-188.
- GORTER (K.) — 1911 — Coffee. IV. *Amer. Chem.*, **379**, 110-130.
- GORTNER (W. A.), KENT (M. J.) — 1958 — Coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxydase. *J. Biol. Chem.*, **233**, 731-735.
- GREWE (R.), LORENSEN (W.) — 1953 — Die ueberfführung der Shikimisaure in China-säure. *Chem. Ber. Dtsch.*, **86**, n° 7, 928-938.
- HANSON (K. R.) — 1962 — The configuration of shikimic acid and certain biochemically related compounds. *J. Chem. Ed.*, **39**, 419-421.
- HANSON (K. R.) — 1966 — Chlorogenic acid biosynthesis. Incorporation of $\alpha^{14}\text{C}$ cinnamic acid into the cinnamoyl and hydroxycinnamoyl conjugates of the potato tuber. *Phytochemistry*, **5**, 491-499.
- HANSON (K. R.), ZUCKER (M.) — 1963 — The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids. *J. Biol. Chem.*, **238**, n° 3, 1105-1115.
- HASLAM (E.), HAWORTH (R. D.), LAWTON (D. A.) — 1963 — Gallotanins. VIII. The preparation and properties of some galloyl esters of quinic acid. *J. Chem. Soc.*, **1963**, 2173-2181.
- HAUSERMANN (M.), BRANDENBERGER (M.) — 1961 — Uber phenolische Pflanzeninhaltsstoffe. IV. Spektrophotometrische Bestimmungsmethode für chlorogensäuren und ihre Anwendung auf pflanzliche Extrakte. *Z. Lebensmittel- Unters. u. Forsch.*, **115**, 516-523.
- HENDERSON (J. H. M.), NITSCH (J. P.) — 1962 — Effect of certain phenolic acids on the elongation of Avena first internodes in the presence of auxins and tryptophan. *Nature*, **195**, 780-782.
- HENZE (R. E.) — 1956 — Inhibition of enzymic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. *Science*, **123**, 1174-1175.
- HERRMANN (K.) — 1956 — Uber das vorkommen von Kaffesaure und chlorogensäure im Obst und gemuse. *Naturwiss.*, **43**, n° 5, 109.
- HERZMAN (M.) — 1957 — Uber die aktivierung der Peroxydase. *Naturwissenschaften. Dtsch.*, **44**, n° 13, 377.
- HERZMAN (H.) — 1959 — Uber die oxydation der Adrenalins. *Hoppe Seyler's. Z. Physiol. Dtsch.*, **315**, 285-287.
- HIGUCHI (T.), BROWN (S. A.) — 1963 — Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenyl propanoïd system in lignification. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 621-628.
- IMASEKI (H.) — 1959 — Studies on the browning and blackening of plant tissues. V. Chlorogenic acid and its isomers in the leaves of Viburnum species. *Bot. Mag. Tokyo.*, **72**, 316-324.
- INGRAHAM (L. L.), CORSE (J.) — 1951 — Enzymic browning of fruits. I. Autoxidation of chlorogenic acid. II. Dissociation constants of substituted catechols. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 5550-5553.
- JACOBSON (J. S.) — 1961 — The brown pigments of autolyzed tobacco leaves. I. Isolation on characterization. II. Incorporation of labelled rutin and chlorogenic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 58-597.

- KOUKOL (J.), CONN (E. E.) — 1961 — Metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698.
- KROGMAN (D. W.), STILLER (M. L.) — Naturally occurring cofactor for photosynthetic phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**, 46-49.
- LENTNER (C.), DEATHERAGE (F. E.) — 1958 — Phenolic acids in coffee. *Chem. and Industry (London)*, 1331-1332.
- LEVY (C. C.), ZUCKER (M.) — 1960 — Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2418-2425.
- Mc CALLA (D. R.), NEISH (A. C.) — 1959 — Metabolism of phenylpropanoid compounds in *Salvia*. I. Biosynthesis of phenylalanine and tyrosine. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 531-536.
- MACHEIX (J.-J.) — 1967 — Sur l'acide chlorogénique des pommes : méthode de dosage et variations au cours de la croissance, de la maturation et de la conservation. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **264**, Série D, 3010-3013.
