

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

①1 N° de publication : **2 957 673**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **10 01079**

⑤1 Int Cl⁸ : **G 01 N 21/64** (2012.01), **G 01 N 33/02**, **B 07 C 5/342**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 METHODE DE DETERMINATION DE LA MATURITE D'UNE MANGUE EN VUE DE SA RECOLTE.

②2 Date de dépôt : 18.03.10.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.09.11 Bulletin 11/38.

④5 Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 20.04.12 Bulletin 12/16.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *LECHAUDEL MATHIEU, JOAS JACQUES, NORMAND FREDERIC et URBAN LAURENT.*

⑦3 Titulaire(s) : *CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public.*

⑦4 Mandataire(s) : *CABINET ORES.*

FR 2 957 673 - B1



Méthode de détermination de la maturité d'une mangue en vue de sa récolte

La présente invention se rapporte au domaine de l'étude de la maturité des mangues en vue de leur récolte.

Plus spécifiquement, la présente invention a pour but la mise au point d'une méthode d'évaluation du degré de maturité d'une mangue verte encore sur l'arbre afin de déterminer le moment de la récolte qui garantira un mûrissement optimal du fruit après cueillette ; ladite méthode doit être non destructive et facilement mise en œuvre par des producteurs sur le lieu de production des fruits.

La consommation internationale de mangues connaît une croissance sensible ; les lieux de consommation étant souvent très distants des lieux de production, il est nécessaire de cueillir les mangues encore vertes, leur mûrissement se faisant lors de leur transport et de leur stockage. Afin de fournir des fruits de qualité, il est important de contrôler la maturité des fruits pour optimiser la date de leur récolte. En effet, la qualité d'une mangue qui ne mûrit pas sur l'arbre dépend du stade de maturité auquel elle a été cueillie. Des mangues cueillies trop tôt ne mûrissent pas correctement, elles ne développent pas ou peu de flaveur et d'arôme et présentent une faible teneur en sucres. A contrario, des mangues cueillies à un stade de maturité trop tardif présentent une durée de conservation réduite et sont plus sensibles aux maladies.

Le choix d'un moment optimisé de récolte est rendu difficile par le fait que toutes les mangues d'un même verger, mais aussi d'un même arbre, ne mûrissent pas à la même vitesse après cueillette. Un critère de récolte usuellement employé est le temps écoulé depuis la floraison ; cependant, ce critère présente une forte variabilité qui dépend du cultivar, du rapport feuilles/fruit de chaque arbre ou encore de la position du fruit dans l'arbre, et donc de la température et de l'ensoleillement auxquels il est exposé..., cette méthode de détermination de la maturité des mangues n'est donc pas satisfaisante.

Il s'avère en conséquence nécessaire de mettre au point une méthode d'évaluation de la maturité de mangue qui soit simple, précise, rapide, fiable et non-destructive ; idéalement, cette méthode devrait pouvoir être utilisée pour chacune des mangues portées par un arbre.

La mise au point de méthodes d'évaluation de la maturité de fruits ou de légumes a déjà été décrite, notamment dans le Brevet Américain US 5,822,068 qui concerne une méthode non destructive de détermination de la qualité (fermeté, texture, couleur et/ou arôme) des fruits et des légumes, en particulier de pommes ; cette méthode repose sur la mesure des valeurs de fluorescence de la chlorophylle ; la fluorescence

minimale F_0 et la fluorescence maximale F_M sont mesurées à l'aide d'une source de lumière rouge, puis le ratio F_V/F_M est calculé, F_V étant dénommé fluorescence variable ($F_V = F_M - F_0$), et présente une relation quasi linéaire avec l'activité photosynthétique dans la peau de la pomme, cette activité étant elle-même corrélée à la qualité du fruit mûr.

5 Kolb *et al.* ont décrit l'utilisation de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle pour évaluer le degré de mûrissement des grains de raisin blanc ; plus particulièrement, ces auteurs proposent de mesurer les valeurs de fluorescence F_0 et F_M . Ils ont ainsi constaté une corrélation entre la valeur de F_0 et l'accumulation de sucre dans les grains de raisin au cours du mûrissement ; ce paramètre peut ainsi être utilisé comme un
10 indicateur non invasif de l'accumulation de sucre au cours du mûrissement des grains de raisin (J. of Agricultural and Food Chemistry (2006) 54, 299-305).

Bron *et al.* ont étudié l'évolution de la fluorescence de la chlorophylle de la peau de papaye au cours de son mûrissement, en particulier lors du changement de couleur (Postharvest Biology and Technology (2004) 33, 163-173).

15 De façon générale, l'intérêt de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle de l'épicarpe de fruit a déjà été décrit pour diverses applications, dans la revue de DeEll *et al.* (1999, Horticultural Reviews 23, 69-107), qui concernent notamment, l'évaluation des dommages provoqués par la conservation réfrigérée des fruits, la détection de stress induit par la chaleur ou par l'atmosphère (faible teneur en oxygène), l'évaluation
20 du mûrissement et de la sénescence, la prédiction de la durée de demi-vie d'un fruit ou d'un légume...

Concernant plus spécifiquement la mangue, les Rapports annuels 2004 et 2005 du CIRAD à la Réunion (accessibles sur le site Internet http://www.cirad.fr/reunion/cirad_reunion/rapport) décrivent la recherche de critères de
25 récolte non destructifs des mangues ; ces documents proposent la mesure de différents paramètres, incluant la variation de la fluorescence de la chlorophylle de la peau (épicarpe) du fruit et le calcul du ratio F_V/F_M pour identifier de nouveaux critères de récolte.

L'article de Joas *et al.* (« La qualité des fruits tropicaux après récolte, connaître le passé du fruit pour anticiper son avenir », Joas J. – Léchaudel M., décembre
30 2008) suggère l'intérêt de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle comme un indicateur non destructif de la maturité interne du fruit qui pourrait être utile pour optimiser la récolte de la mangue verte sans toutefois définir de critère précis.

La mesure de la fluorescence de la chlorophylle de l'épicarpe de la mangue et le calcul du ratio F_V / F_M , décrits jusqu'à présent n'ont cependant pas conduit à

une bonne corrélation avec le degré de mûrissement de la mangue verte, c'est-à-dire à un stade plus précoce que le stade « point jaune ».

Au cours de leur mûrissement, l'épicarpe des mangues, initialement vert prend une coloration dégradée qui va du jaune au rouge ; cette coloration s'amorce par l'apparition d'une zone jaune dans le tiers inférieur du fruit. Le stade de maturité correspondant à l'apparition de cette coloration est appelé stade « point jaune ». Il est surtout observé chez les variétés de mangues de type floridien, toutefois la dégradation des pigments chlorophylliens à l'approche de la maturation de la mangue est un processus commun à l'ensemble des variétés de mangues.

L'évolution de la maturité d'une mangue peut également être évaluée par sa concentration interne en CO₂ qui évolue au cours du temps. Lors de la croissance du fruit, cette teneur reste constante à une valeur comprise entre environ 20.000 et 50.000 ppm ; cette valeur de concentration interne en CO₂ connaît ensuite une augmentation rapide qui indique l'entrée en maturation du fruit, aussi appelée « crise climatérique ».

Les inventeurs sont maintenant parvenus à définir un critère fiable, non invasif et facilement mesurable permettant d'évaluer le stade de maturité d'une mangue verte sur l'arbre. En effet, ils ont montré que le mûrissement d'une mangue verte est optimisé si la mangue est cueillie juste avant le début de la crise climatérique, et bien avant le stade « point jaune ». Ils ont également établi une formule mathématique corrélant la valeur de la concentration interne en CO₂ avec la valeur de la fluorescence variable $F_V = F_M - F_0$; cette corrélation montre en particulier que l'augmentation de la concentration interne en CO₂ coïncide avec une diminution de F_V . Ces travaux permettent donc, à l'aide de la détermination de la fluorescence F_V de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue verte portée sur l'arbre, d'évaluer la concentration interne en CO₂ et ainsi de pouvoir déterminer le meilleur moment pour cueillir ladite mangue.

La présente invention se rapporte ainsi à une méthode non destructive de détermination du degré de maturité d'une mangue verte en vue de sa récolte ; cette méthode présente les avantages suivants :

- elle est facilement mise en œuvre avec un dispositif portable lorsque le fruit est encore sur l'arbre ;
- elle préserve l'intégrité du fruit ; et
- elle est réalisée à un stade précoce (fruits verts) alors qu'aucune modification du fruit n'est visible à l'œil.

Enfin, la mise en œuvre de la méthode selon l'invention permet un mûrissement optimal des fruits après leur cueillette, notamment lors de leur transport et de leur stockage.

Plus spécifiquement, les inventeurs ont montré que la valeur de la concentration interne en CO₂ ([CO₂]_i) pouvait être déterminée par la mesure des valeurs de F₀ et F_M puis du calcul de la valeur de F_V = F_M - F₀ grâce à la formule suivante :

$$[\text{CO}_2]_i = a / (1 + b^{c \cdot F_V}) + d$$

avec a, b, c et d constantes dépendantes de la variété de mangue.

L'établissement de cette corrélation et la détermination des valeurs des constantes a, b, c et d est illustrée à l'exemple 1.

Pour une variété de mangue donnée, les valeurs de la concentration interne en CO₂, en particulier la valeur de [CO₂]_{i0} avant la crise climaterique, sont les mêmes pour chaque fruit. La concentration interne en CO₂ peut être mesurée selon la méthode décrite dans les exemples.

En conséquence, la valeur de F_V étant corrélée à celle de la concentration interne en CO₂, il est possible, par le suivi de l'évolution de la valeur de F_V, de suivre l'évolution de la maturité des mangues vertes avant et au début de la crise climaterique et ainsi de déterminer le moment de la cueillette. Comme la valeur de la concentration interne en CO₂, la valeur de F_V avant la crise climaterique est constante (elle est notée par la suite F_{V0}) ; à titre d'exemple, la valeur de F_{V0} est d'environ 1520 pour la variété de mangue Cogshall et d'environ 1250 pour la variété de mangue José ; elle chute ensuite lorsque la mangue entre dans la phase de crise climaterique.

Un intérêt de cette méthode est que le critère de récolte, la diminution de F_V, est indépendant de la variété de la mangue.

La mesure de la fluorescence est très avantageuse par rapport à la détermination de la concentration interne en CO₂ ; en effet, il s'agit d'une mesure qui ne détruit pas le fruit, facile et rapide à réaliser à l'aide d'un dispositif simple à manipuler, elle peut donc se faire par un cultivateur directement sur l'arbre. En outre, elle est immédiate et ne demande aucune analyse, contrairement à la mesure de CO₂ qui nécessite la mise en œuvre d'un prélèvement de gaz représentatif de la concentration interne en CO₂ et d'un appareil de mesure (type infra-rouge, chromatographe...). Enfin, la variation de F_V juste avant la crise climaterique est proportionnellement plus prononcée que la variation de la concentration interne en CO₂ ; ce qui permet à la méthode selon l'invention d'être plus sensible que si elle s'appuyait sur la mesure de la variation interne en CO₂.

Plus spécifiquement, la méthode non destructive de récolte de mangue verte comprend les étapes suivantes :

a) mesure des fluorescences minimale F_0 et maximale F_M de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue verte non cueillie (sur l'arbre); ladite fluorescence minimale étant induite par une source de lumière rouge de très faible intensité et ladite fluorescence maximale étant induite par une source de lumière blanche halogène ;

b) utilisation de ces deux valeurs de fluorescence pour le calcul de la fluorescence variable $F_V = F_M - F_0$;

et est caractérisée en ce qu'elle comprend en outre les étapes suivantes :

c) comparaison de la valeur calculée de F_V avec la valeur de F_{V0} ;
 d) récolte de la mangue dès que F_V représente entre 75 et 90% de la valeur de F_{V0} .

La valeur de F_{V0} pour une variété de mangue donnée peut être communiquée au cultivateur, par exemple, par une notice jointe au dispositif de mesure de la fluorescence, ou bien, elle peut aussi être déterminée par le cultivateur lui-même (voir l'exemple 1).

Comme cela est démontré dans l'exemple 2, les mangues récoltées grâce à la méthode selon l'invention ont atteint un niveau de maturité interne qui permettra un mûrissement au cours du stockage et/ou du transport conduisant à une mangue mûre présentant des qualités organoleptiques et nutritionnelles similaires à celle d'une mangue mûrie sur l'arbre.

De préférence, la mesure des fluorescences minimale et maximale de la chlorophylle contenue dans l'épicarpe est réalisée sensiblement dans la même zone d'épicarpe, sur ou à proximité de l'apex du fruit ; l'apex est l'extrémité du fruit opposée au pédoncule (voir la **Figure 1**) ; en effet, il s'agit de la partie de l'épicarpe qui change de couleur en premier. La mesure est réalisée lorsque le fruit est sur l'arbre.

Cette mesure des fluorescences est réalisée par fluorescence modulée.

La fluorescence modulée de la chlorophylle est induite par de courtes impulsions de lumière rouge appliquées à une fréquence de 1,6 kHz. Cette lumière d'excitation, produite par une diode émettrice de lumière (de l'ordre de 650 nm), a une très faible intensité (valeur intégrée = $0,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), de telle sorte qu'aucun phénomène d'induction n'a pu se produire ; elle permet de mesurer le niveau minimal de la fluorescence F_0 .

Dans le cadre de la présente invention, la fluorescence minimale F_0 est induite par une source de lumière rouge de faible intensité, c'est-à-dire de préférence d'une intensité inférieure ou égale à $0,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, de préférence comprise entre 0,05 et $0,2 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5 Le niveau maximum de la fluorescence de la chlorophylle F_M est induit par un éclair d'une à trois secondes de lumière blanche de très forte intensité, saturante pour le transfert d'électrons (intensité compris entre 8000 et 20000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

La mesure des fluorescences est effectuée par un détecteur du type fluorimètre.

10 Les détecteurs pouvant être utilisés sont notamment les fluorimètres, tels que les fluorimètres de type « PAM » (pour « pulse amplitude-modulated », c'est-à-dire à amplitude d'impulsions modulée) comme le modèle DualPAM100 ou encore un fluorimètre FMSII de Hansatech qui a été utilisé dans la partie expérimentale.

La technique de mesure de la fluorescence utilisée jusqu'à présent
15 demandait une acclimatation de la zone de mesure à l'obscurité pendant une à deux heures avant la mesure ; les inventeurs ont montré une relation empirique linéaire forte entre les mesures faites sur fruits acclimatés à l'obscurité et les mesures faites directement sur la face à l'ombre du fruit (voir l'exemple 3). Ainsi, pour pallier l'inconvénient lié à l'acclimation du fruit, les mesures de fluorescence de la chlorophylle de l'épicarpe sont de
20 préférence réalisées sur la face du fruit à l'ombre ; elles sont de préférence faites tôt le matin (en l'absence de rayonnement direct du soleil) et en assurant l'étanchéité à la lumière de la tête de mesure de l'appareil, pour minimiser les variations d'intensité lumineuse sur la zone de mesure.

La simplification de la mise en œuvre de la méthode la rend désormais
25 applicable à un grand nombre de fruits afin de détecter ceux de maturité interne voulue et de les récolter.