- MEIFFREN (M.) — 1961 — Contribution aux recherches sur la tracheomycose du caféier en Côte d'Ivoire. *Café, Cacao, Thé*, n° I, janvier-mars 1961, pp. 28-37.
- MITSUHASHI (S.), DAVIS (B. D.) — 1954 — Aromatic biosynthesis. XIII. Conversion of quinic acid to 5-dehydroquinic acid by quinic dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **15**, 268-280.
- NAIR (P. M.), VINING (L. C.) — 1965 — Cinnamic acid hydroxylase in spinach. *Phytochemistry*, **4**, 161-168.
- NEISH (A. C.) — 1961 — Formation of m- and p-coumaric acids by enzymic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. *Phytochemistry*, **1**, 1-24.
- NEISH (A. C.) — 1964 — Major pathways of Biosynthesis of phenols. In *Biochemistry of phenolic compounds*. J. B. Harbone, Ed. Academic Press, London, New York, p. 318.
- NITSCH (J. P.), NITSCH (C.) — 1961 — Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. bot. Fr.*, **108**, 349-362.
- PANIZZI (L.), SCARPATI (M. L.), ORIENTE (G.) — 1955 — Sintesi dell'acido clorogenico. *Experientia*, **11**, 383-384.
- PAYEN (A.) — 1846 — *Ann.*, **60**, 286.
- POLITIS (J.) — 1949 — Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la famille des composés et dans les organes de ces plantes. *C. R. H. Séances Acad. Sci. Paris*, **228**, 265-266.
- ROBIQUET, BOUTRON — 1837 — *Ann. Chemie und Pharmacie*, **23**, 93.
- ROGACHEV (V. I.) *et al.* — 1960 — « Darkening of potato tuber tissues on sterilisation by ionizing radiations » *Konserv. i. ovoshchsushil. Prom*, **15**, 11-15. *Chem. Abs.*, **55**, 3868, 1961.
- ROHRINGER (H.) *et al.* — 1967 — Metabolism of aromatic compounds in healthy and rust infected primary leaves of wheat. I. Studies with $^{14}\text{CO}_2$, quinate U ^{14}C and shikimate U ^{14}C as precursors. *Can. J. Bot.*, **45**, 863.
- RUCKENBROD (H.) — 1954 — The conversions of chlorogenic acid in higher plants. *Planta*, **46**, 19-45.
- RUNECKLES (V. C.) — 1963 — Tobacco polyphenols. II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 2249.
- RUSSELL (D. W.), CONN (E. E.) — 1967 — The cinnamic acid -hydroxylase of Pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, n° 1, 256-258.
- SATÔ (M.) — 1966 — Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts. II. Conver-

- sion by the isolated chloroplasts of p-coumaric acid to caffeic acid. *Phytochemistry*, **5**, 385-389.
- SCARPATI (M. L.), ESPOSITO (P.) — 1963-1964 — Neochlorogenic acid and « Band 510 » structure. *Tetrahedron letters*, **18**, 1147-1150. (Aussi dans : *Ann. Chim. (Rome)*, **53**, (1-2), 35-50, 1964).
- SCARPATI (M.), GUISO (M.) — 1963 — Acidi caffeil-chinico del caffè del Mate. *Ann. Chim. Rome*, **53**, (10), 1315-1328.
- SCARPATI (M.), GUISO (M.) — 1964 — Structure of the three dicaffeoyl-quinic acids of coffee. *Tetrahedron letters*, **39-40**, 2851-2853.
- SISLER (E. C.), EVANS (H. J.) — 1958 — Direct spectrophotometric determination of chlorogenic acid oxydase activity. *Biochim. Biophys.*, **28**, 638-639.
- SLOTTA (K. M.), NEISSER (K.) — 1938 — *Ber.*, **71 B**, 1611.
- SMITH (R. F.) — 1963 — Les acides chlorogéniques du café. I.F.C.C. Premier colloque international sur la chimie des cafés verts, torréfiés et leurs dérivés. Paris, 20-22 mai, 77-84.
- SONDHEIMER (E.), 1958 — On the distribution of caffeic acid and chlorogenic acid isomers in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **74**, 131-138.
- SONDHEIMER (E.) — 1964 — Chlorogenic acid and related depsides. *Bot. Review.*, **30**, 667-711.
- SONDHEIMER (E.), GRIFFIN (D. H.) — 1960 — Activation and inhibition of indoleacetic oxydase activity from peas. *Science*, **131**, 672.