La présente méthode permet également un tri des mangues après leur récolte en fonction de leur degré de maturité ; plus particulièrement, cette méthode de tri des mangues vertes après leur récolte comprend les étapes de :

30 a) mesure des fluorescences minimale F_0 et maximale F_M de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue verte ; ladite fluorescence minimale étant induite par une source de lumière rouge de très faible intensité et ladite fluorescence maximale étant induite par une source de lumière blanche halogène ;

b) utilisation de ces deux valeurs de fluorescence pour le calcul de la fluorescence variable $F_V = F_M - F_0$;

c) répartition des mangues dans plusieurs groupes tels que les mangues d'un groupe donné présentant des valeurs de F_V proches ; à titre d'exemple, les mangues pourront être réparties dans un premier groupe de mangues pour lesquelles F_V est inférieur à 75% de F_{V0} , un deuxième groupe de mangues pour lesquelles F_V est compris entre 75 et 82% de F_{V0} et un troisième groupe de mangues pour lesquelles F_V est compris entre 83 et 90%.

Une telle méthode est illustrée à l'exemple 4 ; cette méthode présente l'avantage de préparer des lots de mangues qui mûriront en même temps et qui pourront être commercialisées sans nécessiter un tri sur le lieu de vente.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfèrent à des exemples de mise en œuvre de la présente invention, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

Figures

La **Figure 1** est la représentation schématique d'une mangue comprenant l'indication de ses différents descripteurs.

La **Figure 2** comprend cinq graphes qui représentent : l'évolution de la fluorescence minimale F_0 de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue Cogshall en fonction du temps (A) ; l'évolution de la fluorescence maximale F_M en fonction du temps (B) ; l'évolution de F_V en fonction du temps (C) ; l'évolution du ratio F_V / F_M en fonction du temps (D) et l'évolution de la concentration interne en CO_2 de la mangue en fonction du temps (E).

La **Figure 3** représente le graphe de la concentration interne en CO_2 en fonction de F_V ; les valeurs ont été mesurées pour des mangues portées par un arbre présentant un ratio feuille/fruit de 10 (triangles pleins), 25 (cercles pleins) et 100 (carrés pleins) ou par un arbre présentant un ratio feuille/fruit de 100 bien exposé au soleil (losanges vides) ou à l'ombre (losanges pleins).

La **Figure 4** représente la teneur en sucres solubles totaux de fruits cueillis à différents stades de maturité (à un niveau de F_V haut : « Fluo haute », à un niveau de F_V moyen : « Fluo moyenne » et au stade « point jaune » : « PJ ») ; cette teneur est mesurée sur le fruit à la récolte et après mûrissement.

La **Figure 5** est un histogramme qui représente les teneurs en caroténoïdes totaux de fruits cueillis à différents stades de maturité (à un niveau de F_V haut : « Fluo haute », à un niveau de F_V moyen : « Fluo moyenne » et au stade « point jaune » : « PJ ») ; cette teneur est mesurée sur le fruit à la récolte et après mûrissement.

5 La **Figure 6** est un graphe représentant schématiquement comment sont comptés les jours entre la récolte du fruit, le début de la crise climatérique et le pic climatérique ; la courbe représente de façon théorique l'évolution de l'intensité respiratoire d'une mangue au cours de sa conservation, les abscisses correspondent au nombre de jours après la récolte.

10 La courbe de la **Figure 7** représente l'évolution de l'intensité respiratoire (émission de CO_2) mesurée pendant la conservation de mangues cueillies à différents stades de maturité (à un niveau de F_V haut : « TemA R1 », à un niveau de F_V moyen : « TemA R2 » et au stade « point jaune » : « Tem PJ »). Après la récolte, l'évolution de la maturité des mangues peut être avantageusement suivie par l'intensité respiratoire ; en
15 effet, ce paramètre peut être mesuré simplement et est proportionnel à la concentration interne en CO_2 .

La **Figure 8** est un histogramme qui représente le nombre de jours entre la récolte et (i) le début de la crise climatérique (« délai pré climatérique ») ou (ii) le pic climatérique (« délai pic ») en fonction du niveau de F_V au moment de la cueillette du fruit
20 (niveau de F_V haut : « Fluo haute », niveau de F_V moyen : « Fluo moyenne » et au stade « point jaune » : « Fluo très basse »).

La **Figure 9** est un graphe qui met en évidence la relation empirique linéaire entre les mesures de fluorescence F_V de la chlorophylle de l'épicarpe de mangue effectuées après acclimatation à l'obscurité de la zone de mesure pendant quelques heures
25 et effectuées directement sur la face à l'ombre du fruit, le matin. La droite de régression (trait plein), son équation et son coefficient de détermination, ainsi que son intervalle de confiance à 95% (traits pointillés) sont représentés.

La **Figure 10** représente le nombre de jours entre le premier fruit mûr et le dernier fruit mûr dans les lots de mangues suivants : un lot « vrac » d'environ 50
30 mangues récoltées sur la base de critères empiriques par un producteur, avant l'apparition du point jaune ; puis quatre lots qui résultent de la division du lot « vrac » en 4 groupes selon le niveau de fluorescence de chaque fruit (lot « fluo très basse » pour les fruits récoltés à un niveau F_V très bas ; lot « fluo basse » pour les fruits récoltés à un niveau F_V

bas ; lot « fluo moyenne » pour les fruits récoltés à un niveau F_V moyen et lot « fluo haute » pour les fruits récoltés à un niveau F_V haut).

EXEMPLES

Exemple 1. Etablissement d'une corrélation entre les mesures de fluorescence et la

5 maturité interne de la mangue sur l'arbre

Le suivi non destructif de paramètres pendant le mûrissement du fruit a consisté à mesurer au 2/3 de la saison de croissance des fruits (environ 100-110 jours après la floraison) et jusqu'à ce que les fruits chutent naturellement de l'arbre (stade fruit mûr) : d'une part, les paramètres de fluorescence de la chlorophylle de la peau (épicarpe du fruit), la fluorescence minimale F_0 , la fluorescence maximale F_M et la fluorescence variable $F_V = F_M - F_0$ et l'efficacité photochimique du photosystème II, F_V/F_M , et d'autre part, de 10 l'évolution de la maturité interne de la mangue par des mesures des teneurs internes en CO_2 .

I.A. Méthode de mesure des paramètres de fluorescence

15 La fluorescence de la chlorophylle est mesurée près de l'apex. Les mesures ont été réalisées sur le fruit attaché à l'arbre à intervalle de quatre jours puis de deux jours en s'approchant de la chute du fruit par un monitoring non destructif. La mesure des fluorescences minimale et maximale est réalisée avec un fluorimètre FMS2 (Hansatech, King's Lynn, UK).

20 Avant d'effectuer la mesure, la zone de l'épicarpe sur laquelle la mesure de la fluorescence est faite est mise à l'obscurité pendant 2 heures à l'aide d'un système occultant. F_0 est mesurée à l'aide d'un faisceau lumineux d'une intensité inférieure à $0,05 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; F_M est mesuré après excitation de la fluorescence de la chlorophylle par application d'une lumière saturante ($18000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 2,5 s.

25 I.B. Méthode de mesure de la concentration interne en dioxyde de carbone (reflétant la maturité interne de la mangue)

La concentration interne en dioxyde de carbone est mesurée lorsque le fruit est sur l'arbre. Un collecteur de gaz, réalisé à l'aide d'un petit verre à eau de contenance 30 ml avec, à sa base, un trou recouvert d'un septum, est maintenu 30 h à la 30 surface du fruit à l'aide de mastic ; à l'issue de cette période, la concentration de gaz dans le collecteur est représentative de la concentration interne de gaz dans la mangue.

Le prélèvement d'échantillon est réalisé tôt le matin afin de minimiser l'effet de la température sur le taux de respiration du fruit ; il est effectué à l'aide d'une

aiguille introduite au travers du septum, l'autre extrémité de l'aiguille est reliée à un tube en verre Venoject (tube pour prélèvement d'échantillons de sang, Terumo Corp.).

Après deux minutes (permettant d'équilibrer la pression des gaz dans le collecteur et le tube), le tube et l'aiguille sont retirés. La concentration en CO₂ et O₂ est mesuré par chromatographie en phase gazeuse (avec un chromatographe Agilent M200) équipé de deux collecteurs et de deux colonnes (8m porapak Q, thermostaté à 55°C et MS-5A 4 m thermostaté à 60°C) avec, respectivement, de l'hélium et de l'argon comme gaz vecteur, les deux étant équipés de détecteurs de conductivité thermique.

I.C. Résultats

Les graphes de ces mesures sont représentés à la **Figure 2** ; les paramètres de fluorescences F₀ (A), F_M (B) et F_V (C) commencent à diminuer avant la chute du fruit et avant tout changement de l'épicarpe (qui reflète de façon visible l'entrée en maturation du fruit lorsqu'il est sur l'arbre).

Les variations du rapport F_V/F_M, en fonction du nombre de jours avant le chute du fruit sont totalement différentes des variations observées pour les trois autres paramètres de mesure de la fluorescence ; ce rapport tend à diminuer seulement vers les derniers jours avant la chute du fruit, période qui correspond au changement net de couleur de la mangue. En raison de cette variation trop tardive, le suivi de ce ratio ne permet pas une cueillette du fruit à un stade optimisé.

Les teneurs internes en CO₂ augmentent avant la chute du fruit de l'arbre ; cette augmentation indique l'entrée du fruit dans la crise climatérique.

A partir des suivis non destructifs des paramètres de fluorescence variable F_V de la chlorophylle de l'épicarpe et des teneurs interne en CO₂ dans des conditions très variables de croissance des fruits (rapport feuilles/fruit, position du fruit dans la canopée...), il est possible d'établir une relation empirique entre F_V et la teneur interne en CO₂ ; le graphe de la concentration interne en CO₂ en fonction de F_V est représenté à la **Figure 3**.

La relation déterminée répond à la formule :

$$[\text{CO}_2]_i = a / (1 + b^{c \cdot F_V}) + d$$

Pour la variété Cogshall, les constantes ont pu être déterminées :
 a = 123086,66 ± 10863,39 ; b = 626,26 ± 43,16 ; c = 145,96 ± 35,23 et
 d = 32231,42 ± 4999,54.

Cette relation confirme que l'évolution de ces paramètres de fluorescence reflète bien l'évolution du stade de maturité interne de la mangue sur l'arbre.

Exemple 2. Identification des seuils de fluorescence permettant une récolte de fruit de qualité avant un changement de couleur visible du fruit

Sur la variété de mangue Cogshall, l'évolution de critères de maturité des mangues en conservation et leur qualité finale ont été comparées pour trois stades de récolte basés sur des niveaux de fluorescence :

- « niveau de F_V haut », c'est-à-dire correspondant à une diminution de F_V d'environ 8 à 15% par rapport au niveau de F_V initial (F_{V0}) ;

- « niveau F_V moyen » c'est-à-dire correspondant à une diminution de F_V d'environ 16 à 25% par rapport au niveau de F_V initial (F_{V0}) ;

- et au stade de récolte dit « point jaune » correspondant à un « niveau F_V faible » c'est-à-dire à une diminution de F_V d'environ au moins 38% par rapport au niveau de F_V initial (F_{V0}).

Les critères suivis sont la durée du mûrissement (exprimée en nombre de jours), l'extrait sec soluble, l'acidité titrable, le pH, les teneurs en sucres solubles totaux et en caroténoïdes.

Acidité titrable, extrait sec soluble et enrichissement en sucres (brix)

L'extrait sec soluble est déterminé à l'aide d'un réfractomètre (Atago ATC-AE, Tokyo, Japon). Une goutte de jus de mangue est déposée dans le réfractomètre et la lecture du degré de Brix est notée.

L'acidité titrable est mesurée par titration d'un volume de 10 ml de jus de mangue avec une solution de soude 0,1 N à l'aide d'un titrateur automatique (Titroline Easy Schott, Mainz, Allemagne).

Les mesures, présentées dans le tableau I ci-dessous, montrent un enrichissement des sucres mesurés par l'extrait sec soluble et une dégradation des acides, mesurée par l'acidité titrable des fruits mûrs récoltés à un niveau de F_V moyen (stade pré-climatérique, avant le début de la crise climatérique ou maturation) qui sont comparables à ceux des fruits mûrs récoltés à un stade « point jaune » :

	Brix	Acidité titrable (még/100g)	pH
Fruits récoltés lors de la chute de la fluorescence	17	3.7	4.4
Fruits récoltés au stade "point jaune"	17.5	3.6	4.6

Teneurs en sucres solubles totaux

L'extraction se fait en plaçant 2,5 g de pulpe broyée et décongelée dans 40 ml de solution aqueuse d'alcool éthylique à 80% sous agitation douce pendant une heure. La solution est ensuite centrifugée (5000 rpm pendant 5 minutes), filtrée et évaporée (5 évaporateur rotatif sous vide à 50°C) jusqu'à obtenir environ 5 ml d'extrait. L'extrait est transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml, ajustée (eau ultra pure) et une fraction est stockée à -20°C. Le dosage des sucres est effectué par ampérométrie pulsée (Chromatographie Liquide Haute Performance ionique – Dionex), équipée d'une colonne carbopac PA1 guard + carbopac PA1 (4X250 mm), avec un volume injecté de 25 µl en élution isocratique (80% NaOH à 200 mM – 15% eau). La teneur en sucres solubles totaux est exprimée en g/100 g de matière fraîche (MF).

L'histogramme de la **Figure 4** montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en sucres solubles totaux des fruits cueillis à un niveau de F_V moyen et celles des fruits cueillis au stade point jaune ; les fruits récoltés à un niveau de F_V haut présentent une teneur en sucres solubles totaux légèrement plus faible, toutefois une teneur de 100 mg/g de matière fraîche (10%) est acceptable pour la variété étudiée.

Teneurs en caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes est réalisée dans l'obscurité. 2 g de lyophilisat de mangue sont pesés, 0,05 g de carbonate de magnésium et 50 ml d'un mélange hexane/acétone/éthanol (50:25:25, v/v) sont ajoutés. Après agitation (30 min) et filtration, 50 ml de solvant sont rajoutés à la solution qui est ensuite centrifugée (5000 rpm pendant 5 minutes). Après filtration, la solution est placée dans une ampoule à décanter et lavée avec 50 ml d'une solution aqueuse de NaCl à 10%, rincée avec 2 x 50 ml d'eau distillée, séchée (Na₂SO₄), et récupérée dans une fiole jaugée de 50 ml complétée avec de l'hexane. Une partie de la solution est filtrée à l'aide d'une seringue en verre de 20 ml et d'un filtre hydrophobe de porosité 0,20 µm et est conservée dans un flacon ambré. La teneur en caroténoïdes est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm (Thermospectronic Helios) et exprimée en µg/g de matière fraîche.

La **Figure 5** est un histogramme qui représente les teneurs en caroténoïdes totaux, composés secondaires qui participent à la valeur nutritionnelle de la mangue ; ces teneurs sont inférieures pour les stades de récolte plus précoces que le stade « point jaune », toutefois cette différence est moins marquée pour les fruits récoltés à un niveau F_V moyen. Il n'est pas possible d'obtenir des fruits récoltés plus précocement qu'un stade point jaune avec des teneurs en caroténoïdes équivalentes à celles du fruit mûri sur

l'arbre car ces dernières dépendent directement du temps passé sur la plante ; l'objectif est donc de minimiser l'écart de la teneur en caroténoïdes des fruits mûrs.

Durée du mûrissement

Les courbes des **Figures 6 et 7** représentent l'évolution théorique et mesurée de l'intensité respiratoire d'une mangue au cours de sa maturation en conservation.

L'intensité respiratoire correspond à la consommation d'O₂ et au dégagement de CO₂ d'une mangue, elle est analysée par chromatographie en phase gazeuse.