- SONDHEIMER (E.), SZYMANSKI (C. D.), CORSE (J. W.) — 1961 — Isolation of chlorogenic acid and its isomers from coffee. *J. agric. Food Chem.*, **9**, 146-149.
- STECK (W.) — 1968 — Metabolism of cinnamic acid in plants : chlorogenic acid formation. *Phytochemistry*, **7**, 1711-1717.
- SZYMANSKI (C. D.) — 1962 — I. Some studies on the chlorogenic acids. II. An attempt to detect quinic dehydrogenase in quinic acid containing plants. Ph. D. Thesis State Univ. College. Forestry, Syracuse Univ.
- TAYLOR (A. O.) — 1968 — The distribution and turnover rate of soluble and insoluble caffeoyl esters in *Xanthium*. *Phytochemistry*, **7**, 63-71.
- THIMANN (K. W.), TOMASZEWSKI (M.), PORTER (W. L.) — 1962 — Growth promoting activity of caffeic acid. *Nature.*, **193**, 1203.
- TIMBERLAKE (C. F.) — 1959 — Complex formation between coffee and some organic acids, phenols and phenolic acids occurring in fruit. *J. Chem. Soc.*, **1959**, 2795-2798.
- ULRICH (R.), THALER (O.) — 1957 — Variations quantitatives et qualitatives de quelques constituants glucosiques de la poire Williams au cours de son développement. *J. agr. trop. Bot. appl.*, **4**, 12-30.
- URITANI (I.) — 1961 — The role of plant phenolics in disease resistance and immunity. Symposium on Biochemistry of plant phenolic substances. Colorado State University, 98-118.
- URITANI (I.), MIYANO (M.) — 1955 — Derivatives of caffeic acid in sweet potato attacked by black rot. *Nature*, **175**, 812.
- VENDRIG (J. C.), BUFFEL (K.) — 1961 — Growth stimulating activity of trans caffeic acid isolated from *Coleus rehneltanus*. *Nature*, **192**, 276-277.
- VOIGHT (J.) — 1960 — *Ernährungsforschung.*, **5**, 410-416, d'après SONDHEIMER, 1964.
- WALKER (J. R. L.) — 1964 — Studies on the enzymic browning of apples. II. Properties of apple polyphenoloxydase. *Austral. J. Biol. Sci.*, **17**, 2, 360-371.
- WEINSTEIN (L. H.), PORTER (C. A.), LAURENÇOT (H. J.) — 1959 — Biosynthesis of

- uniformly labeled shikimic and quinic acids in leaves of *Gingko biloba*. *Contr. Boyce Thompson Inst. Plant. Res.*, **21**, 439-446.
- WEINSTEIN (C. H.), PORTER (C. A.), LAURENCOT (H. J., Jr.) — 1961 — Role of quinic acid in aromatic biosynthesis in higher plants. *Contr. Boyce Thompson. Inst. Plant. Res.*, **21**, 201-214.
- WEINSTEIN (C. H.), PORTER (C. A.), LAURENCOT (H. J., Jr.) — 1961 — Quinic acid as a precursor in aromatic biosynthesis in the rose. *Contr. Boyce Thompson. Inst. Plant. Res.*, **20**, 121-134.
- WEURMAN (E.), SWAIN (T.) — 1953 — Chlorogenic acid and the enzymic browning of apples and pears. *Nature*, **172**, 678.
- WILKINSON (F. B.), PHILIPPS (M.), BACOT (A. M.) — 1954 — Chlorogenic and caffeic acids in the U. S. Type 12 tobacco. *J. Ass. Off. agric. Chemists*, **37**, 1004-1012.
- YANIV, HAIM et GILVARG (C.) — 1955 — Aromatic biosynthesis. XIV. 5-dehydroshikimic reductase. *J. Biol. Chem.*, **213**, 787-795.
- ZENK (M. H.), MULLER (G.) — 1963 — *In vivo* destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid influenced by naturally occurring phenolic acids. *Nature*, **200**, 761-763.
- ZUCKER (M.), STINSON (H. T., Jr.) — 1960 — The role of chlorogenic acid and plastid pigments in the browning of variegated tobacco leaves. *Tobacco. Sci.*, **4**, 229-233.