Principe : le suivi des intensités respiratoires (IR) est réalisé en plaçant les fruits dans une enceinte étanche ambiance confinée et en mesurant l'enrichissement du milieu en dioxyde de carbone et son appauvrissement en oxygène. Pour cela, des enceintes en inox de 18 litres contenant les mangues à étudier sont raccordées à un système multivoies lui-même raccordé à un appareil de chromatographie en phase gazeuse. 6 enceintes peuvent être suivies alternativement. Le prélèvement de l'air se fait en circuit fermé pour chaque enceinte par une électro-vanne. Entre chaque mesure, le volume mort entre le système multivoies et le chromatographe en phase gazeuse (CGP) est purgé par de l'air ambiant.

Pour éviter que les modifications de l'atmosphère affectent le métabolisme des fruits, le confinement ne dure que quelques heures et l'enrichissement en CO₂ ne dépasse jamais 10 000 ppm.

Conditions expérimentales : le CPG utilisé (Agilent M200) est équipé de deux fours, deux colonnes et deux détecteurs.

Pour le dosage du CO₂ : colonne poropak type B, 8 m, à 55°C, gaz vecteur Hélium, détecteur FID (ionisation de flamme).

Pour le dosage de l'O₂ : colonne à tamis moléculaire MS5A, 4 m, 60°C, gaz vecteur Hélium, détecteur TCD (catharomètre).

Un fruit est à maturité de consommation après le pic climatérique, dans la partie descendante de la courbe de la **Figure 6**. A 20-22°C, la maturité de consommation optimale est atteinte entre 1,5 et 3 jours après le pic. Le fruit est alors coloré, souple et présente toutes ses caractéristiques aromatiques.

La durée de conservation à 20°C des fruits récoltés avec un niveau F_v haut ou moyen s'étale sur 10 à 12 jours, dont deux à trois jours de phase pré-climatérique ; la **Figure 8** montre un léger décalage de vitesse de maturation entre des fruits cueillis à un

niveau F_V haut et ceux cueillis à un niveau F_V moyen, et surtout le décalage avec les fruits cueillis au stade « point jaune » qui est le stade de récolte actuelle, trop tardif pour une conservation (le fruit commence à mûrir).

Conclusion

5 Récolter des fruits sur la base de la mesure de la valeur de fluorescence variable F_V de la chlorophylle de la peau permet donc de récolter des fruits plus tôt qu'avec les critères visuels classiques mais ayant pleinement développé leur capacité à mûrir sans altération de leur qualité. Cette récolte précoce permet d'allonger le délai de conservation et de maîtriser la qualité du fruit tout au long de sa maturation comparée à une récolte au
10 stade « point jaune ».

Exemple 3. Mise en évidence d'une relation linéaire entre les mesures de fluorescence faites sur la peau d'un fruit acclimatée à l'obscurité et celles faites directement sur la face à l'ombre du fruit

Le graphique de la **Figure 9** montre une relation linéaire des mesures de
15 fluorescence faites sur la peau d'un fruit acclimatée à l'obscurité et celles faites directement sur la face à l'ombre du fruit. Ainsi la méthode selon l'invention peut être mise en œuvre de façon simplifiée en mesurant la fluorescence de la chlorophylle sous réserve qu'elle soit faite sur une zone de l'épiderme des mangues située à l'ombre.

Exemple 4. Suivi non destructif de l'évolution de la fluorescence de l'épiderme des mangues au cours de leur conservation

20 Ce suivi permet d'évaluer l'homogénéité de maturation d'un lot de fruits triés en fonction de leur niveau de fluorescence.

Un lot de mangues (environ 50 fruits) est récolté sur la base de critères empiriques (cette appréciation se fait en fonction du renflement des épaules de la mangue, de la coloration de l'épiderme, de la coloration du point d'attache du fruit à la panicule) par
25 un producteur, avant l'apparition du point jaune. Ce lot est en suite subdivisé en 4 groupes selon le niveau de fluorescence de chaque fruit : niveau F_V très bas (F_V comprise entre -44 et -35% de F_{V0}), bas (F_V comprise entre -34 et -25% de F_{V0}), moyen (F_V comprise entre -24 et -15% de F_{V0}) et haut (F_V comprise entre -14 et -5% de F_{V0}).

30 La **Figure 10** représente le nombre de jours entre le premier fruit mûr et le dernier fruit mûr dans chacun des lots ; la maturation est évaluée sur la base de l'évolution de la couleur extérieure (coloration et souplesse de l'épiderme, arômes).

Les résultats montrent qu'un tri après récolte sur la base de la F_V permet de réduire l'hétérogénéité de vitesse de maturation due à une hétérogénéité naturelle d'âge

physiologique des mangues. Cette hétérogénéité est liée à la variabilité des dates de floraison (qui peuvent s'étaler sur deux mois) et des conditions de croissance des fruits dans un arbre. Ainsi, en triant les fruits, on constate un décalage de 5 jours entre le premier fruit mûr et le dernier fruit mûr dans le lot « fluo moyenne ». Comparativement, ce délai est de 11 jours pour une récolte empirique.

On peut noter que ce décalage n'est que de 4 jours pour les lots « fluo basse » et « fluo très basse » ; cependant, pour ces lots, le potentiel de conservation est très limité car soit ils mûrissent juste après la récolte (« fluo basse »), soit ils sont déjà en train de mûrir (« fluo très basse »).

REVENDEICATIONS

1. Méthode non destructive de récolte d'une mangue verte comprenant les étapes suivantes :

a) mesure des fluorescences minimale F_0 et maximale F_M de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue verte non cueillie (sur l'arbre); ladite fluorescence minimale étant induite par une source de lumière rouge de très faible intensité et ladite fluorescence maximale étant induite par une source de lumière blanche halogène ;

b) utilisation de ces deux valeurs de fluorescence pour le calcul de $F_V = F_M - F_0$;

caractérisée en ce qu'elle comprend en outre les étapes suivantes :

c) comparaison de la valeur calculée de F_V avec la valeur de la fluorescence variable de ladite mangue verte avant la crise climaterique F_{V0} ;

d) récolte de la mangue dès que F_V représente entre 75 et 90% de la valeur de F_{V0} .

2. Méthode de tri des mangues vertes après leur récolte comprenant les étapes de :

a) mesure des fluorescences minimale F_0 et maximale F_M de la chlorophylle de l'épicarpe d'une mangue verte ; ladite fluorescence minimale étant induite par une source de lumière rouge de très faible intensité et ladite fluorescence maximale étant induite par une source de lumière blanche halogène ;

b) utilisation de ces deux valeurs de fluorescence pour le calcul de la fluorescence variable $F_V = F_M - F_0$;

caractérisée en ce qu'elle comprend en outre l'étape suivante :

c) répartition des mangues dans plusieurs groupes tels que les mangues d'un groupe donné présentent des valeurs de F_V proches, de préférence, en un premier groupe de mangues pour lesquelles F_V est inférieur à 75% de F_{V0} , un deuxième groupe de mangues pour lesquelles F_V est compris entre 75 et 82% de F_{V0} et un troisième groupe de mangues pour lesquelles F_V est compris entre 83 et 90%.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la mesure des fluorescences minimale et maximale de la chlorophylle contenue dans l'épicarpe est réalisée dans la même zone d'épicarpe, sur ou à proximité de l'apex du fruit.

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la mesure des fluorescences minimale et maximale de la chlorophylle est réalisée sur la face à l'ombre du fruit.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la fluorescence minimale F_0 est induite par une source de lumière rouge d'une intensité inférieure ou égale à $0,5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la fluorescence maximale de la chlorophylle F_M est induite par un éclair d'une à trois secondes de lumière blanche de très forte intensité, saturante pour le transfert d'électrons d'intensité compris entre 8000 et 20000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

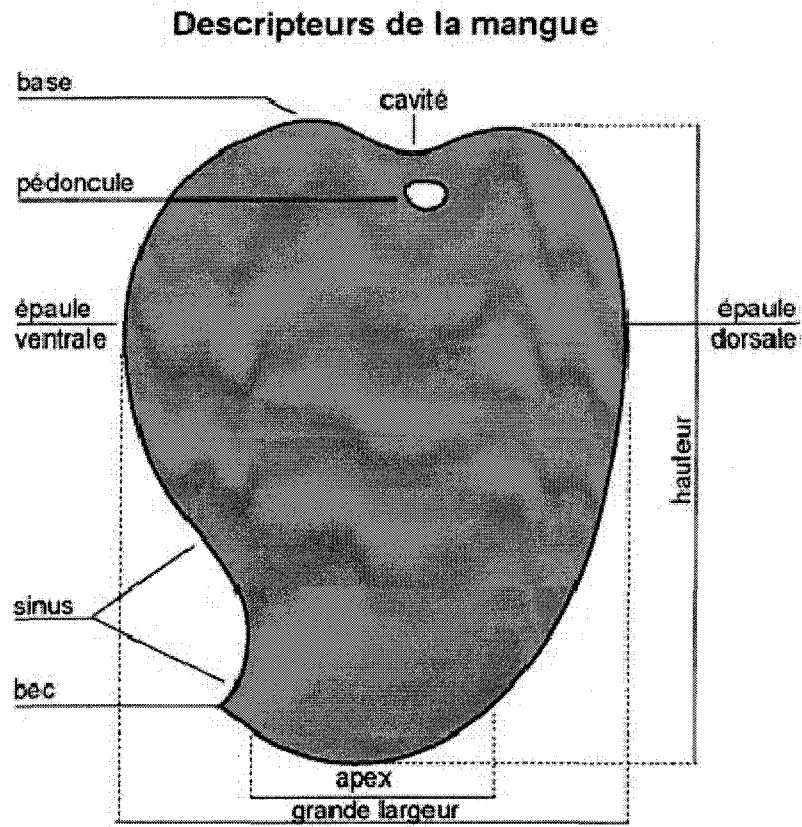


Figure 1

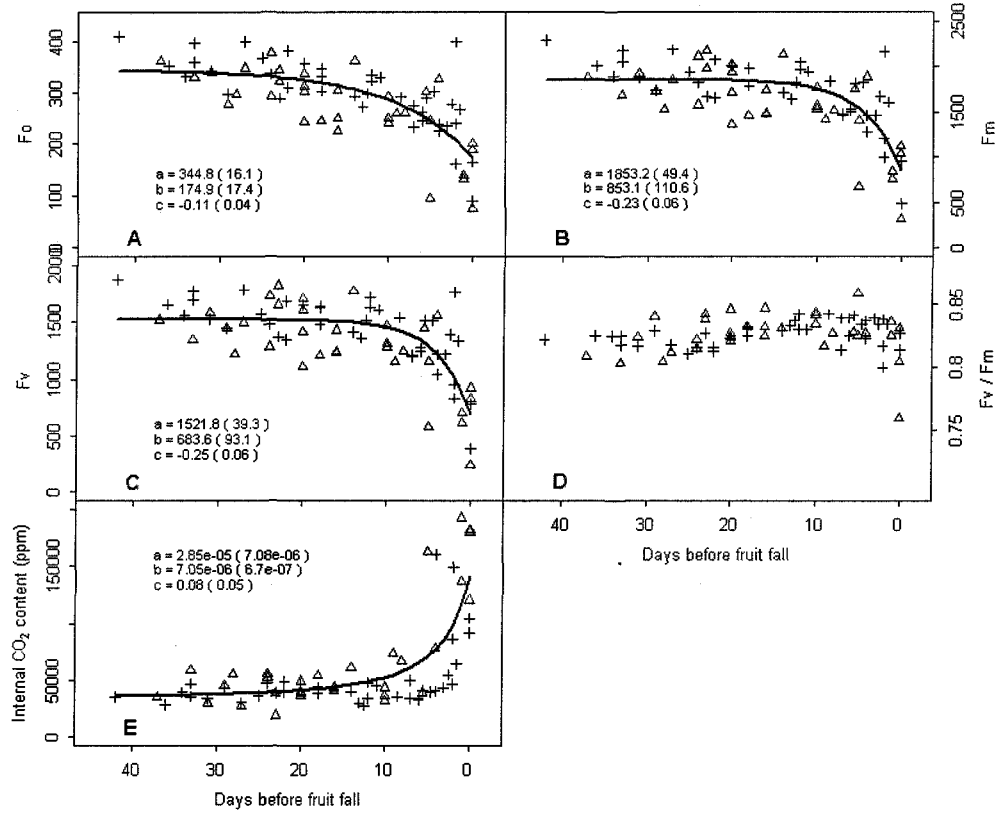


Figure 2

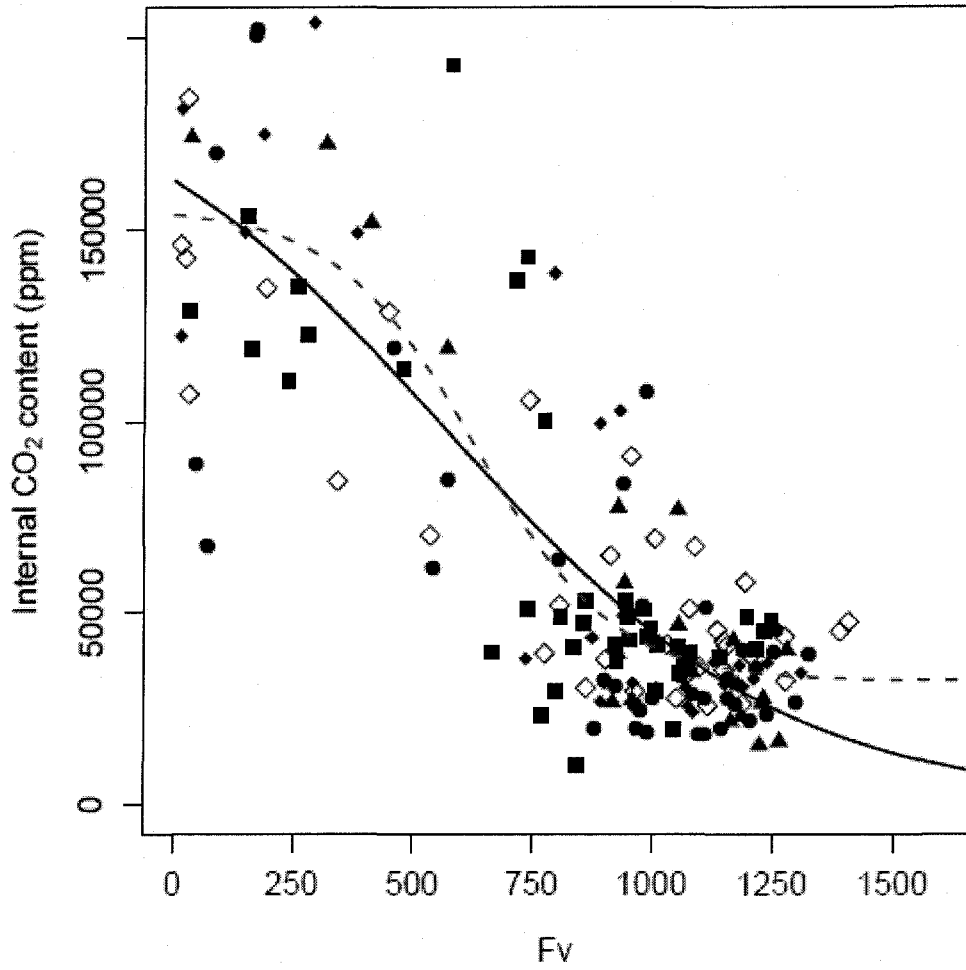


Figure 3

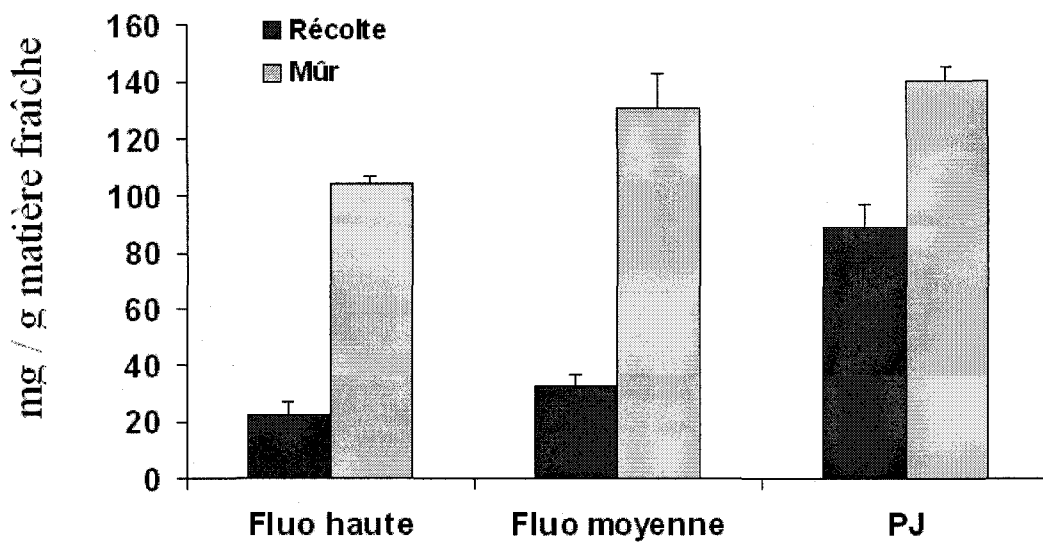


Figure 4

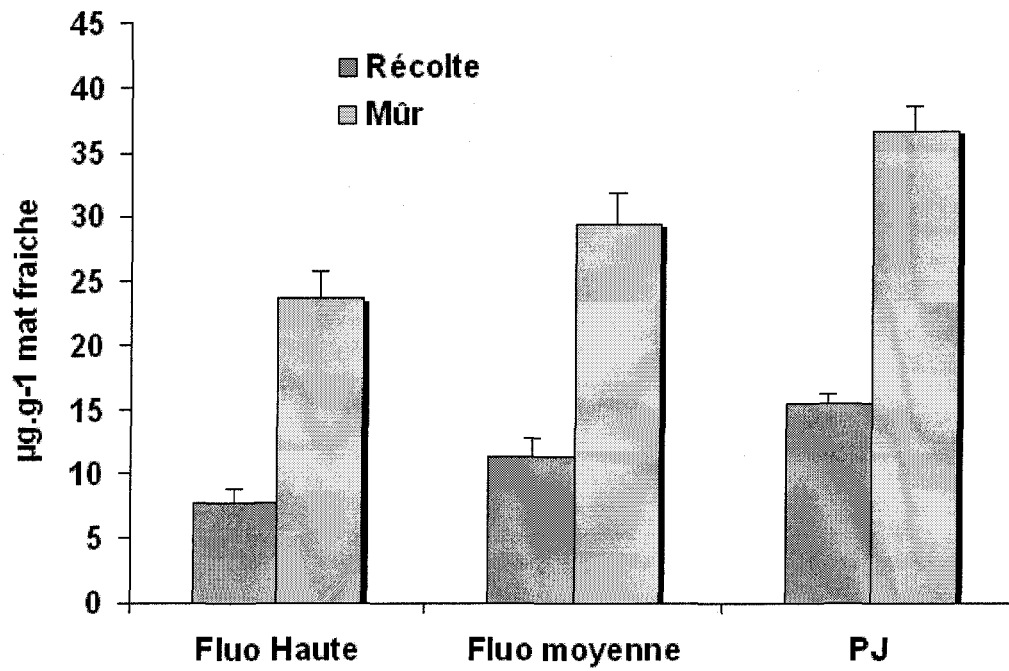


Figure 5

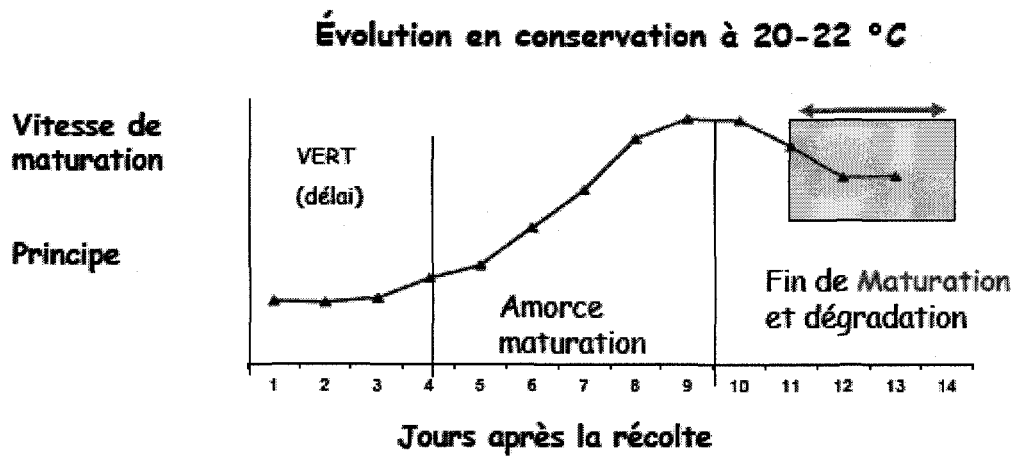


Figure 6

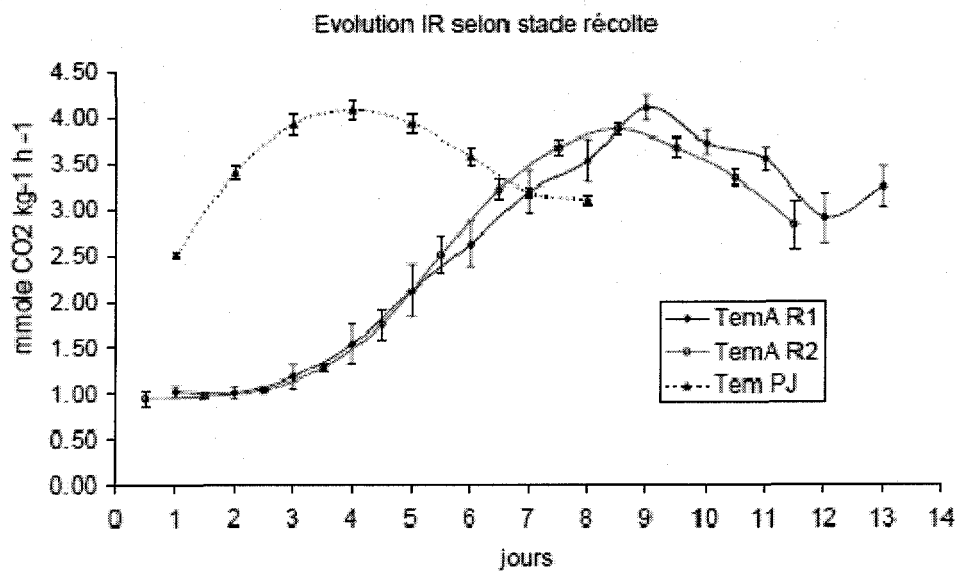


Figure 7

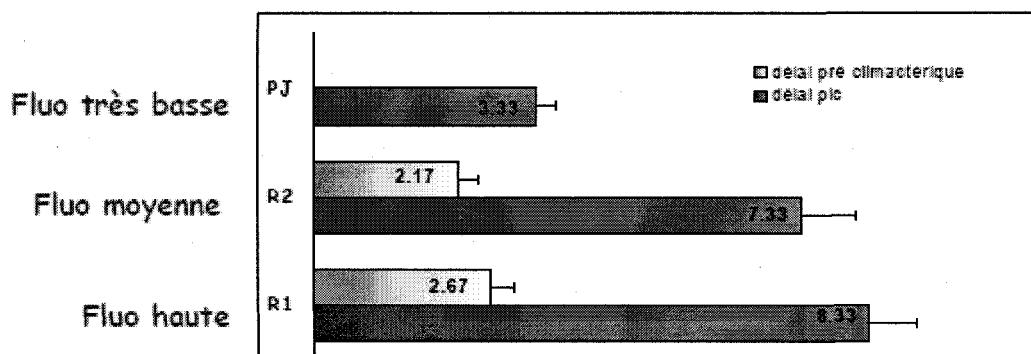


Figure 8

Zone de confiance à 95%

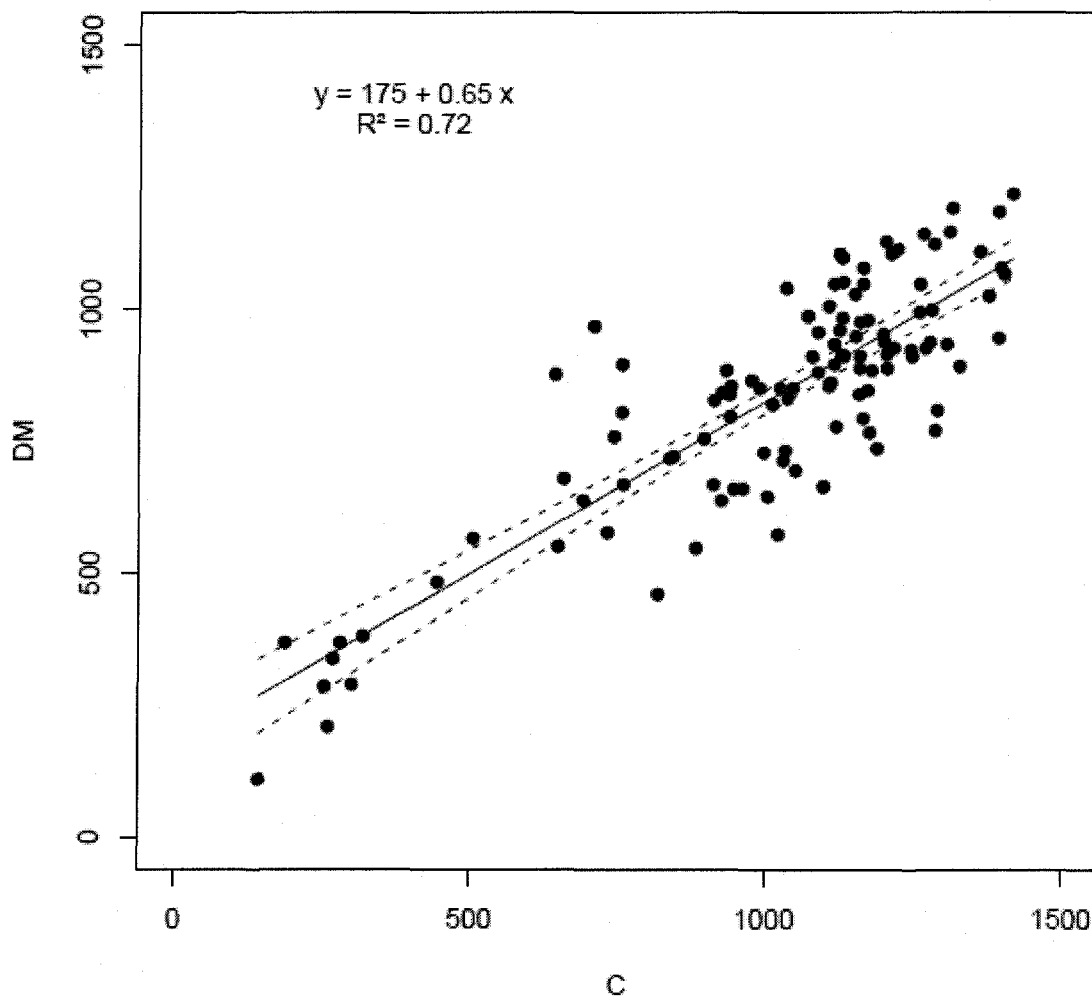


Figure 9

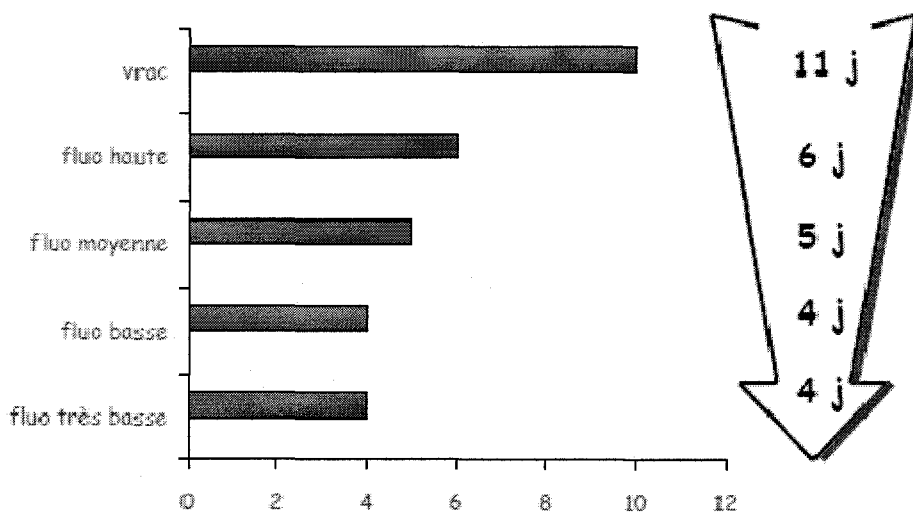


Figure 10

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

NEANT

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL

Mathieu Léchaudel, Laurent Urban, Jacques Joas: "Non destructive evaluation of the degree of maturity on the tree of mango (cv Cogshall) whatever growth conditions: a possible use of chlorophyll fluorescence to supply market with homogeneous batches." In: Jacques Joas: "Incidence de l'état physiologique de la mangue à la récolte sur sa maturation en cours de conservation", 17 octobre 2008 (2008-10-17), Cirad - Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, XP002609442, pages 129-146,

JACQUES JOAS, MATHIEU LÉCHAUDEL: "La qualité des fruits tropicaux après récolte, connaître le passé du fruit pour anticiper son avenir", FRUITS ET LÉGUMES TROPICAUX, décembre 2008 (2008-12), pages 1-2, XP002609443, Montpellier, CIRAD

US 5 822 068 A (BEAUDRY RANDOLPH M [US] ET AL)
13 octobre 1998 (1998-10-13)

SONG J ET AL: "Changes in chlorophyll fluorescence of apple fruit during maturation, ripening, and senescence", HORTSCIENCE, AMERICAN SOCIETY OF HORTICULTURAL SCIENCE, ALEXANDRIA, VA, US, vol. 32, no. 5, 1 août 1997 (1997-08-01), pages 891-896, XP002095167, ISSN: 0018-5345

JACOBI KERYL K ET AL: "Early detection of abnormal skin ripening characteristics of 'Kensington' mango (*Mangifera indica* Linn)", SCIENTIA HORTICULTURAE (AMSTERDAM), vol. 72, no. 3-4, 27 février 1998 (1998-02-27), pages 215-225, XP002609444, ISSN: 0304-4238

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT