

7-349

M. Guille
THE 199

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

PARIS VI

par

Gervais DIEUDONNÉ

Ingénieur ESBMBA-ENSAIA

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR INGENIEUR

Les dérivés hydroxycinnamiques de l'ananas Comosus
variété Cayenne Lisse (Côte d'Ivoire) et leurs relations
avec le brunissement interne

Soutenue le 17 Novembre 1977 devant la Commission d'examen

M.M. D. COME ----- Président

G. BOMPEIX -----

J.J. MACHEIX -----

R. ULRICH -----

P. MARTIN-PREVEL -----

} Examineurs

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

PARIS VI

par

Gervais DIEUDONNÉ

Ingénieur ESBMBA-ENSAIA

pour obtenir

le GRADE de DOCTEUR INGENIEUR

**Les dérivés hydroxycinnamiques de l'ananas Comosus
variété Cayenne Lisse (Côte d'Ivoire) et leurs relations
avec le brunissement interne**

Soutenue le 17 Novembre 1977 devant la Commission d'examen

M.M. D. COME ----- Président

G. BOMPEIX -----

J.J. MACHEIX -----

R. ULRICH -----

P. MARTIN-PREVEL -----

} Examineurs

A MA FEMME ET MES ENFANTS,
AVEC TOUTE MON AFFECTION

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS.

Ce travail a été réalisé :

- dans un premier temps au laboratoire de Physiologie Végétale de l'Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (I.R.F.A.) à Nogent-s/Marne et s'inscrit dans le cadre des recherches sur le brunissement interne de l'ananas de la Côte d'Ivoire.

- dans un second temps au Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte, Centre National de la Recherche Scientifique à Meudon, en accord avec la convention d'études sur le brunissement interne de l'ananas, passée entre l' I.R.F.A. et le C.N.R.S.

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, je voudrais d'abord remercier les personnes qui, à des titres divers, m'ont permis la réalisation de ce travail.

Monsieur le Professeur ULRICH, Directeur honoraire du Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris et du Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte, C.N.R.S., à Meudon, a eu la gentillesse de m'accueillir dans son laboratoire et me fait l'honneur de participer au jury. Qu'il soit assuré de ma respectueuse gratitude.

Ce travail a été conduit sous la direction de Monsieur MACHEIX, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc à Montpellier. Je tiens à lui témoigner ici ma profonde reconnaissance pour sa bienveillance et ses précieux conseils qu'il m'a prodigués pour la réalisation de mes recherches et la rédaction de ce mémoire.

Monsieur le Professeur BOMPEIX, Directeur du Laboratoire de Pathologie Végétale à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris, a bien voulu accepter d'être rapporteur de cette thèse, je l'en remercie très vivement.

Toute ma reconnaissance va à Monsieur MARTIN-PREVEL, Chef de Service du Laboratoire de Physiologie Végétale de l' I.R.F.A.-GERDAT à qui je dois d'avoir pu commencer les premiers travaux de mes recherches dans son laboratoire à Nogent-sur-Marne. Il a bien voulu examiner ce mémoire et faire partie du jury d'examen.

Que Monsieur CUILLE¹, Directeur Général de l'Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes à Paris, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir soutenu matériellement la réalisation de ce travail.

Que Monsieur le Professeur CÔME, Directeur du Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée à l'Université Pierre et Marie Curie à Paris et du Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte, C.N.R.S., à Meudon, Président de mon jury d'examen, trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.

Je remercie à travers l' I.R.F.A., les différents responsables qui se sont occupés de l'approvisionnement en fruits étudiés.

J'associe également à mes remerciements les différentes équipes de recherche du Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte, pour leur gentillesse, en particulier les membres de l'équipe "phénols" pour leur accueil sympathique et les nombreuses marques d'amitié qu'ils ont témoigné à mon égard.

Madame MARCON, Secrétaire au Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte, a dactylographié ce mémoire, je la remercie vivement de sa gentillesse et de sa compétence.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

A.I.A. oxydase	:	Acide indol-acétique oxydase
B.I.	:	Brunissement interne
D.O.	:	Densité optique
I.R.F.A.	:	Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes.
P.O.	:	phénols-oxydases
P.A.L.	:	phénylalanine. Ammonia-Lyase

Solvants utilisés pour la chromatographie

A.A. 2 %	:	Acide acétique à 2 %
A.B.A.E.	:	Acétate de butyle-Acide acétique-Eau (4-1-5)
B.A.	:	Butanol-Ammoniaque (1-1)
B.A.E.	:	Butanol-Acide acétique-Eau (20-7-10) et (4-1-5)
B _Z A.E.	:	Benzène-Acide acétique-Eau (6-7-3)
M.F.E.	:	Méthyl-isobutyl-cétone - Acide formique-Eau (3-1-2)

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I - MATERIEL et CONDITIONS d'ETUDE</u>	7
A - <u>MATERIEL VEGETAL ETUDIE.</u>	
1 - L'Ananas	7
2 - Modalités d'approvisionnement - Origine des fruits étudiés	7
3 - Zones de localisation du B.I. dans l'ananas	9
B - <u>CONDITIONS EXPERIMENTALES de CONSERVATION</u>	10
1 - Simulation de transport à 8°C et de conservation à 20°C	10
2 - Calendrier du prélèvement des échan- tillons	11
3 - Remarques sur les fruits traités	11
C - <u>CONDITIONS d'ECHANTILLONNAGE</u>	12
1 - Rappel sur les critères retenus pour le choix du type d'échantillonnage	12
2 - Techniques d'échantillonnage	13
<u>CHAPITRE II - EXTRACTION, SEPARATION et IDENTIFICATION</u> <u>des COMPOSES PHENOLIQUES de l'ANANAS</u> ..	15
I - <u>TECHNIQUES UTILISEES.</u>	
A - <u>TECHNIQUES d'EXTRACTION</u>	15
1 - Description du protocole expérimental ..	15
2 - Critique de la méthode d'extraction	16

	<u>Pages</u>
B - <u>PURIFICATION des EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES</u>	18
1 - Préparation des extraits	19
2 - Dépigmentation	19
3 - Extraction à l'acétate d'éthyle	20
C - <u>SEPARATION des COMPOSES PHENOLIQUES</u>	20
1 - Chromatographie sur couches minces	20
2 - Chromatographie sur papier	21
II - <u>IDENTIFICATION des COMPOSES PHENOLI-</u>	
<u>QUES de l'ANANAS</u>	
26	
A - <u>LES GROUPEs de COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS</u>	27
B - <u>LES DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES</u>	27
1 - Présentation générale	27
2 - Le produit d'hydrolyse de l'extrait	29
3 - Composés phénoliques dont les caractéris- tiques sont identiques à celles de l'acide p-coumarique et de ses dérivés	29
4 - Composés phénoliques dont les caractéris- tiques de fluorescence aux U.V. sont très voisines de celles de l'acide férulique et de ses dérivés	34
5 - Composés phénoliques possédant des caractè- res proches de ceux de l'acide sinapique et de ses dérivés	36
6 - Composés phénoliques dont les caractéristi- ques sont voisines de celles de l'acide chlorogénique	37
7 - Les autres formes de dérivés hydroxycinna- miques insolubles ou partiellement solubles à l'alcool à 80°, à l'éther de pétrole et à l'acétate d'éthyle	41
Conclusion sur les dérivés hydroxycinnamiques ...	43
 <u>CHAPITRE III</u> - <u>DOSAGES des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES</u> ...	 48
I - <u>TECHNIQUES UTILISEES POUR CES DOSAGES</u>	

A	- <u>ESTIMATION de la TENEUR GLOBALE en DERIVES</u>	
	<u>HYDROXYCINNAMIQUES par LECTURE DIRECTE du SPECTRE</u>	
	<u>de l'EXTRAIT</u>	48
	1 - Estimation de l'extrait non purifié	48
	2 - Estimation de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques de l'extrait purifié ...	50
	3 - Variabilité liée à la méthode de dosage et au matériel	51
B	- <u>DOSAGE des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES APRES</u>	
	<u>SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE</u>	52
	1 - Processus expérimental	52
	2 - Etude critique de quelques aspects du processus expérimental	54
	II - <u>REPARTITION des DERIVES HYDROXYCINNA-</u>	
	<u>MIQUES dans l'ANANAS</u>	59
A	- <u>CONDITIONS EXPERIMENTALES</u>	59
B	- <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	60
	1 - Variations de la teneur globale liées au degré de maturité du fruit	60
	2 - Variations des teneurs en composés phénoli- ques individuels dans les différentes zones du fruit	61
	3 - Etude comparée des gradients de P ₃ et de P ₅ dans quelques fruits	62
	Conclusion	64
	III - <u>EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMI-</u>	
	<u>QUES au COURS de la MATURATION</u>	66
A	- <u>CARACTERISTIQUES GENERALES des FRUITS UTILISES</u> ..	66
	1 - Les fruits verts	66
	2 - Les fruits 3/4 mûrs	67
	3 - Les fruits 4/4 mûrs	67
B	- <u>ETUDE QUALITATIVE</u>	67

	<u>Pages</u>
C - <u>ETUDE QUANTITATIVE</u>	68
1 - Estimation de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques	68
2 - Dosage des principaux dérivés hydroxycinna- miques	68
Conclusion et Discussion	69
<u>CHAPITRE IV - LES RELATIONS ENTRE les DERIVES HYDROXYCIN-</u> <u>NAMIQUES de l'ANANAS et le BRUNISSEMENT</u> <u>INTERNE</u>	72
I - <u>COMPARAISON ENTRE ANANAS SAIN et</u> <u>ANANAS BRUNI</u>	72
A - <u>COMPARAISON ENTRE FRUITS FRAIS et FRUITS SAINS</u> <u>APRES CONSERVATION</u>	73
1 - Aspects qualitatifs	73
2 - Aspects quantitatifs	74
B - <u>COMPARAISON ENTRE FRUITS BRUNIS et FRUITS SAINS</u> <u>APRES CONSERVATION</u>	75
1 - Etude qualitative	75
2 - Gradients comparés des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques dans les fruits non brunis et brunis	81
3 - Etude quantitative	82
CONCLUSION	85
II - <u>VARIATIONS des TENEURS en DERIVES</u> <u>HYDROXYCINNAMIQUES au COURS de la</u> <u>CONSERVATION de l'ANANAS</u>	87
A - <u>FRUITS UTILISES</u>	87
B - <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	89
1 - Résultats sur broyats	89
2 - Résultats sur fruits individuels	90

	<u>Pages</u>
3 - Interprétation des résultats	92
Conclusion	93
III - <u>LES SUBSTRATS du B.I. de l'ANANAS</u> ..	95
1 - Effet de pulvérisation de préparations enzymatiques sur des chromatogrammes d'extraits d'ananas	95
2 - Effet d'adjonction de solution de tyrosinase à des extraits tamponnés d'ananas	96
3 - Brunissement réel, sans apport de tyrosinase.	97
4 - Autres activités enzymatiques	98
5 - Action d'un inhibiteur de brunissement, l'acide ascorbique sur les extraits d'ananas brunis	99
IV - <u>RECHERCHE d'une CORRELATION ENTRE l'INTENSITE du B.I. et la TENEUR en DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES</u>	101
1 - Etude corrélative entre l'intensité du B.I. et la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques	102
2 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en o-diphénols	103
3 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P ₅	103
4 - Remarques sur les valeurs théoriques calculées	103
5 - Corrélation entre intensité du B.I. et D.O. à 280 nm de l'extrait de la phase aqueuse (PA)	104
V - <u>RECHERCHE d'une CORRELATION ENTRE l'APPARITION du B.I. et l'EVOLUTION des O-DIPHENOLS</u>	106
VI - <u>INFLUENCE de QUELQUES FACTEURS PHYSIQUES ou PHYSIOLOGIQUES sur l'EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES au COURS de la CONSERVATION de l'ANANAS en RAPPORT avec l'APPARITION du BRUNISSEMENT INTERNE</u>	109

	<u>Pages</u>
A - <u>INFLUENCE de la TEMPERATURE de CONSERVATION sur</u> <u>l'EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES</u>	110
1 - Conservation à deux paliers de température, à 8°C et à 20°C	110
2 - Conservation à température constante, à 8°C.	111
3 - Conservation à température constante, à 20°C	111
 B - <u>INFLUENCE de la MATURATION sur l'EVOLUTION des</u> <u>DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES LIEE à l'APPARITION</u> <u>du B.I.</u>	 113
1 - Fruits 4/4 mûrs à la récolte	113
2 - Fruits verts à la récolte	115
CONCLUSION	117
 <u>CONCLUSIONS - DISCUSSION</u>	 118
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 127

I N T R O D U C T I O N

Le brunissement est un phénomène courant chez les fruits charnus atteints d'accidents d'origine parasitaire ou de traumatismes physiques (FIDLER et COURSEY, 1969). Suivant les conditions d'apparition, il peut être :

- superficiel, dû fréquemment à une blessure. Ce type de brunissement s'observe chez certains fruits lorsqu'ils sont sectionnés : pomme, poire ... ; la surface de section se colore plus ou moins rapidement en brun. L'échaudure que l'on rencontre fréquemment chez les mêmes fruits en conservation est une forme de brunissement superficiel.

- interne, se localisant alors dans les parties profondes des fruits. Il accompagne généralement les maladies de conservation (ULRICH et MARCELLIN, 1968) dont le "chilling injury", terme anglo-saxon désignant les accidents physiologiques qui surviennent à basse température mais supérieure à la température du point de congélation. Il apparaît, soit à basse température, soit uniquement après remise des fruits à des températures plus élevées (SMITH, 1940, 1947 ; TING et ATTAWAY, 1971). Un brunissement à la décongélation peut, en outre, être observé chez les pêches (GUADAGNI et al., 1949 ; GRICE et al., 1952 ; MOTAWI, 1966 ; BAUERNFEIN et al., 1970) ou les avocats (RAMIREZ-MARTINEZ et LUH, 1973).

Le brunissement de l'ananas est un brunissement interne. Plusieurs termes ont été utilisés suivant le faciès, les zones de localisation, les conditions physiologiques d'apparition du brunissement : "endogenous brown spot" (LINFORD, 1932, 1944), "physiological breakdown" (MILLER, 1951 ; MILLER et al., 1952, 1953), "black heart" et "black heart disease" (SHON KUNG SUN, 1971 ; LEVERINGTON, 1973, cité par l'I.R.F.A., 1975). Selon DULL (1971) le

"physiological break down" n'est pas différent du black heart ou du black heart disease et tous deux correspondent au brunissement interne (B I) décrit et défini par TISSEAU et TISSEAU (1970) ; TEISSON (1972) ; I.R.F.A., 1975).

Le brunissement interne de l'ananas Comosus, variété Cayenne lisse, a depuis longtemps suscité de nombreuses recherches tant les paramètres et les facteurs qui peuvent intervenir sont divers. Ce n'est qu'en 1932 que LINFORD a montré l'origine non parasitaire de ce brunissement, qu'il a confirmée en 1942 en donnant un certain nombre de caractéristiques parmi lesquelles les basses températures qui semblent être une des conditions d'induction du phénomène. Ces résultats ont été ensuite confirmés par les travaux de divers auteurs (IVANOFF, 1946 ; MILLER et al., 1952, 1953). Restées dans l'oubli pendant quelque temps les recherches ont été reprises depuis qu'on s'est aperçu de l'importance économique du problème de brunissement interne pour les pays exportateurs et importateurs. Les études entreprises ont été surtout orientées à des fins pratiques mettant en oeuvre divers traitements, chimiques (TISSEAU, 1963 ; TISSEAU et TISSEAU, 1970, 1971 ; TEISSON, 1972 ; I.R.F.A., 1975) ou thermiques (AKAMINE et al., 1975). Une diminution du B I a été obtenue dans les deux cas sans qu'on puisse cependant arriver à le supprimer complètement ou à expliquer le mécanisme du brunissement et de l'action de chaque facteur.

Un mécanisme du Chilling injury a été proposé par LYONS (1973) s'inspirant de LYONS et RAISON (1970) et de LEVITT (1972). A basse température il se produisait une solidification des lipides membranaires provoquant une fissuration. La perméabilité des membranes augmente et l'équilibre ionique est rompu entraînant un désordre et une perte d'ions observée dans les tissus atteints. L'énergie d'activation des enzymes augmente aussi bien dans les mitochondries que dans les chloroplastes. L'activité des enzymes solubles diminue alors que la température baisse. Le déséquilibre entre ces deux systèmes entraîne l'accumulation de métabolites. Une autre conséquence est l'arrêt du courant cytoplasmique ayant pour effet un approvisionnement en énergie médiocre. Il se forme par ailleurs à partir des acides gras insaturés des peroxydes lipidiques (LEVITT, 1972).

Ces hypothèses ont été le point de départ de nouvelles orientations de recherche quant à l'étude du brunissement interne de l'ananas sur le plan physiologique et métabolique (I.R.F.A., 1975 ; TEISSON, 1977).

Depuis les travaux de LINDET (1895) les connaissances sur la nature enzymatique de nombreux brunissements sont définitivement acquises (JOSLYN et PONTING, 1951 ; MASON, 1955 ; MATHEW et PARPIA, 1971 ...). La mise en évidence de la phénoloxydase (P.O.) et son isolement ont fait l'objet de nombreuses études (JOSLYN et PONTING, 1951 ; MASON, 1955 ; HULME, 1958a ; PRIDHAM, 1963 ; HAREL et al., 1965 ; WALKER et HULME, 1966 ; CONSTANTINIDES, 1967 ; HAREL et MAYER, 1968 ; MATHEW et PARPIA, 1971). L'oxydation des phénols par la P.O. ou éventuellement les peroxydases (TEISSON, 1977) conduit à la formation des produits colorés qui caractérisent le brunissement. Deux étapes de réactions sont généralement considérées :

- une étape enzymatique où les phénols sont transformés en quinones éventuellement réductibles,
- une étape non enzymatique correspondant à une polymérisation et une condensation des quinones. Les produits formés constituent les complexes bruns.

D'autres réactions d'oxydation sont possibles à partir des phénols pouvant conduire à des brunissements non enzymatiques (INGRAHAN et CORSE, 1951) à des modifications de coloration vers le jaune ou le brun par chélation avec des ions métalliques.

Tous les phénols n'interviennent et ne réagissent cependant pas de la même manière dans le phénomène du brunissement. La chélation concerne généralement les phénols o-dihydroxylés ou trihydroxylés (JURD et GEISSMAN, 1956 ; RIBEREAU-GAYON, 1968) mais des cas où des monophénols entrent en combinaison, sont également signalés (HAYASHI, 1962).

Dans le cas du brunissement enzymatique les monophénols ne sont pas directement attaqués par les P.O. (WILLIAMS, 1960 ; SWAIN, 1962) mais peuvent être dégradés par le phénomène d'oxydations induites (ROBERTS, 1957) où l'acide chlorogénique semble jouer un rôle (SWAIN, 1962 ; LAVOLLAY et al., 1963 ; MONTIES, 1966 ...). Par contre les o-diphénols sont les substrats majeurs des P.O., tels l'acide chlorogénique (WEURMAN et SWAIN, 1953 ; HULME, 1958 ; WALKER, 1964 ; SHANNON et PRATT, 1967) et les catéchines (SIEGELMAN, 1955) chez la pomme. Les catéchines sont aussi des substrats préférentiels de brunissement chez la poire (LUH et al., 1953) et chez la pêche (LUH et al., 1967). Dans la banane le substrat de brunissement est la 3-4-dihydroxyphénylalanine (GRIFFITHS, 1959) mais l'acide chlorogénique peut

également intervenir (MATHEW et PARPIA, 1971). Ainsi que le rappelle MACHEIX (1970) le brunissement enzymatique dépend d'un certain nombre de facteurs :

- de l'activité des P.O., ou éventuellement des peroxydases (TEISSON, 1977),
- de la teneur en substrats oxydables,
- de la teneur en oxygène,
- de la présence de co-facteurs, d'inhibiteurs de brunissement dont le plus connu, entre autres, est l'acide ascorbique. La prépondérance de l'un ou de l'autre facteur a été souvent l'objet d'hypothèses très discutées. Selon GUADAGNI et NIMMO (1953), l'intensité du brunissement est en rapport direct avec la teneur en phénols oxydables de la pomme. D'après les travaux de BLAKE et DAVIDSON (1941) sur les pêches, de WALKER (1964a) et HAREL et al. (1966) sur les pommes, de RANADINE et HAARD (1971) sur les poires, la teneur en "tanins" oxydables est capitale dans l'aptitude au brunissement. WEURMAN et SWAIN (1956), MOTAWI (1966) préconisent que la teneur en substrats est indispensable mais le facteur le plus important dans le brunissement enzymatique de la pomme est l'activité in situ de l'enzyme. Contrairement à l'hypothèse de BOGDANSKI (1954), les mêmes auteurs suggèrent que l'action inhibitrice de l'acide ascorbique n'est pas prépondérante dans le brunissement de la pomme. WALKER (1962) montre qu'il n'existe, chez la pomme, aucune relation précise entre la teneur en acide ascorbique et le brunissement ; par contre, il trouve une corrélation nette entre la teneur en acide chlorogénique et le brunissement. L'importance relative des divers facteurs peut d'ailleurs varier considérablement avec l'âge du fruit (MACHEIX, 1970). Selon MILLER (1951, 1952, 1953) la teneur en acide ascorbique diminue au fur et à mesure que le brunissement devient fort chez l'ananas. L'I.R.F.A. (1975) et TEISSON (1977) trouvent une corrélation nette avec l'intensité du B I entre l'activité de la P.O. qui augmente et la teneur en acide ascorbique qui diminue.

L'abondance des phénols dans certains organes végétaux notamment les fruits qui entrent d'une manière très diverse et en quantité importante dans l'alimentation de l'homme, pose le problème de leur devenir dans l'organisme humain. CHASSEVENT (1969) a dégagé les principales actions physiologiques et pharmacologiques de l'acide chlorogénique. Certains phénols ont un effet plus ou moins direct sur l'organisme humain. Ainsi les catéchines (LAVOLLAY et PARROT, 1942 ; LAVOLLAY et al., 1943 ; GAZAVE et al., 1974) ont une action

vitaminique P et jouent un rôle dans la résistance capillaire. Les tanins condensés en s'associant irréversiblement aux protéines entraînent une diminution de la valeur biologique des aliments (MITJAVILA, 1973). Les o-diphénols, en particulier l'acide chlorogénique, participent à la préparation des N-nitrosamines, connues pour leur action cancérogène (CHALLIS et BARLETT, 1975).

Un des intérêts particuliers qu'offrent en outre les dérivés hydroxycinnamiques, est leur distribution quasi universelle chez les plantes supérieures et leur concentration relativement importante dans la plupart des fruits. L'état actuel des connaissances sur les dérivés hydroxycinnamiques est déjà assez avancé mais des précisions restent à apporter quant à leur mode d'action, à la détermination de leur rôle, à l'identification de leur structure.

Sur le plan des composés phénoliques les fruits tropicaux, en l'occurrence l'ananas, ont été très peu étudiés en raison peut-être de l'éloignement géographique des centres de recherche européens ou occidentaux par rapport à leurs sources d'approvisionnement.

En 1956, BATE-SMITH a signalé l'existence de l'acide sinapique chez les Broméliacées. GORTNER et al. (1958) et GORTNER (1963a) ont mis en évidence dans les feuilles et la tige de l'ananas, la présence de deux acides phénoliques libres ou à l'état d'esters : l'acide p-coumarique et l'acide férulique. Auparavant, l'acide di-p-coumaryl 1-4 quinique avait été identifié dans la tige de l'ananas par SUTHERLAND et GORTNER (1959). En dehors de ces travaux aucune étude n'a été entreprise dans le fruit ananas, en ce qui concerne les phénols.

Le but de ce travail est donc d'essayer d'identifier les composés phénoliques de l'ananas, d'étudier leur évolution en rapport avec quelques phénomènes physiologiques dont la maturation, et de définir éventuellement le rôle qu'ils peuvent jouer dans la maladie dite de brunissement interne (B I).

Nous exposerons dans le Chapitre I, le matériel végétal et les méthodes d'étude. Le Chapitre II comportera l'extraction, la séparation et l'identification des composés phénoliques de l'ananas. Leur dosage sera traité dans le Chapitre III en étudiant les gradients et l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation. Nous envisagerons ensuite dans le Chapitre IV une étude comparative entre fruits non brunis et fruits brunis, une étude sur les variations des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la conservation, sur les substrats éventuels du B I, et une recherche de corrélation

entre l'intensité du brunissement interne et la teneur en o-diphénols et autres dérivés hydroxycinnamiques. A la fin du Chapitre IV nous essaierons de mettre en évidence l'influence de quelques facteurs physiques ou physiologiques sur l'évolution de ces composés phénoliques en rapport avec l'apparition du B.I.

C H A P I T R E I

MATERIEL et CONDITIONS d'ETUDE

A - MATERIEL VEGETAL ETUDIE.

1 - L'ananas.

La variété d'ananas que nous avons étudiée est la Cayenne Lisse, de l'espèce *Ananas Comosus* (COLLINS, 1960 ; DULL, 1971 , L.R.F.A., 1975, ...). L'intérêt scientifique qu'elle présente est son abondante disponibilité dans le commerce, grâce à une technique d'induction florale artificielle permettant de planifier la production et la récolte tout au long de l'année.

2 - Modalités d'approvisionnement - Origine des fruits étudiés.

a - Rappel : les conditions de distribution de l'ananas du commerce.

Le circuit commercial de l'ananas passe par deux phases :

- une phase de transport correspondant au transport par bateau dans des cales réfrigérées à 8°C pendant une durée d'environ 10 jours, jusqu'au port européen de débarquement.

- une phase de conservation comprenant le transit aux ports et entrepôts et ensuite la commercialisation des fruits chez les détaillants dans des conditions thermiques variables dont la moyenne générale retenue est égale à 20°C.

Nous avons étudié quelques uns de ces fruits achetés au marché dans le but d'avoir des éléments de comparaison avec les fruits traités au laboratoire.

b - Les fruits traités.

Tous les fruits qui ont fait l'objet de nos expérimentations en laboratoire ont été choisis (site de plantation, stade de maturation, poids) et fournis par l'Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes (I.R.F.A.) de Paris et proviennent de ses deux stations en Côte d'Ivoire et en Martinique.

b/1 - Fruits traités en région parisienne.

L'acheminement des fruits vers Paris a été effectué par avion et nous les avons reçus un à deux jours après la cueillette. Les fruits frais qui ne subissent pas des conditions thermiques de conservation sont échantillonnés aussitôt leur arrivée. Nous reviendrons sur les conditions expérimentales des fruits de conservation dans un paragraphe ultérieur.

b/2 - Fruits traités aux stations de l'I.R.F.A.

D'autres fruits ayant subi une simulation de transport à 8°C et de conservation à 20°C, aux laboratoires de l'I.R.F.A. en Côte d'Ivoire et en Martinique, ont été également étudiés. Cependant le mode d'échantillonnage est différent de celui que nous avons généralement adopté et qui sera décrit ultérieurement.

Remarques sur le choix des différents stades de maturation des fruits étudiés.

- Trois stades de maturation ont été choisis pour l'ensemble des fruits :
 - fruits verts, peau entièrement verte, récoltés 15 jours avant la cueillette normale,
 - fruits 3/4 mûrs dont 3/4 de la hauteur du fruit jaune,
 - fruits 4/4 mûrs dont 4/4 de la hauteur du fruit jaune à la récolte, en mûrissant entièrement sur pied.

- De nombreuses observations ont été rapportées par divers auteurs sur la sensibilité des fruits au brunissement interne (B.I) (MILLER, 1951 ; MILLER et al., 1952, 1953 ; TISSEAU et TISSEAU, 1970 ; SHON KUNG SUN, 1971). Les fruits plus mûrs s'avèrent moins sensibles au B I que les fruits moins mûrs alors que les fruits verts le sont plus comparativement aux fruits mûrs classiques (LEVERINGTON, 1973, cité par l'I.R.F.A. ; I.R.F.A., 1975). Des résultats inverses ont été observés parfois dans les fruits verts par les mêmes auteurs.

L'ensemble de ces observations nous a conduit à nous intéresser non seulement à des fruits dits mûrs (3/4 mûrs, généralement) qui sont les plus courants et les mieux connus au point de vue B I, mais aussi à des fruits verts et des fruits surmûrs (4/4 mûrs), qui constituent en sorte des cas extrêmes.

3 - Zones de localisation du B I dans l'ananas.

L'ananas est un ensemble de petits fruits individuels soudés les uns aux autres et insérés directement autour de l'axe cylindrique central ou coeur. Ces fruits individuels sont appelés couramment yeux.

Dans toute la suite de l'exposé nous désignerons par oeil chaque fruit individuel et par fruit l'ananas entier.

Les symptômes du B I se localisent et se développent généralement au niveau de la base des yeux de la moitié supérieure du fruit, bien qu'on note quelquefois du B I dans l'axe cylindrique central notamment dans les vaisseaux conducteurs qui viennent ensuite irriguer la base des yeux. Quand le B I n'existe qu'à l'état de traces, les tissus de la base des yeux deviennent légèrement gris, translucides et vitreux (I.R.F.A., 1975 ; TEISSON, 1977, observations personnelles). Dans le cas du B I avancé la plupart des tissus constituant la base des yeux et ceux qui les environnent, brunissent. Le B I gagne ensuite et progressivement les yeux. Cependant même dans les cas très sévères il est rare d'observer un B I atteignant les zones périphériques sub-corticales de la pulpe.

La moitié inférieure du fruit ne présente généralement pas de B I. Une réserve doit toutefois être faite concernant les fruits verts ou à peine tournants au jaune, dans lesquels un B I particulier dit "en colonne" se produit sur toute la hauteur du fruit et autour de l'axe cylindrique central. Ce brunissement a été rencontré chez des fruits verts expérimentés, et étudié.

Nous avons tenu compte de ces différentes zones de localisation du B I dans le type d'échantillonnage que nous avons adopté, d'autant qu'il existe un gradient de maturité sensible entre le bas et le haut du fruit.

Nous étudierons uniquement la pulpe du fruit. La peau, la couronne et le pédoncule, qui sont les organes d'échanges et dont les modifications morphologiques constituent des critères de base pour la détermination du stade

de maturation et de la récolte du fruit (SINGLETON, 1965 ; SINGLETON et GORTNER, 1965 ; GORTNER, 1965 ; TEISSON, 1973b), n'ont pas fait l'objet d'une étude particulière dans ce travail.

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES de CONSERVATION.

1 - Simulation de transport à 8°C et de conservation à 20°C.

Pour effectuer des prélèvements d'échantillons il est irréalisable de suivre les circuits de l'ananas du commerce (transport par bateau, stockage dans les centres de distribution, conservation chez les détaillants, ...). Aussi avons-nous essayé de transposer les conditions pratiques en faisant une simulation de transport à 8°C et de conservation à 20°C.

a - Simulations réalisées aux stations de l'I.R.F.A.

Les conditions expérimentales suivies sont celles définies et rapportées par l'I.R.F.A. (1975) :

- mise des fruits au froid à 8°C pendant 10 jours,
- sortie de chambres froides et mise à 20°C,
- observation au bout de 7 jours à 20°C.

Les fruits ainsi traités en Côte d'Ivoire ou en Martinique nous parviennent aux laboratoires (région parisienne), soit à l'état de fruits entiers, soit sous forme de broyats congelés de pulpe de fruits. Chaque broyat représente 3 à 6 fruits ayant les mêmes dates de prélèvement et les mêmes notes de B I et broyés globalement ensemble.

b - Simulations réalisées en région parisienne.

Dans des conditions semblables à celles des expériences précédentes, des simulations de "conservation" ont été faites en laboratoire. Nous désignons ici par conservation l'ensemble des traitements thermiques subis par le fruit comprenant la réfrigération à 8°C et la mise à 20°C.

Dans un premier temps les fruits sont placés dans des cellules étanches aux gaz et maintenus à une température de 8°C pendant 10 jours. Un balayage d'air frais ambiant, de 10 l/h assure l'entraînement et l'évacuation des émanations volatiles des fruits hors des cellules. A la fin du 10ème jour

les fruits sont ensuite sortis des cellules et mis à la température de 20°C dans une chambre climatisée pendant plus ou moins longtemps.

D'autres expériences de simulation de conservation ont été réalisées en maintenant les fruits constamment, soit à 8°C, soit à 20°C.

2 - Calendrier du prélèvement des échantillons.

Les prélèvements ont été faits généralement aux jours suivants :

- J : jour de mise au froid à 8°C
- J + 10 = I : jour de sortie des chambres froides ou des cellules à 8°C et mise à 20°C
- I + 8 : à 20°C
- I + 15 : à 20°C

Le même calendrier de prélèvement a été également retenu pour les fruits conservés strictement à 8°C et à 20°C.

Le mode de prélèvement sera développé dans le paragraphe "techniques d'échantillonnage".

Le prélèvement d'échantillons par échelonnement permet de suivre un certain nombre de phénomènes se produisant au cours de la conservation dont l'évolution éventuelle des composés phénoliques.

3 - Remarques sur les fruits traités.

- Dans l'ensemble, au point de vue des aspects extérieurs, les fruits étudiés présentent, au bout de I + 8 ou I + 15 jours de conservation à 20°C, des traits caractéristiques identiques à ceux des fruits du commerce :

- peau plus ou moins desséchée, de coloration jaune-orange, disparition de la chlorophylle, une maturité avancée,
- couronne plus ou moins fanée,
- pédoncule desséché.

- La conservation entraîne pour les fruits une perte de masse de l'ordre de 1 à 3 % à la fin de la mise au froid et de 5 à 9 % au bout de I + 8 jours à 20°C, ce qui n'est pas négligeable. Cette perte de masse ou émission d'eau sous forme de vapeur que l'on peut observer, par condensation, sur les parois vitrées des cellules de conservation, est due vraisemblablement à la respira-

tion et à la transpiration des fruits.

- Les résultats obtenus en ce qui concerne le B I sont semblables au point de vue faciès et intensité au brunissement interne des fruits du commerce. Une étude quantitative comparative sur le plan des composés phénoliques et du B I, sera envisagée au Chapitre IV. Des notes de brunissement, de 0 à 4, correspondant aux quatre stades du B I selon les échelles de brunissement de l'I.R.F.A. (TEISSON, 1972) ont été attribuées aux fruits observés atteints :

- 0 correspond aux fruits sains après conservation,
- traces : stade initial du B I, caractérisé par des tissus légèrement gris translucides à la base de quelques yeux,
- 1 : quelques yeux et tissus environnants ont bruni,
- 2 et 3 : le centre est plus ou moins affecté, généralement dans la moitié supérieure du fruit,
- 4 : tout l'intérieur du fruit est atteint, sauf les zones périphériques subcorticales.

Dans certains fruits, on rencontre parfois un brunissement dans l'axe cylindrique central sans qu'il y ait eu des traces de B I à la base des yeux. C'est un autre faciès du B I (TEISSON, 1972 ; I.R.F.A., 1975 ; TEISSON, 1977) classiquement observé.

C - CONDITIONS d'ECHANTILLONAGE.

Les caractères morphologiques externes de l'ananas lui confèrent un aspect cylindro-conique volumineux. Au stade de coupe 3/4 mûr le fruit atteint un poids pouvant aller de 0,7 à 2,3 kg (I.R.F.A., 1975) et les dimensions sont variables suivant son développement : hauteur 14 à 18 cm, épaisseur médiane 12 à 15 cm. Il importe donc de tenir compte des différentes zones du fruit pour constituer des échantillons homogènes et représentatifs.

1 - Rappel sur les critères retenus pour le choix du type d'échantillonnage.

a - Broyats de fruits globaux.

Ce type d'échantillonnage permet de grouper les fruits de mêmes caractéristiques (maturité apparente, ...) et dans le cas de brunissement

interne, les fruits de même note de B I ou de même stade de B I. Il pose cependant le problème de dilution de concentration de substances en particulier sur le plan des composés phénoliques. Leur concentration pouvant être importante au niveau de chaque fruit pris individuellement serait diluée au niveau du groupe de fruits broyés globalement ensemble. Ce type d'échantillonnage a été mis en oeuvre par l'I.R.F.A.

b - échantillonnage de fruits entiers par zones.

Le gradient de maturité apparente qui existe sur le fruit traduit vraisemblablement un stade physiologique bien déterminé, à l'intérieur dans les différentes zones. Une étude par zone permet donc de rendre compte éventuellement des variations possibles des substances, en l'occurrence, les composés phénoliques et de respecter partiellement l'anatomie du fruit. Dans le cas de brunissement où certaines zones sont les seuls endroits de localisation fréquente du B I (la base des yeux), ce type d'échantillonnage permet de bien différencier zones brunies et zones non brunies du fruit. Nous avons choisi et utilisé cet échantillonnage dans toutes nos expérimentations.

D'autres techniques plus rigoureuses seraient l'échantillonnage par fruits individuels qui mettraient en évidence les gradients de maturité. Ce type d'échantillonnage ne semble cependant pas réalisable à cause de la texture des tissus de la pulpe, fermes et difficilement séparables.

2 - Techniques d'échantillonnage.

L'échantillonnage proprement dit comprend le tronçonnage, le découpage et la conservation.

a - Tronçonnage :

Il s'agit de débarrasser le fruit de sa couronne et de son pédoncule avec un couteau, en deux sections Sc et Sp (Fig. 1).

b - Découpage :

Le tronc ainsi formé est découpé en 4 tranches équatoriales d'égales épaisseurs (Fig. 2). Chaque tranche est ensuite divisée en 4 couronnes concentriques successives. La largeur des couronnes obtenues est fonction du diamètre des tranches. Nous désignons les couronnes par les chiffres suivants :

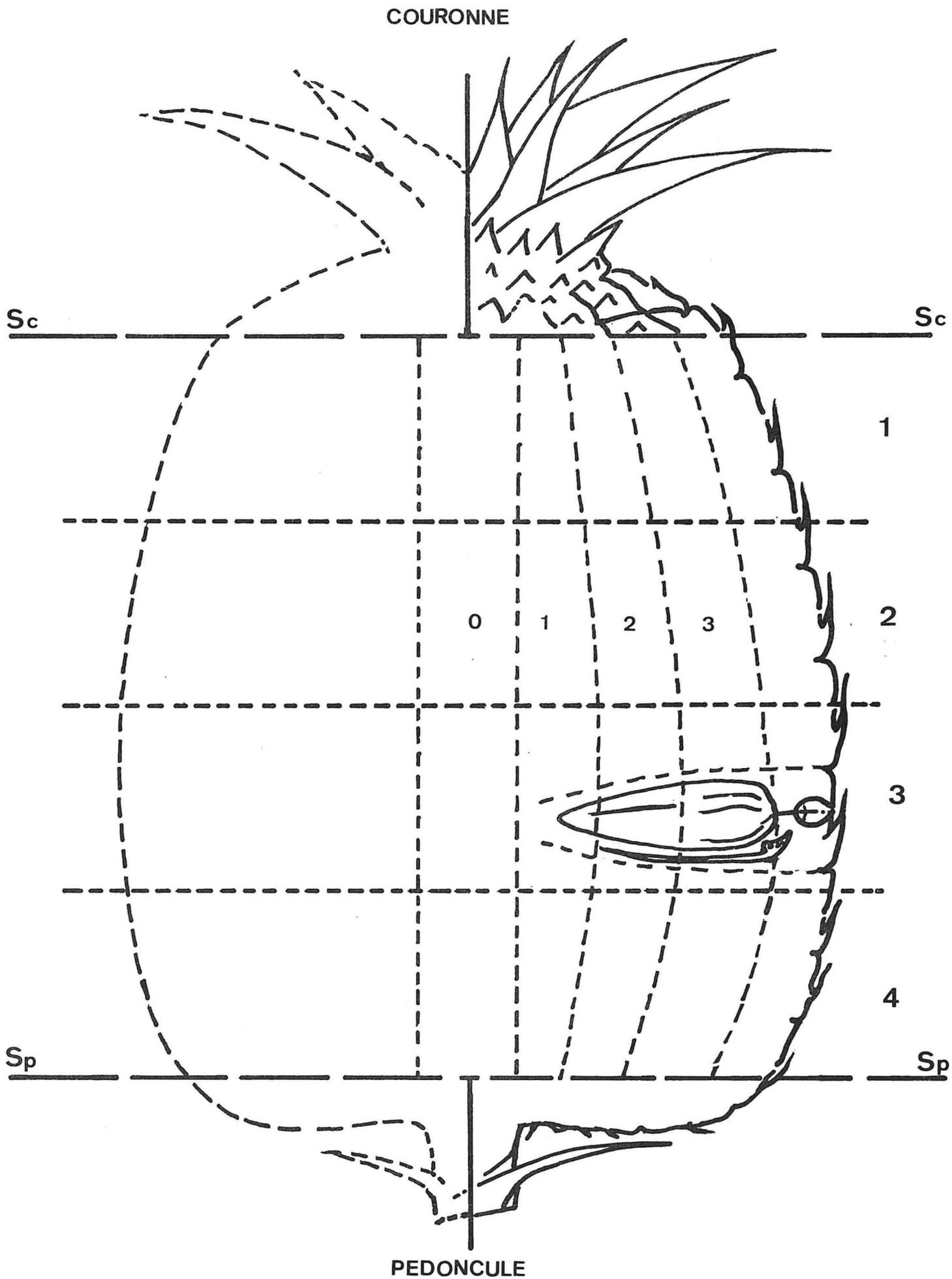


Fig. 1 - Découpage. Echantillonnage de l'ananas

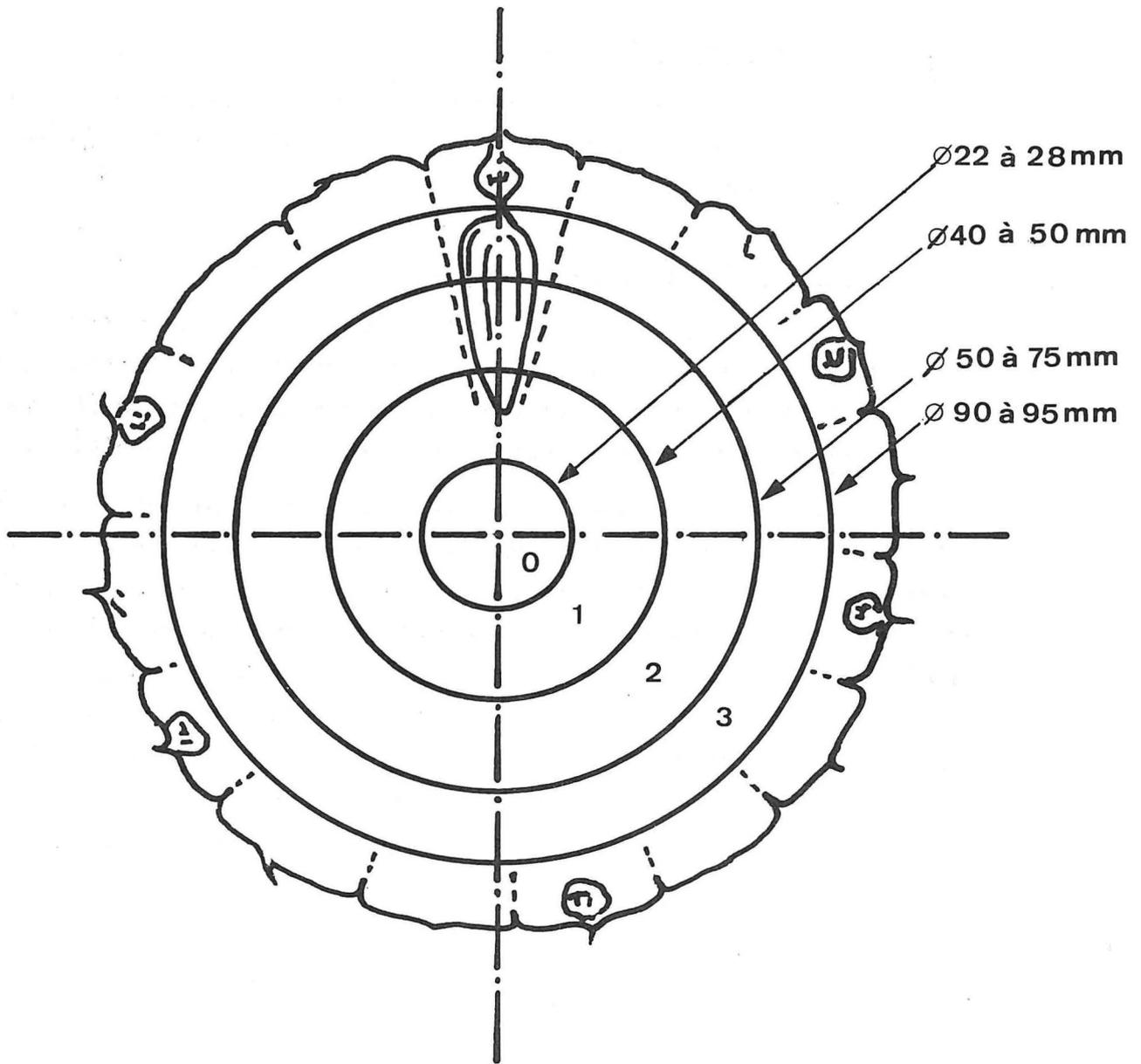


Fig. 2 - Découpe des tranches en couronnes

- couronne 0 : zone 0 : coeur ou axe cylindrique central,
- couronne 1 : zone 1 : base des yeux,
- couronne 2 : zone 2 : yeux,
- couronne 3 : zone 3 : pulpe périphérique subcorticale.

c - Conservation :

Les couronnes découpées en petits morceaux sont emballées rapidement dans des feuilles d'aluminium et plongées dans l'azote liquide en vue de leur conservation.

Remarques sur le découpage des fruits :

Le découpage des fruits en tranches, couronnes, entraîne une perte systématique en substances par le jus formé. Le volume de ce liquide est généralement faible sur un fruit. Une estimation semi-quantitative par mesure spectrophotométrique a montré que la quantité de phénols entraînée reste faible.

Une oxydation peut avoir lieu du fait de l'exposition du matériel à l'air libre au cours du découpage, comme dans la plupart des fruits blessés ou sectionnés, tels que la pomme, la poire, qui présentent un brunissement au niveau de la blessure, ou de la surface de section au bout de quelques minutes. Cette oxydation est probablement très faible en ce qui concerne notre matériel d'autant que le découpage est effectué assez rapidement. Il faut plusieurs heures d'exposition à l'air ambiant pour qu'un fruit frais sectionné puisse avoir un léger changement de coloration vers un jaune un peu foncé à la surface de section, sans cependant aucune apparence de brunissement classique.

C H A P I T R E I I

EXTRACTION, SEPARATION et IDENTIFICATION des COMPOSES PHENOLIQUES de l'ANANAS

I - TECHNIQUES UTILISEES.

A - TECHNIQUES d'EXTRACTION.

La partie du fruit étudiée est constituée uniquement de la pulpe.

1 - Description du protocole expérimental.

Les techniques utilisées sont inspirées de celles de MACHEIX (1968) pour l'extraction des composés phénoliques des pommes.

Chaque échantillon conservé dans l'azote liquide est amené à une température proche de la température de décongélation en le laissant à la température ambiante pendant 2 à 5 mn pour permettre un découpage facile des morceaux et ensuite pesé.

10 à 20 g de matériel végétal sont utilisés suivant l'échantillon.

a - Broyage. (Fig. 2 Bis)

L'épuisement du matériel végétal s'effectue dans l'éthanol à 20 % d'eau.

Nous avons utilisé comme broyeur le VIRTIS "45" HOMOGENIZER à lames coupantes.

Le volume d'éthanol à 95% froid à ajouter est calculé en fonction de la teneur en eau du matériel à broyer.

A vitesse moyenne le broyage dure 3 mn. Le broyat est ensuite filtré sur verre fritté n° 4, en rinçant à l'éthanol 80° sur le résidu solide restant, bol, couvercle, lames et tige support-lames du broyeur.

Toutes les opérations de broyage et de filtration sont conduites à des températures voisines de 0°C pour éviter l'oxydation et la dégradation des substances phénoliques par réchauffement du milieu, principalement au cours du broyage. Le résidu solide est repris dans l'éthanol 80° pour être à nouveau broyé et filtré dans le même temps et les mêmes conditions de refroidissement.

Cinq épuisements successifs sont au total réalisés sur le même matériel.

b - Préparation des extraits hydroalcooliques. (Fig. 2 Bis)

Les filtrats rassemblés sont ensuite concentrés sous vide à 30°C, à l'évaporateur rotatif. En vue de l'étude spectrophotométrique et éventuellement chromatographique, les solutions hydroalcooliques ainsi obtenues sont ramenées à la concentration finale de :

- 10 g de matériel végétal initial dans 50 ml d'éthanol 80°
- ou 20 g " " " 100 ml " "

ceci pour les extraits hydroalcooliques bruts, non purifiés. Les extraits ainsi préparés sont conservés à -20°C en attendant leurs analyses.

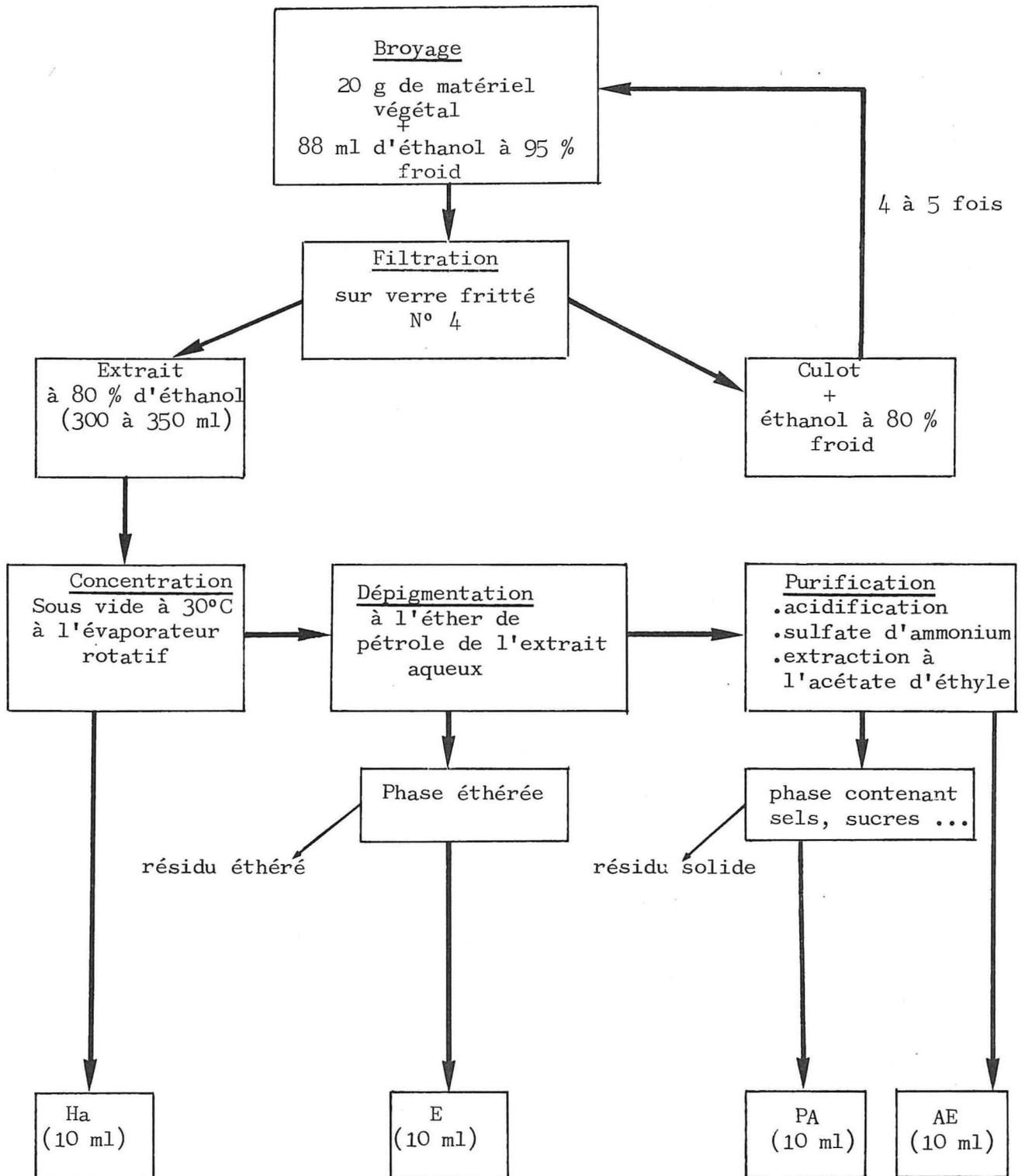
2 - Critique de la méthode d'extraction.

a - Remarques sur le choix de l'extraction à partir du matériel congelé.

Il existe un certain nombre de techniques d'extraction pouvant être adaptées à notre matériel, telle l'extraction à partir de pulpe lyophilisée avec un broyeur à billes type DANGOUMAU par exemple. A cet effet, nous avons déterminé la teneur en eau du matériel. Elle est variable suivant les parties du fruit considérées :

- 88 % dans l'axe cylindrique ou coeur,
- 82 % dans la pulpe périphérique.

Fig. 2 Bis - Extraction et purification des extraits hydroalcooliques.



Notre choix s'est porté de préférence sur l'extraction à partir du matériel congelé pour les raisons suivantes :

- L'ananas est un matériel très fibreux et le broyage au VIRTIS permet d'avoir rapidement une mouture très fine qui se remet facilement en suspension au cours des différents épuisements du résidu. Le broyage constitue donc l'extraction proprement dite. L'ensemble des cinq opérations de broyage - extraction et filtration ne dure que 30 mn, conduites constamment au froid.

b - Caractère exhaustif de l'extraction.

(Tableau : 1)

Nous avons étudié l'efficacité de la méthode d'extraction en enregistrant au spectrophotomètre entre 240 et 360 nm le spectre d'absorption aux U.V. de chaque extrait hydroalcoolique correspondant à un épuisement. Deux séries d'extraction ont été réalisées conjointement suivant le protocole expérimental décrit précédemment, l'une portant sur un échantillon de fruit sain, l'autre sur un échantillon de fruit bruni (tissus brunis), toutes les conditions d'échantillonnage (zones de fruits étudiées) et de conservation étant égales par ailleurs. 20 g de matériel sont utilisés dans chaque cas. Après filtration les extraits sont ramenés aux concentrations suivantes dans l'éthanol à 80 %.

- 1ers extraits ajustés à	100 ml
- 2èmes " concentrés et ajustés à	50 ml
- 3èmes " " "	25 ml
- 4èmes " " "	12,5 ml
- 5èmes " " "	10 ml
- 6èmes " " "	5 ml

Nous avons ensuite enregistré les spectres d'absorption aux U.V. en appliquant la dilution : 300 μ l de chaque extrait dans 2,5 ml d'éthanol à 80 % (Fig. 3).

Les extraits hydroalcooliques bruts (non purifiés) se caractérisent par deux bandes d'absorption : vers 280 nm et vers 315 nm, dont nous envisageons plus tard la signification.

Dans le cas d'un fruit sain (= non bruni) après conservation, ou d'un fruit frais venant d'être récolté, le maximum d'absorption le plus important se situe vers 280 nm alors que l'absorption vers 315 nm n'est qu'un

Tableau 1 - Pourcentage de composés phénoliques extraits au cours des épuisements successifs sur le même matériel.

Extraction	Ananas sain		Ananas bruni	
	% à 280 nm	% à 315 nm	% à 280 nm	% à 315 nm
1ère	87,68	89	86,80	87
2ème	3,89	4,0	4,10	5,39
3ème	3,65	3,3	3,70	3,80
4ème	3,36	3,0	3,51	2,9
5ème	1,22	0,7	1,64	0,9
6ème	0,20	0,0	0,25	0,01

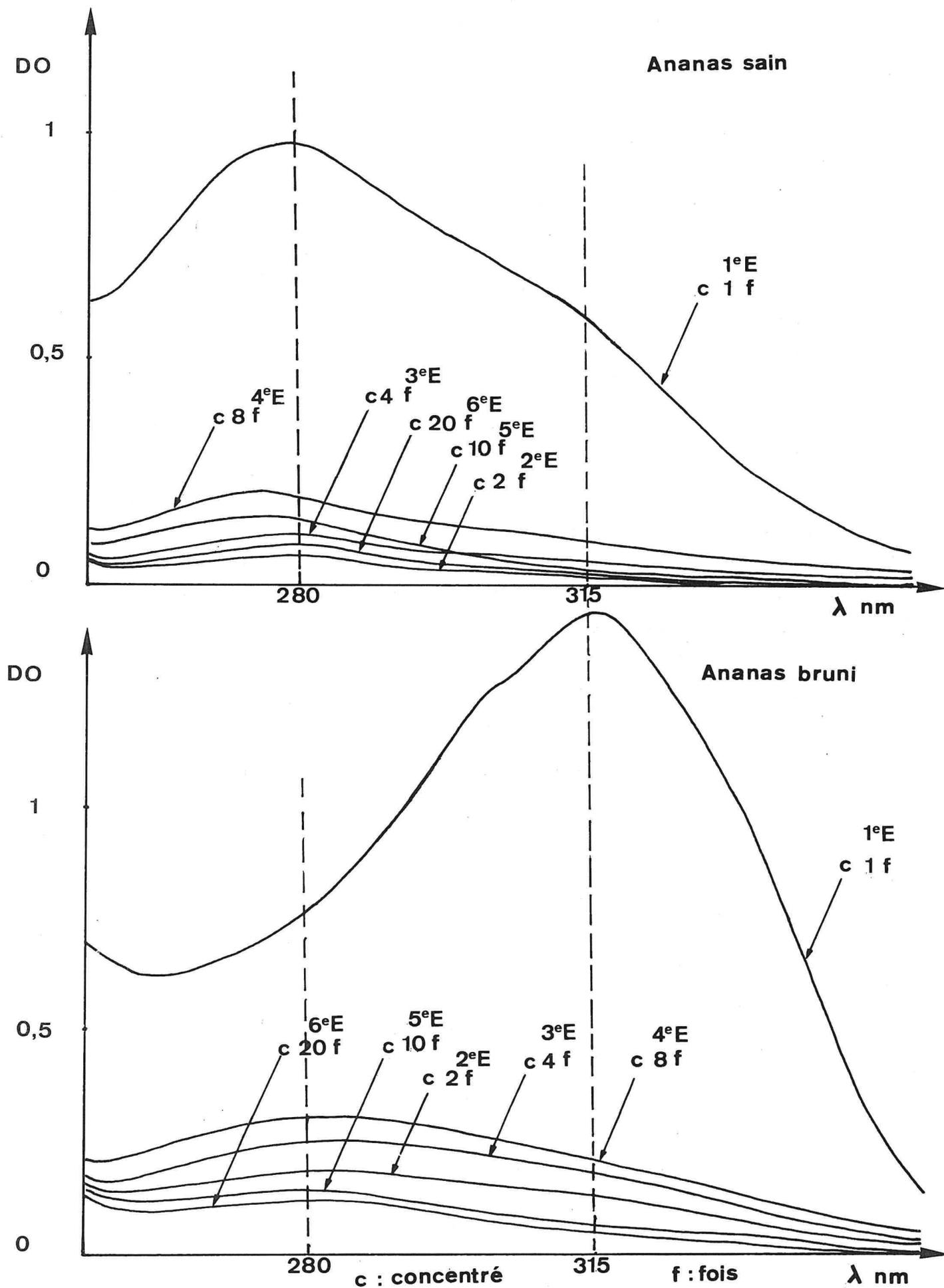


Fig. 3 - Spectres d'absorption des six extractions successives effectuées sur le même matériel (300 μ l d'extrait dans 2,5 ml d'alcool (80°) c : concentré ; f : fois ; E : extraction

léger épaulement. Par contre, pour un fruit bruni le maximum d'absorption le plus important est la bande vers 315 nm, celle vers 280 nm devenant fortement réduite ou masquée par la première. Nous discuterons ultérieurement de ces résultats ; pour l'instant nous n'insisterons que sur l'aspect exhaustif des extractions. Le Tableau 1 montre que la quasi totalité des composés phénoliques solubles dans l'éthanol à 80% est obtenue au cours des quatre premières extractions.

En conclusion, la méthode d'extraction par l'éthanol à 20% d'eau (en faisant cinq épuisements successifs) est satisfaisante pour extraire du matériel les dérivés hydroxycinnamiques et les flavonoïdes solubles.

Cette méthode est cependant loin d'être idéale pour extraire tous les composés phénoliques présents dans le matériel, notamment les formes "insolubles" qui peuvent en constituer une part importante. L'on sait que des unités simples comme l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique et les acides de la série benzoïque peuvent être impliqués dans la synthèse des formes insolubles telle que la lignine (BROWN et NEISH, 1959 ; GOLDSCHMID et HERGERT, 1961 ; HIGUCHI et BROWN, 1963 ; SARKANEN et LUDWIG, 1971), ce qui les rendent en conséquence insolubles dans l'éthanol par les techniques classiques d'extraction.

Dans un travail de recherche non publié, GORTNER, cité par DULL (1971) a mis en évidence la présence de l'acide férulique dans les fibres des tissus de l'ananas, interférant avec la pectine. Nous reviendrons sur ces formes insolubles dans une étude ultérieure.

En dehors des formes insolubles naturelles, les produits de brunissement, dans le cas des tissus brunis (ananas bruni) restent inextractibles dans le culot (le culot des tissus des fruits frais ou des fruits non brunis étant de coloration blanche après la dernière extraction). Ce sont vraisemblablement des produits d'oxydation polymérisés et condensés qui peuvent avoir comme point de départ des unités phénoliques simples tels que des mono et des diphénols oxydés en quinones.

B - PURIFICATION des EXTRAITS HYDROALCOOLIQUES.

Les extraits hydroalcooliques bruts contiennent, outre les composés phénoliques, de nombreuses substances de nature non phénolique,

notamment des pigments chlorophylliens et caroténoïdes, des acides organiques, des lipides, des sucres, qui peuvent interférer sur le spectre global d'absorption.

Par ailleurs, ces extraits se prêtent mal à une séparation chromatographique : d'une part, on est limité dans la quantité à déposer et d'autre part, il faut un temps relativement long (20 h.) pour avoir une séparation assez nette des taches (Fig. 4).

Une purification s'impose donc pour éliminer les substances non phénoliques. Nous avons sur la Fig. 5 un chromatogramme indiquant l'emplacement des différentes substances présentes dans l'extrait brut après 6 h. de développement et révélations classiques.

Protocole expérimental.

Nous avons utilisé la méthode inspirée de FLEURIET et MACHEIX (1972) pour purifier les extraits hydroalcooliques bruts.

1 - Préparation des extraits. (Fig. 2 Bis)

A partir des extraits bruts (20 g/100 ml), on prélève une partie aliquote de 50 ml, que l'on fait évaporer sous vide à 30°C jusqu'à avoir une phase aqueuse. Le volume final est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

2 - Dépigmentation.

Dans une ampoule à décanter on ajoute aux 10 ml d'extrait aqueux un volume équivalent d'éther de pétrole (benzine de pétrole, température de distillation : 40°-60°C). Après agitation et séparation des phases on élimine la phase supérieure étherée. Trois épuisements sont nécessaires pour débarrasser l'extrait de la majeure partie des pigments.

Remarques :

Une mise au froid à basse température peut permettre de précipiter certains caroténoïdes (BUREAU-BERTHAULT, 1975). Nous l'avons également observé sur nos extraits au bout de quelques jours de conservation à -20°C. Toutefois les pigments restants dans l'extrait final ne gênent pas la séparation chromatographique : ils migrent généralement avec les fronts de solvants.

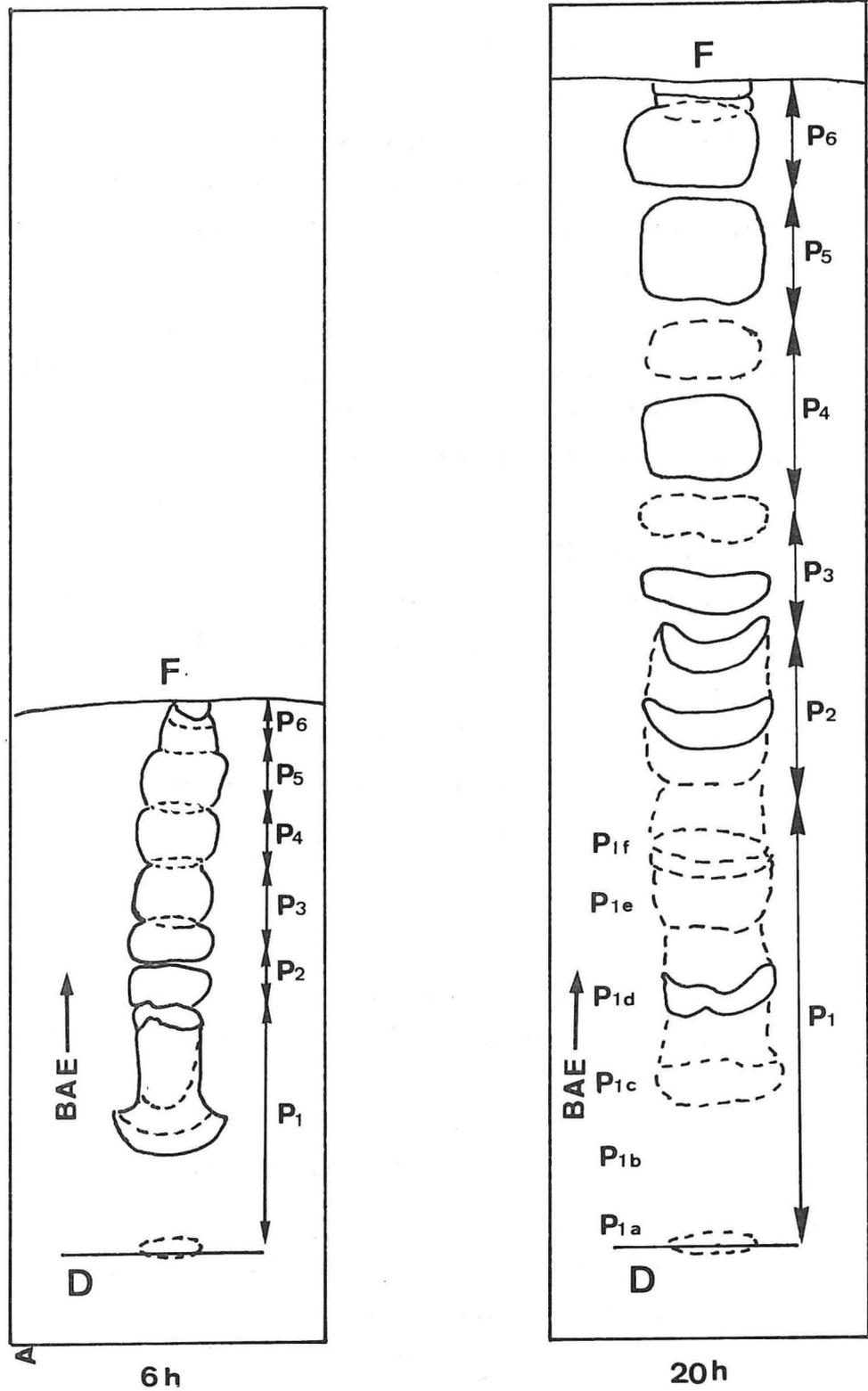


Fig. 4 - Chromatographies monodimensionnelles de l'extrait brut (non purifié) dans le B.A.E. (4-1, 4-2 ou 20-7-10) monophasique. Désignation des phénols présents : P₁, P₂ ..., P₆
 Papier Whatman n° 3 (W) ; D = dépôt ; F = front de solvant.

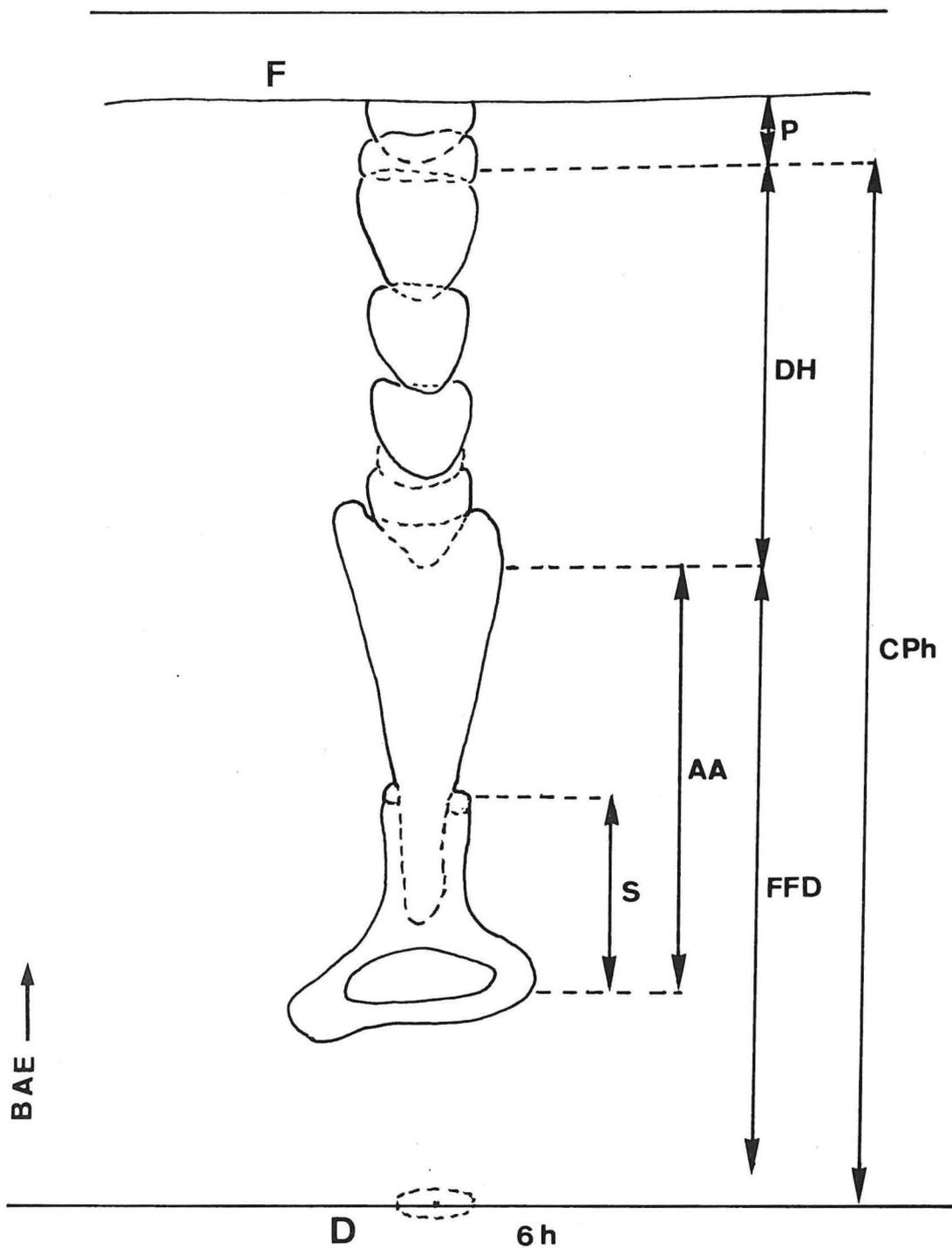


Fig. 5 - Chromatographie monodimensionnelle de l'extrait brut montrant la position relative de chaque groupe de substances sur le chromatogramme.

FFD : Flavoloïds, flavonoïdes et divers

CPh : composés phénoliques : révélations classiques

P : pigments : " dans le visible

AA : acides aminés : " à la ninhydrine

S : sucres : " au phtalate d'aniline

DH : dérivés hydroxycinnamiques

Une quantité très faible de composés phénoliques est extraite au cours de la dépigmentation. Une étude chromatographique et spectrophotométrique sera faite ultérieurement concernant les différentes phases de l'extraction.

3 - Extraction à l'acétate d'éthyle.

A l'extrait aqueux dépigmenté on ajoute 2 ml d'éthanol à 95 % pour permettre une meilleure extraction des composés phénoliques (FLEURIET et MACHEIX, 1972 ; MACHEIX, 1974). On acidifie ensuite l'extrait par une solution d'acide métaphosphorique à 20% de manière à avoir une solution finale à 2 % d'acide et à pH : 1,5. Pour faciliter le passage des composés phénoliques dans l'acétate d'éthyle on relève la force ionique du milieu en l'additionnant de sulfate d'ammonium jusqu'à la concentration de 20 %, puis on extrait ensuite les composés phénoliques avec un volume équivalent d'acétate d'éthyle. Après séparation des phases, la phase organique est recueillie quantitativement dans un ballon à distiller. On réalise cinq extractions successives pour avoir un épuisement complet de l'extrait en composés phénoliques, notamment en dérivés hydroxycinnamiques (Fig. 6).

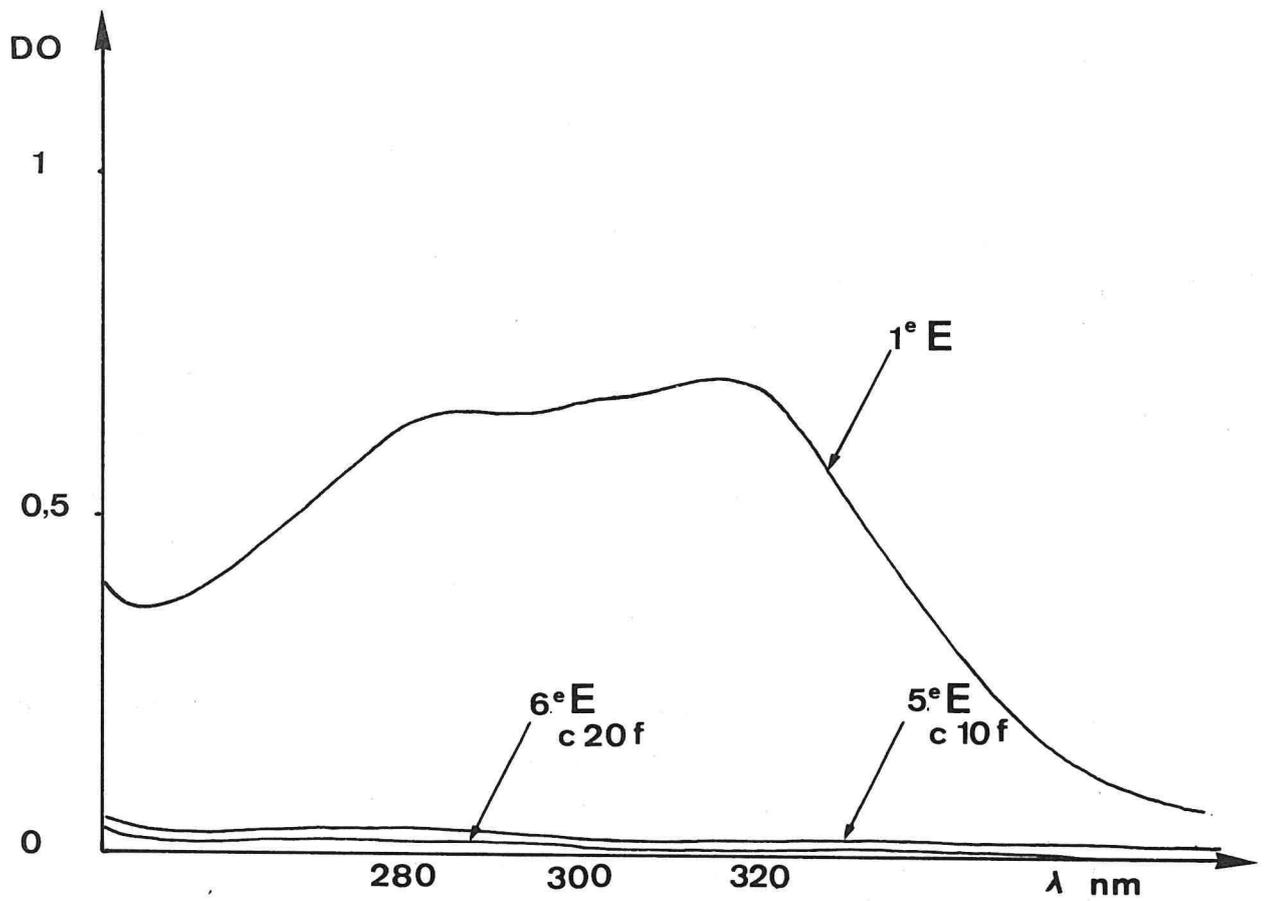
L'ensemble des phases organiques (à l'acétate d'éthyle) est ensuite évaporé sous vide à 30°C jusqu'à résidu sec et repris dans un volume minimum d'éthanol à 80 %. Tous les extraits purifiés sont finalement amenés à la concentration finale de 2 g de matière fraîche par ml d'éthanol à 80 %, après dépigmentation et extraction à l'acétate d'éthyle, et sont conservés au froid à -20°C en attendant d'être analysés.

C - SEPARATION des COMPOSES PHENOLIQUES.

De nombreux travaux ont été consacrés à la séparation des composés phénoliques par chromatographie. Parmi eux des travaux de synthèse regroupent les principes et techniques généraux indispensables pour les isoler d'un matériel végétal donné (SEIKEL, 1962, 1964 ; BATE-SMITH, 1964 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ; MABRY et al., 1970 ; BEZANGER-BEAUQUESNE, 1971, ...).

Parmi les diverses techniques de séparation nous en avons utilisé deux :

1 - La chromatographie sur couches minces, ascendante, mono et bi-dimensionnelle sur trois adsorbants :



Ananas bruni

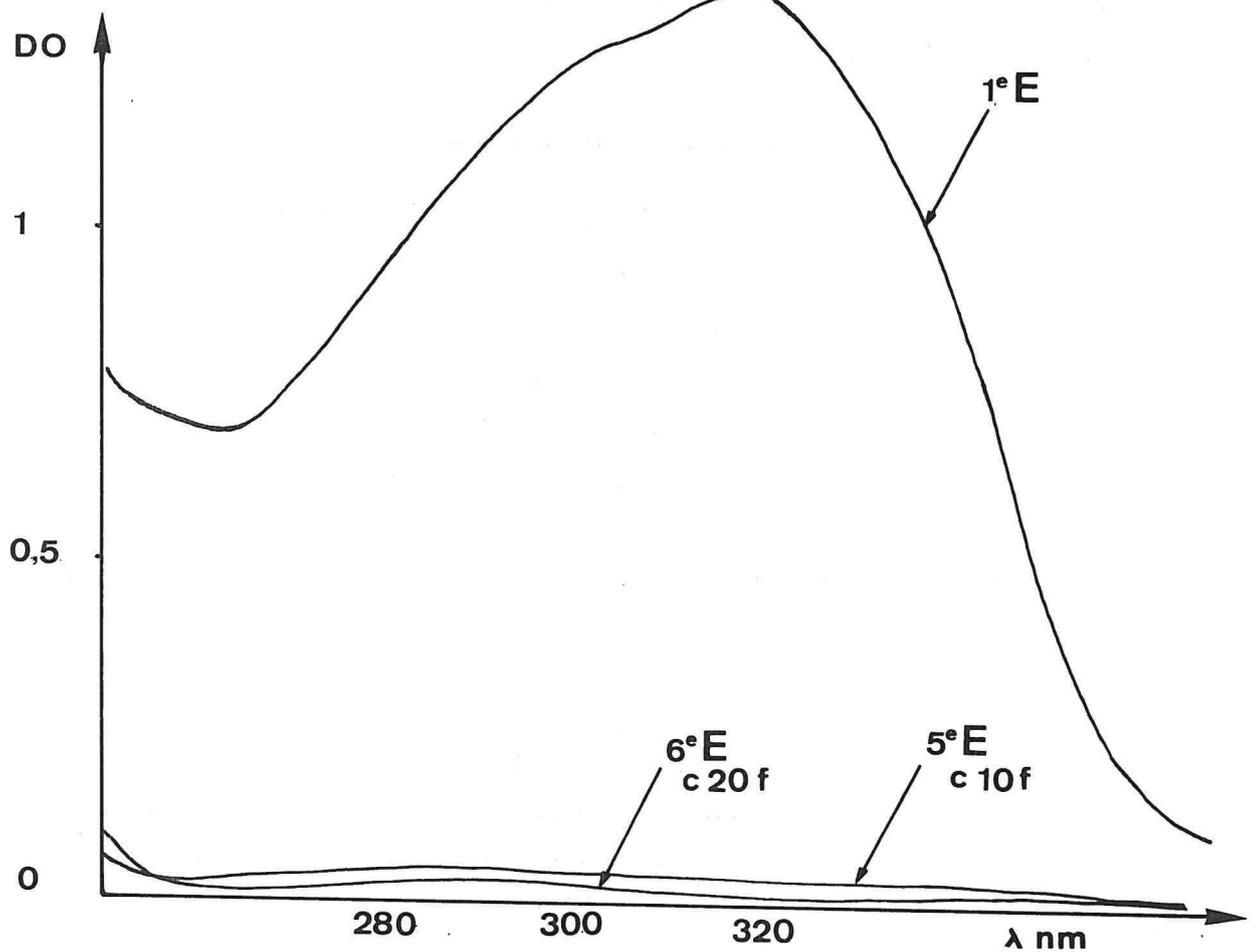


Fig. 6 - Spectres d'absorption des extraits purifiés dans l'alcool 80 % après extraction à l'acétate d'éthyle, 300 μ l d'extrait purifié dans 2,5 ml d'éthanol à 80 %. E : extraction ; c : concentré ; f : fois

- le gel de silice F 1500
- le polyamide G 1600
- la cellulose F 1440

Ces adsorbants sont souvent déjà prêts sur des feuilles plastiques ou plaques de verre, de dimension 20 cm x 20 cm, dans le commerce.

De très bons résultats ont été obtenus en ce qui concerne la netteté de la séparation des composés phénoliques, par ordre croissant avec le polyamide, le gel de silice et la cellulose (Fig. 7).

Nous avons été cependant limité au point de vue rendement à cause de la capacité d'adsorption très faible des adsorbants et des difficultés de séchage des dépôts. Les couches minces semblent se prêter mieux à l'étude des micro-quantités qu'à l'étude des macro-quantités.

Pour ces raisons nous avons choisi la technique de séparation par chromatographie sur papier Whatman n° 3 qui donne d'aussi bons résultats que la poudre de cellulose, et qui sera la principale mise en oeuvre dans la suite de ce travail.

2 - Chromatographie sur papier.

a - Préparation des chromatogrammes.

La chromatographie bidimensionnelle descendante a permis d'obtenir une séparation très satisfaisante à partir des extraits purifiés.

L'extrait étudié est déposé sous forme de spot ou de bande, à l'aide d'une microsiringue Hamilton de 100 μ l. 500 à 1000 μ l d'extrait sont ainsi déposés sur le papier Whatman n° 3 qui a une grande capacité d'absorption et permet une migration rapide. Le séchage du dépôt peut être accéléré par courant d'air à température ambiante. Les développements des chromatogrammes sont réalisés dans des cuves en verre étanches pour assurer une bonne saturation.

b - Solvants utilisés.

Parmi les nombreux solvants essayés, nous avons retenu ceux qui nous ont donné les meilleurs résultats, classiquement utilisés pour la séparation des composés phénoliques (CORNER et HARBORNE, 1960 ; HARBORNE et CORNER, 1961 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ; TANGUY, 1970, 1971 ; MACHEIX, 1971 ; TANGUY et MARTIN, 1972 ; MACHEIX, 1974 ; FLEURIET, 1975) :

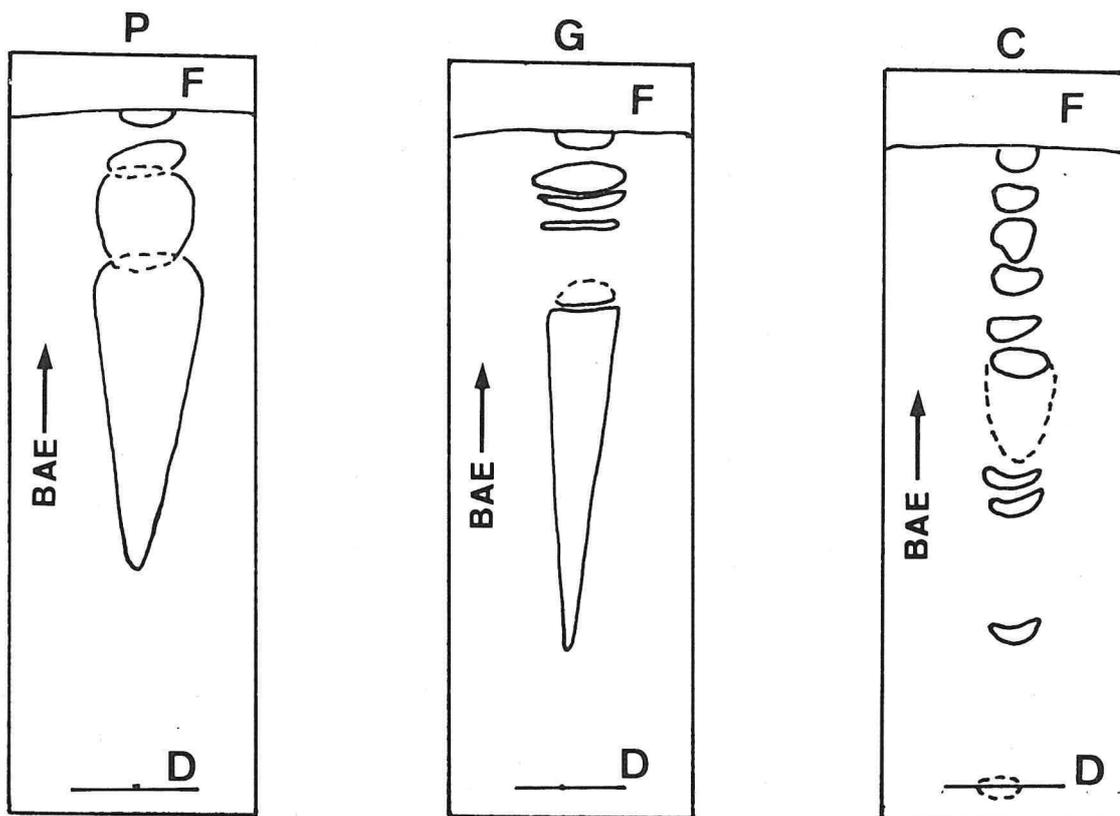


Fig. 7 - Chromatographie sur couches minces ascendante, mono-dimensionnelle d'extrait purifié (2 g/ml d'extrait à 80 % d'éthanol) montrant la netteté de la séparation des composés phénoliques sur poudre de cellulose.

- P : polyamide G1600 Schleicher-Schüll
 G : gel de silice F1500 " "
 C : cellulose F1440 " "
 F : front de solvant ; D = dépôt (75 μ l)

- Le mélange butanol-acide acétique-eau (B.A.E.) a été utilisé sans saturation préalable des chromatogrammes sous deux formules :

. B.A.E. (20-7-10) v/v, monophasique adapté aux extraits bruts.

Le développement dure 20 h. en chromatographie monodimensionnelle ascendante et permet une séparation suffisante pour une estimation semi-quantitative de certains dérivés hydroxycinnamiques qui migrent beaucoup.

. B.A.E. (4-1-5) v/v, diphasique (la phase supérieure) (SEIKEL, 1964 ; RIBEREAU-GAYON, 1968). En chromatographie descendante un développement de 16 h. permet une bonne séparation des composés phénoliques de l'extrait purifié. Cette première migration sert généralement de point de départ pour un deuxième développement dans un autre système de solvants.

- Le mélange acétate de n-butyle-acide acétique-eau A.B.A.E. (4-1-5) v/v, diphasique (la phase supérieure) préconisé par TAYLOR (1965) et fréquemment utilisé par MACHEIX (1974). Une saturation préalable des chromatogrammes en présence de la phase aqueuse pendant une nuit, est cependant indispensable pour avoir un bon développement. Associé avec le B.A.E., il a été souvent employé en 2ème dimension en chromatographie descendante. Quand la concentration des composés phénoliques étudiés devient importante, la séparation des taches n'est pas nette. De ce fait nous lui avons préféré le système suivant :

- Le mélange méthyle-isobutyle-cétone-acide formique-eau M F E (3-1-2) diphasique (la phase supérieure) permet de séparer les divers isomères de l'acide chlorogénique (JEAN et REID, 1959 ; LOCHE et CHOUTEAU, 1963 ; LOCHE, 1966 ; STECK, 1967a ; COLONNA, 1969 ; TANGUY, 1970). Nous l'avons utilisé en 2ème dimension avec le B.A.E. diphasique. Une saturation préalable des chromatogrammes avec la phase aqueuse est nécessaire pendant 16 à 18 h. avant le développement (4 h.).

- Le mélange butanol ammoniacal à 2 %, B A (1-1) v/v, diphasique (la phase supérieure) de HARBORNE et CORNER (1961) permet, sans saturation préalable, la séparation des esters quinquiques et sucrés. Dans ce système de solvants les esters hydroxycinnamiques avec l'acide quinique ne migrent pas ou migrent peu ; par contre, ceux avec un sucre ont un Rf sensiblement supérieur. Nous l'avons utilisé chaque fois pour caractériser les composés isolés après chromatographie bidimensionnelle ou pour les purifier.

- Une autre possibilité de caractérisation des composés phénoliques peut être obtenue avec le mélange acide acétique-eau, à 2 % dans l'eau. Sans saturation préalable, le développement est conduit pendant 2 à 3 h. Chacun des dérivés hydroxycinnamiques se dédouble en deux taches correspondant aux isomères cis (à Rf le plus élevé) et trans de la molécule (WILLIAM, 1955). Ce dédoublement est fortement influencé par la lumière (MACHEIX, 1974). Il est donc nécessaire d'opérer le développement chromatographique en l'absence de lumière. Cette précaution a été aussi prise dans tous les autres cas de développement chromatographique.

- Pour l'étude des produits d'hydrolyse (les aglycones) obtenus à partir des extraits globaux ou des composés isolés, nous avons mis en oeuvre le mélange Benzène-acide acétique-eau, Bz A E (6-7-3) v/v, diphasique (la phase supérieure) (IBRAHIM et TOWERS, 1960 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ; TANGUY, 1970). Le développement est réalisé sans saturation préalable des chromatogrammes.

c - Révélation des chromatogrammes.

Pour détecter les composés phénoliques sur les chromatogrammes, plusieurs techniques de révélation sont possibles en utilisant le plus souvent leurs propriétés physico-chimiques (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; MACHEIX, 1974).

Nous avons appliqué au repérage des composés phénoliques de notre matériel quelques unes d'entre elles qui ont donné des résultats satisfaisants.

o. Observation en lumière ultra-violette (256 nm et 366 nm).

L'exposition des chromatogrammes à la lumière ultra-violette permet de repérer les composés phénoliques grâce à leur coloration de fluorescence. La plupart des composés phénoliques ont une coloration de fluorescence propre qui peut être modifiée en présence de vapeurs d'ammoniac par un phénomène d'ionisation.

o. Réactions avec des révélateurs chimiques.

Le réactif de HOEFFNER est constitué par le mélange volume à volume d'acide acétique à 5 % et de nitrate de sodium à 5 %. Il provoque la nitrosation des groupements phénoliques en milieu alcalin. Mis au point pour l'acide chlorogénique (HOEFFNER, 1932) auquel il donne une coloration rose-violacée, ce réactif réagit également avec d'autres phénols (BATE-SMITH, 1956) en particulier avec les dérivés hydroxycinnamiques.

- Le mélange à volume égal de chlorure ferrique à 1 % et de ferricyanure de potassium à 1 % dans l'eau, colore en bleu les substances phénoliques. Le réactif est sensible mais manque de spécificité.
 - Le nitrate d'argent ammoniacal à 3 % oxyde les fonctions phénoliques. La réaction est très sensible mais il y a interférence des sucres et d'autres substances organiques. On peut conserver les chromatogrammes ainsi révélés par trempage dans une solution d'hyposulfite de sodium.
 - Les sels de diazonium préparés selon RIBEREAU-GAYON (1968), réagissent spécifiquement mais manquent de sensibilité.
 - La complexation avec les métaux est souvent utilisée pour caractériser certains composés phénoliques. Ainsi le réactif de Benedikt (REZNIK et EGGER, 1961 ; TRONCHET, 1968) éteint la coloration de fluorescence des composés à groupement o-diphénolique par complexation de ces derniers avec le cuivre. Par contre, il conserve et même accentue la coloration de fluorescence des monophénols. On le prépare à partir des mélanges suivants :
- 1,6 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, dissout dans 15 ml d'eau,
 - 15 g de citrate de sodium, $2\text{H}_2\text{O}$, dans 65 ml d'eau chaude,
 - 13 g de Na_2CO_3 anhydre,
 - 1 g de NaHCO_3

le volume est ajusté à 100 ml dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée.

D'autres réactifs ont été également utilisés pour mettre en évidence les anthocyanes et les catéchines (MACHEIX, 1968), l'acide quinique (CARTWRIGHT et ROBERTS, 1955) et les sucres (CRAMER, 1962, cité par RANDERATH, 1971).

d - Identification des composés phénoliques.

L'identification des composés phénoliques peut être réalisée suivant les techniques classiques mises en oeuvre.

1 - la séparation chromatographique fournit une indication nécessaire sur la nature de certains composés phénoliques soit par leur isomérisation, soit par leur migration dans quelques solvants particuliers. Cette première indication peut être complétée par :

- les révélations en lumière ultra-violette où la plupart des composés phénoliques notamment les dérivés hydroxycinnamiques sont facilement reconnaissables par leur coloration de fluorescence caractéristique. Par exemple les

dérivés p-coumariques sont non fluorescents en lumière ultra-violette seule et prennent une fluorescence bleue-violette en présence de vapeurs d'ammoniac ; la fluorescence de l'acide chlorogénique et des dérivés caféïques passe du bleu au vert-jaune dans les mêmes conditions.

- les révélations avec les révélateurs chimiques par oxydation, copulation, complexation, nitrosation des fonctions phénoliques.

- la comparaison des valeurs de Rf dans de différents systèmes de solvants et en présence de témoins de référence (produits Fluka) ou extraits de végétaux où les composés phénoliques étudiés ont été antérieurement identifiés (FLEURIET, communication personnelle).

Dans le cas des caractéristiques communes observées entre un composé inconnu et un témoin de référence, la présence d'une seule tache après co-chromatographie (en mélangeant les deux substances) dans différents solvants, permet de conclure à l'identité des deux substances.

2 - l'étude spectrophotométrique en lumière ultra-violette permet d'apporter des indications complémentaires sur la structure des composés phénoliques obtenus par séparation chromatographique et élution. Les dérivés hydroxycinnamiques en particulier, absorbent principalement entre 300 et 340 nm. Cette propriété peut être utilisée pour caractériser un composé par son maximum d'absorption dans un milieu donné d'une part et, d'autre part en faisant varier le pH de ce milieu (MACHEIX, 1974).

Les spectres ont été enregistrés au spectrophotomètre PERKIN-ELMER 356.

3 - l'étude chimique par hydrolyse permet de déterminer les constituants moléculaires du composé étudié selon trois processus classiquement utilisés (ALIBERT, 1968 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ; MACHEIX, 1968) :

- l'hydrolyse alcaline s'effectue à température ambiante en solution sodique 2N, pendant 2 h. sous atmosphère d'azote pour éviter l'oxydation des composés phénoliques, très facile en milieu alcalin. On arrête l'hydrolyse par acidification du milieu qui passe du jaune au blanc. L'adjonction d'acide doit se dérouler vers 0°C pour supprimer l'échauffement du milieu dû à la réaction chimique.

- l'hydrolyse acide est réalisée en solution aqueuse avec de l'acide chlorhydrique 2N, dans un bain-marie bouillant pendant 1 h.

- l'hydrolyse enzymatique peut être conduite suivant le processus décrit pour l'estérase par LEVY et ZUCKER (1960), pour la β glucosidase par ALIBERT (1968) en milieu tamponné à 37°C. L'addition d'une solution acide au milieu permet de bloquer l'action enzymatique et d'arrêter l'hydrolyse.

L'étude par hydrolyse enzymatique n'a pas pu être menée d'une manière approfondie dans ce travail. Dans tous les cas, les acides phénoliques libérés sont extraits à l'éther éthylique. La phase étherée est ensuite évaporée jusqu'à sec sous vide à 30°C et le résidu est repris dans un volume minimum d'éthanol à 80 % en vue d'une co-chromatographie avec des substances phénoliques témoins.

La fraction non phénolique de la phase aqueuse restante peut être traitée différemment suivant ce que l'on veut mettre en évidence. L'analyse des sucres peut être réalisée suivant le protocole défini par RIBEREAU-GAYON (1959, 1968), inspiré de la méthode de HARBORNE et SHERRAT (1957), en neutralisant au préalable le milieu avec de la di n -octyl-méthyl-amine et en effectuant des séparations chromatographiques et des révélations appropriées.

4 - les techniques qui viennent d'être décrites ne prétendent pas d'une manière absolue, à elles seules, aboutir à la détermination complète des composés phénoliques étudiés. D'autres techniques plus élaborées au point de vue étude fine, peuvent être appliquées et apporter des réponses définitives sur leur structure. Ainsi l'étude des spectres aux I R et de résonance magnétique nucléaire sont souvent mises en oeuvre.

II - IDENTIFICATION des COMPOSES PHENOLIQUES de l'ANANAS.

L'étude par chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (20-7-10) à partir d'un extrait brut (non purifié) nous a permis de repérer en lumière ultra-violette, au départ 6 taches que nous avons désignées par P₁, P₂, P₃, P₄, P₅ et P₆. A chacune des taches correspond un ou plusieurs composés phénoliques qui se séparent très difficilement même après 20 h. de développement (Fig. 4). Par contre, une très bonne séparation a été obtenue par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes de solvants B.A.E. (4-1-5)/M.F.E. (3-1-2) en particulier à partir d'un extrait purifié (Fig. 8).

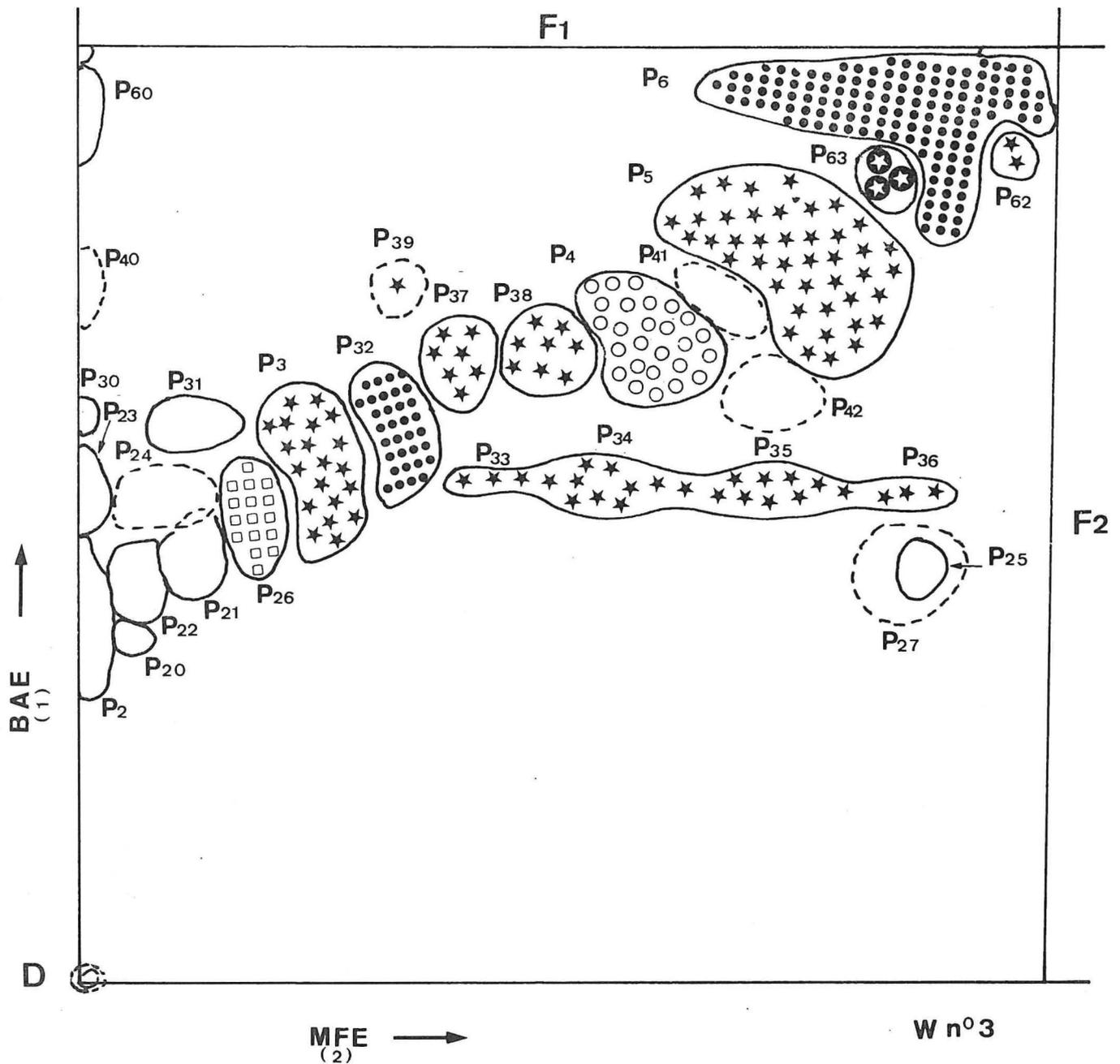


Fig. 8 - Chromatogramme bidimensionnel d'un extrait purifié (2 g/ml)

F₁ et F₂ : fronts de solvants

D : dépôt (quantité déposée : 1 ml)

concentration de l'extrait purifié, 2 g. de matière fraîche par ml

Identification des spots : P₆₂ : acide p.coumarique libre ;
P₆₃ : cinnamyl-glucose ; P₅ : acide di p.coumaryl-1,4 quinique ;
P₃, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₃₈, P₃₉ : acides p.coumaryl-quiniques ;
P₃₇ : p.coumaryl-glucose ; P₄ : acide caféyl-quinique ;
P₃₂, P₆ : férulyl-glucoses ; P₂₆ : sinapyl-glucose

Dérivés hydroxycinnamiques non identifiés : P₆₀ ; P₄₀, P₄₁ ; P₄₂
P₃₀ ; P₃₁ ; P₂₇ ; P₂₅ ; P₂₄ ; P₂₃ ; P₂₂ ; P₂₁ ; P₂₀ ; P₂

A - LES GROUPES de COMPOSES PHENOLIQUES PRESENTS

La plupart des composés constituant la tache P₁ ne sont cependant pas repérables sur le chromatogramme bidimensionnel à cause vraisemblablement de leur concentration faible ou de leur insolubilisation totale ou partielle dans l'acétate d'éthyle au cours de la purification de l'extrait. Aussi nous avons tenu compte des composés P₁, obtenus uniquement en monodimensionnel à partir de l'extrait brut, pour distinguer au total, dans le matériel 32 à 33 composés phénoliques différents parmi lesquels, (Tableaux la, lb) :

- des dérivés hydroxycinnamiques dont l'une des caractéristiques est leur dédoublement moléculaire en isomères cis et trans dans l'acide acétique à 2 %. Une étude détaillée sera consacrée à ces composés.

- des flavonols ou des hétérosides de flavonols. Leur séparation peut être réalisée directement par chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (20-7-10) à partir de l'extrait brut. Dans l'ensemble ils constituent le groupe de composés phénoliques de la tache P₁, qui migrent peu dans la plupart des solvants utilisés. Leur coloration de fluorescence en lumière ultra-violette varie du jaune-vert pâle au jaune-vert plus ou moins brillant en présence de vapeurs d'ammoniac. Malgré la diversité de ces composés les concentrations individuelles sur le chromatogramme restent cependant généralement faibles. Leur identification n'a pas fait l'objet d'une étude particulière dans ce travail.

Remarques :

Les flavanes fréquents dans les fruits charnus comme la pomme (LAVOLLAY et al., 1944 ; NAKABAYASHI, 1953 ; HERRMANN, 1958 ; MACHEIX, 1968 ..), la poire (MOSEL et HERRMANN, 1974), la pêche (WONG et al., 1971 ; BUREAU-BERTHAULT, 1975), ne semblent pas être représentés dans notre matériel.

D'autres familles de flavonoïdes semblent être présentes mais leur mise en évidence demanderait une étude particulière qui n'a pas été abordée ici.

B - LES DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES.

1 - Présentation générale.

La plupart des dérivés hydroxycinnamiques ont été isolés par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes de solvants B.A.E./M.F.E. et

Tableau 1a - Caractéristiques de révélation des composés P₁

F : fluorescent

composés phénoli- ques	Révélation	
	U.V.	U.V. + NH ₃
P _{1a}	bleu F	bleu F
P _{1b}	-	-
P _{1c}	jaune-vert pâle F	jaune-vert F
P _{1d}	jaune-vert F	jaune-vert F
P _{1e}	jaune-vert F	jaune-vert F
P _{1f}	bleu-vert pâle F	vert-jaune F

Remarque : le composé P_{1b} n'est pas caractérisé ici.
Il fera l'objet d'une étude particulière dans
un chapitre ultérieur.

Tableau 1b - Caractéristiques de révélation des différents composés présents dans l'extrait purifiés.

F : fluorescent nF : non fluorescent
 (+) conserve et renforce la fluorescence
 (-) éteint la fluorescence

Composés phénoliques	Révélation		
	U.V.	U.V. + NH ₃	Benedikt
P ₆	bleu F	vert-jaune F	+
P ₆₀	jaune pâle F	jaune pâle F	+ ?
P ₆₁	sombre nF	sombre nF	+
P ₆₂	sombre nF (légèrement violet)	violet F	+
P ₅	sombre nF (légèrement violet)	bleu-violet F	+
P ₄	bleu F	vert-jaune F	-
P ₄₀	nF	bleu F	+
P ₄₁	nF	bleu F	+
P ₄₂	vert-jaune pâle F	vert-jaune F	+
P ₃	sombre nF (légèrement violet)	bleu F	+
P ₃₀	nf	bleu F	+
P ₃₁	vert-jaune pâle F	vert-jaune F	+
P ₃₂	bleu F	vert-jaune F	+
P ₃₃	nF	bleu F	+
P ₃₄	nF	bleu F	+
P ₃₅	nF	bleu F	+
P ₃₆	nF	bleu F	+
P ₃₇	nF	bleu F	+
P ₃₈	nF	bleu F	+
P ₃₉	nf	bleu F	+

Tableau 1b -- Caractéristiques de révélation des différents composés présents dans l'extrait purifiés.

F : fluorescent nF : non fluorescent
 (+) conserve et renforce la fluorescence
 (-) éteint la fluorescence

Composés phéno- liques	Révélation		
	U.V.	U.V. + NH ₃	Benedikt
P ₆	bleu F	vert-jaune F	+
P ₂	bleu-pâle F	vert-jaune F	+
P ₂₀	jaune pâle F	vert-jaune F	+
P ₂₁	nf	violet F	+
P ₂₂	nf	violet F	+
P ₂₃	jaune-vert	jaune-vert F	+
P ₂₄	jaune pâle F	vert-jaune pâle F	+
P ₂₅	nf	violet F	+
P ₂₆	bleu-vert F	jauné-vert turquoise F	+
P ₂₇	jaune pâle F	vert-jaune F	+ ?

rechromatographiés dans d'autres solvants (A.B.A.E., B.A., A.A 2 %) en vue de leur purification. Le comportement chromatographique de chacun des composés a été étudié dans les divers solvants mis en oeuvre (Fig. 8a, 8b, 8c, 8d).

Suivant les colorations de fluorescence en lumière ultra-violette un nombre important de composés phénoliques présents dans le matériel répondent aux caractéristiques des dérivés hydroxycinnamiques (MACHEIX, 1974 ; FLEURIET, 1975) :

- une série importante de composés (P₅, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₃₉, P₃₀, P₄₀, P₄₁, P₆₂) présente des comportements proches de ceux de l'acide p-coumarique ou de ses dérivés (WILLIAMS, 1955 ; LEVY et ZUCKER, 1960) : sombres non fluorescents, légèrement violets aux U.V. et virant au bleu ou bleu-violet fluorescent en présence de vapeurs d'ammoniac.
- une tache (P₄), de coloration de fluorescence bleue aux U.V. devenant vert-jaune brillant en présence d'ammoniac, rappelle les caractéristiques de l'acide chlorogénique et de ses isomères.
- deux taches (P₆ et P₃₂) bleues fluorescentes devenant vert-jaune fluorescentes en atmosphère d'ammoniac, semblent être des dérivés proches de l'acide férulique.
- une tache (P₂₆) bleu-vert fluorescent qui devient vert-jaune turquoise en présence d'ammoniac, pourrait être un dérivé de l'acide sinapique.
- trois taches (P₂₀, P₂₁, P₂₅) non fluorescentes aux U.V. seuls et violettes fluorescentes en présence d'ammoniac ; leur comportement chromatographique semble les différencier beaucoup de l'acide p-coumarique et de ses dérivés.
- une tache (P₆₃) sombre non fluorescente en l'absence ou en présence d'ammoniac, caractéristique semblable à celle de l'acide cinnamique, migrant au niveau de ce dernier près du front dans la plupart des solvants utilisés.

D'autres taches (P₂, P₂₂, P₂₃, P₂₄, P₂₇, P₃₁, P₄₂, P₆₀ ...) ont des colorations de fluorescence variant du jaune pâle au vert-jaune pâle en présence de vapeurs d'ammoniac. L'isomérisation cis-trans dans l'acide acétique à 2 % permet d'obtenir des spots diffus et imprécis. Il n'a pas été possible de préciser avec certitude leur appartenance au groupe des dérivés hydroxycinnamiques. Leur concentration apparaît généralement faible sur les chromatogrammes.

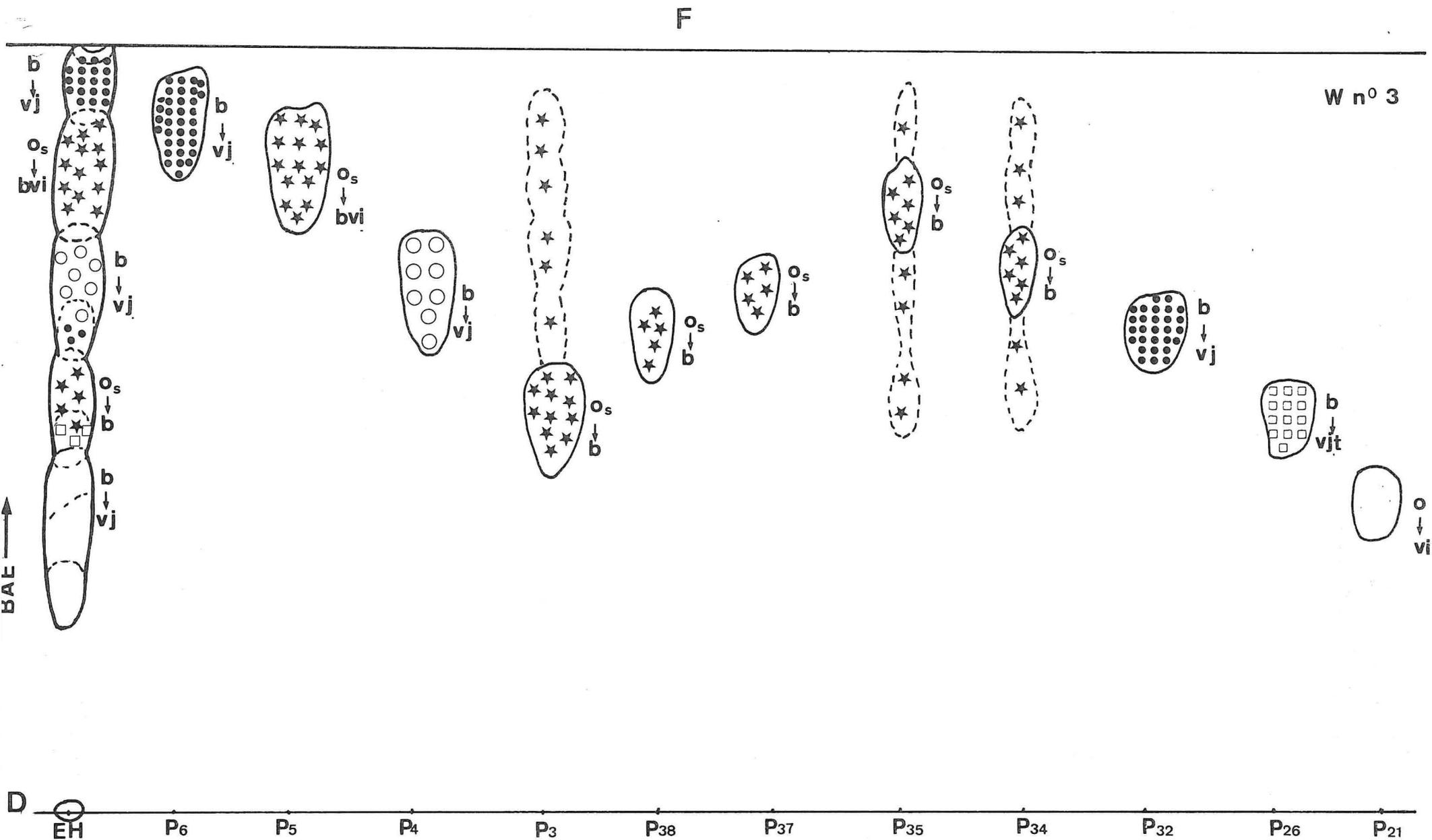


Fig. 8a - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (4-1-5) des principaux dérivés hydroxycinnamiques purifiés identifiés chez l'ananas *Comosus*, variété Cayenne Lisse. Fluorescence aux U.V. + NH₃ : b = bleu ; bv = bleu-vert ; bvi = bleu violet ; bp = bleu pâle ; vi = violet ; vj = vert jaune ; vjt = vert jaune turquoise ; O (s) = sombre non fluorescent, légèrement violet. ; D = dépôt ; F = front de solvant.

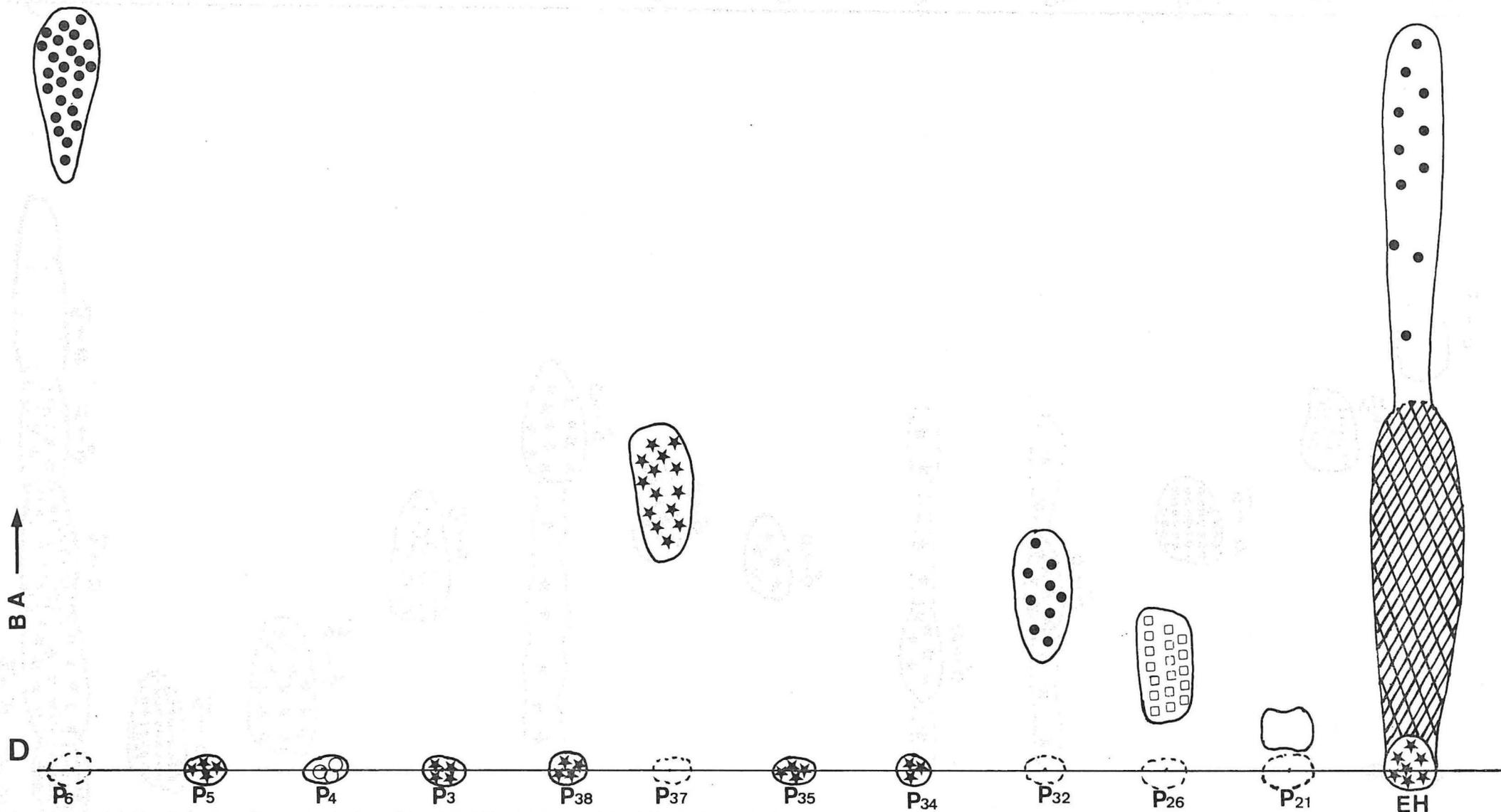


Fig. 8b - Chromatographie monodimensionnelle dans le butanol ammoniacal. B.A (1-1) des principaux dérivés hydroxycinnamiques purifiés identifiés chez l'ananas Comosus, variété Cayenne Lisse. Seuls les esters avec sucres migrent. EH : extrait hydroalcoolique purifié. F : front de solvant ; D : dépôt. Identification des spots, voir Fig. 8 et 8a.

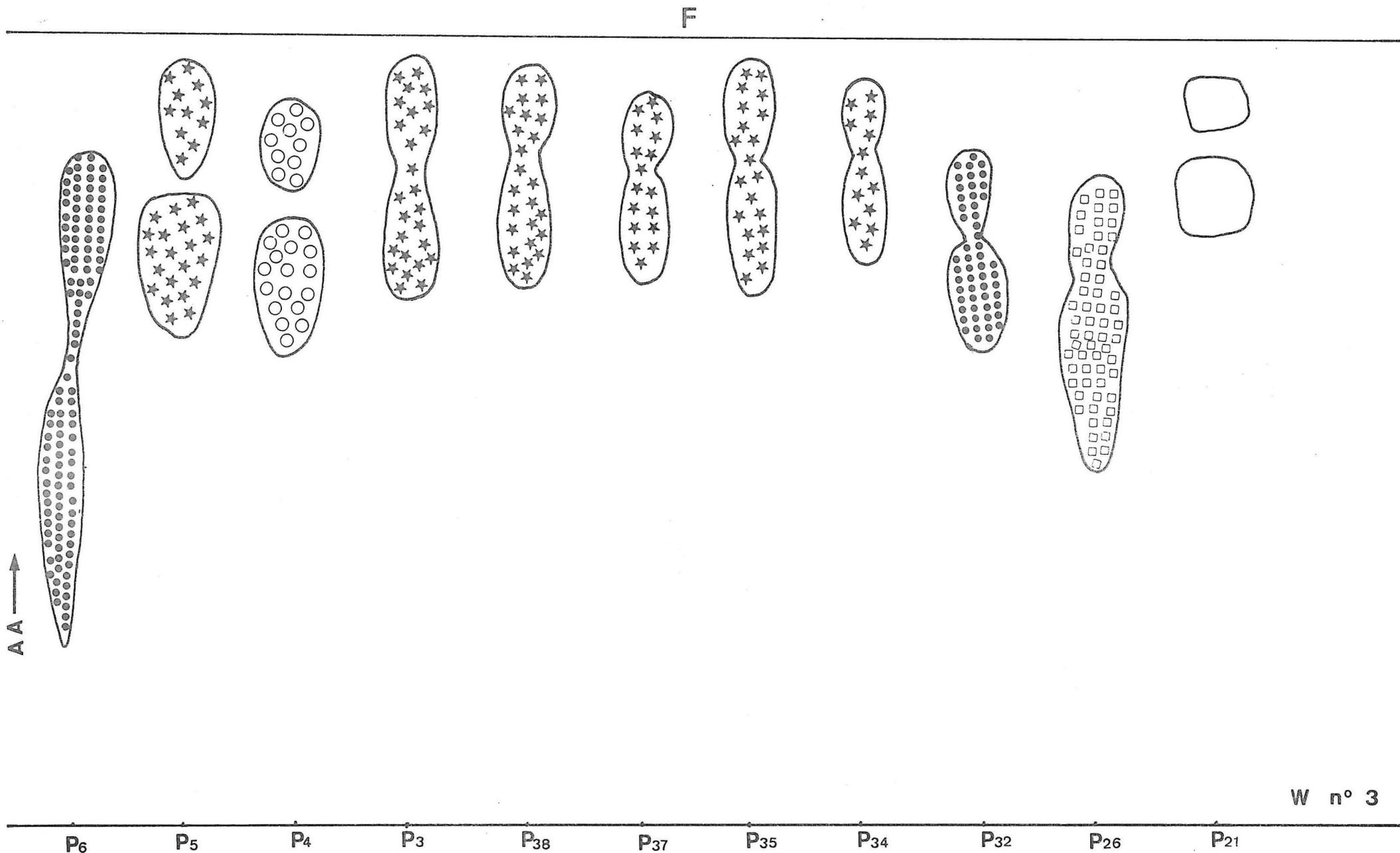


Fig. 8c - Chromatographie monodimensionnelle dans l'acide acétique à 2 % AA des principaux dérivés hydroxycinnamiques purifiés, identifiés chez l'ananas *Comusus*, variété Cayenne Lisse. Isomérisation cis trans : les isomères trans (Rf inférieurs) sont relativement plus importants que les isomères cis au point de vue concentration.

F : front de solvant ; D : dépôt ; Identification des spots : voir Fig. 8 et 8a.

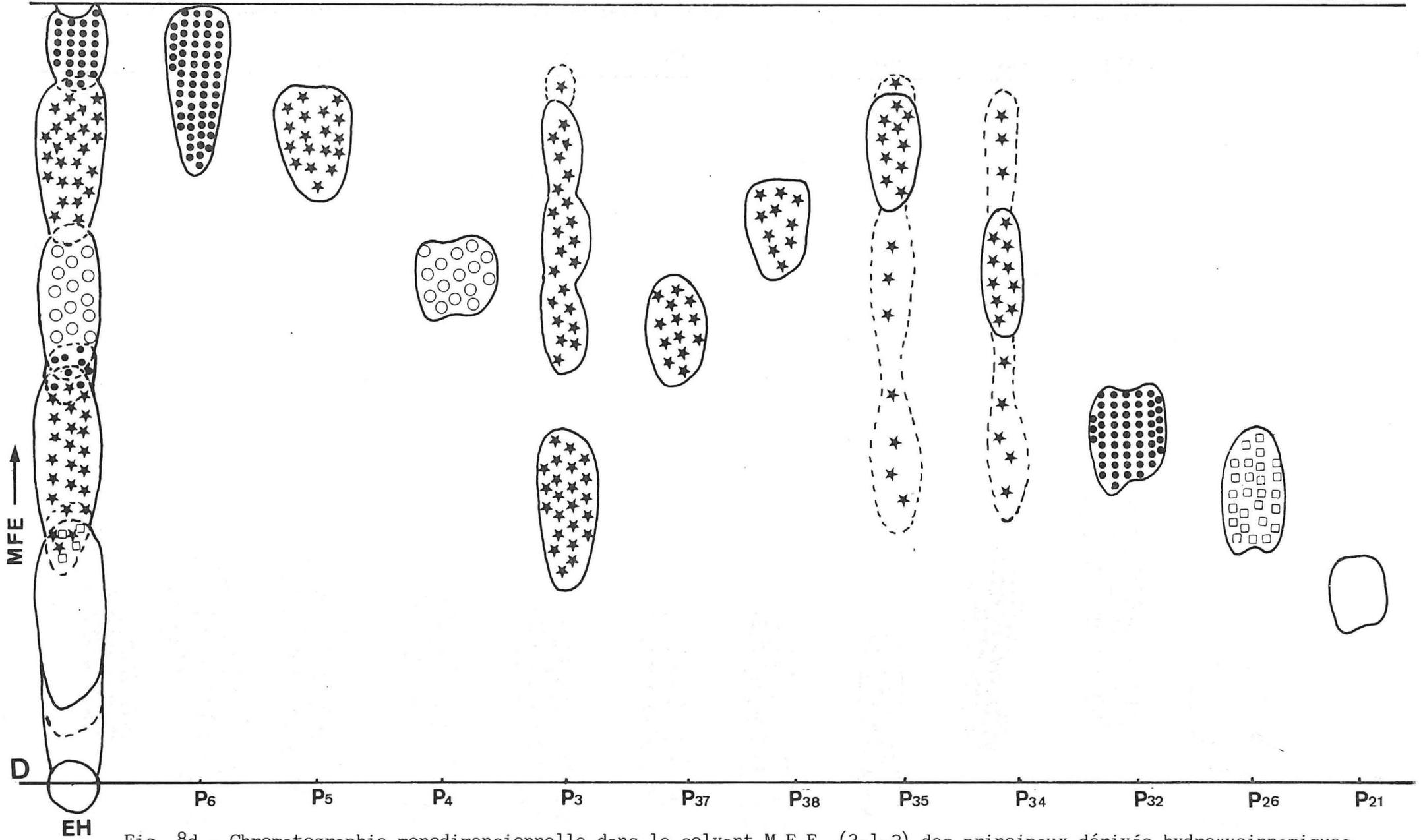


Fig. 8d - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant M.F.E. (3-1-2) des principaux dérivés hydroxycinnamiques purifiés, identifiés chez l'ananas Comosus, variété Cayenne Lisse. Identification des spots : voir Fig. 8 et 8a
 F : front de solvant ; D : dépôt ; EH : extrait hydroalcoolique purifié.

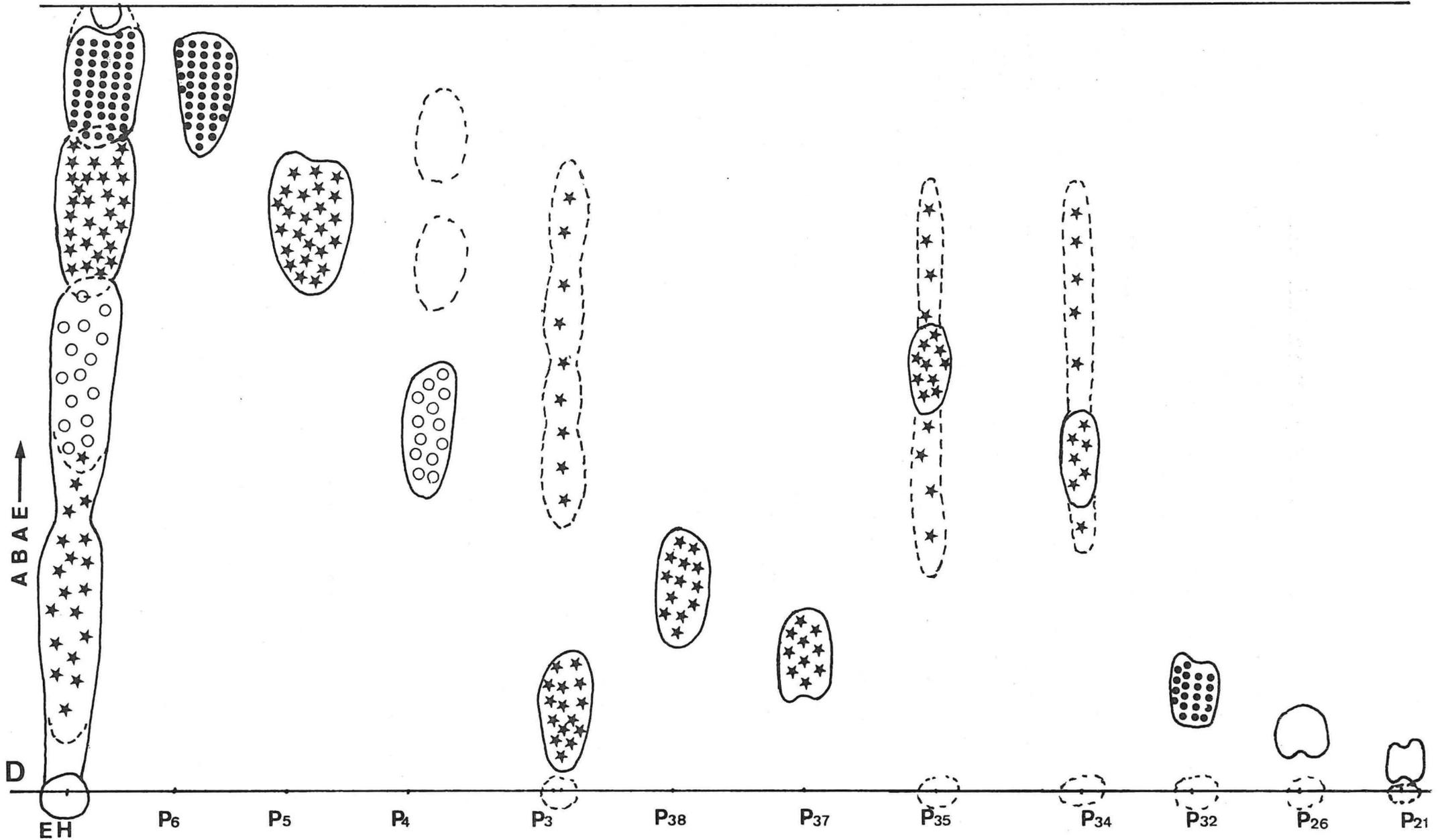


Fig. 8e - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant A.B.A.E. (4-1-5) des principaux dérivés hydroxycinnamiques purifiés et identifiés chez l'ananas *Comosus*, variété Cayenne Lisse. F = front de solvant ; D : dépôt ; EH : extrait hydroalcoolique purifié. Identification des spots : voir Fig. 8 et 8a.

2 - Les produits d'hydrolyse de l'extrait (Fig. 9).

L'hydrolyse alcaline d'un extrait purifié selon les techniques déjà définies permet de libérer les acides phénols simples liés aux parties non phénoliques de différents composés présents. Nous avons identifié dans l'hydrolysate, après co-chromatographie en présence des témoins un certain nombre d'acides dont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique. Un autre acide, dont le comportement chromatographique se rapproche de celui de l'acide gentisique, semble être présent aussi dans l'hydrolysate. Les quatre ou cinq acides sont donc présents dans les extraits de fruits, sous forme d'esters. Cependant, l'hydrolyse reste incomplète comme dans le cas de la tomate "cerise" (FLEURIET, 1975) contrairement à celui de la pomme (MACHEIX, 1974). On peut penser qu'il s'agit là, en ce qui concerne les composés phénoliques non ou partiellement hydrolysés, d'hétérosides.

3 - Composés phénoliques dont les caractéristiques sont identiques à celles de l'acide p-coumarique et de ses dérivés.

Le réactif de Benedikt, pulvérisé sur un chromatogramme bidimensionnel d'un extrait purifié, conserve et même renforce la coloration bleue ou bleu-violet fluorescente en lumière ultra-violette, des composés que nous pensons être des dérivés de l'acide p-coumarique. Cette réaction positive montre qu'il s'agit de composés à fonction monophénolique. Isolés par chromatographie bidimensionnelle dans les solvants B.A.E./M.F.E. les principaux d'entre eux ont été rechromatographiés dans les systèmes de solvants A.B.A.E. ou B.A. en vue de leur purification.

a - Le composé P₅ (Tableau 2) a des R_f généralement élevés dans les solvants de développement mis en oeuvre sauf dans le solvant B.A. où il ne migre pas du tout. Ceci suggère que P₅ n'est pas un ester sucré de l'acide p-coumarique mais peut être un ester de l'acide quinique. Son spectre d'absorption aux U.V., dans l'éthanol à 20 % d'eau, est semblable à celui de l'acide p-coumarique et présente un maximum d'absorption à $\lambda = 312$ nm (Fig. 10, 10a). En milieu basique (la solution, incolore au départ, devient jaune clair), un déplacement bathochromique du maximum d'absorption peut être enregistré (avec $\Delta\lambda = 50$ nm). Cette caractéristique

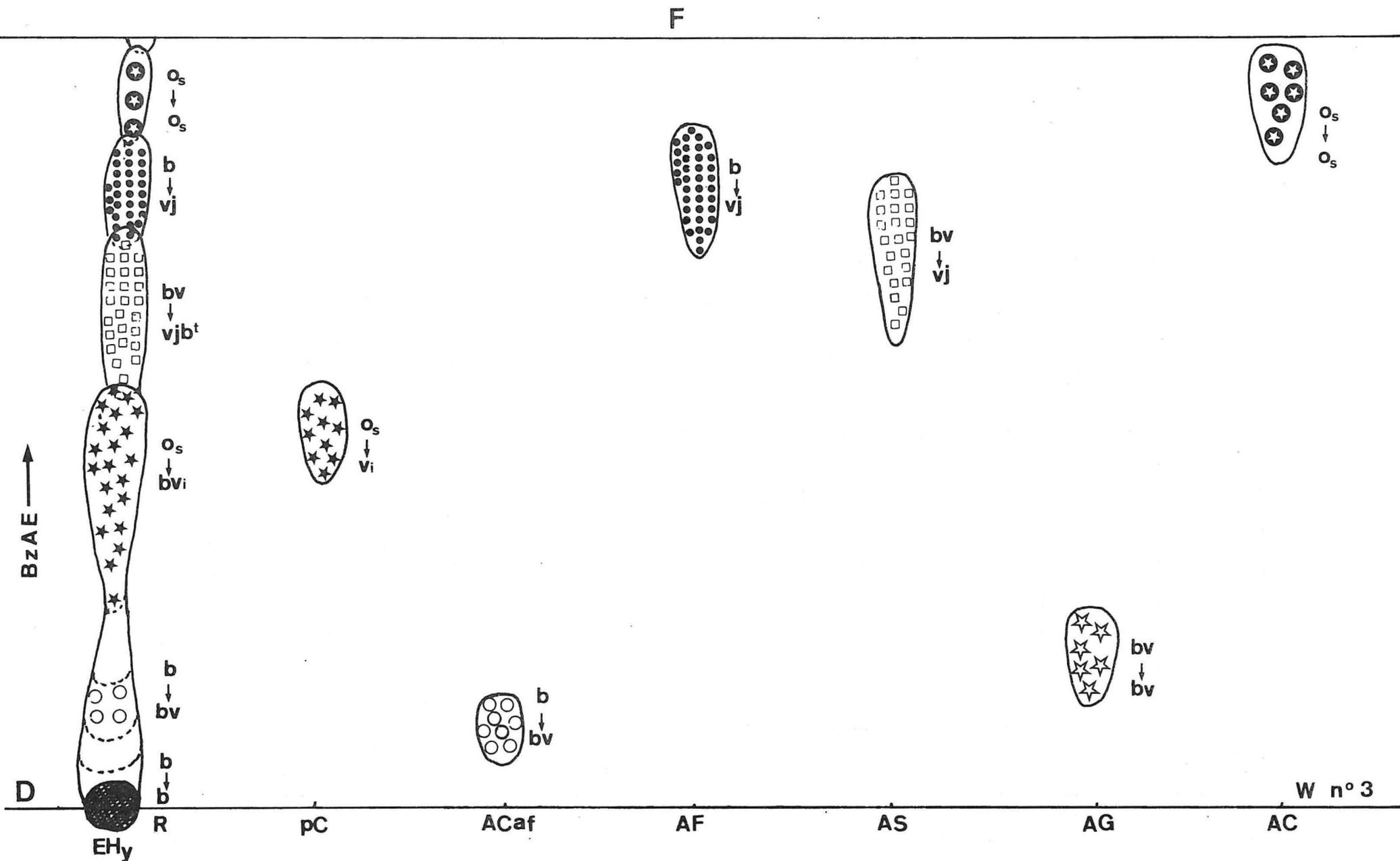


Fig. 9 - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant Bz A.E (6-7-3) de l'hydrolysats (après hydrolyse alcaline de l'extrait purifié EHy). L'importance du spot résiduel R indique que l'hydrolyse est incomplète. Acides phénoliques témoins : pc : acide p.coumarique ; A.caf. : acide caféique ; AF : acide férulique ; AS : acide sinapique ; AG : acide gentisique ; AC : acide cinnamique ; D : dépôt ; F : front de solvant. Fluorescence aux U.V. + NH₃ : b : bleu ; bv : bleu-vert ; vj : vert jaune ; vjbt : vert-jaune brillant vi : violet ; o(s) : sombre non fluorescent ; bvi : bleu violet.

Tableau 2 - Comportements chromatographiques de P₅ et d'un témoin de référence.

Composés	Rf					Révélation			
	B.A.E. (4-1-5)	M.F.E. (3-1-2)	A.B.A.E. (4-1-5)	B.A. (1-1)	A.A. 2 %	U.V.	U.V. + NH ₃	Hoepfner	Benedikt
(1)	0,82 ^a 0,86 ^b 0,82 ^b	0,85 ^a	0,63 ^a	0,01 ^a	0,82-0,88 ^a	s n F			
P ₅	0,81	0,86	0,71	0,01	0,72-0,85	s n F	b vi F	j br	+

Données bibliographiques :

s n F : sombre non fluorescent

b vi F : bleu-violet fluorescent

j br : jaune-brun

(1) di p-coumaryl 1-4-quinique

(a) MELIN (1976)

(b) SUTHERLAND et GORTNER (1958)

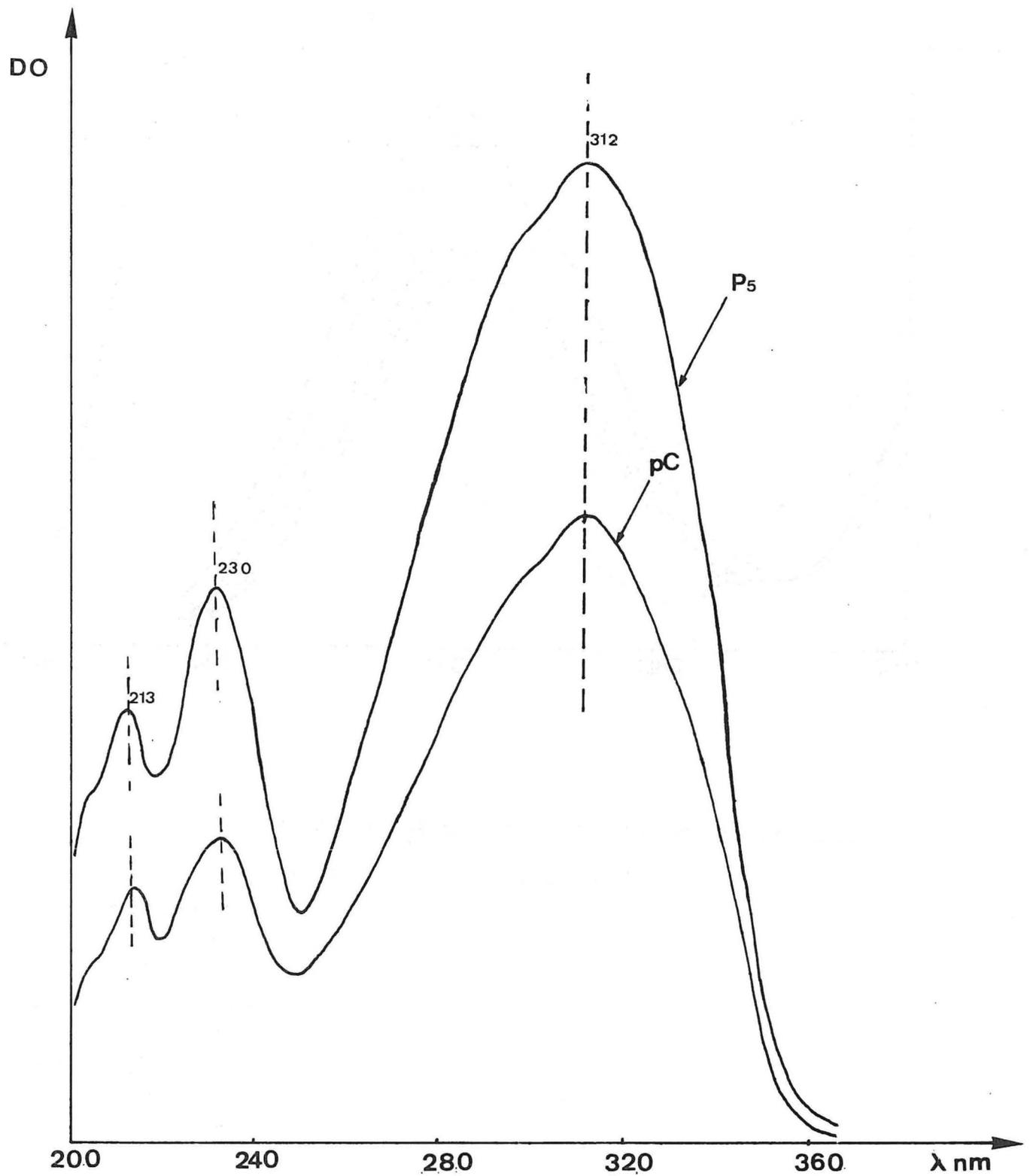


Fig. 10 - Spectres d'absorption de P₅ et de l'acide p-coumarique (pC) dans l'alcool à 80 %

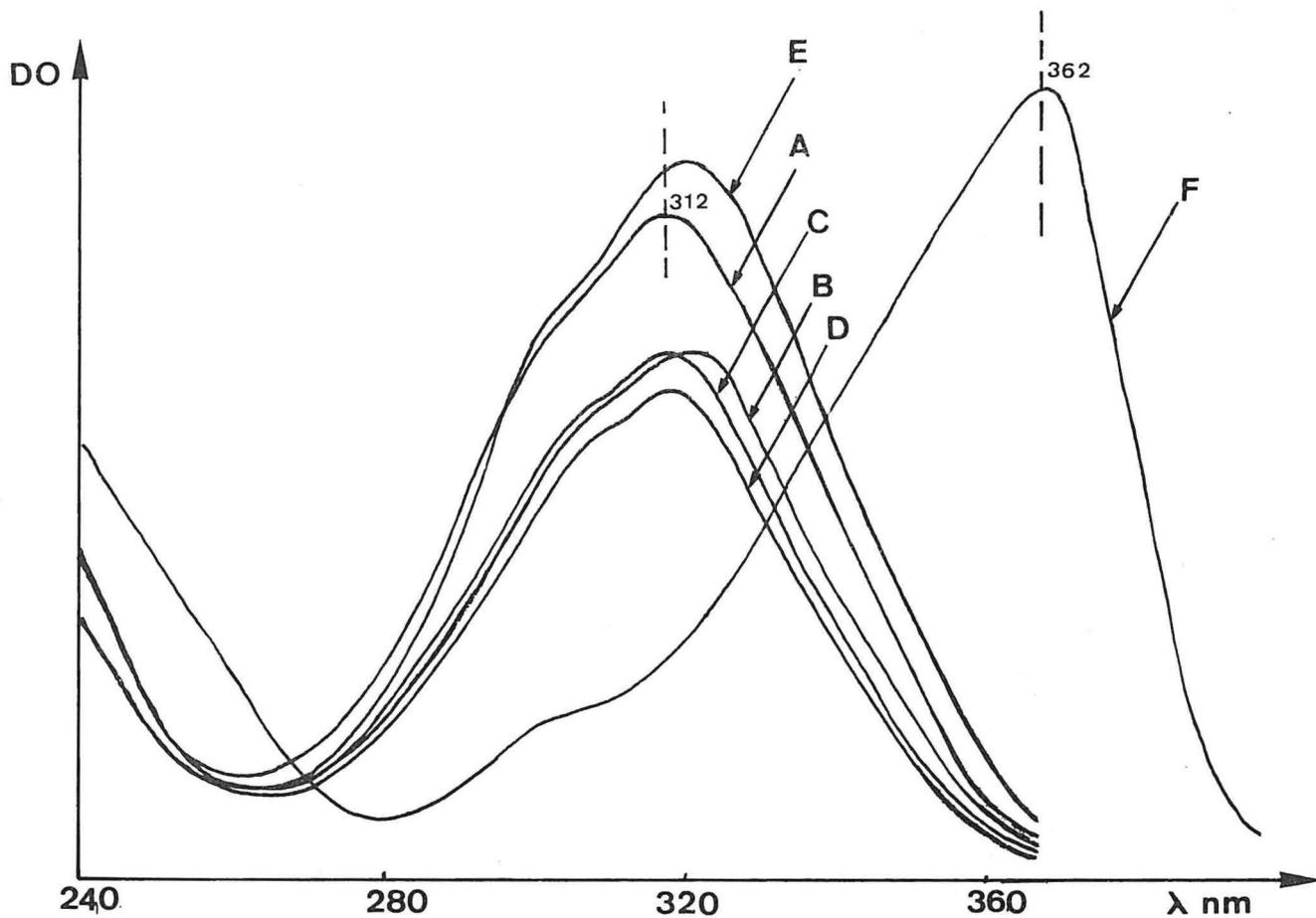


Fig. 10a - Spectres d'absorption du composé P₅

A	-	en milieu éthanolique à 20 % d'eau	pH = 5
B	-	"	"
C	-	"	"
D	-	"	"
E	-	"	"
F	-	"	"

+ 1 goutte de HCl 12N, pH 1,5
 + CH₃ COON_a pH 6,5
 + éthylate de Na 0,002 M pH 6
 + AlCl₃ 0,1 % pH 4,5
 + 1 goutte de NaOH₄N pH 9

indique qu'il existe dans la molécule de P₅ une fonction phénolique libre. Par contre, en milieu éthanolique acide à pH 1,5, la variation du maximum du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde est faible ($\Delta\lambda = 3$ nm). Ceci montre que le radical carboxylique de l'acide phénolique n'est pas libre et est vraisemblablement engagé dans une liaison avec une autre molécule. Les produits d'hydrolyse (alcaline et acide) sont identifiés à l'acide p-coumarique en ce qui concerne l'aglycone et à l'acide quinique pour la fraction non phénolique (Fig. 16a). Cependant les hydrolyses ne sont pas complètes, ce qui semble suggérer que P₅ est un ester quinique "complexe" de l'acide p-coumarique. Par référence aux données de la littérature il s'identifie au quiny-l-p-coumarate étudié par SUTHERLAND et GORTNER (1958) dans la plante de l'ananas Comosus, variété Cayenne, dont la structure a été suggérée comme étant le dip-coumaryl-1-4 quinique. L'étude chromatographique de la partie non phénolique de l'hydrolysate a permis de montrer qu'en dehors de l'acide quinique il existe une autre tache sombre non fluorescente aux U.V. (à 256 nm) qui, au point de vue valeur de R_f, rappelle l'acide ascorbique (Fig. 10b). L'étude de ce composé n'a pas été cependant approfondie pour permettre de conclure sur sa nature.

Remarque :

Un extrait de tissus de pédoncules de fruits a été préparé dans les mêmes conditions que pour les pulpes. L'étude chromatographique de l'extrait obtenu nous a permis de retrouver rapidement P₅ et autres dérivés hydroxycinnamiques identiques à ceux rencontrés dans les fruits. Le dip-coumaryl-1-4 quinique a été étudié dans cette partie de la plante de l'ananas et dans les feuilles (SUTHERLAND et GORTNER, 1959) (Fig. 10c).

b - Le composé P₆₂, quantitativement faible dans l'extrait est repéré sur le chromatogramme par un petit spot qui migre près du front de solvants (B.A.E., M.F.E., A.B.A.E.) utilisés. Sombre non fluorescent aux U.V., il devient bleu-violet fluorescent en présence de vapeurs d'ammoniac. Après hydrolyses alcaline et acide, la partie aglycone a été identifiée à l'acide p-coumarique, alors que la fraction non phénolique n'a donné aucune réaction vis-à-vis de la p-nitraniline, du phtalate d'aniline, du réactif de CARTWRIGHT et ROBERTS (1955). Par ailleurs, P₆₂ réagit positivement avec le réactif de Benedikt, ce qui suggère la présence d'un groupement

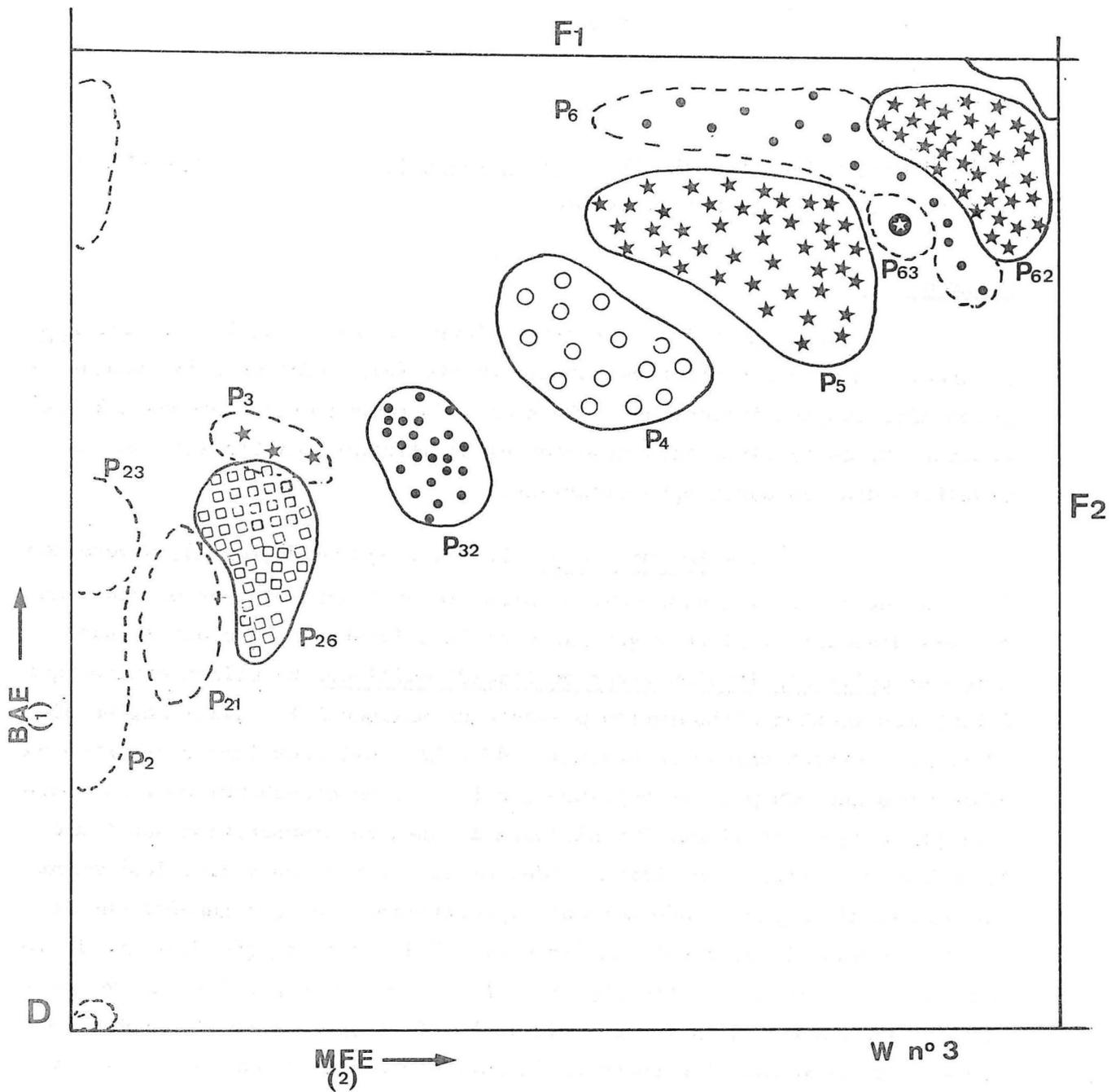


Fig. 10c - Chromatogramme bidimensionnel d'un extrait purifié de tissus de pédoncule d'ananas.

F_1 et F_2 : fronts de solvants ; D = dépôt

Identification des spots : voir fig. 8 et 8a

monophénolique dans la molécule. P₆₂ n'est vraisemblablement pas un ester mais de l'acide p-coumarique libre.

Remarque :

Contrairement à ce qui vient d'être observé dans les fruits, P₆₂ se trouve en quantité relativement importante (Fig. 10c) dans les tissus de pédoncule, comparativement aux autres dérivés p-coumariques présents à des concentrations faibles. Nous discuterons de l'intérêt particulier de ces résultats dans un paragraphe ultérieur.

c - Le composé P₃ (Tableau 3; Fig. 8c, 8d, 11), sombre non fluorescent aux U.V. seuls, devient bleu-violet fluorescent en présence de vapeurs d'ammoniac. Il ne migre pas dans le solvant B.A., ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'un ester de l'acide quinique. En milieu éthanolique à 80 % son spectre d'absorption présente un maximum à $\lambda = 311,5$ nm. Un déplacement bathochromique du maximum ($\Delta\lambda = 51,5$ nm) peut être enregistré en milieu basique. On peut en conclure que P₃ est un monophénol dont la fonction phénolique est libre. Par ailleurs le spectre d'absorption subit une très faible variation en milieu acide, et en revenant en milieu légèrement alcalin il n'y a pas de déplacement hypsochromique, ce qui suggère que la fonction carboxylique n'est pas libre et qu'elle est engagée dans une liaison avec une molécule. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude des produits d'hydrolyses (alcaline et acide). En effet après chromatographie en présence de témoins, l'aglycone et la partie non phénolique de P₃ ont été identifiés respectivement à l'acide p-coumarique et à l'acide quinique. P₃ est donc un ester quinique de l'acide p-coumarique. C'est un mélange vraisemblablement, de dérivés p-coumariques isomères comme le montre l'étude suivante des composés P₃₃, P₃₄, P₃₅ et P₃₆. P₃ diffère cependant des p-coumaryl-quiniques classiques (MACHEIX, 1974) par ses comportements chromatographiques.

Remarque :

P₃ se comporte généralement dans les solvants utilisés en une tache plus ramassée et plus concentrée que celle de P₅ dans les extraits de fruits (pulpes). Par contre, il n'existe qu'à l'état de traces dans les tissus de pédoncule.

Tableau 3 - Comportements chromatographiques de P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₄, P₃₅

et des témoins de référence.

Composés	Rf					Révélation			
	B.A.E. (4-1-5)	M.F.E. (3-1-2)	A.B.A.E. (4-1-5)	B.A. (1-1)	A.A. 2 %	U.V.	U.V.+NH ₃	Hoepfner	Benedikt
(1)	0,63 ^a 0,68 ^b	0,42 ^c 0,42 ^b	0,14 ^c 0,15 ^b	0,52 ^c 0,52 ^b	* 0,74-0,55 ^b				
(2)	0,71 ^a 0,72 ^b	0,64 ^c 0,64 ^b	0,51 ^c 0,50 ^c	0,15 ^c 0,17 ^b	* 0,77-0,87 ^b				
(3)	0,72 ^b	0,64 ^c 0,64 ^b	0,39 ^c 0,38 ^b	0,15 ^c 0,17 ^b	* 0,77-0,87 ^b				
(4)	0,68 ^b	0,46 ^b 0,47	0,17 ^c 0,17	0,18 ^b 0,15	* 0,77-0,87 ^b				
P ₃	0,48	0,36	0,35	0,01	0,75-0,85	s n F	b F	j	+
P ₃₇	0,65	0,48	0,15	0,40	0,72-0,80	s n F	b F	j	+
P ₃₈	0,59	0,61	0,20	0	0,83-0,91	s n F	b F	j	+
P ₃₄	0,70 à 0,72	0,69 à 0,72	0,42 à 0,45	0,01	0,70 0,73	s n F	b F	j	+
P ₃₅	0,75 à 0,79	0,80 à 0,85	0,54 à 0,57	0,01	0,78 0,82	s n F	b F	j	+

b F : bleu fluorescent
s n F : sombre non fluorescent
j : jaune
(+) : conserve et renforce la fluorescence

(a) FLEURIET (1975)
(b) MELIN (1976)
(c) MACHEIX (1974)

* acide acétique à 15 %

Données bibliographiques :
(1) : p-coumaryl-1-glucose
(2) : p-coumaryl-1-3 quininique
(3) : p-coumaryl-1-4 quininique
(4) : p-coumaryl-1-5 quininique

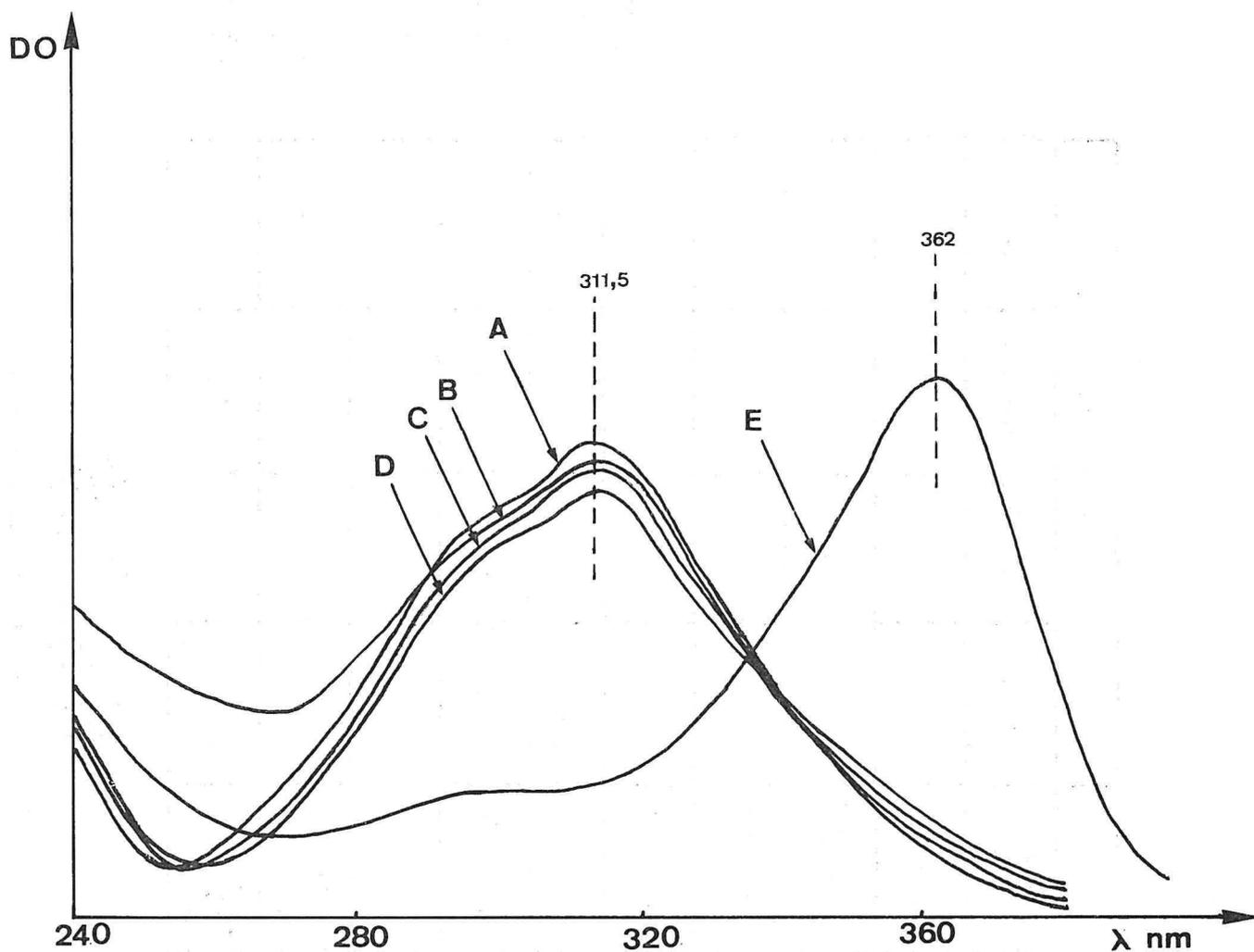


Fig. 11 - Spectres d'absorption du composé P_3

- A : en milieu éthanolique à 20 % d'eau pH = 5
- B : " " " + 1 goutte de HcL
12 N pH 1,5
- C : " " " + $AlCl_3$ 0,1 % pH 4,5
- D : " " " + éthylate de Na
0,002 M pH 6
- E : " " " + 1 goutte de NaOH 4N
pH 9

d - Les composés P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆ (Tableau 3), ont le même Rf que P₃ dans le solvant B.A.E., mais se comportent différemment dans les solvants M.F.E. et A.B.A.E.. Ils se présentent sur le chromatogramme en une succession de taches très peu séparables les unes des autres. Seuls P₃₄ et P₃₅ ont des concentrations constamment plus importantes que les deux autres. Leurs caractéristiques communes se résument ainsi :

- Rf = 0 dans le solvant B.A.,
- fluorescence bleue aux U.V. et en présence d'ammoniac,
- réaction positive avec le réactif de Benedikt,
- déplacement bathochromique en milieu basique à pH 9,
- les produits d'hydrolyse sont identifiés à l'acide p-coumarique et à l'acide quinique.

Il s'agit d'esters quiniques de l'acide p-coumarique, probablement isomères de P₃. En effet, P₃ isolé du matériel par chromatographie bidimensionnelle dans les solvants B.A.E./M.F.E., purifié dans le solvant A.B.A.E., puis re-chromatographié seul dans les solvants M.F.E. et A.B.A.E. donne naissance à quatre autres composés qui s'identifient au point de vue Rf et coloration de fluorescence aux U.V. aux composés P₃₃, P₃₄, P₃₅ et P₃₆. La formation d'isomères par trans-estérification est possible au cours des différentes manipulations comme l'ont signalé SCARPATI et ESPOSITO (1963) dans le cas des dérivés caféïques. Cependant la présence constante de P₃₃, P₃₄, P₃₅ et P₃₆ dans la première séparation bidimensionnelle classique dans les solvants B.A.E./M.F.E. et la différence nette entre les valeurs de Rf dans les divers solvants comparativement à celles de P₃ dans les mêmes solvants, laissent penser que l'hypothèse d'isomères très proches de P₃ existant naturellement dans le matériel, est vraisemblable pour ces quatre composés. Chacun d'eux se dédouble dans l'acide acétique à 2 %, en donnant les isomères de position cis et trans.

Remarque :

Ces quatre composés ne semblent pas exister ou seulement à l'état de très faibles traces dans l'extrait des tissus de pédoncule de fruits où P₃ se trouve lui-même en quantité très faible.

e - Les composés P₃₇, P₃₈ (Tableau 3, Fig. 12, 13, 16b, 20),

sont vraisemblablement des dérivés p-coumariques à cause de leur coloration de fluorescence aux U.V., sombre légèrement violet sans ammoniac et virant au bleu en présence d'ammoniac. Ils se comportent différemment dans les divers solvants utilisés. P₃₇ migre très bien dans le B.A., par contre P₃₈ a un R_f = 0 dans ce même solvant, ce qui traduit pour le premier la présence d'un sucre dans sa molécule et pour le second, de l'acide quinique. Les spectres d'absorption dans l'éthanol à 20 % d'eau sont semblables et rappellent les spectres de l'acide p-coumarique ou de ses dérivés. En effet, P₃₇ présente un maximum d'absorption à 314 nm et P₃₈ à 312 nm. L'hydrolyse (alcaline ou acide) permet la libération d'un aglycone commun aux deux composés qui est identifié à l'acide p-coumarique et de deux parties non phénoliques différentes : celle qui correspond à P₃₈ a été identifiée à l'acide quinique, par contre, la partie non phénolique de P₃₇ chromatographiée en présence d'un témoin commercial et d'un éluat de papier traité dans les mêmes conditions d'hydrolyse, s'identifie au glucose. D'autres analyses telles que l'étude du spectre en milieu plus ou moins basique (déplacement bathochromique), la réaction positive vis-à-vis du réactif de Benedikt, ont été réalisées en vue de la détermination de leur nature exacte. Ainsi, P₃₇ est un ester p-coumaryl-glucose et P₃₈ un acide p-coumaryl-quinique.

f - D'autres composés quantitativement moins importants dans l'extrait, sont repérés à l'état de très faibles traces sur le chromatogramme : P₂₁, P₂₂, P₂₅, P₃₀, P₃₉, P₄₀, P₄₁. Non fluorescents aux U.V. seuls, ils virent au bleu ou bleu-violet fluorescent en présence de vapeurs d'ammoniac et réagissent positivement vis-à-vis du réactif de Benedikt, ce qui suggère la présence d'une fonction monophénolique dans leur molécule. En dehors de ces quelques points caractéristiques qui les rapprochent des dérivés p-coumariques, nous n'avons pas pu avoir d'autres indications sur leur structure.

Ainsi, l'acide p-coumarique existe sous trois formes dans l'ananas :

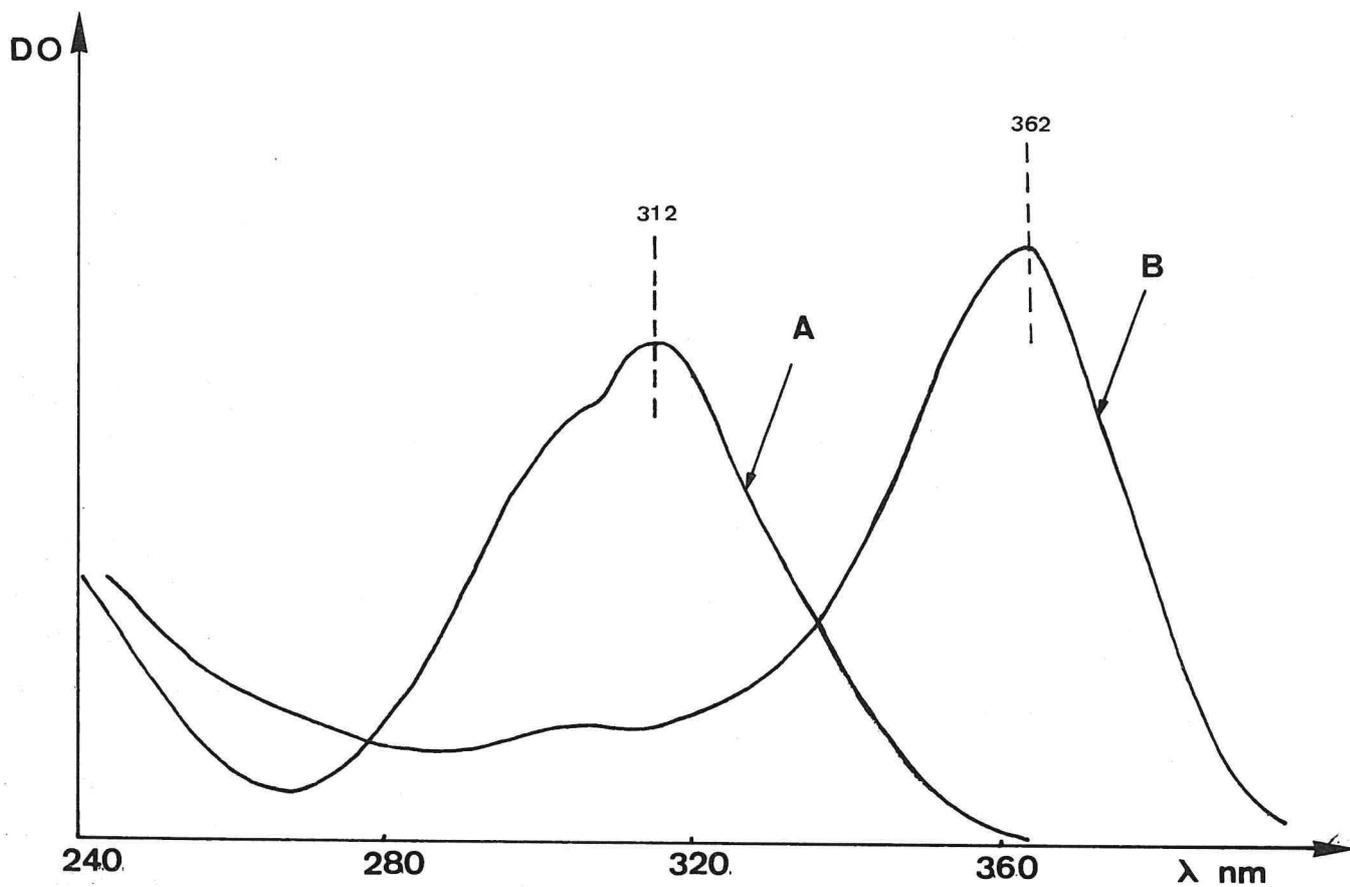


Fig. 12 - Spectres d'absorption de P₃₈ en milieu éthanolique à 20 % d'eau (A) à pH5 et en milieu alcalin à pH9 (B).

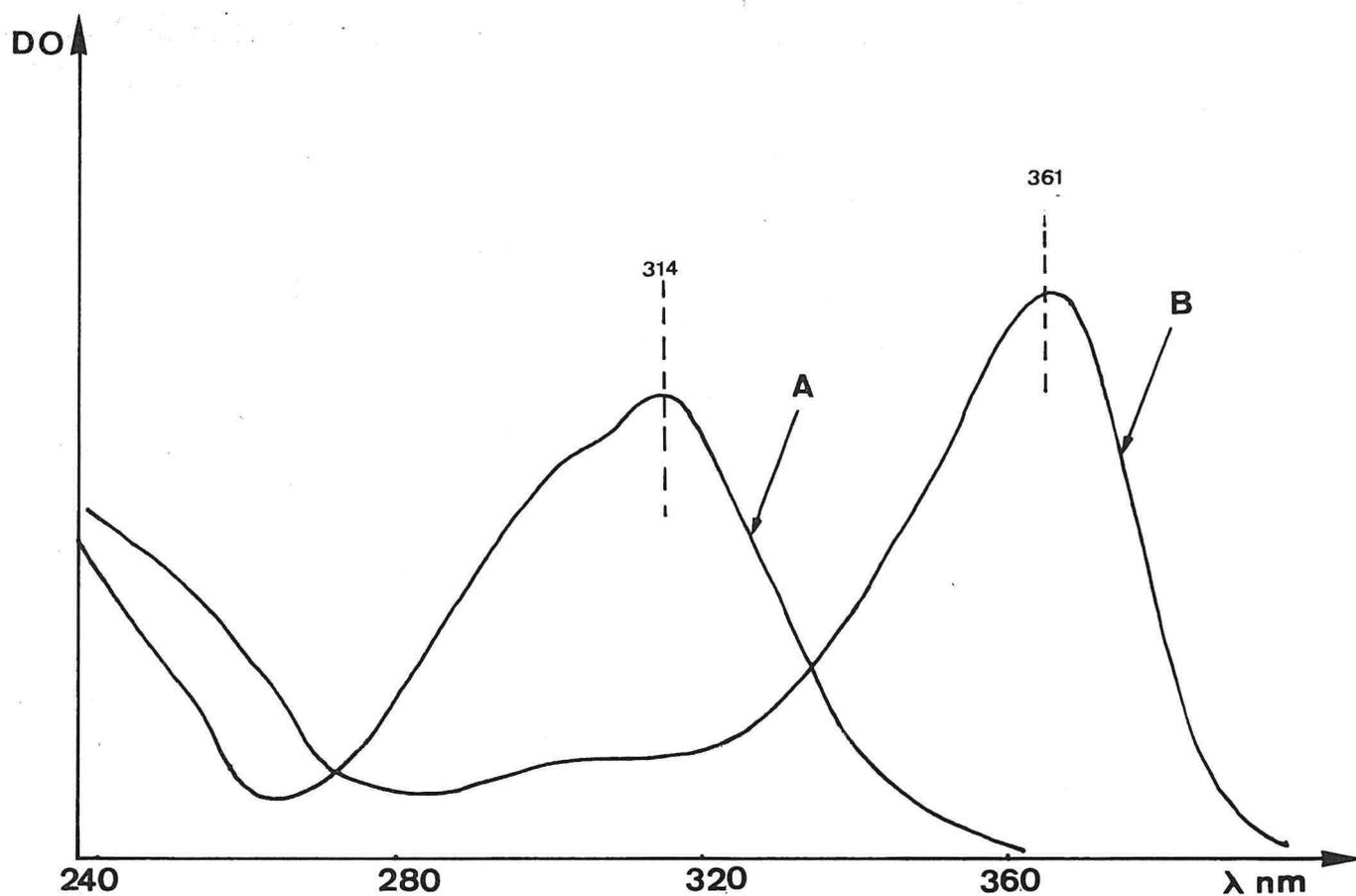


Fig. 13 - Spectres d'absorption de P₃₇ en milieu éthanolique à 20 % d'eau pH5 (A) et en milieu alcalin à pH9 (B).

- à l'état libre (P_{62}), l'acide p-coumarique existe en quantité relativement faible dans notre matériel. Selon BATE-SMITH (1956) c'est l'acide phénolique le plus fréquemment rencontré dans les végétaux supérieurs.
- sous forme d'esters quiniques ($P_5, P_3, P_{33}, P_{34}, P_{35}, P_{36}, P_{38} \dots$). C'est la forme combinée la plus diversement représentée et quantitativement la plus abondante.
- sous forme d'ester avec le glucose. Un seul composé, P_{37} , représente ce type d'ester dans notre matériel. Sa concentration est cependant relativement modeste par rapport à celles des esters quiniques. De nombreux travaux de recherche ont montré l'existence des formes combinées de l'acide p-coumarique avec les sucres dont les plus connus ont été rapportés par CORNER et HARBORNE (1960), HARBORNE et CORNER (1961), MACHEIX (1971), CHU et al. (1973). L'importance de ce type de combinaison mérite d'être soulignée en ce sens que la synthèse des composés phénoliques tel que l'acide chlorogénique passe peut-être par le biais d'un ester p-coumaryl-glucose (RUNECKLES, 1963 ; MACHEIX, 1974).

4 - Composés phénoliques dont les caractéristiques de fluorescence aux U.V. sont très voisines de celles de l'acide férulique et de ses dérivés.

Ces composés sont caractérisés par leur coloration de fluorescence bleue aux U.V. seuls, virant au vert-jaune en présence de vapeurs d'ammoniac. Leur réaction positive vis-à-vis du réactif de Benedikt montre qu'il s'agit des composés ayant un groupement monophénolique.

a - Le composé P_6 (Tableau 4, Fig. 14, 16a, 16b) migre généralement près du front dans la plupart des solvants utilisés (B.A.E., M.F.E., A.B.A.E., B.A., A.A 2 %) en formant une trainée plus ou moins longue et diffuse. Par suite probablement des impuretés que l'on peut entraîner au cours de l'élution du composé ou d'une dégradation possible au cours des manipulations, P_6 rechromatographié, en vue de sa purification, dans les solvants A.B.A.E., B.A., n'a pas tout à fait les mêmes caractéristiques spectrales que lorsqu'il est obtenu directement à partir des chromatographies monodimensionnelles dans le solvant B.A.E. Dans ce dernier

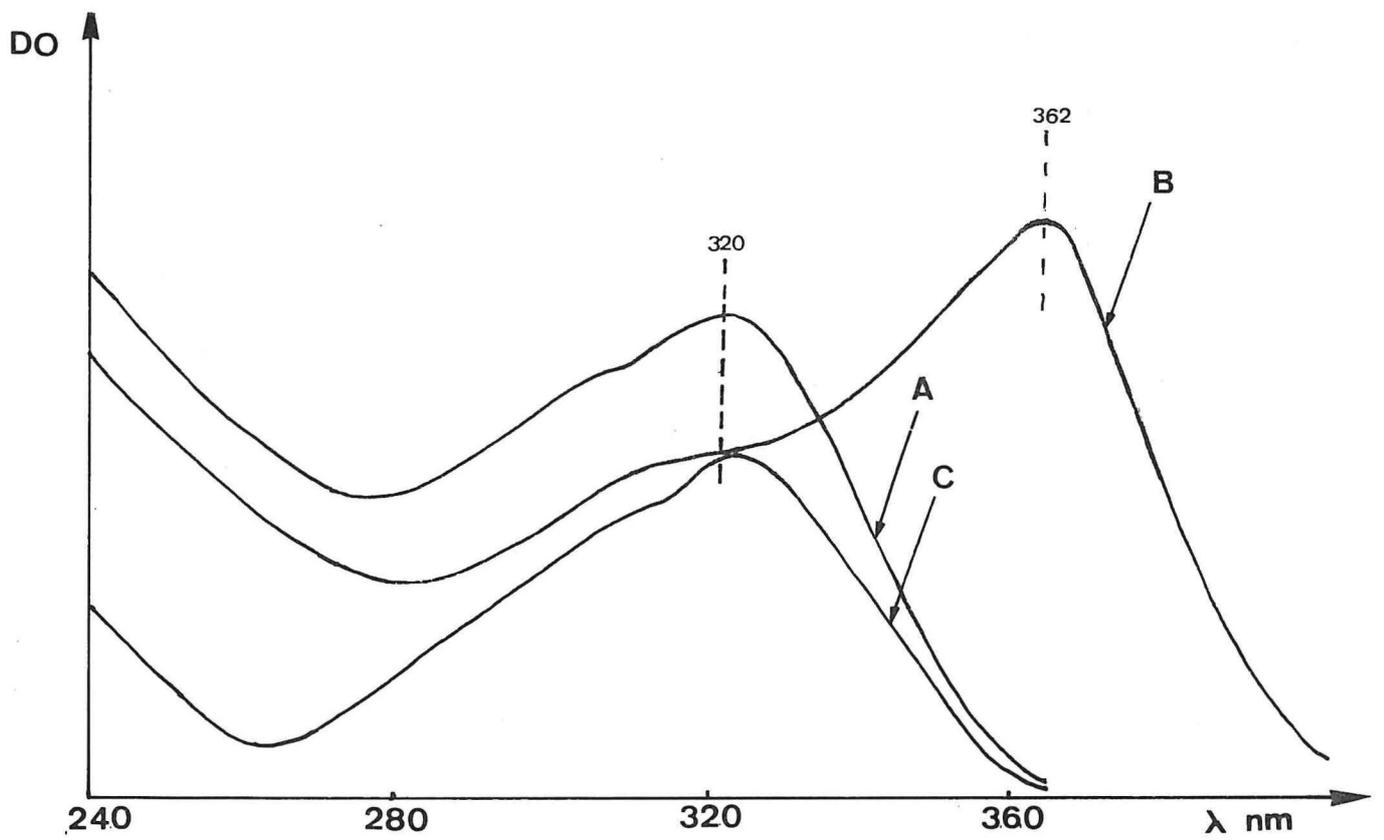


Fig. 14 - Spectres d'absorption du composé P₆ en milieu éthanolique à 20 % d'eau (A) et en milieu alcalin (B) à pH9, et de l'acide férulique (C)

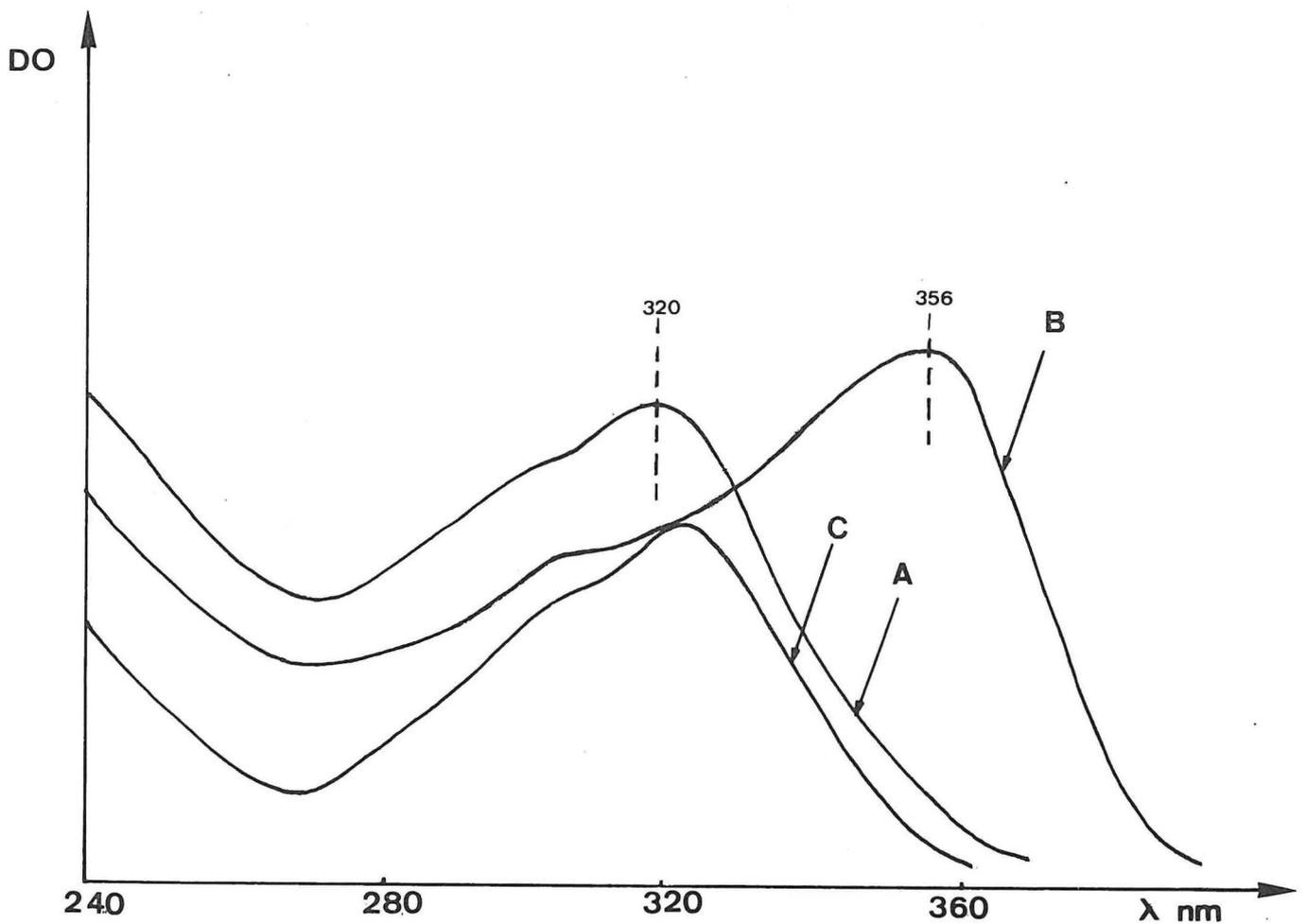


Fig. 15 - Spectres d'absorption du composé P₃₂ en milieu éthanolique à 20 % d'eau (A) et en milieu alcalin (B) pH9 et de l'acide férulique (C).

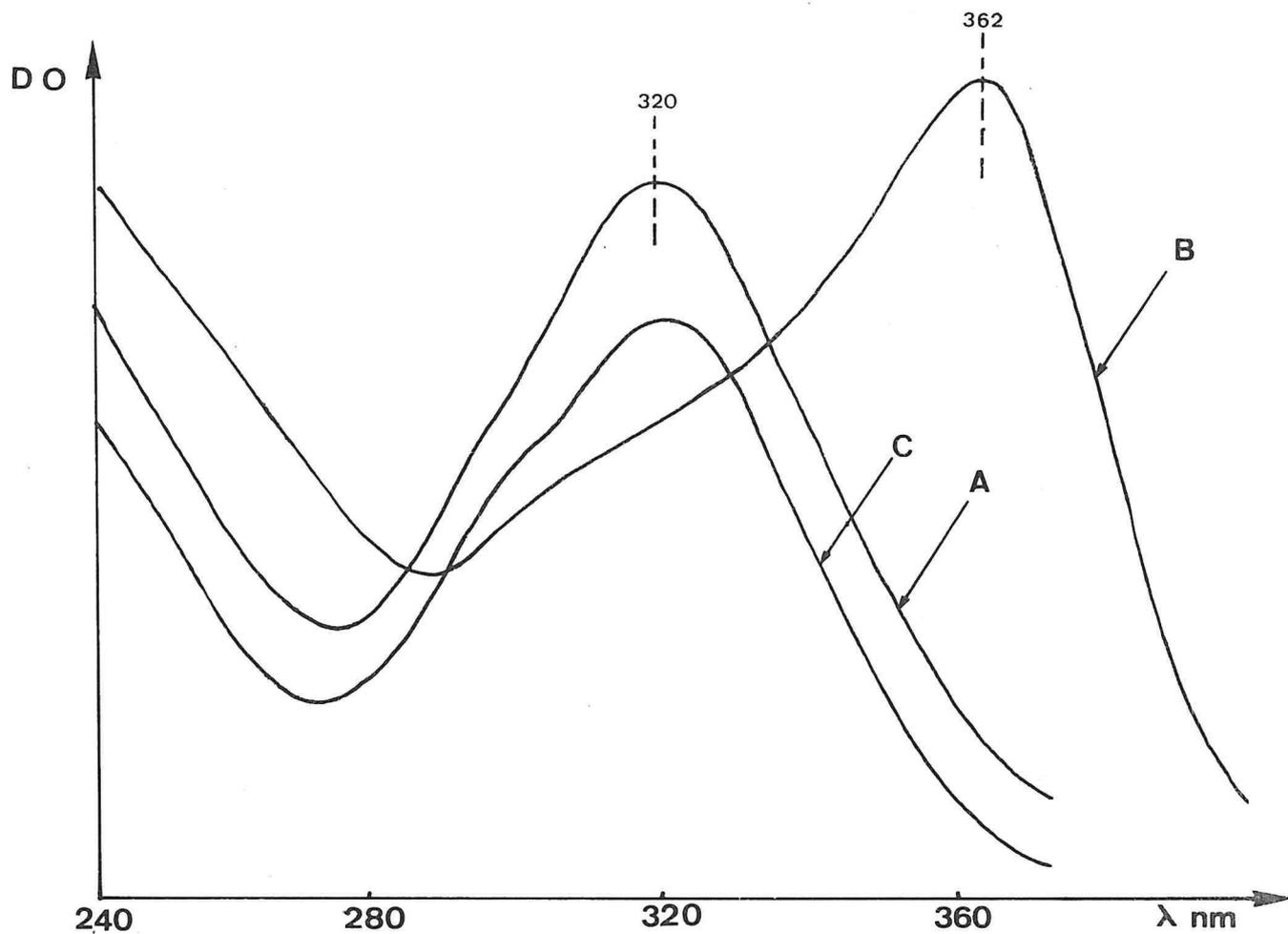


Fig. 16 - Spectres d'absorption du composé P_{26} , en milieu éthanolique à 80% (A) et en milieu alcalin (B) à pH9 ; et de l'acide sinapique (c).

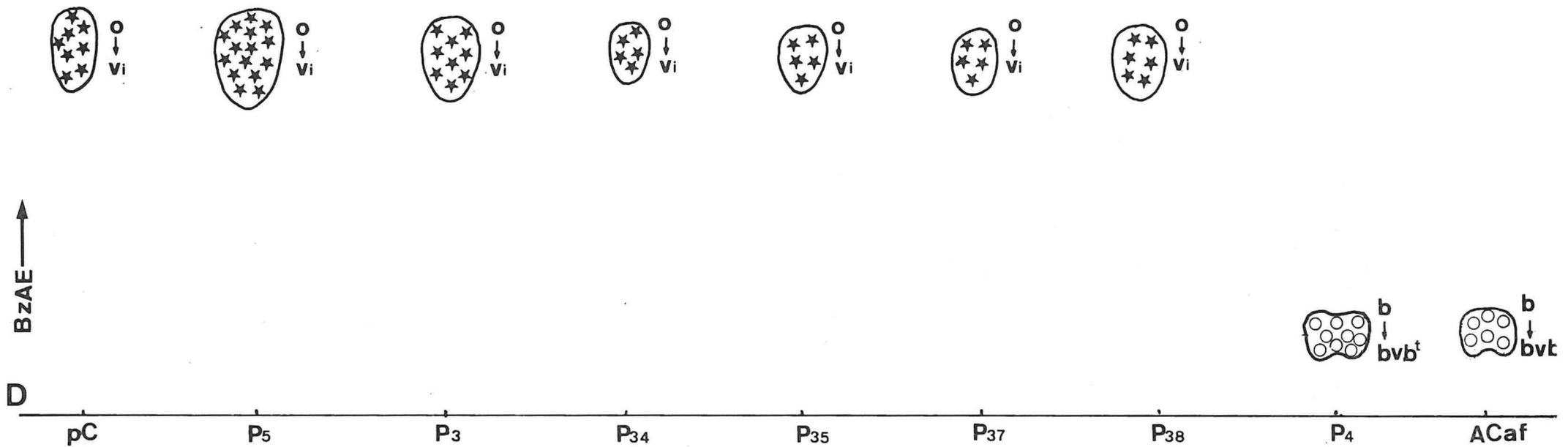


Fig. 16a - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant BzA.E. (6-7-3) des aglycones des composés purifiés, après hydrolyse, en présence d'acides-phénols témoins :

pc = acide p-coumarique ; ACaf = acide caféique

Fluorescence aux U.V. + NH₃ : b = bleu ; bvi = bleu violet ; bvb^t = bleu vert brillant ; O = non fluorescent

F = front de solvant ; D = dépôt

F

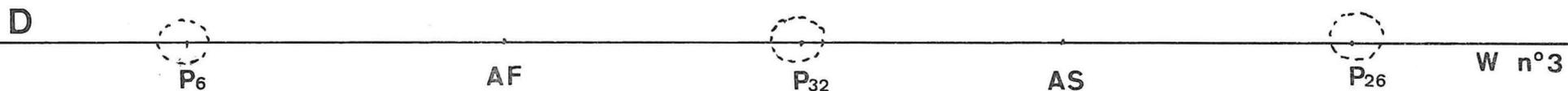
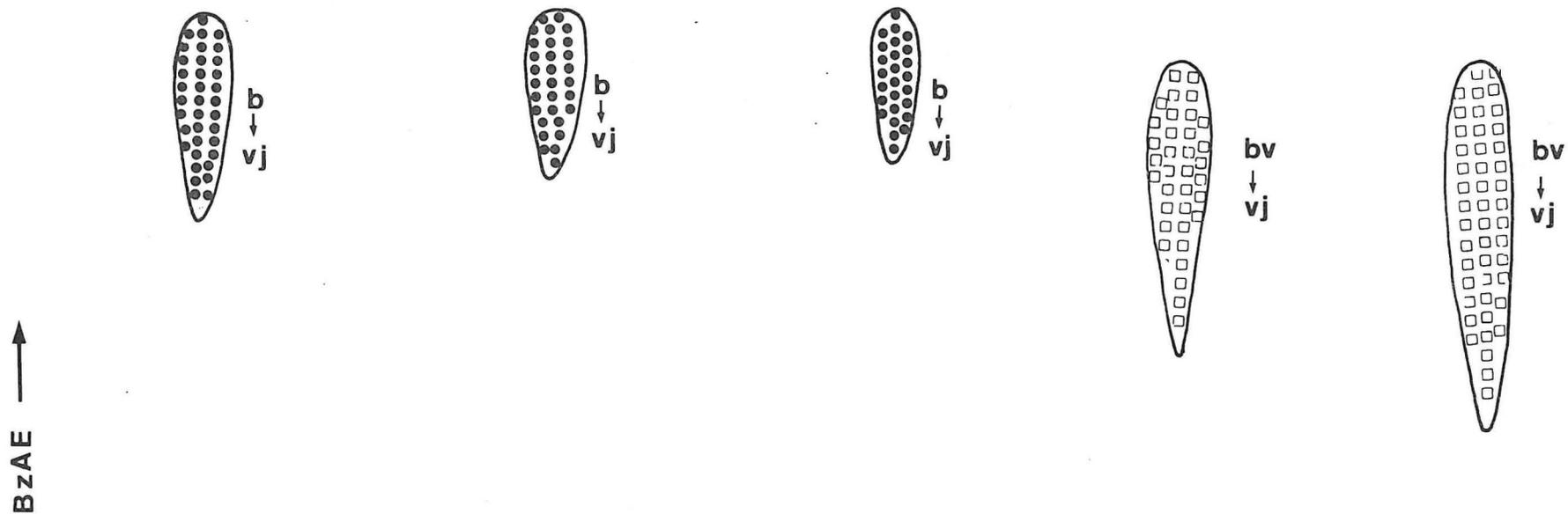


Fig. 16a (suite) - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant Bz.A.E. (6-7-3) des hydrolysats des composés purifiés : P₆, P₃₂, P₂₆ : parties phénoliques

Acides phénoliques témoins : AF = acide férulique ; AS = acide sinapique

Fluorescence aux U.V. + NH₃ : b = bleu ; vj = vert jaune ; bv = bleu vert

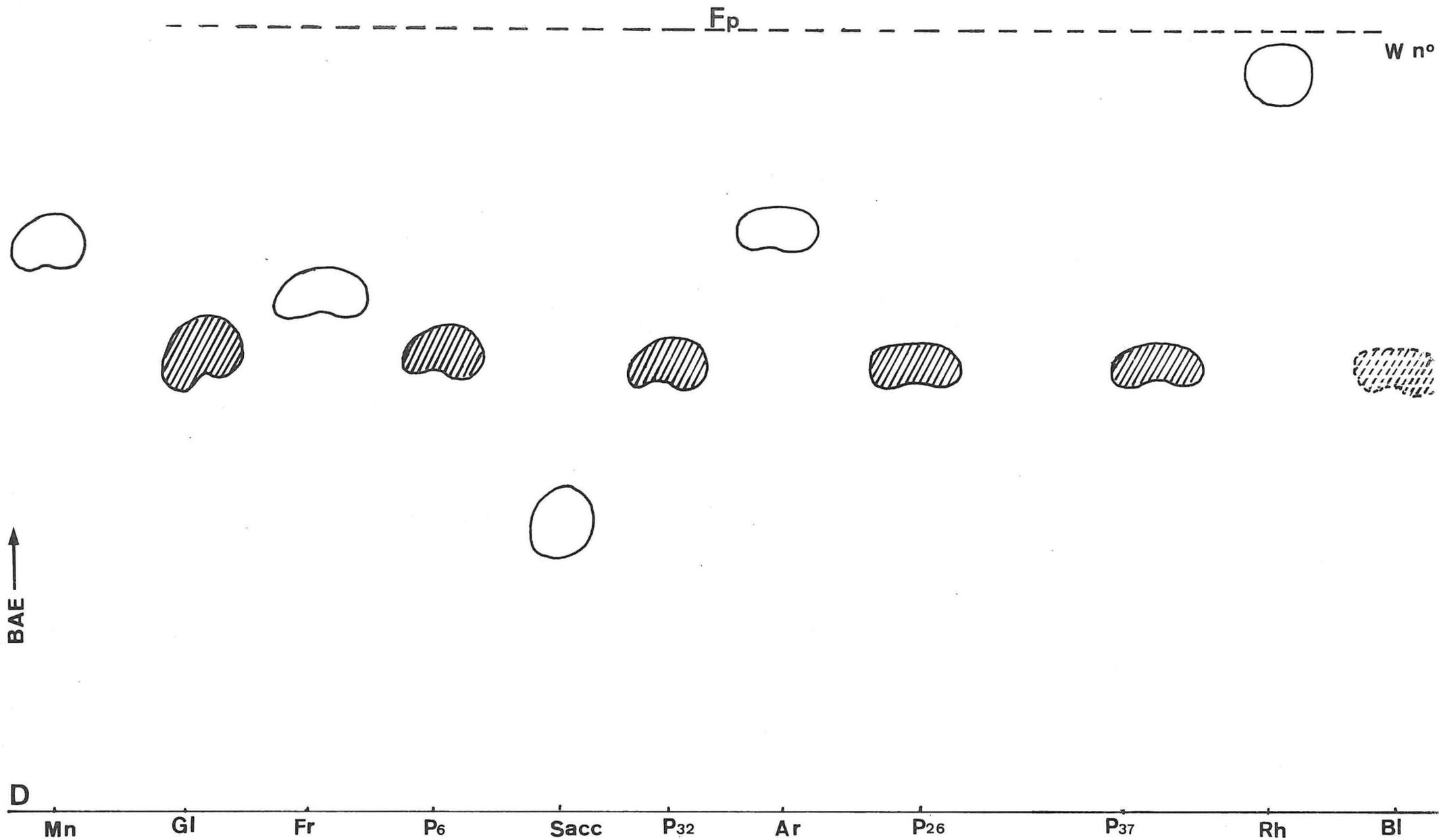


Fig. 16b - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (4-1-5) des parties non phénoliques, après hydrolyse, des composés purifiés P₆, P₃₂, P₂₆, P₃₇. Sucres témoins : Mn = manose ; GI = glucose ; Fr = fructose ; Sacc = saccharose ; Ar = arabinose ; Rh = Rhamnose.

Révélation au phtalate d'aniline : les taches correspondant au glucose deviennent brunes après chauffage vers 100°C.

Fp = front perdu ; D = dépôt

cas P₆ absorbe à 319 nm alors que l'acide férulique présente un maximum d'absorption à 320 nm.

L'étude chimique par hydrolyses alcaline et acide a conduit à l'identification après révélations chimiques d'un aglycone à l'acide férulique et d'une fraction non phénolique au glucose au point de vue Rf et réaction au phtalate d'aniline. Un éluat de papier témoin hydrolysé dans les mêmes conditions que le composé révèle aussi la présence du glucose principalement mais à une concentration nettement plus faible que celle du glucose de l'hydrolysât. P₆ est donc un ester de l'acide férulique avec du glucose. Comparé aux dérivés féruliques classiques dont le férulyl-glucose extrait des pommes (FLEURIET, communication personnelle), P₆ se comporte différemment au point de vue chromatographie dans la plupart des solvants utilisés. Par ses Rf élevés s'agit-il d'un diférulyl-glucose ? On sait que les substances aromatiques à groupements méthoxylés migrent beaucoup, généralement près du front de solvants (RANDERATH, 1971). Ce qui serait certainement un cas rare car les dérivés féruliques connus sont surtout à l'état de monoférulyl-quinique ou glucose dans divers matériels végétaux (HARBORNE et CORNER, 1961 ; TANGUY, 1970 ; MACHEIX, 1974 ; FLEURIET, 1975).

P₆ semble contenir un autre constituant organique dissociable par hydrolyse. En effet, la chromatographie de l'aglycone nous a permis de voir la présence d'un corps autre que l'acide férulique libéré, non fluorescent aux U.V. et devenant jaune-brun (oxydation ?) à l'air au bout de quelques jours. En dehors de ces indications nous n'avons pas pu approfondir l'étude de ce constituant. L'hypothèse d'une contamination bien qu'elle ne soit pas absolument écartée, ne semble cependant pas être probable.

Remarque :

P₆ se trouve également dans l'extrait des tissus de pédoncule mais à une concentration inférieure par rapport à celle du fruit.

b - Le composé P₃₂ (Tableau 4 ; Fig. 15, 16a, 16b) par ses comportements chromatographiques notamment dans le solvant B.A. où il migre assez bien, par son spectre d'absorption en lumière ultra-violette (λ max = 320 nm), et par les produits d'hydrolyse (alcaline et acide) qui sont respectivement identifiés à l'acide férulique et au glucose en ce qui

Tableau 4 - Comportements chromatographiques des composés P₃₂, P₆ et des témoins de référence.

Composés	Rf					Révélation			
	B.A.E. (4-1-5)	M.F.E. (3-1-2)	A.B.A.E. (4-1-5)	B.A. (1-1)	A.A. 2 %	U.V.	U.V.+ NH ₃	Hoepfner	Benedikt
(1)	0,44 ^d			0,11 ^d					
(2)	0,65 ^a 0,67 ^b	0,31 ^b	0,135 ^b	0,03 ^a 0,115 ^b	* 0,72 ^b 0,82 ^b				
(3)	0,50 ^c 0,57 ^c	0,65 ^c 0,48 ^c	0,09 ^c 0,12 ^c	0,42 ^c 0,28 ^c	0,71 ^c 0,63 ^c				
P ₆	0,93	0,84	0,91	0,86	0,75 0,38	b F	vj F	j o	+
P ₃₂	0,59	0,45	0,13	0,25	0,72 0,65	b F	vj F	j o	+

Données bibliographiques : (1) : ester ferulyl-6-glucose
 (2) : acide férulyl-quinique
 (3) : ester férulyl-glucose

* acide acétique à 15 %
 (A.A. 15 %)

b F : bleu fluorescent

vj F : vert-jaune fluorescent

j o : jaune orangé

(+) : conserve et renforce la fluorescence

(a) TANGUY et GALLET (1969)

(b) MELIN (1976)

(c) FLEURIET (1975)

(d) BIRKOFER et al. (1965)

concerne l'aglycone et la partie non phénolique, est un glucoside de l'acide férulique. Comparé avec du férulyl-1-glucose extrait des pommes. (FLEURIET, 1975) P₃₂ s'identifie à cet ester. Comme P₆, P₃₂ semble contenir également le même composé aromatique qui devient jaune-brun à l'air (par oxydation ?).

c - Le composé P₆₁ repérable seulement en monodimensionnel dans le solvant B.A.E., à cause de sa concentration généralement faible, réagit positivement vis-à-vis du réactif de Benedikt. L'emplacement chromatographique de son spot correspond parfaitement avec celui de l'acide férulique témoin dans tous les solvants utilisés. Il s'agit vraisemblablement de l'acide férulique libre qui peut avoir deux origines : l'une, soit qu'il existe réellement à l'état libre dans le matériel, au même titre que l'acide p-coumarique, mais à une concentration faible, l'autre, soit qu'il résulte d'une hydrolyse partielle de P₆ ou de P₃₂ qui peut se produire au cours des différentes manipulations.

Les dérivés de l'acide férulique présents dans notre matériel sont des esters avec des sucres, en l'occurrence le glucose (P₆ et P₃₂) qui sont peut être associés à un autre composé organique aromatique. La présence de l'acide férulique à l'état libre semble être possible en tant que métabolite intermédiaire et précurseur de P₆ et de P₃₂ mais l'hypothèse d'un artefact, par suite de sa faible concentration dans l'extrait, n'est pas à écarter.

5 - Composés phénoliques possédant des caractères proches de ceux de l'acide sinapique et de ses dérivés.

Nous désignons ainsi les composés qui, observés en lumière ultraviolette, présentent une coloration de fluorescence bleu-vert virant au vert-jaune turquoise (en présence de vapeurs d'ammoniac. Outre le dédoublement moléculaire en isomères cis et trans dans l'acide acétique à 2 %, qui permet de les grouper parmi les dérivés hydroxycinnamiques, ces composés réagissent positivement avec le réactif de Benedikt. Ce qui suppose la présence dans leur noyau benzénique d'un groupement monophénolique.

Seul P₂₆ a été étudié d'une manière approfondie dans ce groupe, les autres composés semblables se trouvant à l'état de très faibles traces sur les chromatogrammes n'ont pu être isolés et purifiés.

Le composé P₂₆ (Tableau 5 ; Fig. 16, 16a, 16b) a des Rf moyens dans la plupart des solvants utilisés. Il migre très bien dans le solvant B.A. Ce solvant a été employé en dernière étape pour la purification de P₂₆ après une première chromatographie bidimensionnelle dans les deux systèmes B.A.E./M.F.E. P₂₆ peut être un dérivé avec un sucre. Son spectre d'absorption en lumière ultra-violette dans l'éthanol à 80 % est très proche de celui de l'acide sinapique.

L'étude chimique de P₂₆, par hydrolyses (alcaline et acide) a permis de trouver l'acide sinapique constituant l'aglycone et un sucre réducteur dont les caractéristiques chromatographiques en présence des témoins commerciaux et d'un éluat de papier hydrolysé, et de révélation au phtalate d'aniline, correspondent à celles du glucose. Le composé P₂₆ est donc un ester de l'acide sinapique avec un sucre, qui semble être du glucose. Cependant, outre l'acide sinapique que l'on retrouve après hydrolyse de P₂₆ dans la partie phénolique, on y a remarqué la présence également du même constituant aromatique, déjà rencontré au cours de l'identification des composés P₆ et P₃₂. P₂₆ est donc constitué d'acide sinapique, de sucre (vraisemblablement du glucose) et peut être est-il associé à la même substance aromatique dont les caractéristiques ont été données précédemment (voir les composés P₆, P₃₂).

Remarque :

En quantité relativement modeste par rapport au fruit, P₂₆ existe également dans les tissus de pédoncule.

La présence de l'acide sinapique et de ses dérivés a été rarement signalée dans les fruits charnus. FLEURIET (1975) a montré la présence d'un dérivé de l'acide sinapique dans la tomate "cerise".

6 - Composés phénoliques dont les caractéristiques sont voisines de celles de l'acide chlorogénique.

Nous caractérisons ainsi les composés phénoliques qui, observés en lumière ultra-violette, présentent comme l'acide chlorogénique une coloration de fluorescence bleue virant au vert-jaune en atmosphère d'ammoniac et dont la réaction vis-à-vis du réactif de Benedikt est également négative (les colorations de fluorescence précédentes devenant sombres ou éteintes aux U.V.). Cette dernière propriété traduit leur nature o-diphénolique.

Tableau 5 - Comportements chromatographiques du composé P₂₆ et des témoins de référence

Composés	Rf					Révélation			
	B.A.E. (4-1-5)	M.F.E. (3-1-2)	A.B.A.E. (4-1-5)	B.A. (1-1)	A.A. 2 %	U.V.	U.V.+ NH ₃	Hoepfner	Benedikt
(1)	0,45 ^a 0,42 ^b	0,63-0,54 ^a	0,00 ^a 0,01 ^b	0,32 ^a 0,30 ^b	0,47-0,75 ^a				
P ₂₆	0,55	0,39	0,07	0,18	0,41 à 0,75	b vF	vjt F	br O	+

Données bibliographiques : (1) sinapyl-sucre
(glucose ?)

(a) FLEURIET (1975)

(b) MELIN (1976)

bf F : bleu-vert fluorescent

vjt F : vert-jaune turquoise fluorescent

br O : brun orangé (dans le visible)

Parmi les dérivés hydroxycinnamiques existant dans notre matériel, seul le composé P_4 semble être un o-diphénol répondant à ces caractéristiques.

a - Etude spectrophotométrique de P_4 (Fig. 17, 18, 19).

En milieu éthanolique faiblement aqueux (à 20 % d'eau), P_4 absorbe en lumière ultra-violette avec un maximum à 328 nm, identique à celui de l'acide chlorogénique. Ce maximum subit un déplacement bathochromique en milieu alcalin à pH = 9 avec $\Delta\lambda = 48$ nm, ce qui suggère qu'il y a dans la molécule au moins une fonction phénolique libre. Par contre, le passage du milieu acide en milieu légèrement basique n'entraîne pas un effet hypsochromique du maximum d'absorption. Dans ce cas le radical carboxylique de la chaîne latérale n'est donc pas libre.

b - Etude chromatographique de P_4 (Tableau 6 ; Fig. 19, 20).

Le composé P_4 est isolé de l'extrait par chromatographie bidimensionnelle dans les solvants B.A.E./M.F.E. qui donne une très bonne séparation, comme nous l'avons déjà signalé antérieurement. La purification est ensuite réalisée par chromatographie monodimensionnelle dans le solvant A.B.A.E. dont la particularité classique est de permettre la séparation des différents isomères de l'acide chlorogénique (acide caféyl-3 quinique) présents dans un extrait. Nous n'avons cependant pu distinguer qu'une seule tache de P_4 sur le chromatogramme développé dans ce solvant. Elué et concentré selon les techniques précédemment définies, P_4 est alors comparé par co-chromatographie à des composés phénoliques témoins de référence dont l'acide chlorogénique et le mélange "isochlorogénique" (produits FLUKA) :

- dans tous les solvants utilisés, P_4 a des Rf légèrement supérieurs à ceux de l'acide chlorogénique.

- le mélange "isochlorogénique" utilisé est constitué de :

5 taches quand il est séparé dans le solvant B.A.E.,

6 taches dans le solvant M.F.E.,

7 taches dans le solvant A.B.A.E., parmi lesquelles des acides dicaféyl-3,4 ; -3,5 et -4,5 quiniques (SONDHEIMER et al., 1961 ; CORSE et al., 1965 ; MELIN, 1976). Aucune de ces différentes fractions ne correspond à P_4 , au point de vue Rf. Par contre, il a été observé qu'une de ces

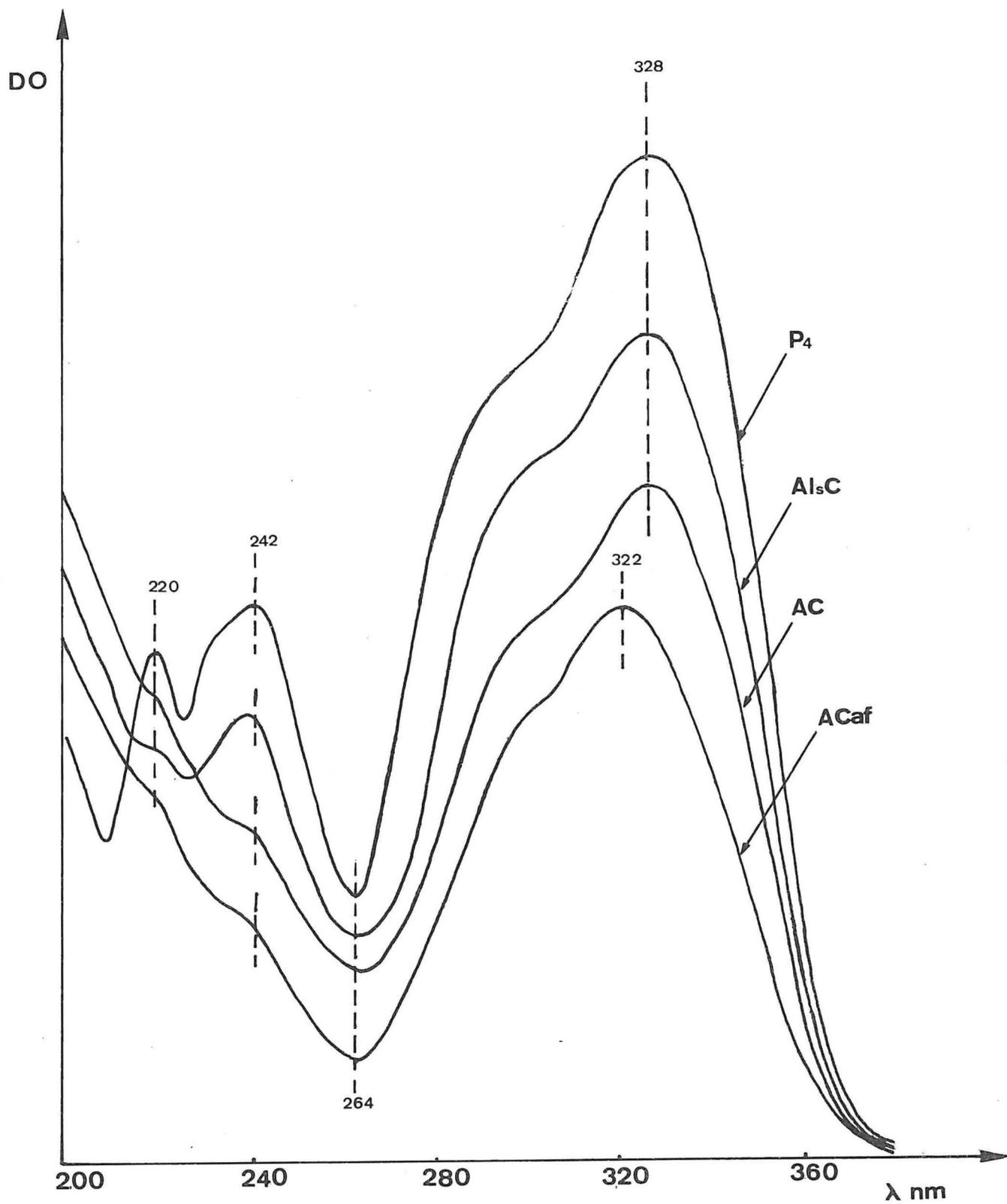


Fig. 17 - Spectres d'absorption en U.V. de P₄, des acides
 AlsC : "isochlorogénique" ; AC : chlorogénique ;
 ACaf : caféique, dans l'éthanol à 80 %

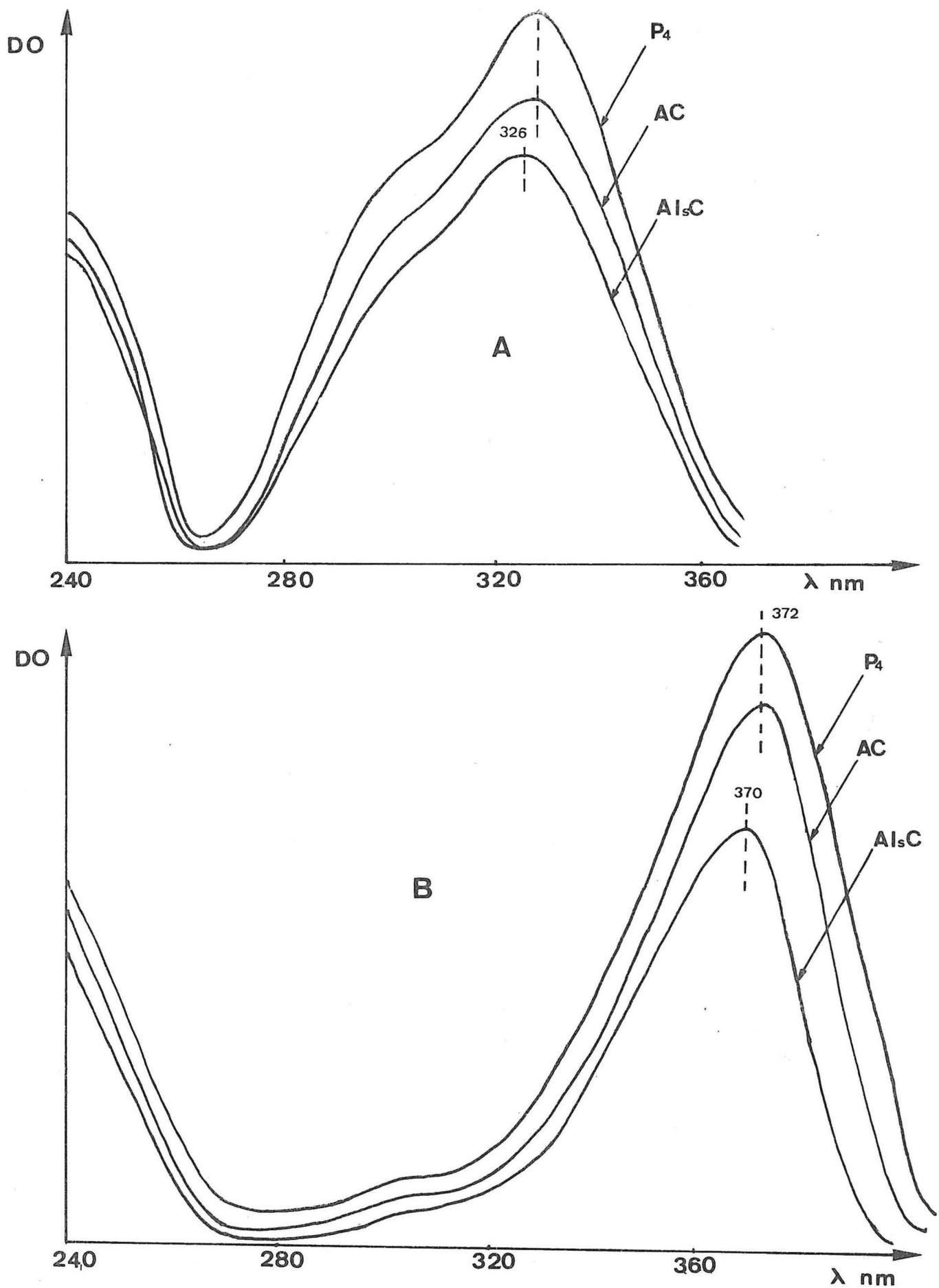


Fig. 18 - Spectres d'absorption en milieu éthanolique à 20 % d'eau
 (A) à pH5 ; en milieu basique (B) à pH9 de P₄

AC : acide chlorogénique
 AIsC : "acide isochlorogénique" (mélange)

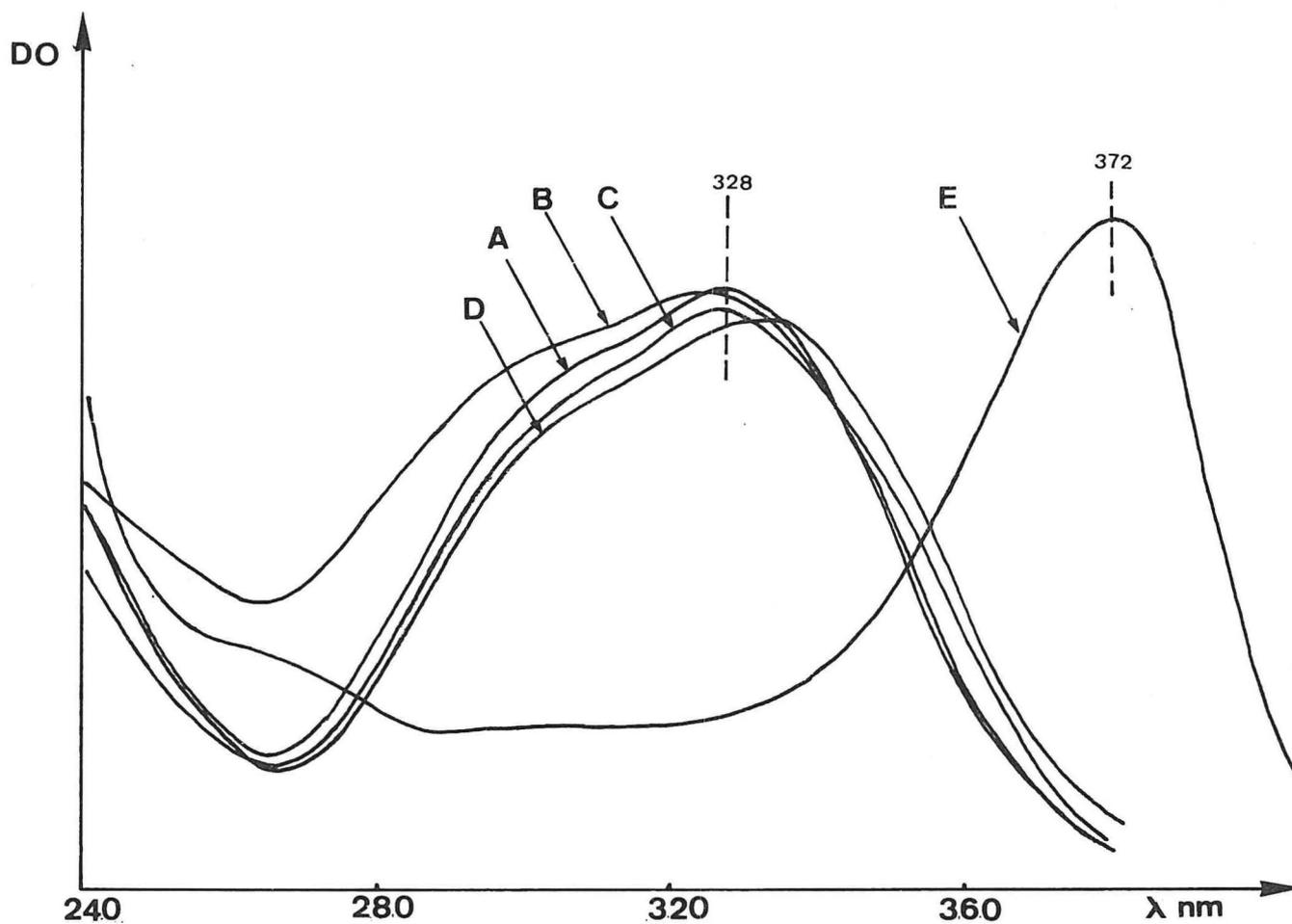


Fig. 19 - Spectres d'absorption du composé P_4

- A : en milieu éthanolique à 20 % d'eau (pH5)
 B : " " " " + éthylate de Na
 0,002 M pH6
 C : " " " " + 1 goutte d'acide
 Hcl 12N pH 1,5
 D : " " " " $AlCl_3$ 0,1 %
 pH 4,5
 E : " " " " + 1 goutte de
 NaOH 4N pH9

Tableau 6 - Comportements chromatographiques de P₄ et des témoins de référence.

Composés	Rf					Révélation			
	B.A.E. (4-1-5)	M.F.E. (3-1-2)	A.B.A.E. (4-1-5)	B.A. (1-1)	A.A. 2 %	U.V.	U.V.+ NH ₃	Hoepfner	Benedikt
(1)	0,67 ^a	0,54 ^a à 0,67	0,46 ^a	0,04 ^a	* 0,36-0,53 ^a				
(2)	0,72 ^a	0,71 ^a à 0,82	0,58 ^a à 0,77	0,125 ^a	* 0,36-0,53 ^a				
(3)	0,72 ^a	0,71 ^a à 0,82	0,58 ^a à 0,77	0,37 ^a	* 0,53-0,65 ^a				
(4)	0,66 ^a 0,57 ^b	0,35 ^a	0,12 ^a	0,06 ^a 0,01 ^b	* 0,68-0,82 ^a				
(5)	0,58 ^a 0,45 ^b	0,25 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a 0,01 ^b	* 0,77-0,86 ^a				
T ₁	0,62	0,42	0,19	0,04	0,78 0,60	b F	vj F	rvi	-
T ₂	0,60 à 0,80	0,53 à 0,92	0,13 à 0,82	0,09	-	b F	vj F	rvi	-
P ₄	0,68	0,75	0,69	0,01	0,64 0,59	b F	vj F	rvi	-

b F : bleu fluorescent (un peu brillant)
vj F : vert-jaune fluorescent
rvi : rouge violacé (dans le visible)
(-) : éteint la fluorescence

Données bibliographiques et témoins de référence : (1) : dicaféyl-quinique ; (2) : dicaféyl-quinique
(3) : dicaféyl-quinique (trois fractions du mélange isochlorogénique T₂)
(a) MELIN (1976)
(4) : ac.caféyl-5 quinique; (T₁) : ac. chlorogénique
(b) TANGUY et GALLET (1969)
(T₂) : mélange "isochlorogénique"
* dans A.A. à 15 %

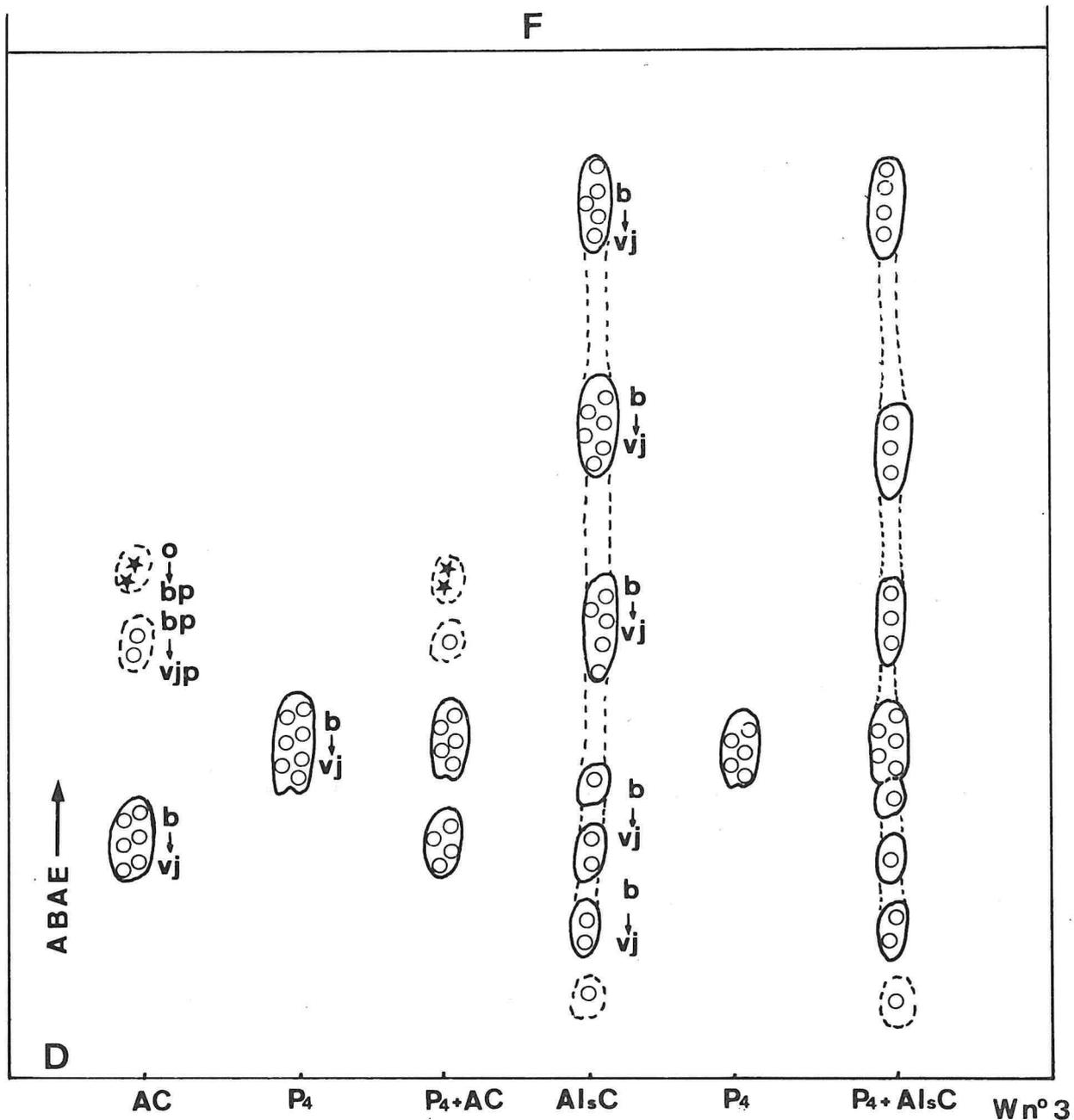


Fig. 20 - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant A.B.A.E. (4-1-5) montrant les différences de comportement du composé P₄ purifié en présence de témoins de référence.

Fluorescence aux U.V. + NH₃ : B = bleu ; vj = vert jaune ;
 bp = bleu pâle ; vjp = vert jaune pâle ; O = non fluorescent (dérivé p. coumarique)

F = front du solvant ; D = dépôt

Témoins de référence : AC = acide chlorogénique
 (produits FLUKA)

Al₅C = "acide isochlorogénique" (mélange)

fractions, dans les mêmes solvants, correspond à l'acide chlorogénique, comme le signalent par ailleurs HANSON et ZUCKER (1963).

- Les données bibliographiques sur les autres isomères possibles de l'acide chlorogénique tels que l'acide néo-chlorogénique ou acide caféyl-5 quinique (JEAN et REID, 1958 ; COLONNA et BOUDET, 1971a), l'acide cryptochlorogénique ou acide caféyl-4 quinique (SONDHEIMER, 1958 ; SCARPATI et ESPOSITO, 1963) ne correspondent pas aux caractéristiques chromatographiques de P_4 .

Comme l'acide chlorogénique et le mélange "isochlorogénique" qui ont des R_f très peu différents de 0 dans le solvant B.A., P_4 ne migre pas dans ce solvant. Par cette propriété, P_4 est un ester de l'acide quinique au même titre que les témoins de référence utilisés.

c - Etude des produits d'hydrolyses alcaline et acide de P_4 (Fig. 21).

L'étude des produits d'hydrolyses nous a permis d'apporter une confirmation aux idées générales émises sur la nature de P_4 . En effet, par hydrolyses alcaline et acide, P_4 est scindé en deux parties : la partie phénolique est identifiée à l'acide caféique et la partie non phénolique à l'acide quinique. Ces hydrolyses ne sont cependant pas totales. Ceci peut être dû au fait que P_4 serait probablement une molécule complexe. Toutefois, la scission de cette molécule par hydrolyse alcaline montre qu'il s'agit d'une liaison ester.

En conclusion, P_4 est un ester quinique de l'acide caféique. En éliminant les témoins utilisés ainsi que les dérivés caféyl-quiniques précédemment étudiés, il ne pourrait s'agir pour P_4 que, soit d'un ester quinique du type caféyl-1-quinique qui n'est cependant pas connu actuellement dans la nature (RIBEREAU-GAYON, 1968), soit d'un ester quinique du type di-caféyl-1,4 quinique ou cynarine que l'on rencontre dans l'artichaut (PANIZZI et SCARPATI, 1954a ; MANCINI et al., 1960 ; ALESSANDRO et al., 1976).

Pour vérifier partiellement ces hypothèses nous avons isolé préalablement de l'artichaut deux composés o-diphénoliques (réaction négative avec le réactif de Benedikt) dont l'un quantitativement moins important dans ce matériel, a des R_f : 0,03 (B.A.) ; 0,61 (B.A.E.) ; 0,38 (M.F.E.) ; 0,21 (A.B.A.E.), très voisins de ceux de l'acide chlorogénique, il s'agit vraisemblablement de cet acide ; l'autre, plus abondant

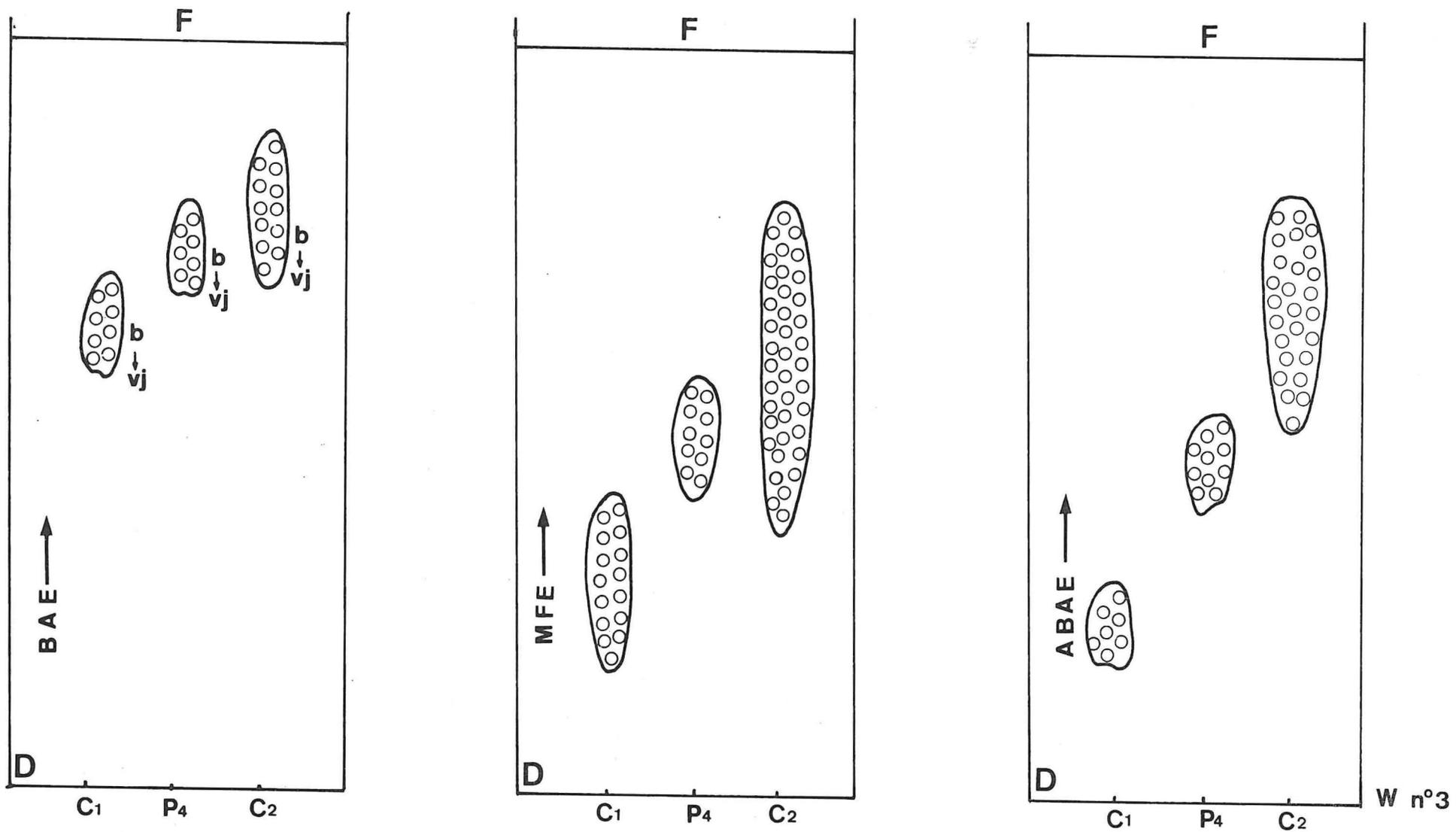


Fig. 21 - Chromatographie monodimensionnelle dans les solvants B.A.E. (4-1-5), M.F.E. (3-1-2), et A.B.A.E. (4-1-5) du composé P₄ et de la cynarine (C₂) isolée de l'artichaut avec un autre o.diphénol (C₁).
 Fluorescence aux U.V. + NH₃ : b = bleu ; vj = vert jaune ; F = front de solvant ; D = dépôt

constitue la cynarine avec des Rf nettement différents : 0,01 (B.A.) ; 0,75 (B.A.E.) ; 0,40 à 0,76 (M.F.E.) ; 0,70 (A.B.A.E.). Co-chromatographié en présence de témoins, P₄ révèle des comportements identiques sinon très proches de ceux de la cynarine (artichaut) dans la plupart des solvants utilisés. Notre présomption sur la nature de P₄ en faveur d'un dérivé possible du dicafeyl-1-4 quinique semble avoir, de ce fait, quelque fondement.

Par ailleurs, l'étude chromatographique de la phase aqueuse de P₄ hydrolysé contenant la partie non phénolique, a montré qu'en dehors de l'acide quinique révélé par le réactif de CARTWRIGHT et ROBERTS (1955), nous avons observé sur le chromatogramme la présence de deux taches qui réagissent négativement au réactif précédent mais qui, examinés en lumière ultra-violette deviennent sombre non fluorescents à 256 nm et à 366 nm. Ces caractéristiques sont communes à beaucoup d'autres substances organiques telles que, en particulier, l'acide cinnamique et l'acide ascorbique. Par co-chromatographie dans les solvants utilisés, seul l'acide ascorbique a les mêmes Rf que l'une des deux taches mises en évidence et devient jaune-brun (par oxydation ?) à l'air après plus de 24 h. d'exposition, comme les deux taches.

P₄ contiendrait donc dans sa molécule une autre substance organique qui semblerait avoir quelque rapprochement avec les caractéristiques et comportements chromatographiques de l'acide ascorbique. Ces indications, assez générales, ne nous permettent cependant pas de formuler une hypothèse précise quant à la nature de cette substance. Rappelons que P₅, l'ester di p-coumaryl 1-4 quinique précédemment identifié aurait également contenu dans sa molécule la même substance.

Les dérivés hydroxycinnamiques sont particulièrement abondants et très diversifiés dans l'ananas. Il est probable qu'il existe d'autres formes de combinaisons en dehors de celles que nous venons de mettre en évidence et qui peuvent avoir une influence sur leur solubilité dans les différents solvants employés au cours de l'extraction et de la purification de l'extrait. Nous envisageons d'étudier la présence de ces dérivés hydroxycinnamiques dans le paragraphe suivant.

7 - Les autres formes de dérivés hydroxycinnamiques insolubles ou partiellement solubles à l'alcool 80°, à l'éther de pétrole et à l'acétate d'éthyle.

Nous essayons de déterminer après séparation chromatographique et identification, les dérivés hydroxycinnamiques présents dans chaque phase :

- phase solide ou culot, résidu de l'extraction,
- phase étherée contenant les pigments,
- phase acétate d'éthyle conduisant à l'obtention de l'extrait purifié,
- phase aqueuse après purification.

L'étude de la phase acétate d'éthyle d'où provient l'extrait purifié a été effectuée dans le cadre de l'identification des groupes de composés phénoliques présents notamment les dérivés hydroxycinnamiques. Il s'agit alors de mettre en évidence les autres formes éventuelles de ces dérivés dans les trois autres phases de fractionnement.

a - Phase solide ou culot d'extraction (Fig. 22).

L'étude chromatographique du culot après remise en suspension dans l'éthanol à 20 % d'eau ne permet de distinguer aucun composé phénolique susceptible d'être révélé, soit aux U.V., soit avec les réactifs chimiques révélateurs mis en oeuvre. Par contre, l'hydrolyse alcaline du culot en milieu aqueux donne, après séparation chromatographique un certain nombre de composés phénoliques dont les comportements et les caractéristiques de fluorescence sont ceux :

- de l'acide p-coumarique,
- de l'acide férulique,
- d'un composé semblable à l'acide cinnamique,
- d'un autre composé fluorescent jaune-vert avec ou sans atmosphère d'ammoniac.

Les taches observées sur les chromatogrammes sont généralement de faibles concentrations, ce qui signifie que l'hydrolyse a été incomplète et très peu de molécules ont été dissociées.

Il ressort de cette étude les deux points suivants :

- le caractère exhaustif de l'extraction que nous avons déjà montré dans la critique de la méthode d'extraction. En dehors des formes vraisemblablement

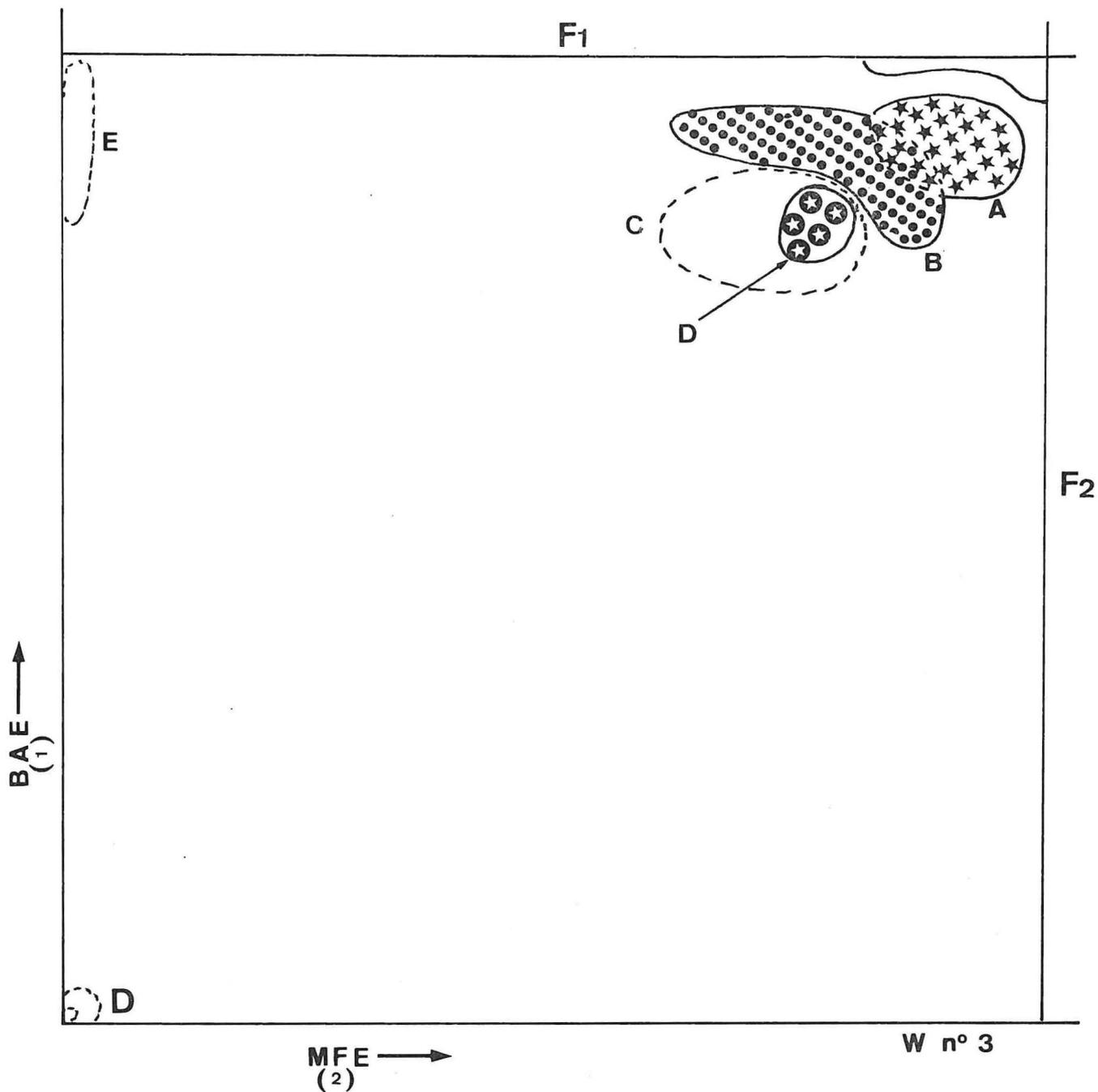


Fig. 22 - Chromatographie bidimensionnelle d'un hydrolysat (partie phénolique) de culot ou résidu d'extraction. F_1 et F_2 : fronts de solvants ; D = dépôt

Substances identifiées : (A) = acide p.coumarique
 (B) = acide férulique
 (D) = acide cinnamique

Substances non identifiées : (C) et (E)

plus complexes insolubles, la totalité des composés phénoliques présents passe dans l'extrait au cours de l'extraction par l'éthanol à 80 %, .

- certaines unités simples non libres telles que les dérivés p-coumarique, férulique et d'autres, semblent participer à la synthèse des molécules plus complexes au niveau des tissus. Divers auteurs ont montré la présence des dérivés hydroxycinnamiques intervenant dans la formation de la lignine (BROWN et NEISH, 1959 ; GOLDSCHMID et HERGERT, 1961 ; HIGUCHI et BROWN, 1963 ; SARKANEN et LUDWIG, 1971). Selon HIGUCHI et BROWN (1963) et TAYLOR et ZUCKER (1966), l'acide chlorogénique peut être utilisé dans cette formation en subissant au préalable une dégradation. DULL (1971) cite le travail non publié de GORTNER montrant la présence de l'acide férulique dans la paroi cellulaire des tissus de la tige de l'ananas.

b - La phase étherée après dépigmentation de l'extrait.

L'observation en lumière ultra-violette d'un chromatogramme de cette phase, après élimination de l'éther de pétrole et reprise dans l'éthanol à 20 % d'eau, révèle que, quelques-uns des dérivés hydroxycinnamiques précédemment identifiés sont entraînés par l'éther au cours de la dépigmentation dans de très faibles proportions, principalement P₅ (acide dip-coumaryl 1,4 quinique) et P₄ (acide caféyl-quinique, un di-caféyl 1-4 quinique ?). L'hydrolyse alcaline réalisée n'a libéré que les aglycones de ces deux composés : l'acide p-coumarique et l'acide caféique. Aucune autre forme ne semble être présente dans cette phase en dehors des dérivés hydroxycinnamiques déjà étudiés. Leur passage dans l'éther de pétrole peut être dû tout simplement à leur concentration relativement importante dans l'extrait.

c - La phase aqueuse après purification à l'acétate d'éthyle (Fig. 23).

Après épuisement de l'extrait à l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse restante renferme entre autres, les sels, les sucres, les acides organiques, les acides aminés, les composés phénoliques totalement ou partiellement insolubles dans ce solvant.

. L'addition d'une solution sodique 4N à cette phase jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune, permet de nous trouver dans des conditions

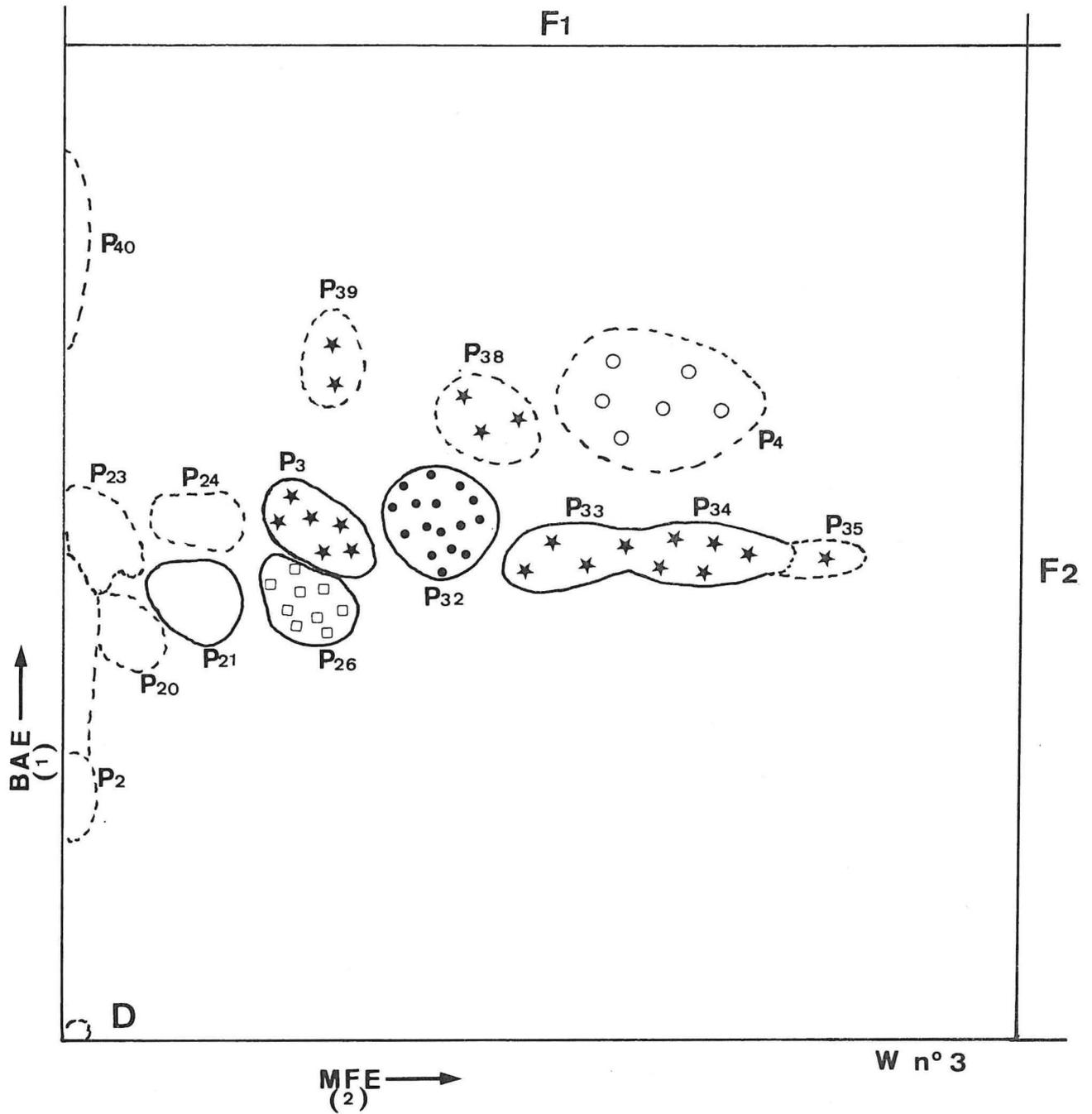


Fig. 23 - Chromatogramme bidimensionnel de la "phase aqueuse" de l'extrait purifié après précipitation au froid des sels et sucres.

F_1 et F_2 = fronts de solvants ; D = dépôt

Identification des spots : voir Fig. 8 et 8a

semblables à celles de l'hydrolyse alcaline d'un extrait aqueux de pulpe. En réalisant ainsi cette hydrolyse selon les techniques déjà définies nous avons pu constater après séparation chromatographique la présence dans la partie phénolique de l'hydrolysate d'un certain nombre d'acides phénoliques dont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique identifiés à des témoins de référence.

• La phase aqueuse contient donc encore des dérivés de ces différents acides vraisemblablement sous forme d'esters. Nous avons essayé de les extraire par l'éthanol en utilisant les techniques suivantes :

- les 10 à 20 ml de la phase aqueuse provenant d'un extrait de 20 g de matière fraîche, sont repris dans un grand volume d'éthanol 95° (200 ml environ). La solution trouble obtenue après l'avoir bien agitée est ensuite placée à -20°C dans un congélateur pendant 48 h. pour permettre la précipitation des sels, sucres et divers. Si la partie surnageante n'est pas suffisamment limpide, on filtre sur un papier filtre ou centrifuge, à froid. On concentre l'extrait jusqu'à un volume final d'environ 5 ml, à 30°C et sous vide. On reprend les 5 ml dans 200 ml d'éthanol 95° en les remettant à -20°C pendant 48 h. Puis on filtre ou centrifuge et on évapore l'éthanol comme précédemment. On répète l'opération 3 fois. L'extrait final est repris dans un volume minimal d'éthanol 80° en vue d'une séparation chromatographique (Fig. 24). L'observation en lumière ultra-violette d'un chromatogramme de cet extrait nous a permis de retrouver les principaux dérivés hydroxycinnamiques, déjà identifiés, en quantités plus ou moins faibles suivant les composés (Tableaux 7, 7bis).

Il ne semble pas y avoir d'autres formes de dérivés hydroxycinnamiques que celles que nous avons déjà rencontrées dans l'extrait purifié. La solubilisation dans l'acétate d'éthyle dépend sans doute d'un certain nombre de facteurs dont la nature des groupements fonctionnels dans chaque composé. Un essai d'estimation quantitative des dérivés hydroxycinnamiques contenus dans cette phase (en moyenne 3,7 %) a été réalisé (voir Chap. III).

Les principaux dérivés hydroxycinnamiques identifiés dans l'ananas sont rappelés sur la Fig. 24.

Conclusion sur les dérivés hydroxycinnamiques.

Il ressort de cette étude que l'ananas est très riche en dérivés hydroxycinnamiques, notamment en esters de l'acide p-coumarique. Cette particularité permet de dégager un certain nombre de points importants en ce

Tableau 7 - Importance relative des concentrations des composés phénoliques extraits au cours de l'extraction (estimation visuelle de l'intensité de fluorescence de chacune des taches révélées aux U.V. sur chromatogramme)

Composés phénoliques	Importance relative des concentrations des composés phénoliques dans les différentes phases de l'extraction			
	Extrait brut Ha	Extrait purifié "A.E."	phase "aqueuse"	phase "éthérée" (pigments)
P ₆	+++	+++	0	0
P ₆₂	+	+	0	0
P ₆₁	+	+	0	0
P ₆₀	+	+	0	0
P ₅	+++++	++++	-	-
P ₄	++++	++++	-	-
P ₄₂	++	++	0	0
P ₄₁	+	+	0	0
P ₄₀	+	+	0	0
P ₃₉	+++	++	+	0
P ₃₈	+++	+++	-	0
P ₃₇	++	++	0	0
P ₃₆	++	+	-	0
P ₃₅	+++	++	-	0
P ₃₄	+++	++	-	0
P ₃₃	++	+	-	0
P ₃₂	++++	+++	+	0
P ₃₁	++	+	-	0
P ₃₀	+	+	0	0
P ₃	+++++	++++	-	0

Ha : extrait hydroalcoolique brut

AE : extrait purifié par extraction à l'acétate d'éthyle

+

- : très faible

Tableau 7bis - Importance relative des concentrations des composés phénoliques extraits au cours de l'extraction.

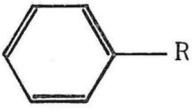
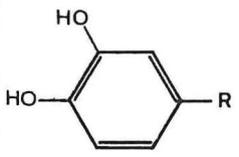
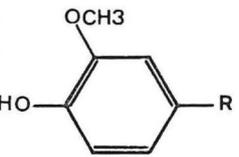
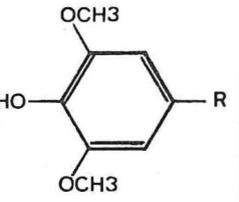
Composés phénoliques	Importance relative des concentrations des composés phénoliques dans les différentes phases de l'extraction			
	Extrait brut Ha	Extrait purifié "A.E."	phase "aqueuse"	phase "éthérée" (pigments)
P ₂₇	+	+	0	0
P ₂₆	++++	+++	++	0
P ₂₅	+	+	0	0
P ₂₄	++	+	-	0
P ₂₃	++++	+++	++	0
P ₂₂	++	+	+	0
P ₂₁	+++	++	+	0
P ₂₀	++	+	+	0
P ₂	++++	++	++	0
P _{1f}	+	-	-	0
P _{1e}	+	-	-	0
P _{1d}	+	-	-	0
P _{1c}	+	-	-	0
P _{1b}	0	0	0	0
P _{1a}	+	+	0	0

Ha : extrait hydroalcoolique brut
A.E. : extrait purifié par extraction à l'acétate d'éthyle.
+ : importance des concentrations
- : très faibles traces

Fig. 24 - Principaux dérivés hydroxycinnamiques identifiés dans l'extrait hydroalcoolique de l'ananas.



Nous ne faisons pas figurer ici les acides phénoliques simples et les esters quiniques ou avec le glucose, absents dans l'extrait ou existant à l'état de très faibles traces dont les tentatives de recherche n'ont abouti à aucune caractérisation. Sauf les acides simples : p-coumarique et férulique et les dérivés de l'acide cinnamique de quantité relativement faible dans l'extrait, les esters soulignés sont dosables, notamment les dérivés p-coumariques particulièrement abondants dans l'ananas.

Acide cinnamique et dérivés	Termes de la série cinnamique	Acides phénoliques simples	Esters quiniques	Esters avec le glucose
 et cinnamyl-quinique ? cinnamyl-glucose		<u>p-coumarique</u>	<u>p.coumaryl quiniques (isomères)</u>	<u>p. coumaryl-glucose</u>
			<u>caféyl-quinique (dicaféyl-quinique ?)</u>	
		<u>férulique ?</u>		<u>férulyl-glucose (isomères)</u>
				<u>sinapyl-glucose</u>

qui concerne la répartition dans le fruit des divers termes de la série cinnamique.

1 - Les acides hydroxycinnamiques libres (p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) sont rares. Seul l'acide p-coumarique a été retrouvé à l'état libre en quantité relativement faible et peut-être l'acide férulique. Comme l'a noté MACHEIX (1975) dans le cas de la pomme où l'acide p-coumarique a été signalé dans la peau du fruit par FISHER (1965-1966), il peut s'agir d'un artefact résultant des conditions de température et de pH mal adaptées à l'extraction et à l'évaporation de l'extrait, entraînant la libération d'acides phénols simples. Cette situation peut également avoir lieu dans certaines conditions de conservation des fruits (RAMIREZ-MATINEZ et LUH, 1973).

En ce qui concerne notre matériel, une libération d'acides phénols simples ne semble pas avoir lieu en respectant bien les conditions d'extraction et d'évaporation déjà précisées. La présence constante de l'acide p-coumarique dans chaque extrait étudié nous a permis de conclure qu'il existe à l'état libre dans le fruit en dehors de ses formes combinées. Parallèlement à l'étude de la pulpe, nous avons retrouvé l'acide p-coumarique libre présent en quantité relativement importante dans les extraits des tissus de pédoncule. GORTNER et al. (1958) ont d'ailleurs signalé sa présence dans cette partie de la plante de l'ananas sans préciser les conditions d'extraction. Le pédoncule, organe de support et de transport de la sève vers le fruit, se prolonge par l'axe cylindrique (KRAUSS, 1948, 1949 ; COLLIN, 1960 ; PY et TISSEAU, 1965), ce qui pourrait expliquer logiquement la présence de l'acide p-coumarique libre dans le fruit. DULL (1971) a estimé la teneur en acide p-coumarique de l'apex de l'ananas en cours de développement de 33 à 73 $\mu\text{g/g}$ de poids frais, sans donner des détails supplémentaires sur la forme de cet acide, s'il a été analysé à l'état libre ou sous forme combinée, ou globalement ensemble sous les deux formes.

L'acide férulique libre semblerait exister dans le fruit comme il le fait dans la tige (GORTNER et al., 1958) mais sa très faible concentration sur le chromatogramme ne permet pas de conclure d'une manière définitive. En effet, l'hypothèse d'un artefact dû à l'extraction ou à l'évaporation de l'extrait n'est pas absolument écartée.

2 - Les formes combinées des acides phénols simples (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) sont diversement exprimées. La combinaison avec l'acide quinique est très fréquente principalement avec l'acide p-coumarique (P₅, P₃, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₃₈ identifiés et d'autres P₃₀, P₃₉, P₄₀, P₄₁, non identifiés mais qui semblent être des esters quiniques car ils ne migrent pas dans le solvant B.A.) et avec l'acide caféique (P₄, identifié). Les autres formes de combinaison sont limitées aux sucres : P₃₇ un p-coumarique-glucose ; P₃₂ et P₆ des dérivés féruliques d'un sucre dont les comportements chromatographiques sont identiques à ceux du glucose ; P₂₆ un sinapyl-glucose.

L'importance de l'acide citrique, de l'acide malique et de l'acide ascorbique dans le fruit (DULL, 1971) laisse penser qu'une combinaison des acides phénols simples avec ces acides organiques pourrait avoir lieu, comme l'ont signalé dans d'autres matériels végétaux, certains auteurs. Par exemple le caféyl-tartrique du raisin (RIBEREAU-GAYON, 1965), l'acide caféyl-malique du haricot (TANGUY et MARTIN, 1972), l'acide caféyl-putrescine de la datte (MARTIN, TANGUY et al., 1973). Ce type de combinaison directe entre un acide phénolique et un acide organique ne semble pas exister dans notre matériel. Par contre, la combinaison acide phénolique-acide quinique-acide organique ou acide phénolique-acide organique-acide quinique, pourrait exister en ce qui concerne les deux composés P₄ et P₅ qui semblent avoir dans leur molécule, en dehors de l'acide quinique, une autre substance organique qui a les mêmes comportements chromatographiques et la même coloration sombre non fluorescente aux U.V que l'acide ascorbique.

Un autre type de combinaison concerne uniquement les composés P₃₂ (férulyl-glucose), P₆ (dérivé férulique avec un sucre très proche du glucose) et P₂₆ (sinapyl-glucose). En plus des constituants moléculaires ainsi identifiés les trois composés ont en commun un troisième constituant de nature aromatique et non fluorescent aux U.V.

3 - Les dérivés de l'acide cinnamique que l'on rencontre dans les végétaux sous forme d'esters comme l'acide cinnamyl-quinique (LEVY et ZUCKER, 1960 ; HANSON, 1966 ; KOJIMA et al., 1969) et le cinnamyl-glucose (HARBORNE et CORNER, 1961 ; AVADHAN et TOWERS, 1961 ; RONECKLES, 1963 ; STECK, 1968 ; KOJIMA et URITANI, 1972b) pourraient exister dans notre matériel, au moins l'un des deux esters.

Le composé P₆₃ se comporte au point de vue chromatographique et coloration de fluorescence comme l'acide cinnamique témoin de référence. L'étude chimique de sa composition n'a pas pu être réalisée à cause de sa très faible concentration dans l'extrait.

Les dérivés de l'acide benzoïque n'existent peut-être pas dans le matériel. Aucune étude approfondie n'a été entreprise concernant ces composés en dehors des simples observations faites sur les chromatogrammes.

4 - Les termes phénoliques de la série cinnamique (p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) sont diversement représentés avec prédominance des dérivés de l'acide p-coumarique. En effet l'acide p-coumarique existe à l'état libre et à l'état combiné sous forme de deux types d'esters dont l'un groupe 10 à 11 dérivés p-coumariques avec l'acide quinique et l'autre constitué d'un seul composé p-coumarique estérifié par le glucose, P₃₇.

L'acide caféique est représenté par P₄, le seul composé o-diphénolique à quantité appréciable dans l'extrait. Sa nature de di-caféyl-1-4 quinique reste cependant à préciser.

Les acides férulique et sinapique sont présents dans le matériel principalement sous forme d'esters avec un sucre qui est vraisemblablement du glucose (le dérivé sinapique étant du sinapyl-glucose). L'acide férulique pourrait exister à l'état libre mais sa concentration serait relativement plus faible vis-à-vis des dérivés esters. Aucune trace d'esters quiniques de ces acides, tels que par exemple, l'acide férulyl-3 quinique et ses isomères abondants dans le café (PICTET et BRANDENBERGER, 1960 ...) n'a été trouvée dans le matériel.

La présence sous forme libre de l'acide p-coumarique et de l'acide férulique, semble être un cas particulier chez l'ananas. Dans de nombreux fruits sains tels que la pomme, la poire, la tomate ... il n'existe aucun acide hydroxycinnamique présent sous forme libre ; les acides libres peuvent apparaître, par contre, lorsque ces fruits sont soumis à des conditions exceptionnelles, naturelles ou provoquées (MACHEIX et col., 1976).

D'un terme de la série cinnamique à l'autre, les deux types d'esters ne sont que rarement exprimés simultanément. Il y a un pourcentage important de dérivés estérifiés par l'acide quinique ou par les sucres suivant le terme. Un fait fondamental est remarquable : l'abondance des dérivés du

terme p-coumarique, notamment des acides p-coumariques-quiniques. Cette situation se retrouve également dans beaucoup de fruits (MACHEIX et col., 1976). La prédominance particulière des dérivés p-coumariques dans l'ensemble pourrait avoir une signification physiologique importante au niveau de la croissance de l'ananas dans la mesure où les dérivés p-coumariques sont utilisés comme co-facteurs de l' A.I.A. oxydase (enzyme d'oxydation de l'acide indolylacétique) alors que les dérivés féruliques moins abondants sont des inhibiteurs de cette enzyme (GORNER et KENT, 1953, 1958).

Notons enfin que l'importance des dérivés hydroxycinnamiques vis-à-vis des autres groupes de composés phénoliques présents est considérable. Dans les différentes fractions de l'extraction, notamment dans l'extrait purifié, les composés les plus abondants et quantitativement appréciables sont les dérivés hydroxycinnamiques, alors que les flavonols et leurs hétérosides ont des concentrations relativement modestes.

Une estimation de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques semble donc être possible d'une part et, d'autre part, un dosage des composés individuels peut également être envisagé.

C H A P I T R E III

DOSAGES des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES

Parmi les nombreuses méthodes de dosages possibles dont les principes généraux ont été présentés par MACHEIX (1974), nous avons retenu la spectrophotométrie en lumière ultra-violette associée ou non à la chromatographie pour doser les dérivés hydroxycinnamiques extraits de l'ananas.

I - TECHNIQUES UTILISEES POUR CES DOSAGES.

A - ESTIMATION de la TENEUR GLOBALE en DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES par LECTURE DIRECTE du SPECTRE de l'EXTRAIT.

1 - Estimation sur l'extrait non purifié (extrait brut).

Les spectres d'absorption des extraits d'ananas sains sont caractérisés par deux bandes d'absorption dont l'une, la plus importante, se situe vers 280 nm et l'autre, l'épaulement vers 315 nm, alors que les spectres des extraits d'ananas brunis ont une forme spécifique avec un important maximum d'absorption vers 315 nm, masquant complètement celui vers 280 nm (voir fig. 3 et 6).

Les dérivés hydroxycinnamiques absorbent fortement entre 300 et 330 nm donc la mesure de la densité optique (D.O) à 315 nm permet d'avoir une estimation par excès de la teneur globale de l'extrait.

Cependant en dehors des dérivés hydroxycinnamiques, plusieurs substances phénoliques ou non peuvent absorber à cette longueur d'onde :

- les flavonols et leurs hétérosides présents en quantité non négligeable, responsables en partie de la coloration jaune de l'extrait, interfèreraient, mais faiblement à 315 nm car ils absorbent principalement en lumière ultraviolette vers 360-380 nm (HARBORNE, 1964).

- les composés organiques tels que sucres, acides organiques, acides aminés aromatiques n'absorbent pas vers 315 nm. Par contre, vers 280 nm leur interférence pourrait être non négligeable. L'acide ascorbique par exemple, a une bande d'absorption entre 245 et 265 nm dans l'éthanol aqueux à 20 % d'eau. La concentration de cet acide dans l'ananas reste cependant assez modeste (ULRICH, 1952 ; MAPSON, 1970).

- les pigments chlorophylliens et caroténoïdes absorbent sur toute la zone U.V. (GOODWIN, 1965). Il est certain qu'à 315 nm leur participation à l'absorption dans le spectre global de l'extrait non purifié n'est pas sans importance.

L'ensemble des observations qui viennent d'être rappelées nous permet de faire les remarques suivantes :

- les résultats de mesure de la D.O de l'extrait à 315 nm ne donnent qu'une valeur surestimée de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques et n'apportent aucune signification précise quant au dosage d'un composé bien défini présent dans l'extrait.

- l'importance de certains groupes de composés peut être exploitée pour exprimer la teneur globale en équivalent de ces composés. Il s'agit principalement des esters p-coumariques qui sont particulièrement abondants et diversement représentés dans l'extrait.

La valeur obtenue, par lecture directe de la D.O à 312 nm de la solution hydroalcoolique (50 à 300 μ l de l'extrait brut dans 2,5 ml d'éthanol à 20 % d'eau), est rapportée à une courbe étalon de l'acide p-coumarique (Fig. 25). La teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques est ainsi exprimée en μ g d'acide p-coumarique par gramme de matière fraîche.

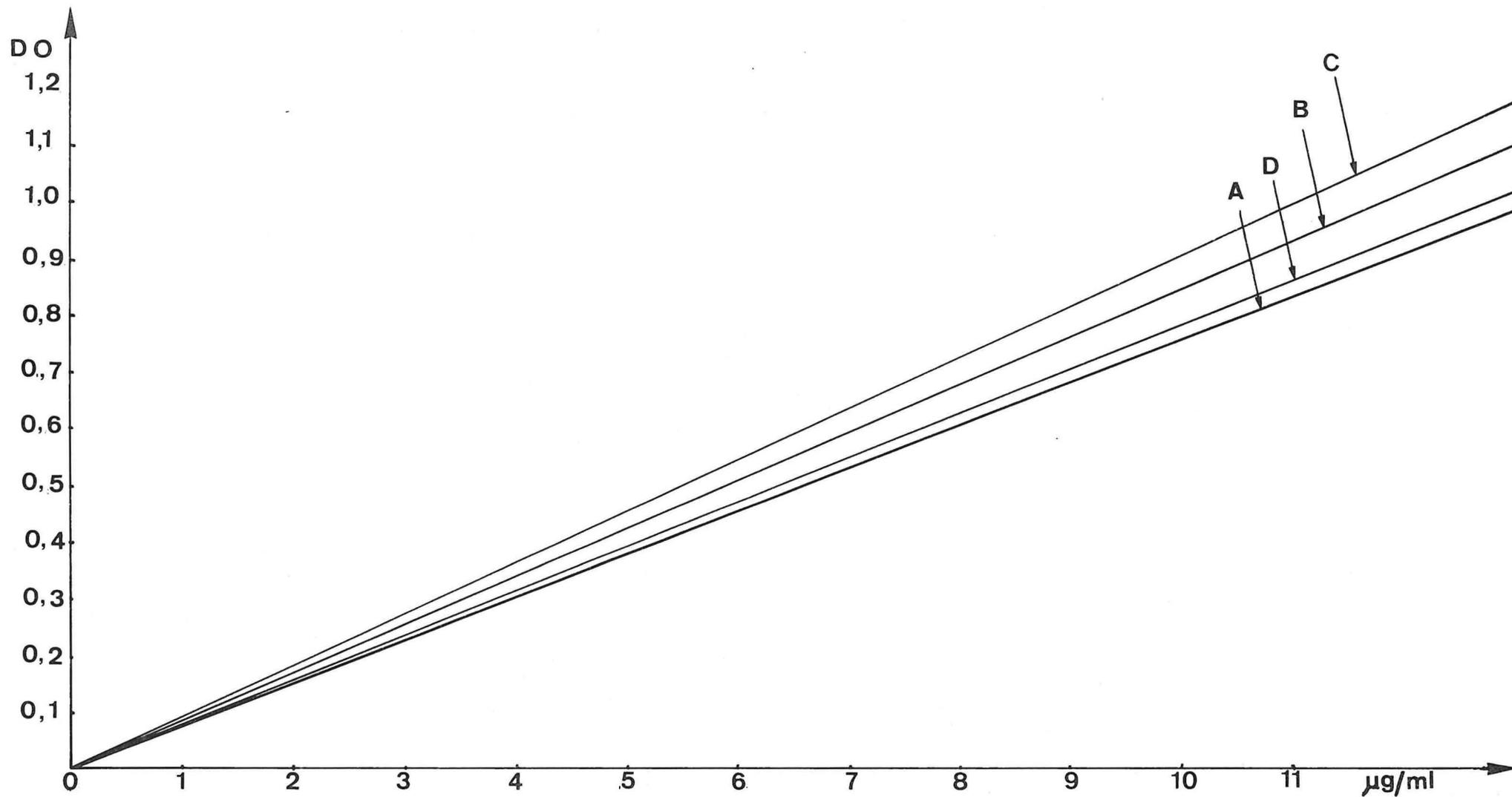


Fig. 25 - Courbes d'étalonnage. Variation des solutions éthanoliques (à 80 %) de l'acide p.coumarique (A) ($\lambda_{\max} = 312 \text{ nm}$), de l'acide chlorogénique (B) ($\lambda_{\max} = 328 \text{ nm}$), de l'acide férulique (C) ($\lambda_{\max} = 323 \text{ nm}$) et de l'acide sinapique (D) ($\lambda_{\max} = 323 \text{ nm}$), en fonction de leur concentration.

2 - Estimation de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques sur l'extrait purifié.

Inversement à celui de l'extrait non purifié, le spectre d'absorption de l'extrait purifié se caractérise toujours par un maximum vers 315 nm et un épaulement à 280 nm. La lecture directe de la D.O. (à 312 nm) de l'extrait permet donc d'avoir une idée rapide de l'importance quantitative des dérivés hydroxycinnamiques présents. Comme précédemment nous avons rapporté la valeur obtenue à la courbe étalon d'acide p-coumarique et exprimé le résultat en μg d'acide p-coumarique par gramme de matière fraîche.

La purification de l'extrait selon les techniques déjà définies entraîne une perte en substances phénoliques soit par passage dans la phase étherée (dépigmentation), soit par insolubilité totale ou partielle dans l'acétate d'éthyle. Cette perte est cependant faible au niveau des dérivés hydroxycinnamiques (Fig. 26). D'après les résultats du tableau 8 on peut constater que plus de 95,5 % de dérivés hydroxycinnamiques passent dans l'acétate d'éthyle au cours de la purification.

Tableau 8 : Pourcentage de concentration en dérivés hydroxycinnamiques dans les différentes phases de l'extraction.

Extraits	DO _{AE}	DO _{PA}	DO _E	DO _{Ha}
1	97	2,4	0,6	100
2	94,2 M=95,5	5 M=3,7	0,8 M=0,8	
3	95,2	4	0,8	
4	96	3,3	0,7	
5	95,1	4	0,9	

On pourrait donc définir globalement la D.O. de l'extrait purifié mesurée à 315 nm (ou éventuellement à 280 nm) selon la relation suivante :

$$DO_{Ha} = DO_{AE} + DO_{PA} + DO_E, \text{ les différentes phases étant ramenées}$$

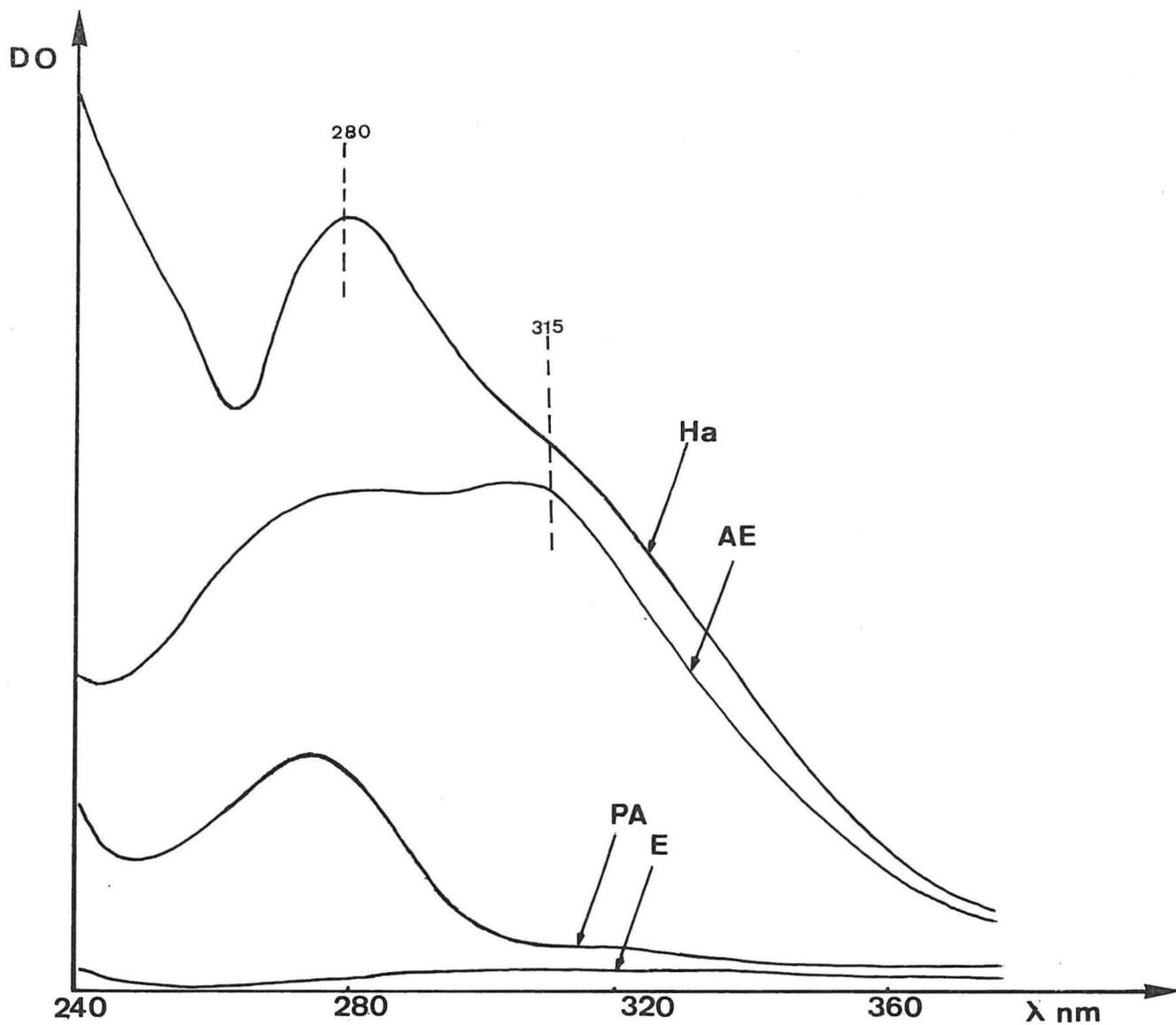


Fig. 26 - Spectres d'absorption en lumière ultra-violette des extraits des différentes phases de l'extraction.

Ha : extrait hydroalcoolique brut

AE : extrait purifié à l'acétate d'éthyle

PA : phase aqueuse après élimination des sels et des sucres

E : phase étherée contenant les pigments.

A concentration identique ces différentes phases sont telles

qu'à 315 nm : $DO_{Ha} = DO_{AE} + DO_{PA} + DO_E$

à une même concentration,

- Ha = extrait hydroalcoolique brut (avant purification)
- AF = extrait purifié à l'acétate d'éthyle (après purification)
- E = extrait contenant les pigments
- PA = extrait provenant de la phase aqueuse (après précipitation des sels selon les techniques décrites antérieurement).

3 - Variabilité liée à la méthode de dosage et au matériel.

Nous avons estimé la variabilité liée au processus de la méthode par lecture directe de la densité optique et la variabilité liée au matériel végétal. Pour cela nous avons effectué dix dosages sur les mêmes extraits bruts et purifiés et sur dix extraits bruts et purifiés provenant de dix fruits différents (3/4 mûrs à la récolte), les zones étudiées étant toujours les zones 21.

Les résultats rapportés dans le Tableau 9 montrent que la variabilité liée à la méthode de dosage est faible, par contre, les variations sont grandes aussi bien avec les extraits bruts qu'avec les extraits purifiés correspondants quand il s'agit des fruits individuels. En effet, à la variabilité due à la méthode de mesure s'ajoute la variabilité liée au matériel. Deux réponses peuvent être apportées pour expliquer l'importance de ces variations :

- la première est que les fruits, bien qu'apparemment semblables au point de vue degré de maturité, n'ont pas les mêmes teneurs en composés phénoliques ; cela tient vraisemblablement à un certain nombre de facteurs dont la maturation.
- le mauvais choix ou échantillonnage des fruits à la récolte. Les fruits étudiés sont généralement cueillis 3/4 mûrs, sauf cas spéciaux. Il est évident que de petites modifications au niveau du degré de maturité, ne peuvent être distinguées que difficilement au moment de la récolte.

La méthode par lecture directe de la D.O de l'extrait permet donc une estimation de la teneur en dérivés hydroxycinnamiques. La rapidité de sa mise en oeuvre constitue éventuellement son intérêt particulier vis-à-vis d'autres méthodes faisant intervenir des processus élaborés.

Tableau 9 - Variabilités liées à la méthode de dosage de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques et au matériel végétal.

Toutes les mesures sont exprimées en équivalent d'acide p-coumarique en μg par gramme de matière fraîche. Fruits provenant de la récolte 1976 (10 fruits).

	Dosages sur les mêmes extraits				Dosage sur des extraits différents provenant de 10 fruits frais identiques (3/4 mûrs)			
	Extrait brut		Extrait A.E. correspondant (purifié)		Extraits bruts		Extraits A.E. correspondants (purifiés)	
valeurs expérimenta- les	63,8	63,6	43,4	42,9	44,1	45,1	28,7	27,5
	63,5	64,4	42,8	43,6	65,7	66,3	47,9	45,9
	64,0	64,0	43,9	43,5	58,7	72,2	38,5	52,2
	63,3	63,7	43,0	43,6	63,6	60,6	43,7	41,1
	63,9	64,2	43,7	43,1	82,4	75,9	62,3	55,6
Moyenne	63,8		43,4		63,5		44,3	
Ecart-type	0,32		0,36		11,69		6,96	
Intervalle de confiance de la moyenne (P = 95 %)	$\pm 0,24$		$\pm 0,27$		$\pm 8,80$		$\pm 5,25$	
coefficient de variation	0,50 %		0,80 %		18,4 %		15,7 %	

B - DOSAGE des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES APRES SEPARATION
CHROMATOGRAPHIQUE.

L'application de cette méthode est inspirée des résultats obtenus au cours de l'étude qualitative des dérivés hydroxycinnamiques.

1 - Processus expérimental.

a - Séparation chromatographique.

La chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes de solvants :

- B.A.E. (4-1-5) diphasique (phase supérieure) en 1ère migration pendant 16 h.
- M.F.E. (3-1-2) diphasique (phase supérieure) en 2ème migration pendant 4 h.,

a permis d'obtenir une bonne séparation des dérivés hydroxycinnamiques, les taches étant convenablement séparées les unes des autres. Nous avons utilisé cette technique de séparation pour doser par spectrophotométrie, directement après élution, les composés présents en quantités appréciables dans l'extrait purifié, principalement :

- P₅ : acide di.p-coumaryl-1,4 quinique
- P₄ : acide caféyl-quinique (dicaféyl-1,4 quinique ?)
- P₃ : acide p-coumaryl-quinique (complexe)
- P₃₇ : p-coumaryl-glucose
- P₃₈ : acide p-coumaryl-quinique
- P₃₂ : férulyl-glucose
- P₂₆ : sinapyl-glucose

Remarque :

Le composé P₆ (ester férulyl-glucose, complexe) a été dosé directement après chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (4-1-5). Nous avons déjà évoqué au cours de son identification (Chapitre II) les raisons de ce choix.

Préparation des chromatogrammes.

L'extrait purifié à analyser est déposé dans un angle du chromatogramme à l'aide d'une microsiringue de précision. On part toujours de quantités constantes connues : 500 μ l à 1000 μ l d'extrait (à 2 g/ml). Les

valeurs inférieures à cette fourchette conduisent généralement à des concentrations non dosables. Par contre, au-delà de 1 ml d'extrait déposé, les taches sont mal séparées les unes des autres. Selon les techniques inspirées de celles de MACHEIX (1974), FLEURIET (1975), les dépôts et le développement des chromatogrammes sont réalisés à l'air libre et à température ambiante.

b - Elution des taches.

Après séchage dans un courant d'air à température ambiante, le chromatogramme ainsi développé est observé en lumière ultra-violette afin de repérer les taches. Le papier contenant la tache du composé que l'on désire doser est alors découpé en petits carrés de 1 cm de côté. L'éluat s'effectue ensuite dans un volume suffisant d'éthanol à 20 % d'eau pendant une durée allant de 24 à 48 h., à l'obscurité afin d'éviter tout phénomène secondaire d'isomérisation possible sous l'effet de la lumière, et un mauvais rendement d'éluat (MACHEIX, 1974). Le mélange doit être agité de temps à autre pour favoriser l'accélération de l'éluat.

c - Mesures.

Après décantation, on enregistre le spectre d'absorption de l'éluat contre un blanc, un éluat de papier traité dans les mêmes conditions chromatographiques et dont l'emplacement sur le chromatogramme et la surface sont identiques à ceux de la tache étudiée. Les mesures de D.O. sont faites aux maxima d'absorption des composés dosés.

Le manque de substances de référence correspondant exactement aux composés étudiés nous a conduit à exprimer leur concentration suivant des courbes d'étalonnage établies à partir des solutions éthanoliques à 80 %, d'acides phénoliques simples connus (Fig. 25).

Nous avons exprimé la teneur en P_4 suivant une courbe d'étalonnage de l'acide chlorogénique. Les mesures ont été faites à 328 nm, maximum d'absorption de P_4 et de l'acide chlorogénique en milieu éthanolique à 20 % d'eau.

Les D.O. de P_6 et P_{32} (esters férulyl-glucose) et de P_{26} (ester sinapyl-glucose) ont été lues respectivement à 324 nm et à 320 nm. Leur concentration est exprimée en équivalent d'acide férulique ou d'acide sinapique suivant des courbes d'étalonnage.

Pour déterminer les concentrations en dérivés p-coumariques, nous avons utilisé le coefficient d'extinction molaire de l'acide p-coumarique libre témoin ($\epsilon = 23000$ en solution éthanolique au maximum d'absorption, JURD, 1957). Les mesures ont été faites au maximum d'absorption de chacun des composés dosés.

Pour : P₅ à 312 nm
 P₃ à 311,5 nm
 P₃₇ à 314 nm
 P₃₈ à 312 nm

D'une manière générale, les résultats sont rapportés à l'unité de masse de la matière fraîche prélevée ($\mu\text{g/g.m.f}$) (Tableau 10).

2 - Etude critique de quelques aspects du processus expérimental.

Les diverses techniques utilisées (chromatographie, élution) pour aboutir au dosage spectrophotométrique des dérivés hydroxycinnamiques sont généralement simples, mais leur mise en oeuvre nécessite souvent de délicates opérations du fait que l'analyse porte sur des micro-quantités et que des pertes de substances peuvent avoir lieu au cours des manipulations. D'autres phénomènes secondaires peuvent également survenir : hydrolyse chimique, oxydation, polymérisation ou dégradation des composés, quand le milieu se trouve dans des conditions de pH, de température et de luminosité inadéquates. MACHEIX (1974) a souligné l'importance fondamentale de ces différents facteurs dans le dosage spectrophotométrique des dérivés hydroxycinnamiques de la pomme.

a - Influence de la durée de séchage. (Tableau 11)

Le séchage des chromatogrammes est indispensable pour éliminer les solvants de développement. La présence même à l'état de traces de certains d'entre eux au niveau des taches à éluer entraîne des valeurs excessivement élevées de D.O. mesurées en masquant totalement ou partiellement les spectres des composés étudiés. Cela est dû à l'absorption des groupements moléculaires non saturés, en l'occurrence à la fonction cétonique qui absorbe vers 280 nm, le méthyl-isobutyl-cétone du solvant M.F.E. (Fig. 27). Nous avons suivi l'influence de la durée de séchage sur l'expression de spectre du composé P₅ (acide di p-coumaryl-1.4-quinique) en solution dans l'éthanol à 80 %, préalablement déposé sur un chromatogramme et développé dans le solvant M.F.E.

Tableau 10 - Variabilité liée au dosage des principaux dérivés hydroxycinnamiques sur des extraits différents provenant de fruits frais (3/4 mûrs à la récolte). Zones analysées : zones 21.
Toutes les mesures sont exprimées en μg par gramme de matière fraîche.

Composés	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₃₇	P ₃₈	P ₃₂	P ₂₆
valeurs expérimentales	7,5	5,5	1,3	9,5	0,9	4,0	2,5	4,3
	5,4	3,8	1,7	8,8	1,3	3,6	1,9	4,7
	6,8	4,2	1,5	7,4	1,8	3,3	2,2	3,8
	8,1	5,1	1,1	10,1	1,2	3,9	1,7	4,1
	7,2	4,9	1,8	9,2	2,6	2,7	1,1	4,5
	6,6	4,7	1,0	8,3	1,5	3,2	2,0	
	7,0	5,0	2,1	9,7	2,0	4,5	1,4	
		4,4	1,3	8,0		3,0		
		2,9	1,6	8,9		2,9		
		6,0	1,7	9,1				
moyenne	6,8	4,7	1,5	8,9	1,6	3,5	1,8	4,3
écart-type	0,8	0,8	0,3	0,8	0,4	0,7	0,4	0,3
intervalle de confiance de la moyenne (P=95%)	$\pm 0,8$	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,4$	$\pm 0,4$
coefficient de variation	11,3 %	17,8 %	21,4 %	8,7 %	27,5 %	20,2 %	24,4 %	7,3 %

Tableau 11 - Influence de la durée de séchage du chromatogramme sur le spectre du composé P₅ (durée d'élution : 32 h.)

D.O à \ Durée de séchage	6 h.	18 h.	24 h.	32 h.	Témoin de référence
312 nm	0,679	0,577	0,528	0,521	0,523
	0,662	0,580 *	0,531 **	0,519	0,524
280 nm	1,051	0,694	0,280	0,230	0,236
	1,104	0,707 **	0,255 *	0,227	0,236

: pic d'absorption à la longueur d'onde considérée

** : épaulement " " "

* : faible épaulement " " "

b - Influence de la durée de l'élution sur le rendement des teneurs des composés élués.

Quelles que soient les techniques utilisées pour solubiliser les composés phénoliques adsorbés sur le papier (LOCHE, 1966 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ; MACHEIX, 1974) la durée de contact avec le solvant éluant doit être suffisante pour permettre une élution totale. MACHEIX (1974) a montré que le rendement d'acide chlorogénique est de 100 % dans l'éthanol à 20 % d'eau et de 32 % dans l'éthanol absolu, après 16 h. d'élution.

Dans le but d'avoir un meilleur rendement de l'élution, nous avons employé l'éthanol à 80 %, pour suivre dans le temps l'évolution de l'élution des principaux dérivés hydroxycinnamiques étudiés. Les composés préalablement isolés du matériel ont été déposés sur un chromatogramme non développé avant d'être élués.

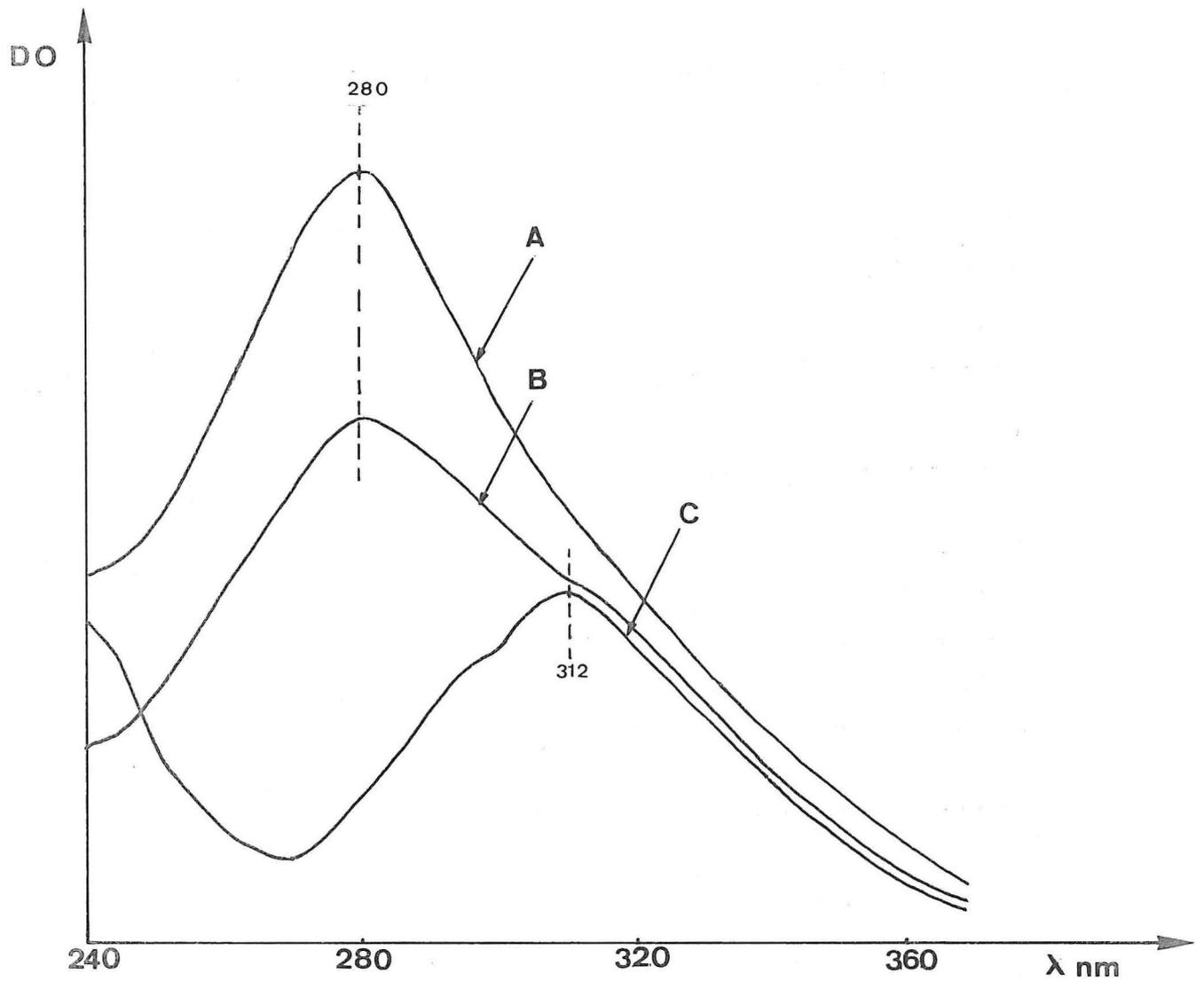


Fig. 27 - Spectres d'absorption du composé P₅ (di.p.coumaryl-1-4 quinique ?) en présence de traces plus ou moins importantes du solvant M.F.E. (phase organique).

- A - chromatogramme séché pendant 6 h.
 B - " " " 18 h.
 C - " " " 32 h.

Tableau 12 - Pourcentage des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques élués en fonction de la durée de l'élution.

Durée de com- posés phénoliques / l'élution	6 h.	18 h.	24 h.	32 h.	48 h.
P ₆	51	78	96	100	
P ₅	45	77	89	94	100
P ₄	58	89	93	100	
P ₃	69	82	95	100	
P ₃₇	63	84	91	100	
P ₃₈	65	81	90	100	
P ₃₂	60	72	93	100	
P ₂₆	53	75	84	96	100

D'après les résultats du tableau 12, nous pouvons conclure que le rendement de l'élution est différent d'un composé à l'autre et d'une manière générale la récupération des composés initialement déposés n'est de 100 % qu'au bout d'un temps relativement long de 32 à 48 h.

Nous avons tenu compte de ces conditions expérimentales dans tous les dosages effectués à partir des extraits chromatographiés.

d - Variabilité des résultats de l'élution à partir des extraits.

Pour estimer la variabilité liée aux résultats de l'élution, nous nous sommes inspirés de la méthode qui consiste à ajouter une concentration

connue d'une des substances qui existent dans l'extrait à chromatographier et à calculer le pourcentage de sa récupération. Afin de réaliser cette expérience nous avons utilisé le composé P₅ purifié dont la D.O. d'une solution hydro-alcoolique connue est de 0,562. Partant de 1 ml d'extrait purifié (2 g de matière fraîche par ml d'extrait purifié), chromatographié selon les techniques précédentes, nous avons d'abord élué et dosé par spectrophotométrie le composé P₅ ainsi obtenu. La D.O. mesurée est de 0,349, le volume de l'éluat étant de 10 ml.

Nous avons ensuite surchargé de 600 µl de P₅ purifié (D.O. = 0,562) un chromatogramme sur lequel nous avons déposé au préalable 1 ml d'extrait purifié. Après développement, séchage et observation aux U.V. la tache correspondant à l'ensemble de P₅ est éluée dans 10,6 ml d'éthanol à 80 % pendant 48 h. La D.O. de l'éluat est mesurée à 312 nm.

Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 - Récupération du composé P₅ ajouté dans un extrait purifié. Quatre dosages de P₅ ont été effectués sur le même extrait purifié. Les concentrations de P₅ sont exprimées en densité optique (D.O.).

D.O. des éluats de P ₅ à partir de 1 ml d'extrait	D.O. des éluats de P ₅ provenant de 1 ml d'extrait + 600 µl de P ₅ purifié (solution D.O. = 0,562)	% de récupération
0,349 0,352 M = 0,348 0,345 ± 0,005 0,348	0,885 M = 0,890 ± 0,064 0,895	$\frac{0,890 - 0,348}{0,562} \times 100 =$ 97

On constate que presque la totalité (97 %) de P₅ ajouté est retrouvée, après séparation chromatographique bidimensionnelle dans les solvants

B.A.E./M.F.E., dans l'éluat d'une part et, d'autre part on peut remarquer la faible variabilité liée aux quatre dosages du composé P₅ effectués sur le même extrait purifié. Malgré une perte systématique de 3 % on peut dire que les résultats obtenus sont très satisfaisants. L'oxydation, possible au moment du dépôt, peut être à l'origine de cette perte, mais le caractère monophénolique de P₅ laisserait plutôt à penser que ce phénomène est vraisemblablement faible.

En conclusion, la méthode chromatographique bidimensionnelle dans les solvants B.A.E./M.F.E., reste donc une méthode très intéressante pour doser dans l'ananas P₅ (di p-coumaryl-1,4-quinique) et d'une manière générale elle est valable pour les autres dérivés hydroxycinnamiques étudiés. Les pertes de substance, par oxydation ou dues aux manipulations, inhérentes au processus expérimental, ne peuvent être que faibles à cause du nombre très réduit des manipulations.

Associée avec la spectrophotométrie cette méthode chromatographique permet de déterminer spécifiquement et quantitativement les composés que l'on veut doser, d'autant que les dérivés hydroxycinnamiques de l'ananas ont des maxima d'absorption en lumière ultraviolette très voisins les uns des autres. Par ailleurs, la rapidité de sa mise en oeuvre constitue l'élément principal de son efficacité.

Nous avons donc appliqué dans les deux exemples d'études de variation de teneurs suivants, les deux méthodes proposées :

- par lecture directe du spectre de l'extrait,
- par chromatographie associée à la spectrophotométrie pour le dosage des composés individuels.

II - REPARTITION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES dans l'ANANAS

On sait classiquement que le fruit dit mûr, présente des gradients de maturité : la base étant plus mûre que la partie médiane et celle-ci plus évoluée que la partie se trouvant sous la couronne (MILLER et col., 1953 ; DUPAIGNE, 1953 ; PY et TISSEAU, 1965 ; GORTNER, 1965 ; DULL et al., 1967 ; I.R.F.A., 1975 ; observations personnelles). Nous avons donc cherché à préciser la répartition des principaux dérivés hydroxycinnamiques étudiés pour voir s'il existe des variations de concentration en relation avec le degré de maturité des différentes parties du fruit.

A - CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Selon les techniques d'échantillonnage décrites au Chapitre I, chaque fruit est divisé en 16 zones ou couronnes auxquelles correspondent les 16 extraits purifiés que nous désignons par les nombres :

10	11	12	13	pour la 1ère tranche		
20	21	22	23	"	2ème	"
30	31	32	33	"	3ème	"
40	41	42	44	"	4ème	"

Dans chaque nombre le premier chiffre représente la tranche, le second la zone ou la couronne. Par exemple, 10, 20, 30, 40 désignent les quatre cylindres d'égale hauteur de l'axe central ; 11, 21, 31, 41 les 4 couronnes suivantes correspondant aux quatre tranches.

Nous avons comparé dans un premier temps les variations de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques dans trois catégories de fruits : deux ananas verts, deux ananas 3/4 mûrs et deux ananas 4/4 mûrs.

Les variations des teneurs en composés phénoliques individuels ont été étudiées ensuite dans des ananas 3/4 mûrs à la récolte.

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX.

1 - Variations de la teneur globale liées au degré de maturité du fruit.

Les résultats rapportés sont exprimés en équivalent d'acide p-coumarique (μg par gramme de matière fraîche) et concernent deux types d'études faites dans le sens du découpage vertical et horizontal du fruit (Fig. 28, 29, 30 et 30bis).

a - Variations dans le sens vertical (Fig. 31)

La teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques varie en augmentant progressivement quand on passe du haut vers le bas du fruit, autrement dit des zones moins mûres vers les zones plus mûres. En moyenne, par rapport aux zones moins mûres (les zones de la tranche 1), on retrouve dans les zones plus mûres (les zones de la tranche 4) :

- 1,7 à 2 fois plus de dérivés hydroxycinnamiques pour les fruits verts,
- 1,5 à 2,3 fois plus pour les fruits 3/4 mûrs,
- 1,6 à 2 fois plus pour les fruits 4/4 mûrs.

Il est clair que la teneur en dérivés hydroxycinnamiques d'une zone du fruit est liée au degré de maturité de cette zone.

b - Variations dans le sens horizontal (Fig. 32)

Par rapport aux zones 0 (l'axe cylindrique central) les zones 1 présentent des teneurs nettement inférieures qui vont ensuite augmenter

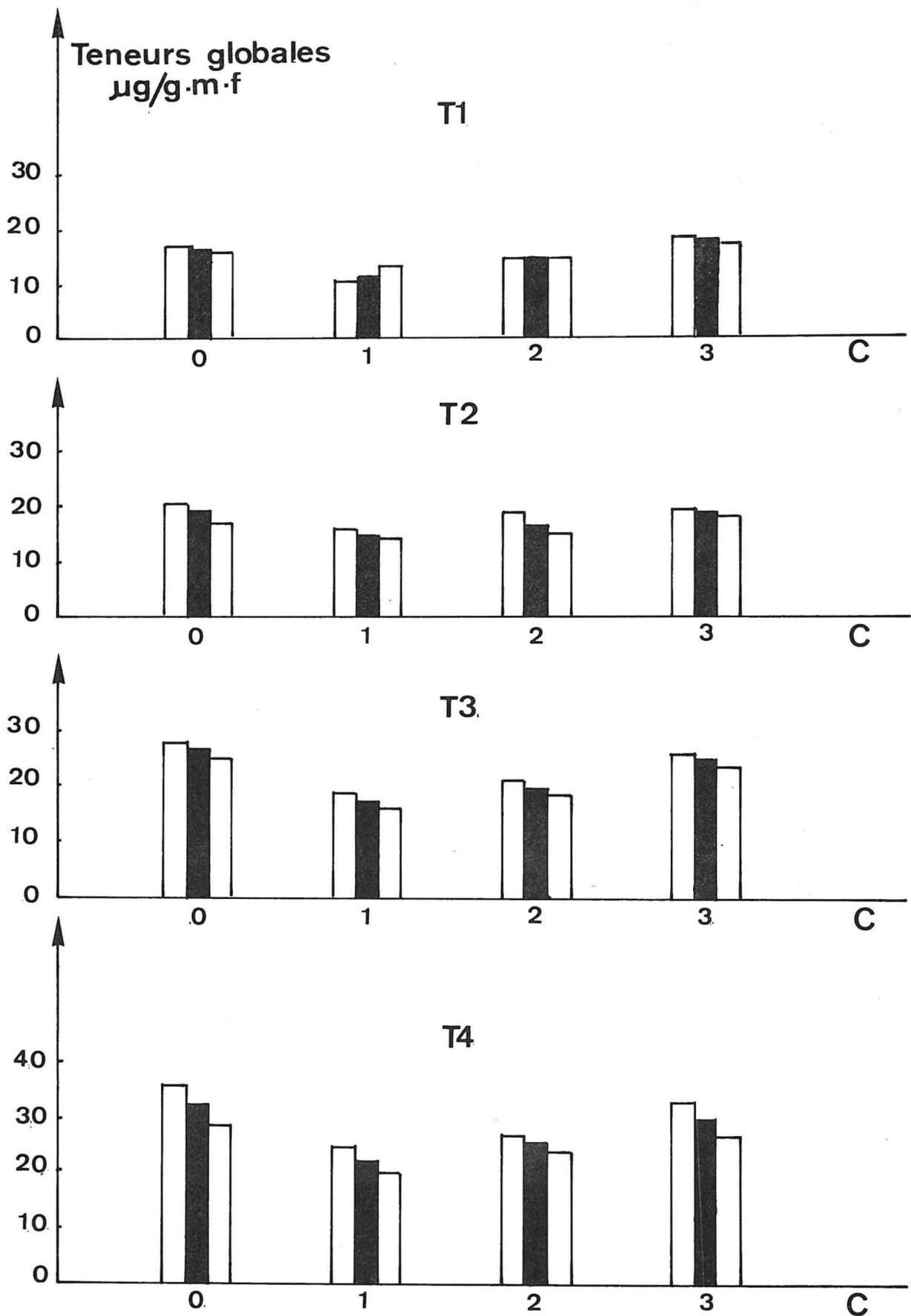


Fig. 28 - Gradients de teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques exprimés en $\mu\text{g/g}$. de matière fraîche dans deux ananas verts (Mai 1976).

T : tranche
C : couronne

□ : teneurs globales
■ : teneur globale moyenne

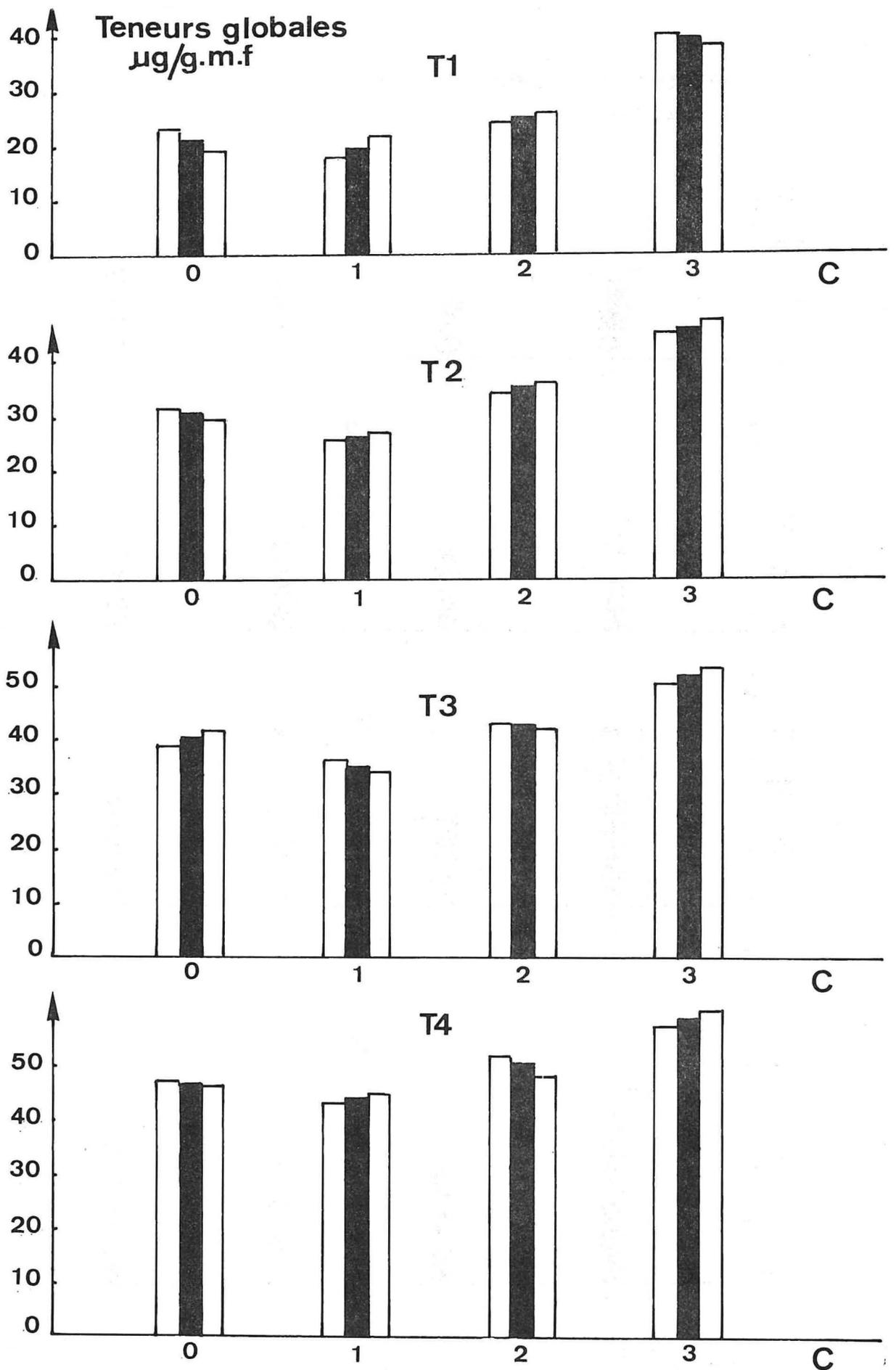


Fig. 29 - Gradients de teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques exprimés en $\mu\text{g/g.}$ de matière fraîche dans deux ananas 3/4 mûrs (Mai 1976).

T : tranche

C : couronnes

□ : teneurs globales
 ■ : teneur globale moyenne

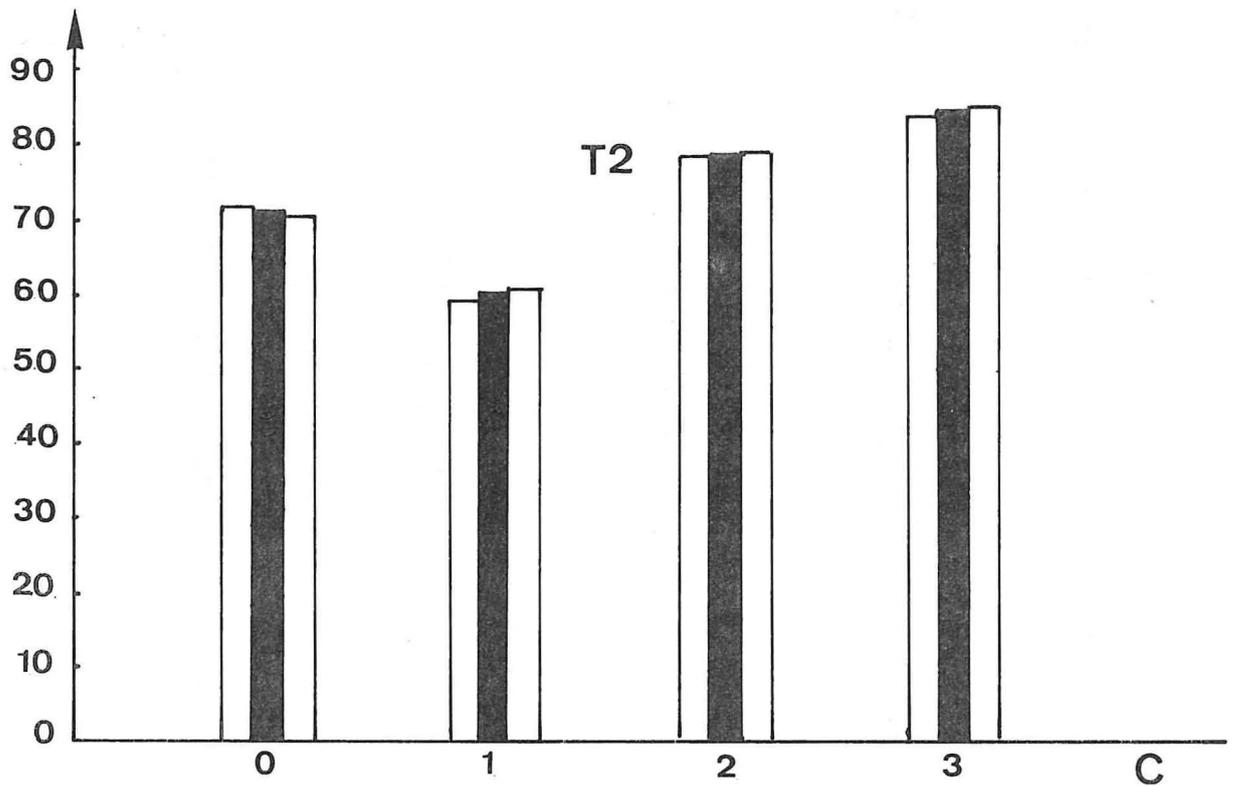
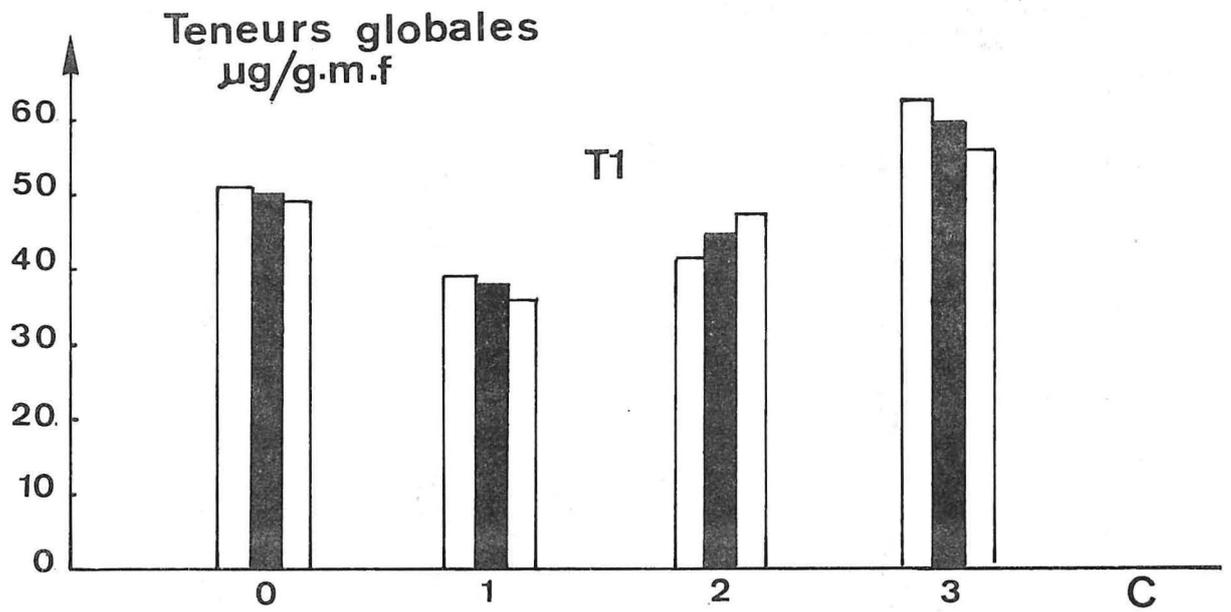


Fig. 30 - Gradients de teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche dans deux ananas 4/4 mûrs (Mai 1976).

T : tranche

C : couronnes

: teneurs globales
 : teneur globale moyenne

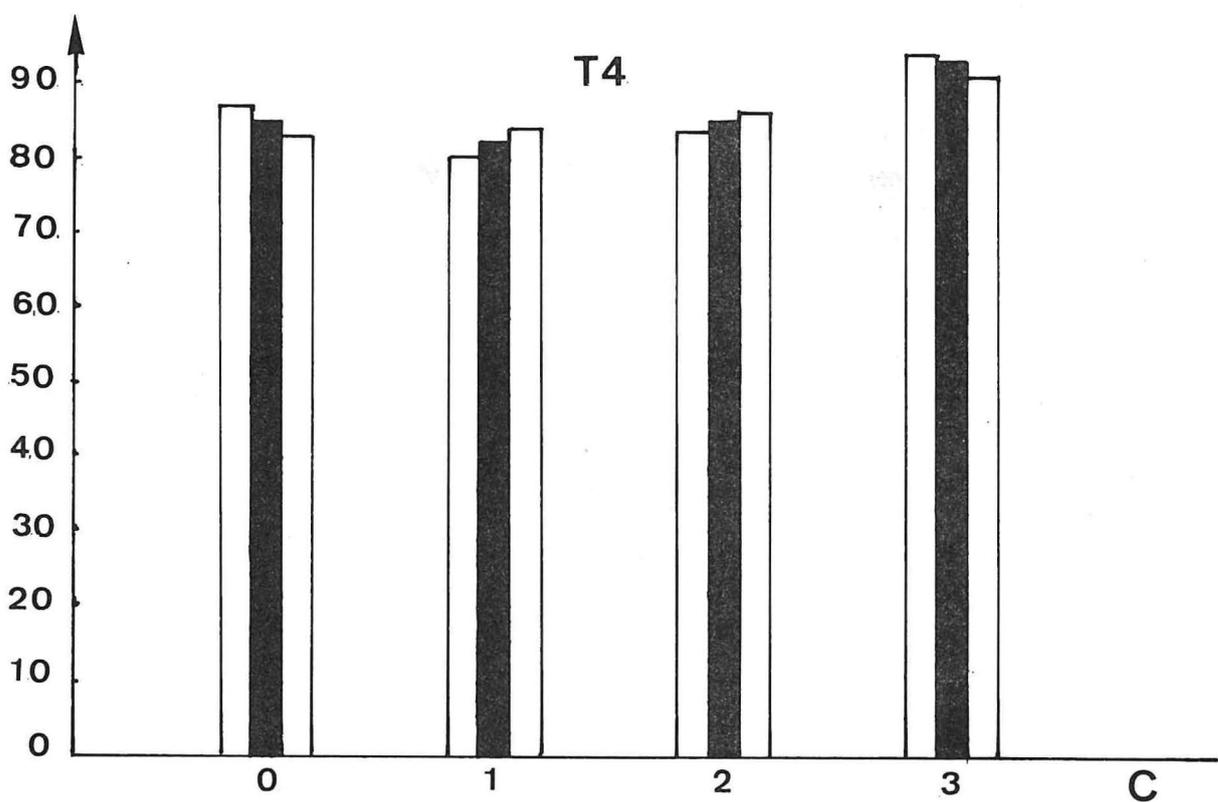
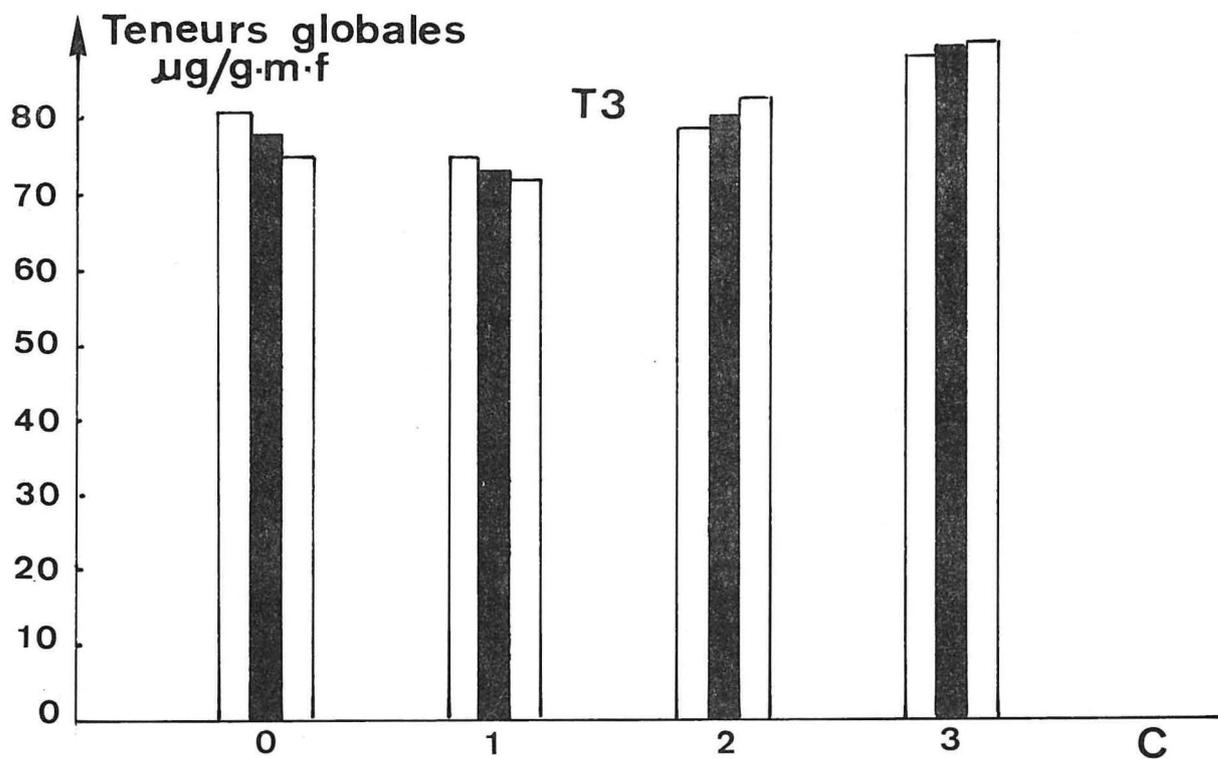


Fig. 30bis - Gradients de teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche dans deux ananas 4/4 mûrs (Mai 1976)

T : tranche
C : couronnes

□ : teneurs globales
■ : teneur globale moyenne

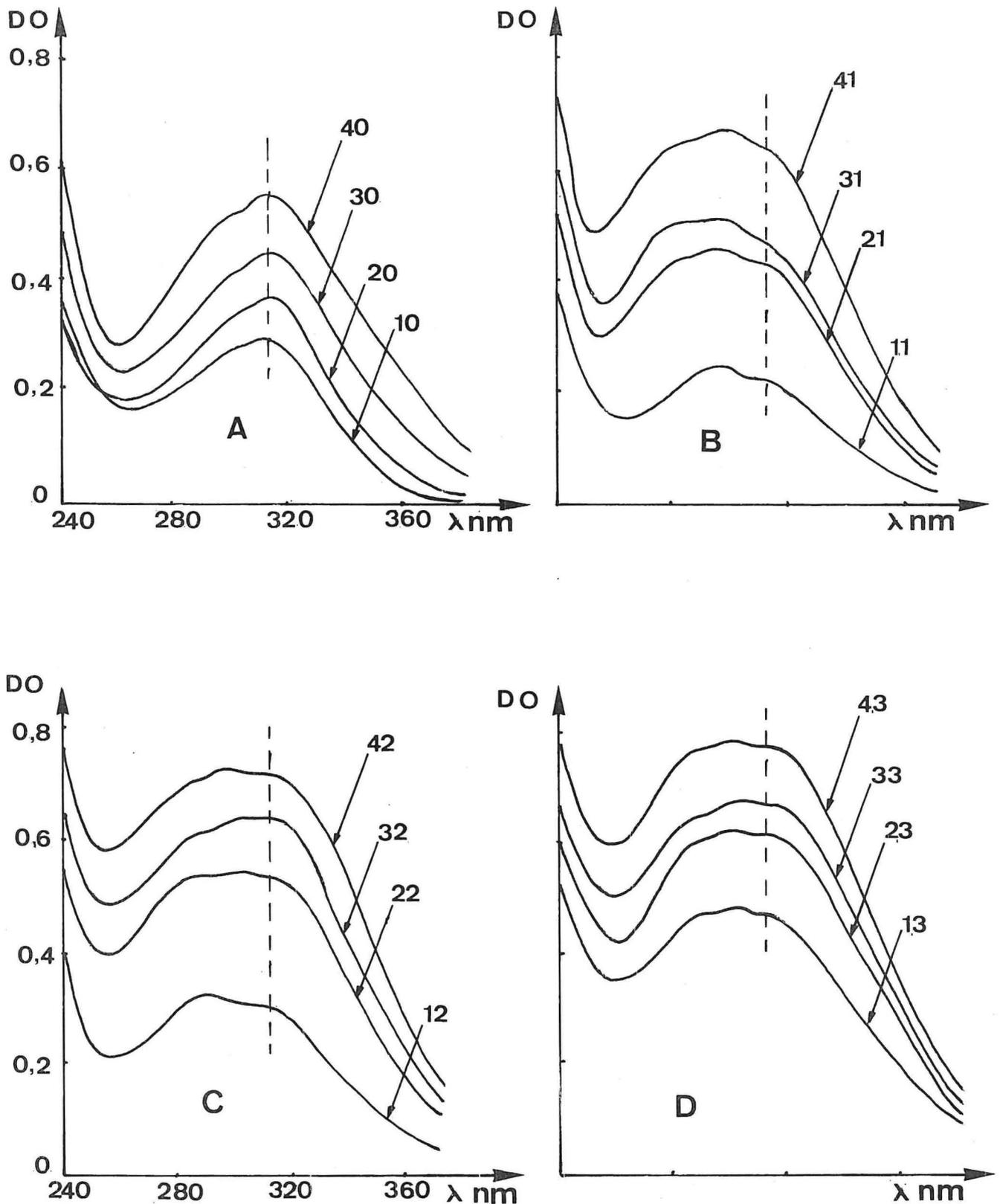


Fig. 31 - Spectre d'absorption en U.V. de 16 extraits purifiés correspondant aux 16 zones d'un ananas 3/4 mûr. Evolution de la teneur globale en dérivés hydrocinnamiques dans les différentes zones du fruit (verticalement). Concentration des solutions dosées : 125 μ l d'extrait purifié dans 2,5 ml d'éthanol 80° (2 g de m.f. par ml d'extrait purifié).

- A - colonne des zones 0 (axe cylindrique central)
- B - colonne des zones 1
- C - colonne des zones 2
- D - colonne des zones 3

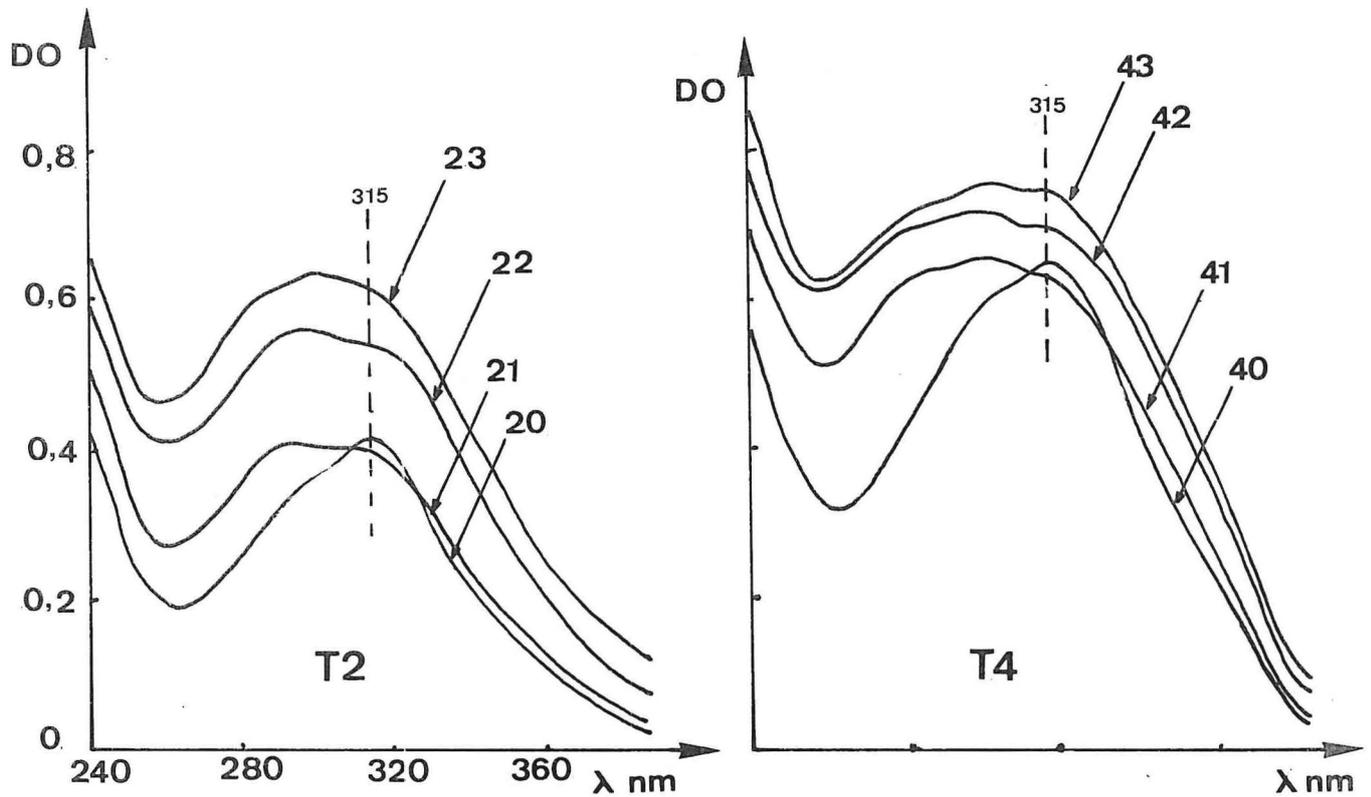


Fig. 32 - Spectres d'absorption de 8 extraits purifiés provenant de 8 zones d'un ananas 3/4 mûr.
 Evolution de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques (horizontalement).
 Concentration des solutions analysées : 125 μ l d'extrait purifié dans 2,5 ml d'éthanol 80° (2 g de m.f. par ml d'extrait purifié)

T₂ = les 4 zones de la tranche 2

T₄ = les " " " 4

graduellement dans les zones 2 et 3. Ces variations s'observent dans toutes les tranches du fruit pour les trois catégories de fruits.

Les teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques varient beaucoup quantitativement avec l'âge et suivant les zones du fruit. L'augmentation observée dans la pulpe périphérique pourrait être liée à l'influence de l'ensoleillement. Ce point n'a pas été cependant étudié dans ce travail mais on sait que l'exposition d'un fruit sur l'arbre peut entraîner des variations de teneurs en composés phénoliques. Chez la pomme la partie ensoleillée contient 2 fois plus de quercétine que la partie ombragée ; la proportion de variation est légèrement moindre pour les catéchines (WORKMAN, 1963 ; MACHEIX, 1974). MEHERIUK et PORRITT (1968), MACHEIX (1974) observent que les teneurs en acide chlorogénique sont par contre les mêmes dans les deux cas.

2 - Variations des teneurs en composés phénoliques individuels dans les différentes zones du fruit.

Pour l'ensemble des dérivés hydroxycinnamiques étudiés, nous avons observé des variations croissantes de teneurs, verticalement des zones moins mûres vers les zones plus mûres et horizontalement de l'axe cylindrique central vers la pulpe périphérique. Les figures 33 et 33a, représentent les variations de teneurs des principaux composés identifiés (fruits 3/4 mûrs à la récolte). Nous avons obtenu, dans d'autres séries de résultats, des évolutions dans le même sens avec d'autres catégories de fruits.

- La teneur en P₆ augmente légèrement dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres et de l'intérieur vers la pulpe périphérique. Des fluctuations de concentration sont cependant observées dans certaines zones du fruit.

- La teneur en P₅ est de 5 à 10 fois plus élevée dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres et de 1 à 2,5 fois plus dans la pulpe périphérique relativement aux zones internes.

- P₄ le seul o.diphénol présent dans l'extrait varie également dans les mêmes sens. La concentration devient double dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres et dans la pulpe périphérique comparativement aux zones internes.

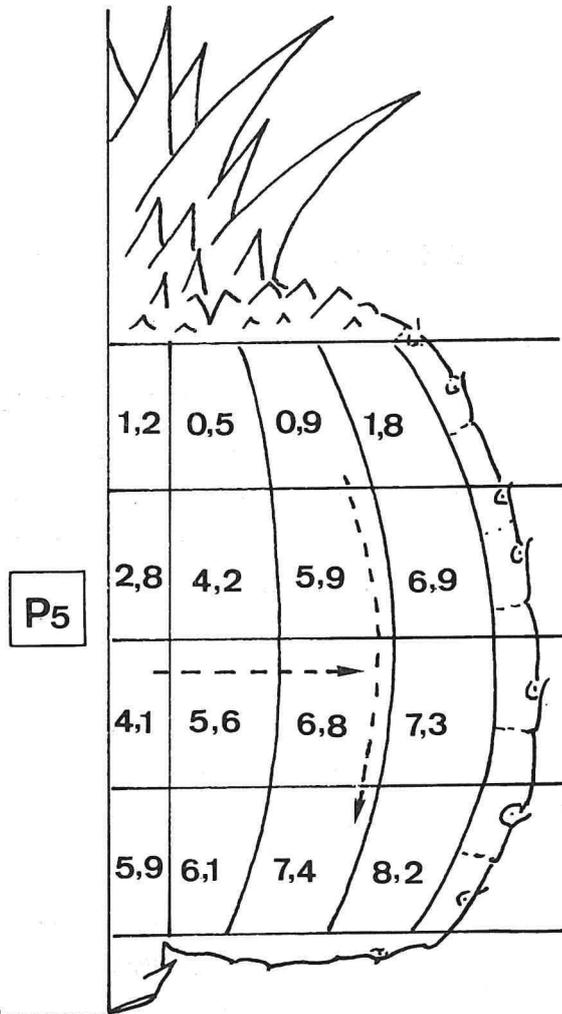
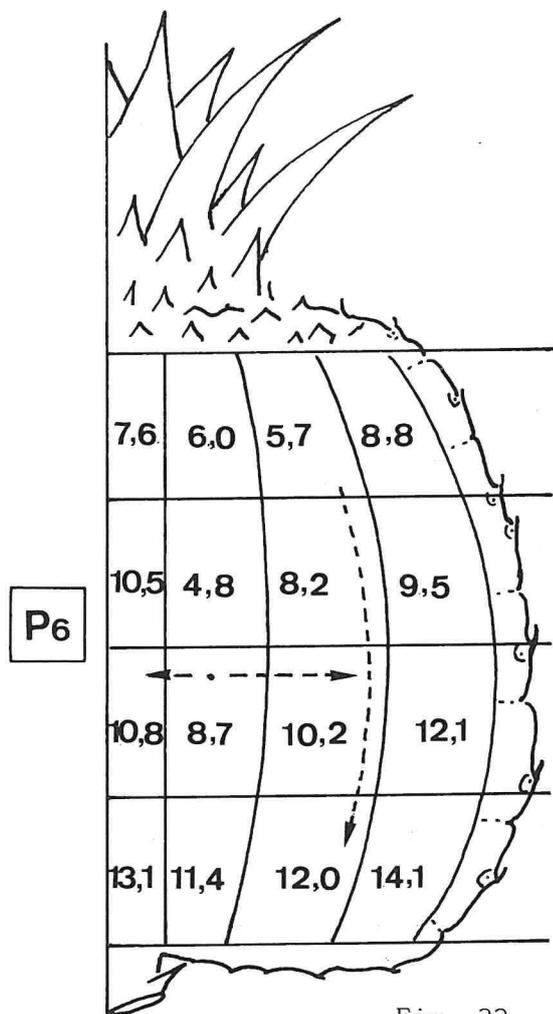
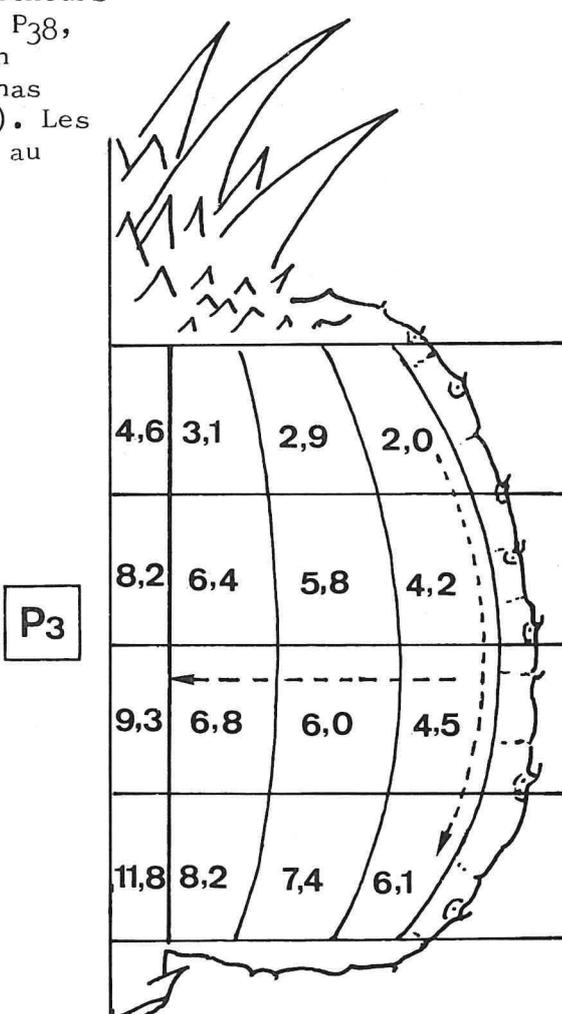
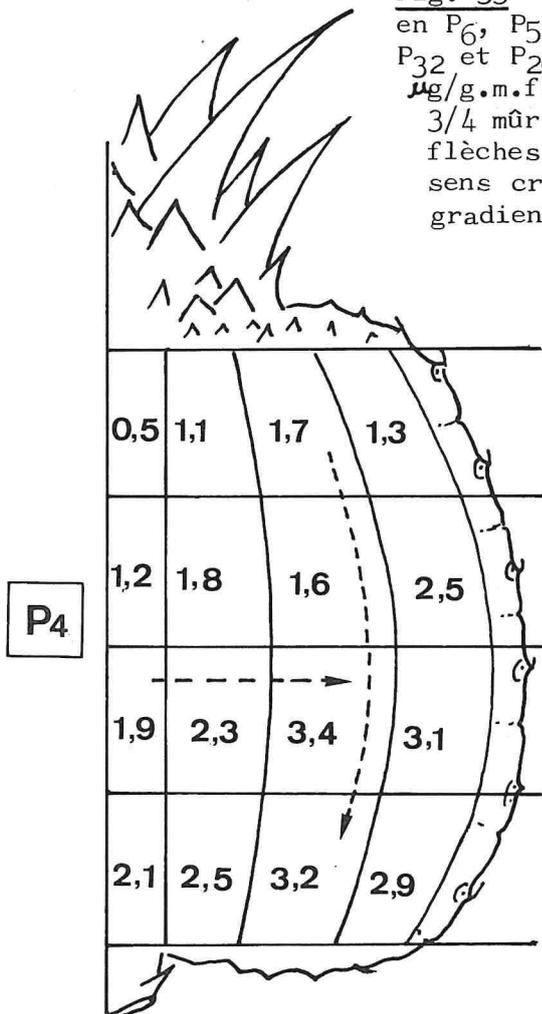


Fig. 33 - Gradients de teneurs en P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ rapportés en µg/g.m.f. dans un ananas 3/4 mûr (récolte 1976). Les flèches correspondent au sens croissant des gradients



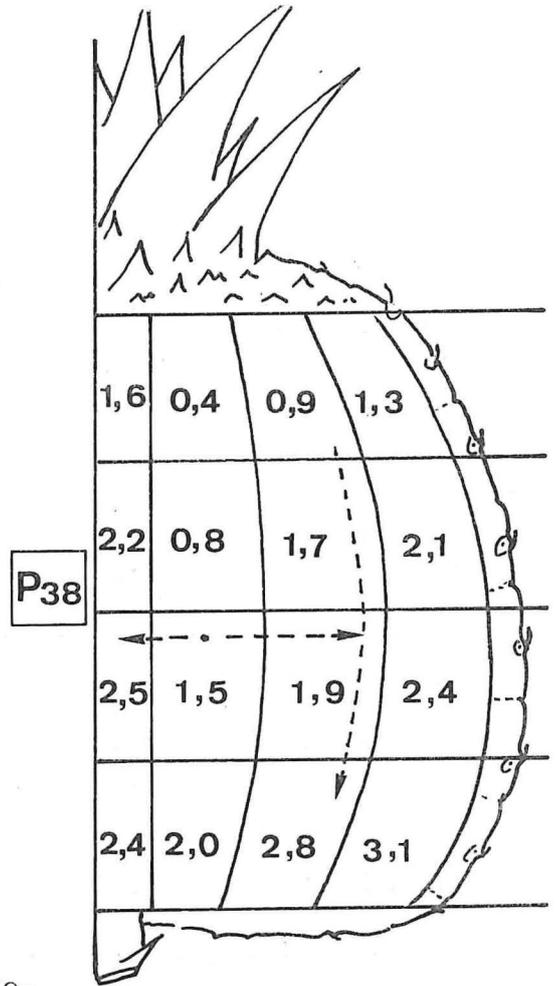
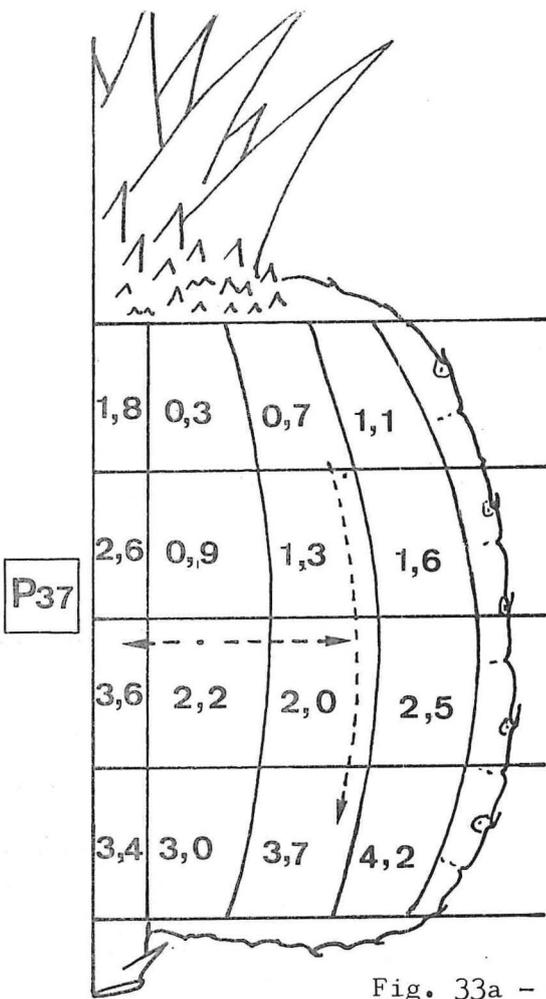
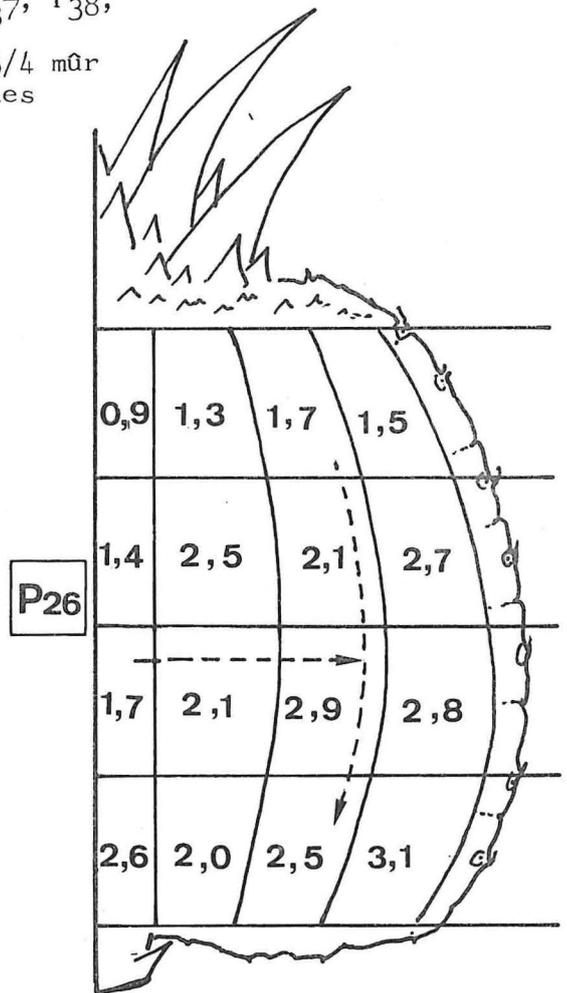
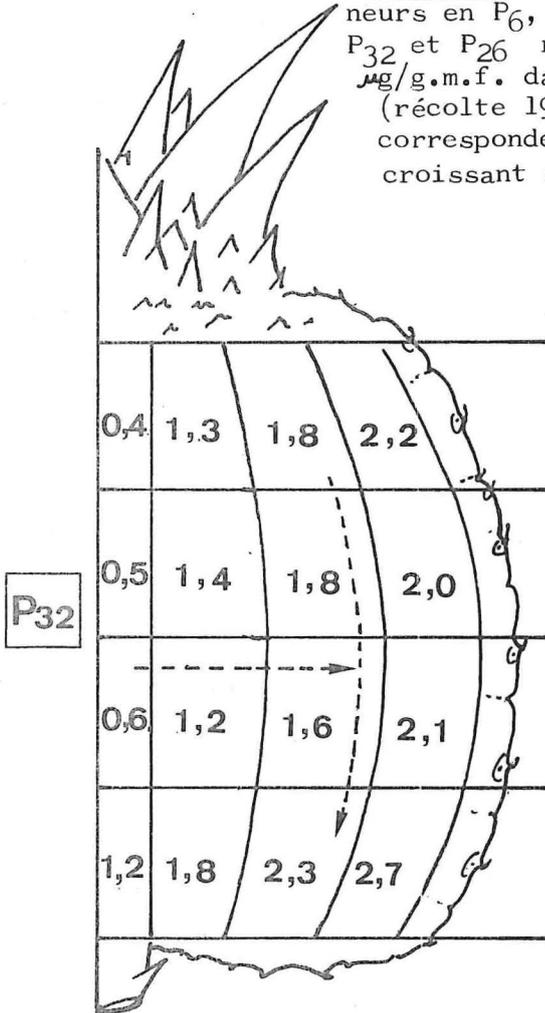


Fig. 33a - Gradients de te-
neurs en P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈,
P₃₂ et P₂₆ rapportés en
µg/g.m.f. dans un ananas 3/4 mûr
(récolte 1976). Les flêches
correspondent au sens
croissant des gradients.



- P₃ est particulièrement abondant dans l'axe cylindrique central. Sa teneur est de 1 à 2 fois plus faible dans les zones de la pulpe périphérique par rapport aux zones internes. Par contre, elle est 1 à 3 fois plus élevée dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres.
- La teneur en P₃₇ varie de manière importante quand on passe des zones moins mûres aux zones plus mûres. La proportion d'augmentation est de 1 à 10. De l'intérieur vers la pulpe périphérique cette variation est faible. Toutefois, les concentrations restent légèrement plus élevées dans l'axe cylindrique central, que dans les autres zones du fruit.
- L'évolution de P₃₈ est identique à celle de P₃₇ avec des concentrations relativement importantes dans l'axe cylindrique central, une faible variation de l'intérieur vers la pulpe périphérique et une augmentation de teneur de 1 à 5 fois dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres.
- Les teneurs en P₃₂ et P₂₆ varient très faiblement en augmentant dans les zones plus mûres. Cette évolution s'observe également de l'intérieur vers la pulpe périphérique.
- P₅ et P₃₇ ont des teneurs 1 à 10 fois plus élevées quand on passe successivement dans les zones 11, 21, 31 et 41 du même fruit. Par contre, les autres composés ne varient que dans une proportion de 1 à 2 dans les mêmes zones.
- En résumé, les composés présents P₃, P₃₇ et P₃₈ ont des teneurs nettement plus élevées dans l'axe cylindrique central que partout ailleurs dans le fruit. P₃ reste cependant le composé le plus important. Par contre, P₆, P₅, P₃₂ et P₂₆ sont plus concentrés dans la pulpe périphérique que dans les zones intérieures, P₆ et P₅ étant ici les composés les plus abondants.

3 - Etude comparée des gradients de P₃ et de P₅ dans quelques fruits.

Nous avons cherché à préciser l'importance des gradients de teneurs en P₃ et P₅ entre autres, dans trois fruits semblables (3/4 mûrs) en les comparant verticalement dans l'axe cylindrique central et horizontalement dans la tranche 2.

En dehors des variations que nous avons déjà signalées lors de l'étude précédente, nous pouvons constater qu'en moyenne (Fig. 34) :

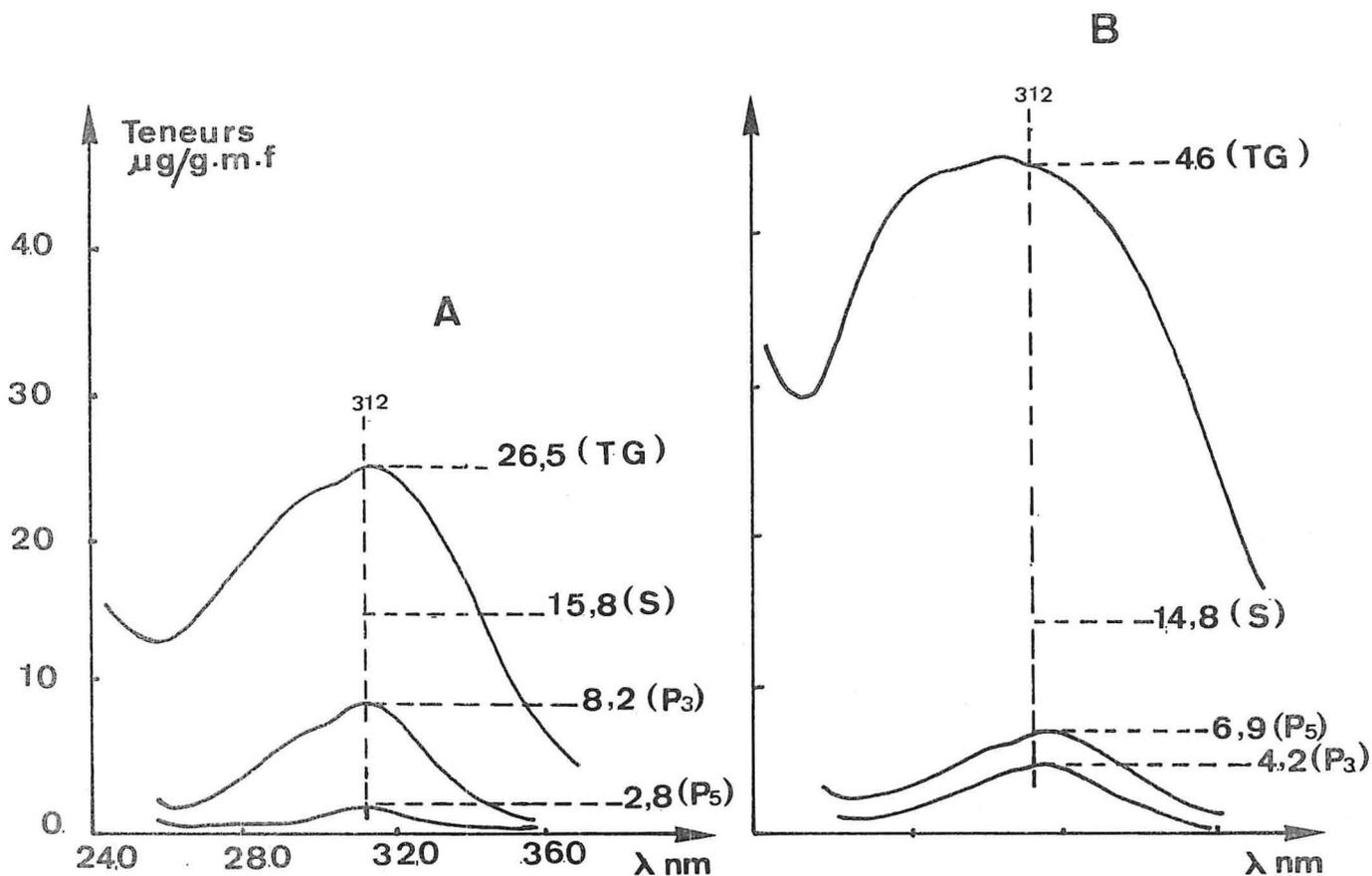


Fig. 34 - Etude comparative de la distribution de P₅ et P₃ dans les zones 20 (A) et 23 (B) de trois ananas 3/4 mûrs.

Les valeurs figurées représentent les moyennes des valeurs mesurées.

TG = teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques

S = P₅ + P₃ + P₃₇ + P₃₈

- La teneur en P_3 est 3 fois plus importante que celle de P_5 dans l'axe cylindrique central et représente respectivement le 1/3 et le 1/9 de la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques,

- et inversement, la teneur en P_5 est 1,7 fois plus importante que celle de P_3 , dans la zone 23, soit respectivement le 1/7 et le 1/11 de la teneur globale dans cette zone (Tableau 14, Fig. 34).

Tableau 14 - Comparaison des teneurs en P_5 et P_3 entre les zones 20 et 23 des fruits 3/4 mûrs.

Nombre d'ex-traits	P_5 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{mf}$)		P_3 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{mf}$)		Teneurs globales ($\mu\text{g/g} \cdot \text{mf}$)	
	zone 20	zone 23	zone 20	zone 23	zone 20	zone 23
1	2,9	7,1	7,6	4,0	28,5	46,7
2	3,0 $M=2,8$	7,9 $M=6,9$	8,6 $M=8,2$	4,9 $M=4,2$	30,2 $M=26,5$	49,8 $M=46$
3	2,5	5,7	8,4	3,7	20,8	41,5

L'ensemble des résultats portant sur la répartition des dérivés hydroxycinnamiques dans le fruit nous a permis de faire les remarques suivantes :

- La teneur relativement élevée de P_3 ($\lambda_{\text{max}} = 311,5 \text{ nm}$) dans l'axe cylindrique central montre que l'importance du maximum d'absorption vers 312 nm des extraits purifiés correspondants est due pour une grande part à ce composé P_3 . Cette forte concentration est-elle due à une activité synthétique in situ ou résulte-t-elle d'une migration de matière provenant d'autres organes ? Un phénomène connu est le transfert par la sève de certains composés phénoliques (MACLEOD et PRIDHAM, 1965). L'axe cylindrique central est une zone très vascularisée, un transfert de composés phénoliques par la sève, provenant d'autres organes (feuilles, tige) est possible. Rappelons que P_3 existe en quantité

relativement faible dans le pédoncule et que P₆₂ (acide p-coumarique libre) s'y trouve en quantité appréciable. Cependant dans le fruit, P₆₂ n'est pas dosable et sa teneur dans l'axe cylindrique central est très faible. Une synthèse a lieu vraisemblablement utilisant P₆₂ comme élément précurseur. On peut penser que P₃, un dérivé p-coumaryl-quinique, est parmi les produits de synthèse. Un rapprochement peut être fait ici concernant les composés P₃₇ (p-coumaryl-glucose) et P₃₈ (p-coumaryl-quinique) qui ont également des teneurs assez élevées dans l'axe cylindrique central. Leur synthèse in situ pourrait se faire à partir de P₆₂ (acide p-coumarique libre), du glucose et de l'acide quinique présents dans le fruit, vraisemblablement utilisés sous des formes activées (STECK, 1968 ; MACHEIX, 1974), ce qui impliquerait que P₆₂ serait transféré de la tige (prolongement du pédoncule) à l'axe cylindrique central où il serait utilisé partiellement sinon en totalité pour la synthèse de P₃₇, P₃₈, P₃ et d'autres dérivés hydroxycinnamiques. Une migration d'au moins une partie de P₆₂ vers la pulpe périphérique serait également concevable pour la synthèse d'autres composés tels que P₆, P₅, P₄, P₃₂, P₂₆ qui ont des teneurs légèrement supérieures dans ces zones par rapport à la partie centrale du fruit.

Conclusion.

Quelques points intéressants sur le plan physiologique et métabolique peuvent être dégagés à l'issue de cette étude :

- Les gradients de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques sont très nets dans le fruit. Les concentrations augmentent verticalement du sommet (zones moins mûres) vers la base (zones plus mûres) et horizontalement de l'axe cylindrique central vers la pulpe périphérique, en ce qui concerne notamment les composés P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆. Seul P₃ diminue de concentration de l'axe cylindrique central vers la pulpe périphérique.
- L'augmentation de teneurs dans la pulpe périphérique serait due vraisemblablement à l'influence de l'ensoleillement sur la peau du fruit et de là les zones subcorticales. Un phénomène semblable a été observé chez les pommes à épiderme rouge (SIEGELMAN, 1964 ; HEINICKE, 1966) chez la pomme Calville blanc (MACHEIX, 1974).

- Les teneurs particulièrement élevées de certains composés dont P₃, P₃₇, P₃₈ dans l'axe cylindrique central suggèrent que ces zones, entre autres, pourraient être le siège d'une activité synthétique importante au point de vue phénolique. On pourrait dès lors envisager le transfert d'éléments simples, tel que P₆₂ (acide p-coumarique libre) à partir d'autres organes (feuilles, tige, ...) en vue de la synthèse in situ de ces composés et autres dérivés hydroxycinnamiques importants comme P₆, P₅, P₄, P₃₂, P₂₆ ..., dans l'ananas.

III - EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES au COURS de la MATURATION de l'ANANAS.

La maturation des fruits s'accompagne généralement d'un certain nombre de modifications d'ordre biochimique. Sur le plan des composés phénoliques en particulier, des variations de teneurs ont été observées dans beaucoup de fruits dont la pomme (MACHEIX, 1974), la tomate (FLEURIET, 1975), la cerise (MELIN, 1976).

Dans le but de déterminer un indice qui prédisposerait le fruit au brunissement interne, nous avons cherché à préciser l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation de l'ananas en suivant leurs variations qualitative et quantitative dans des fruits frais à différents stades de maturation.

A - CARACTERISTIQUES GENERALES des FRUITS UTILISES.

Trois catégories de fruits ont été étudiées provenant de différentes récoltes :

1 - Les fruits verts.

Nous désignons dans cette catégorie les fruits dont la peau encore verte montre un très faible début de dégradation de la chlorophylle à la base de chacun des fruits mais dont les caractères morphologiques externes (poids,

taille ...) sont comparables à ceux des fruits dits "mûrs". Ils ont été cueillis 15 jours avant le stade de récolte normale. Selon divers auteurs (SINGLETON, 1965 ; SINGLETON et GORTNER, 1965 ; TEISSON, 1973b ; I.R.F.A., 1975), la maturation de l'ananas débute 14 à 20 jours avant le stade de récolte normale du fruit et se traduit par des modifications de caractères morphologiques : arrêt du développement pondéral de la couronne, flétrissement du pédoncule et de caractères physico-biochimiques : arrêt de l'afflux de saccharose, augmentation de concentration des sucres réducteurs, début de dégradation de la chlorophylle de la peau, synthèse des caroténoïdes dans la chair. Les fruits verts étudiés semblent donc correspondre aux fruits définis ainsi par ces auteurs.

2 - Les fruits 3/4 mûrs, constituent les fruits dits "mûrs". Les 3/4 de leur hauteur atteignent la coloration jaune au stade de récolte normale. Généralement destinés au commerce, ils continuent à mûrir plus ou moins tardivement suivant les conditions de conservation (I.R.F.A., 1965). Comme nous l'avons déjà signalé, l'identification des dérivés hydroxycinnamiques a été réalisée à partir des extraits de fruits 3/4 mûrs.

3 - Les fruits 4/4 mûrs, groupent les fruits qui ont mûri naturellement et complètement (surmaturation) sur pied. Ils sont récoltés lorsque la coloration de toute la peau tourne entièrement au jaune.

Dans tous les cas les parties de fruits étudiées sont toujours les zones 21 (tranche 2, couronne 1) suivant les techniques d'échantillonnage, d'extraction, de purification d'extraits, décrites au Chapitre I.

B - ETUDE QUALITATIVE.

• Les dérivés hydroxycinnamiques présents dans les extraits étudiés.

La séparation chromatographique bidimensionnelle dans les solvants B.A.E./M.F.E. selon le processus déjà défini, nous a permis de retrouver, en appliquant les différentes techniques de révélation et d'analyse chimique, les mêmes dérivés hydroxycinnamiques que ceux déjà identifiés précédemment (voir Chapitre II). La seule différence se situe au niveau de l'importance

relative de concentration de chacun des composés qui va en croissant de l'ananas vert à l'ananas 4/4 mûr (Tableau 15 ; Fig. 35).

C - ETUDE QUANTITATIVE.

Nous avons estimé la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques par lecture directe du spectre de l'extrait et dosé les principaux composés après séparation chromatographique.

1 - Estimation des teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques.

L'estimation des teneurs globales a été réalisée sur des extraits purifiés à l'acétate d'éthyle, qui contiennent plus de 95 % de dérivés hydroxycinnamiques présents dans le matériel (voir paragraphe I, dosages).

L'analyse des résultats expérimentaux rapportés dans le Tableau 16, nous permet de constater que les fruits 3/4 mûrs contiennent 1 à 2,5 fois plus de dérivés hydroxycinnamiques que les fruits verts alors que les fruits 4/4 mûrs en ont 1 à 2 fois plus que les fruits 3/4 mûrs.

Il semble donc qu'il y ait une augmentation des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques, plus particulièrement des dérivés p-coumariques, au cours de la maturation du fruit sur pied.

Remarque : La ou les substances des extraits bruts qui absorbent vers 280 nm en lumière ultra-violette, évoluent dans le même sens que les dérivés hydroxycinnamiques des mêmes extraits, au cours de la maturation du fruit. A titre indicatif nous avons mesuré les D.O. des extraits bruts de quelques fruits, à cette longueur d'onde (Tableau 17).

2 - Dosage des principaux dérivés hydroxycinnamiques.

Pour permettre une comparaison valable entre les 3 types d'extraits purifiés (à l'acétate d'éthyle et de concentration 2 g de matière fraîche par ml d'éthanol à 80 %) correspondant aux 3 catégories de fruits étudiés, nous sommes intéressés surtout aux principaux composés dosables après séparation chromatographique dans les solvants B.A.E./M.F.E.

Tableau 15 - Principaux dérivés hydroxycinnamiques présents dans les trois catégories d'extraits (zones 21)

+ : importance relative des taches (observation aux U.V.)
 - : très faibles traces

Dérivés hydroxycinnamiques	Extrait de fruit vert	Extrait de fruit 3/4 mûr	Extrait de fruit 4/4 mûr
P ₆	+++	++	++
P ₆₁	-	+	+
P ₆₂	++	+	+
P ₅	+++	++++	+++++
P ₄	++	+++	++++
P ₄₀	-	+	+
P ₄₁	-	+	+
P ₄₂	-	+	+
P ₃	++++	+++++	+++++
P ₃₀	-	+	+
P ₃₁	-	+	+
P ₃₂	++	+++	++++
P ₃₃	+	+	++
P ₃₄	+	++	+++
P ₃₅	+	++	+++
P ₃₆	+	++	++
P ₃₇	+	++	+++
P ₃₈	++	+++	++++
P ₃₉	-	+	++
P ₂	+	++	++
P ₂₀	-	+	+
P ₂₁	+	++	+++
P ₂₂	-	+	+
P ₂₃	+	+++	++++
P ₂₄	-	+	+
P ₂₅	-	+	++
P ₂₆	++	+++	++++
P ₂₇	-	+	+

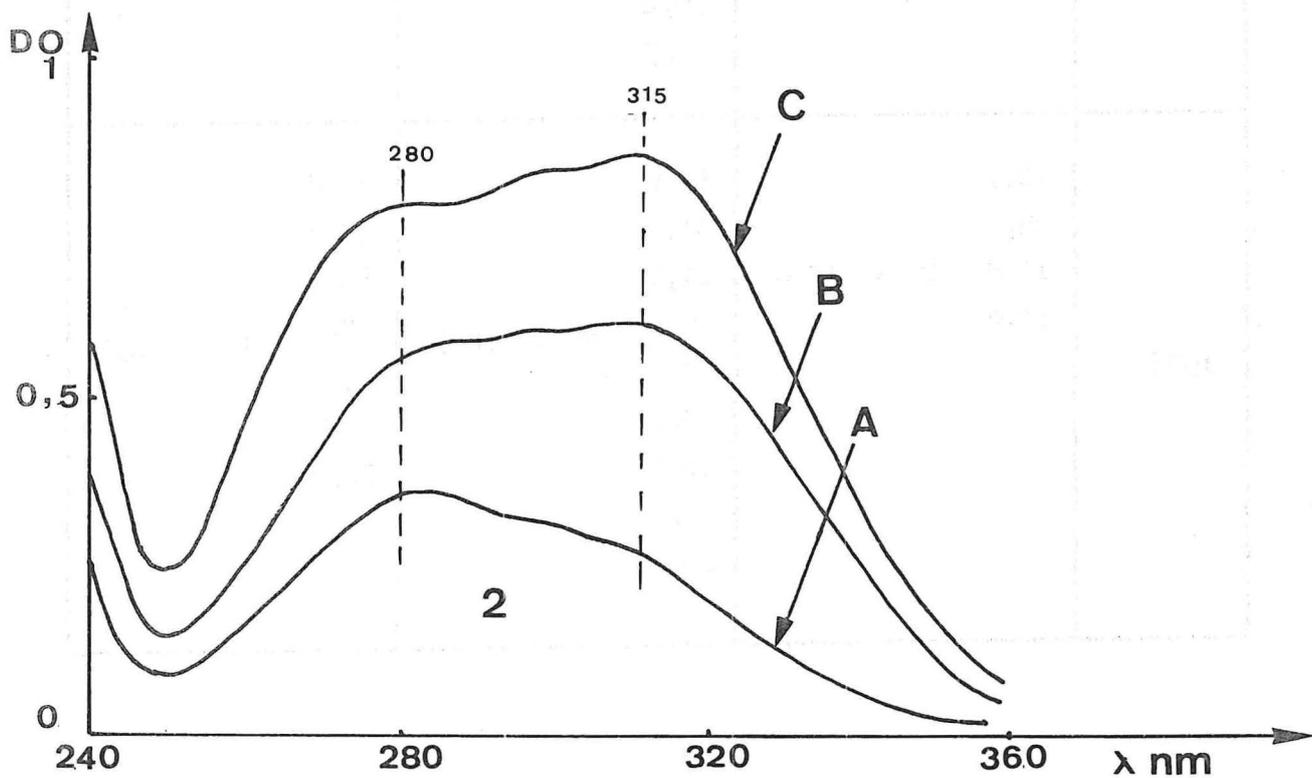
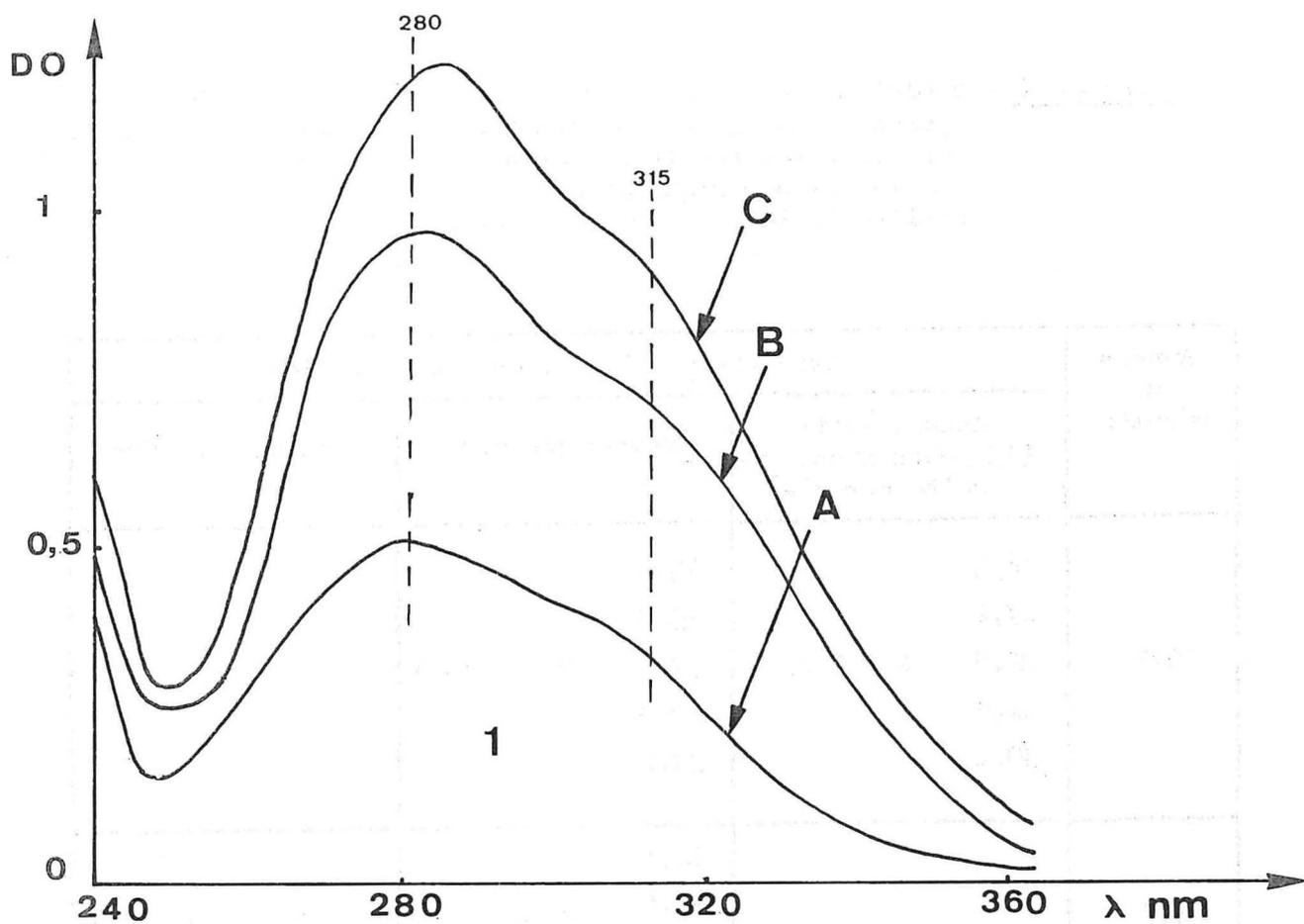


Fig. 35 - Spectres d'absorption comparés en U.V. d'extraits hydroalcooliques. bruts (1), purifiés (2), d'ananas vert (A), d'ananas 3/4 mûr (B), d'ananas 4/4 mûr (C).

Tableau 16 - Evolution quantitative des teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques dans les trois catégories d'extraits purifiés. Les résultats obtenus sont en équivalent d'acide p-coumarique et exprimés en μg par gramme de matière fraîche. M : moyenne

Années de récolte	Extraits purifiés (acétate d'éthyle)		
	Ananas verts (15 jours avant récolte normale)	Ananas 3/4 mûrs	Ananas 4/4 mûrs
1973	16,3 17,2 22,8 M = 23,7 31,9 30,2	45,8 35,8 37,7 M = 38,9 42,9 32,2	
1975		24,1 38,4 M = 29,6 30,2 25,7	
1976	12,7 25,7 11,8 M = 17,0 17,9	43,6 31,9 27,0 49,1 M = 41,6 47,8 40,8 42,6 42,1 49,7	61,8 55,3 83,9 67,0 M = 62,7 65,0 52,7 52,9

Tableau 17 - Variation de la D.O. de l'extrait brut mesurée à 280 nm dans différentes catégories de fruits.

Stade de maturation	Nombre d'extraits (ou de fruits)	D.O. de l'extrait brut* dilué au 1/51, à 280 nm		
Ananas verts	9	0,202 0,180 0,174 0,379	0,267 0,256 0,354 0,209	0,139 M= 0,240
Ananas 3/4 mûrs	15	0,332 0,539 0,436 0,353 0,310 0,456 0,276 0,463	0,471 0,787 0,492 0,586 0,379 0,379 0,518	M= 0,460
Ananas 4/4 mûrs	4	0,630 0,465 0,880 0,406		M= 0,595

* : concentration initiale : 2 g de matière fraîche par ml d'éthanol à 80 %

M : moyenne

La densité optique de l'éluat de chacun des composés est lue à son maximum d'absorption (voir Chap. II) et ensuite exprimée en terme de concentration suivant la courbe d'étalonnage correspondante (Fig. 25).

L'ensemble des résultats obtenus (Tableau 18) permet de faire les remarques suivantes :

- La maturation du fruit sur pied (du stade vert au stade 3/4 mûr) entraîne une légère diminution de concentration pour le composé P₆, par contre, une augmentation pour les composés P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ (Tableau 19).

- Au cours de la surmaturation du fruit sur pied (du stade 3/4 mûr au stade 4/4 mûr) on a des évolutions dans les mêmes sens pour les composés étudiés (Tableau 20).

Des fluctuations sont observées au sein d'un même lot (variabilité due au matériel) et d'une année à l'autre les niveaux des teneurs peuvent être très différents, à cause vraisemblablement de l'influence de nombreux facteurs d'ordre physique, chimique, agronomique (climat, nutrition, techniques culturales, etc ...) auxquels les fruits sont soumis.

Conclusion et discussion.

L'ensemble des résultats qui viennent d'être exposés nous permet de dégager les points suivants :

- Les dérivés hydroxycinnamiques évoluent dans le même sens : l'augmentation de leurs teneurs est en rapport avec l'âge physiologique et le degré de maturité du fruit. Aux zones plus mûres correspondent des teneurs relativement plus élevées comparées aux zones moins mûres. Cette situation particulière est tout à fait l'inverse de ce que l'on observe classiquement dans de nombreux fruits. C'est dans les fruits en fin de croissance tels que la poire (HULME, 1958a ...), la pomme (HULME, 1958a ; MACHEIX, 1968, 1974), la cerise (MELIN, 1976), pour n'en citer que quelques-uns que les dérivés hydroxycinnamiques sont les moins abondants.

- Une augmentation de concentration de la plupart des dérivés hydroxycinnamiques présents dans le fruit, s'observe au cours de la maturation. Elle porte principalement sur les dérivés p-coumariques particulièrement abondants et très diversifiés, qui sont accumulés en quantités appréciables. Toutefois les

Tableau 18 - Evolution quantitative des principaux composés identifiés chez l'ananas Comosus, variété Cayenne Lisse au cours de la maturation sur pied.
M = moyenne

Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$

Extraits purifiés	Composés récolte	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₃₇	P ₃₈	P ₃₂	P ₂₆
Ananas verts	1973 (5 fruits)	9,8 11,0 9,2 M=10,2 9,6 11,5	2,6 1,7 2,0 M=2,0 2,1 3,6	1,5 1,8 1,6 M=1,8 1,2 2,9	1,3 1,5 1,8 3,2 2,1	1,2 0,8 1,7 M=1,0 0,9 0,5	0,4 0,9 1,5 M=0,9 0,7 0,9	1,5 1,2 2,0 M=1,5 1,4 1,2	1,9 2,7 3,1 M=2,3 2,2 1,8
	1976 (4 fruits)	19,5 18,3 12,8 M=16,0 13,5	5,3 7,0 7,0 M=6,9 8,1	6,0 6,0 5,4 M=6,1 7,1	2,1 4,4 2,5 M=2,9 2,8	1,3 1,6 1,2 M=1,3 1,1	0,8 1,0 1,1 M=1,0 1,2	2,0 1,8 1,8 M=1,9 1,9	3,4 2,8 M=3,2 3,4
Ananas 3/4 mûrs	1973 (5 fruits)	6,6 4,5 5,8 M=6,2 9,6 4,6	2,8 2,4 9,3 M=2,7 2,6 3,2	1,9 1,7 2,8 M=2,0 1,8 1,8	4,9 4,1 3,4 M=4,1 4,4 3,6	1,3 2,4 1,9 M=1,6 1,5 1,1	1,6 0,8 1,2 M=1,3 1,2 1,8	1,6 1,9 M=1,7 1,8 1,4	1,9 1,1 2,8 M=2,4 1,5 1,8
	1975 (4 fruits)	8,0 9,8 7,0 9,7 M=8,6	2,9 2,3 2,4 2,0 M=2,4	1,7 1,2 1,3 1,8 M=1,5	2,1 6,0 5,3 3,4 M=4,2	1,7 1,1 0,9 1,8 M=1,4	- 1,3 1,8 0,9 M=1,3	1,4 1,6 1,1 1,3 M=1,4	0,7 1,4 1,8 2,3 M=1,6
	1976 (4 fruits)	20,5 11,6 12,0 14,5 M=14,7	12,8 8,8 13,1 9,1 M=11,0	6,6 6,6 7,0 8,0 M=7,0	4,2 6,8 7,4 7,4 M=6,5	3,2 2,6 2,7 4,4 M=3,2	2,4 2,0 2,2 2,9 M=2,4	2,6 2,9 2,5 3,1 M=2,8	3,5 2,4 3,0 5,4 M=3,6
Ananas 4/4 mûrs	1976 (4 fruits)	9,5 13,8 9,8 M=11,2 11,8	17,4 14,0 19,6 M=19,3 26,3	7,0 8,8 7,5 M=7,8 8,0	8,8 10,7 11,5 M=11,0 12,8	3,6 4,2 4,2 M=4,1 4,4	4,1 4,4 4,3 M=4,3 4,2	4,8 3,8 3,8 M=3,9 3,3	8,6 8,4 12,6 M=9,5 8,5

Tableau 19 - Pourcentage de variation des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation des fruits sur pied (récolte 1976).

Stade de maturation Composés	Fruits verts	Fruits 3/4 mûrs	%
	Teneurs ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	Teneurs ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	
P ₆	100	92	- 8 %
P ₅	63	100	+ 37 %
P ₄	87	100	+ 13 %
P ₃	45	100	+ 55 %
P ₃₇	41	100	+ 59
P ₃₈	58	100	+ 42 %
P ₃₂	68	100	+ 32 %
P ₂₆	89	100	+ 11 %

- : diminution

+ : augmentation

Tableau 20 - Pourcentage de variation des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la surmaturation des fruits sur pied (récolte 1976).

Stade de maturation Composés	Fruits 3/4 mûrs	Fruits 4/4 mûrs	%
	Teneurs ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	Teneurs ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	
P ₆	100	76	- 24 %
P ₅	57	100	+ 43 %
P ₄	90	100	+ 10 %
P ₃	59	100	+ 41 %
P ₃₇	78	100	+ 22 %
P ₃₈	56	100	+ 44 %
P ₃₂	72	100	+ 28 %
P ₂₆	38	100	+ 62 %

- : diminution

+ : augmentation

autres termes (caféique, férulique, sinapique) de la série cinnamique sont représentés et augmentent dans le même sens.

Il est à rapprocher de cette augmentation l'hypothèse suivant laquelle le composé P₆₂ (acide p-coumarique) qui diminue sensiblement chez les fruits 3/4 et 4/4 mûrs par rapport aux fruits verts, mais tout en restant non dosable, peut être utilisé pour la synthèse des dérivés quiniques (P₅, P₃, P₃₇, P₃₈) et glucosidiques (P₃₇, etc ...) après une phase vraisemblable d'activation. Rappelons que P₆₂ se trouve en quantité très appréciable dans le pédoncule du fruit. Son transfert et sa migration dans le fruit par l'intermédiaire de la sève sont très probables. Mais son utilisation immédiate réduirait rapidement sa concentration à tel point qu'on se trouverait toujours à des niveaux relativement bas non dosables.

- Le composé P₆ (dérivé férulique avec un sucre) diminue au contraire pendant la maturation. Il pourrait participer à la formation des molécules telles que P₃₂, un autre dérivé férulique sucré ou P₂₆ un dérivé sinapique, qui augmentent au cours de la maturation.

- Le seul o.diphénol présent en quantité dosable (P₄) augmente également au cours de la maturation mais tout en restant à une concentration modeste par rapport aux dérivés p-coumariques dont P₅.

La période de temps choisie pour observer les fruits du stade fruits verts au stade fruits 4/4 mûrs sur pied, peut être relativement courte pour permettre une étude complète de l'évolution des composés phénoliques. En effet des variations de concentration des dérivés hydroxycinnamiques sont observées pendant la croissance de nombreux fruits. Ainsi, dans la pomme (MACHEIX, 1974), l'acide chlorogénique et l'acide p-coumaryl-quinique augmentent de concentration pendant une courte période de la croissance pour diminuer ensuite alors que le p-coumaryl-glucose diminue régulièrement.

Le même phénomène de diminution de concentration de l'acide chlorogénique a été mis en évidence par divers auteurs dans d'autres fruits dont la poire (ULRICH et THALER, 1957 ; HULME, 1958a ; JOSLYN et GOLDSTEIN, 1964 ; RYUGO, 1969 ; DAVIES et al., 1971 ; RANADIVE et HAARD, 1971), le raisin (RIBEREAU-GAYON, 1963), la tomate (WALKER, 1962 ; WARDALE, 1973 ; FLEURIET, 1975), le pamplemousse (MAIER et HASEGAMA, 1970). Un phénomène semblable a été observé concernant les dérivés caféyl-shikimiques de la datte (MAIER et al., 1964).

Chez l'ananas, avant le stade fruits verts - autrement dit pendant la croissance - il est probable qu'on soit aussi et déjà en période d'augmentation en ce qui concerne les dérivés hydroxycinnamiques autres que P₆. Celui-ci aurait peut-être augmenté pendant cette période pour diminuer ensuite pendant la maturation. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être vérifiée dans le cadre de ce travail.

Le phénomène qui est observé chez l'ananas est tout à fait différent de ce que l'on rencontre généralement dans de nombreux fruits où il y a une baisse de concentration des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques en fin de croissance. Chez l'ananas par contre, les dérivés hydroxycinnamiques augmentent de concentration au cours de la maturation (fin de croissance ?) excepté pour le composé P₆ (férulyl-glucose) qui diminue de concentration dans le même temps.

C H A P I T R E IV

LES RELATIONS entre les DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES de l'ANANAS
et le BRUNISSEMENT INTERNE (B.I.)

La répartition des dérivés hydroxycinnamiques dans l'ananas et leur évolution au cours de la maturation telles que nous les avons mises en évidence précédemment posent le problème de leur relation éventuelle avec le B.I.

Pour répondre à cette question nous avons cherché à préciser :

- les différences qu'il y a entre fruits brunis et non brunis,
- les variations des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la conservation,
- la nature des substrats du B.I.,
- les relations éventuelles entre B.I. et teneurs en dérivés hydroxycinnamiques.

Par ailleurs, nous avons étudié l'influence de quelques facteurs physiques ou physiologiques sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la conservation des fruits.

I - COMPARAISON ENTRE ANANAS SAIN et ANANAS BRUNI.

La maturité des ananas du commerce ou des ananas ayant subi une simulation de transport et de conservation selon les conditions définies au

Chapitre I, évolue plus ou moins vite suivant la durée et les conditions de conservation (AKAMINE et al., 1974 ; I.R.F.A., 1975 ; observations personnelles). En fin de conservation le degré de maturité atteint par les fruits est semblable à celui des fruits 4/4 mûrs à la récolte avec, en surcroît, des modifications pigmentaires plus ou moins importantes (coloration jaune-orange plus ou moins foncée) et un début de dessèchement de la peau. A ce stade la plupart des fruits présentent à l'observation des symptômes du B.I., alors que d'autres fruits cependant restent sains sans B.I.

Dans un premier temps nous avons comparé, à titre d'information, des fruits sains (non brunis) après conservation, à des fruits frais. Ensuite, une comparaison a été faite entre des fruits brunis et des fruits non brunis.

Tous les fruits utilisés ont été récoltés au stade 3/4 mûrs. L'échantillonnage et la préparation des extraits ont été réalisés selon les techniques définies aux Chapitre I et II, et portent toujours sur les mêmes zones 21 des fruits.

Dans le cas des fruits brunis nous avons analysé les principaux dérivés hydroxycinnamiques dans deux lots de fruits ayant deux notes de B.I. différentes.

A - COMPARAISON ENTRE FRUITS FRAIS et FRUITS SAINS après CONSERVATION.

1 - Aspects qualitatifs.

L'observation en lumière ultra-violette des chromatogrammes des deux extraits de fruits frais et non brunis après conservation montre qu'il n'y a pas de différence qualitative en ce qui concerne les composés phénoliques présents : on retrouve les mêmes composés aussi bien chez les fruits sains après conservation que chez les fruits frais et il ne disparaît ni n'apparaît aucun composé déjà présent ou nouveau. Cependant dans l'ensemble, l'intensité de coloration de fluorescence devient sensiblement plus forte dans le cas des extraits de fruits sains après conservation, que dans le cas des extraits de fruits frais (Fig. 30, 30a), ainsi que le confirme l'étude quantitative.

2 - Aspects quantitatifs.

L'étude quantitative réalisée concerne uniquement les variations de teneurs en P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆.

a - Teneurs en dérivés hydroxycinnamiques (Tableau 21).

Le dosage spectrophotométrique nous a permis de conclure que les fruits non brunis après conservation ont des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques légèrement plus élevés que les fruits frais. Ainsi, la teneur en P₅ est multipliée par 1,5, celle en P₄ par 1,4 et celle en P₃ par 1,2. Alors que les composés P₃₇, P₃₈, P₃₂, P₂₆ ne semblent pas varier beaucoup, le composé P₆ par contre diminue légèrement.

b - Variations des teneurs dans d'autres zones de fruits non brunis.

Nous avons étudié les variations des teneurs en P₅, P₄ et P₃ des fruits non brunis après conservation, verticalement dans les zones 11, 21, 31, 41 et horizontalement dans les zones 20, 21, 22 et 23, dans le but de déterminer s'il existe d'autres variations différentes de celles que nous avons mises en évidence précédemment dans les fruits à différents stades de maturation. Les résultats des dosages effectués montrent que l'on retrouve les mêmes variations de teneurs que lors de l'étude des gradients dans les fruits frais 3/4 mûrs (voir Chap. III). Il semble donc qu'il n'y ait pas de variations différentes de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques, sauf quantitativement, de celles que nous avons mises en évidence chez les fruits frais 3/4 mûrs, dans les zones 21 des fruits sains après conservation.

L'ensemble de ces résultats nous permet de dégager quelques points intéressants :

- Dans le fruit sain (zone 21), non brun, après conservation, comparativement au fruit frais 3/4 mûr, il y a une augmentation de teneurs en P₅, P₄ et P₃ d'une part et, d'autre part, une diminution de teneur en P₆. Par contre, les composés P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ restent à des concentrations très peu variables. Rappelons que ces derniers augmentent de concentration, en même temps que d'autres dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation de l'ananas sur pied. On peut penser que leurs faibles variations de teneurs

Tableau 21 - Teneurs comparées en P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ entre fruits frais, fruits brunis et fruits non brunis après conservation. Zones étudiées : zones 21. Les résultats sont exprimés en μg par gramme de matière fraîche.

Dérivés hydroxycinnamiques	Origine des extraits purifiés (A.E.)			
	Ananas frais	Ananas non brunis après conservation	Ananas brunis (B.I. = $\frac{1}{2}$)	Ananas brunis (B.I. = $1\frac{1}{2}$)
P ₆	6,7 7,1 M=7,2 \pm 1,4 7,8	4,7 5,2 M=5,1 \pm 0,9 5,4	4,9 4,1 M=4,5 \pm 0,3 4,4	3,7 3,3 M=3,3 \pm 0,4 2,8
P ₅	3,8 3,3 M=3,7 \pm 1,0 4,1	5,1 4,9 M=5,2 \pm 0,3 5,6	18,8 20,3 M=20,6 \pm 4,8 22,6	97,1 89,6 M=92,7 \pm 9,7 91,5
P ₄	1,1 1,8 M=1,5 \pm 0,8 1,5	1,6 2,5 M=2,1 \pm 0,4 2,1	7,8 10,1 M=8,7 \pm 2,9 8,3	38,7 41,3 M=40,1 \pm 3,2 40,2
P ₃	6,3 5,8 M=6,0 \pm 0,6 6,0	7,5 6,9 M=7,2 \pm 0,8 7,1	3,7 2,9 M=3,6 \pm 1,5 4,1	2,4 3,5 M= 2,8 \pm 1,4 2,7
P ₃₇	2,1 1,3 M=1,7 \pm 1,0 1,8	2,0 1,5 M=1,8 \pm 0,6 1,9	1,3 1,7 M=1,3 \pm 0,9 0,9	0,7 1,1 M = 0,9 -
P ₃₈	1,5 2,0 M=1,7 \pm 0,7 1,6	1,7 2,2 M=1,9 \pm 0,7 1,8	1,2 0,8 M=0,9 \pm 0,5 0,9	- - M = 0,5 0,5
P ₃₂	1,9 1,4 M=1,6 \pm 0,6 1,6	2,3 1,7 M=2,0 \pm 0,8 2,1	1,6 1,9 M=1,6 \pm 0,9 1,2	-
P ₂₆	2,7 3,4 M=3,1 \pm 0,9 3,1	3,6 3,1 M=3,3 \pm 0,6 3,3	2,2 2,5 M=2,2 \pm 0,6 2,0	1,6 0,9 M = 1,3 -

A.E. = extraits purifiés à l'acétate d'éthyle

M = moyenne

Remarque : trois fruits ont été analysés dans chaque cas.

seraient probablement dues ici à un ralentissement de l'activité métabolique conduisant à leur formation.

- Bien que l'augmentation de teneurs en P_5 , P_4 , P_3 et autres composés, soit faible en général, elle montre encore une fois le phénomène particulier d'augmentation de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation de l'ananas.

B - COMPARAISON ENTRE FRUITS BRUNIS et FRUITS SAINS après CONSERVATION.

1 - Etude qualitative.

a - Spectres d'absorption et chromatogrammes (Fig. 36, 36a, et 39).

Nous avons vu que le spectre d'absorption en lumière ultra-violette d'un extrait d'ananas bruni se caractérise par un important pic d'absorption vers 315 nm, noyant complètement le maximum vers 280 nm, alors que pour le spectre de l'extrait d'ananas sain, c'est le maximum vers 280 nm qui reste le plus important par rapport à l'épaule à 315 nm. Ce qui suppose dans le fruit bruni l'apparition et l'accumulation des composés phénoliques absorbant vers 315 nm.

L'observation aux U.V. des deux chromatogrammes d'extraits de fruits brunis et sains après conservation, montre que ce sont P_5 (l'acide dip-coumaryl-1,4 quinique) et P_4 (caféyl quinique, un acide di-caféyl-1,4 quinique ?) représentés par de grandes taches dans le cas de fruit bruni, qui constituent les deux dérivés hydroxycinnamiques responsables pour une bonne part de l'importance du maximum d'absorption vers 315 nm.

L'absorption due à P_4 reste cependant dans les deux cas toujours inférieure à celle due à P_5 .

b - Mise en évidence de composés phénoliques nouveaux.

L'étude chromatographique a montré qu'en dehors des dérivés hydroxycinnamiques identifiés communs aux deux types d'extraits, il apparaît avec le brunissement interne de l'ananas, trois nouveaux composés (Fig. 36), dont quelques caractéristiques sont rappelées dans le Tableau 22. Il s'agit vraisemblablement des produits d'oxydation (P_{43} , P_{310}) et des produits de brunissement représentés par Plb.

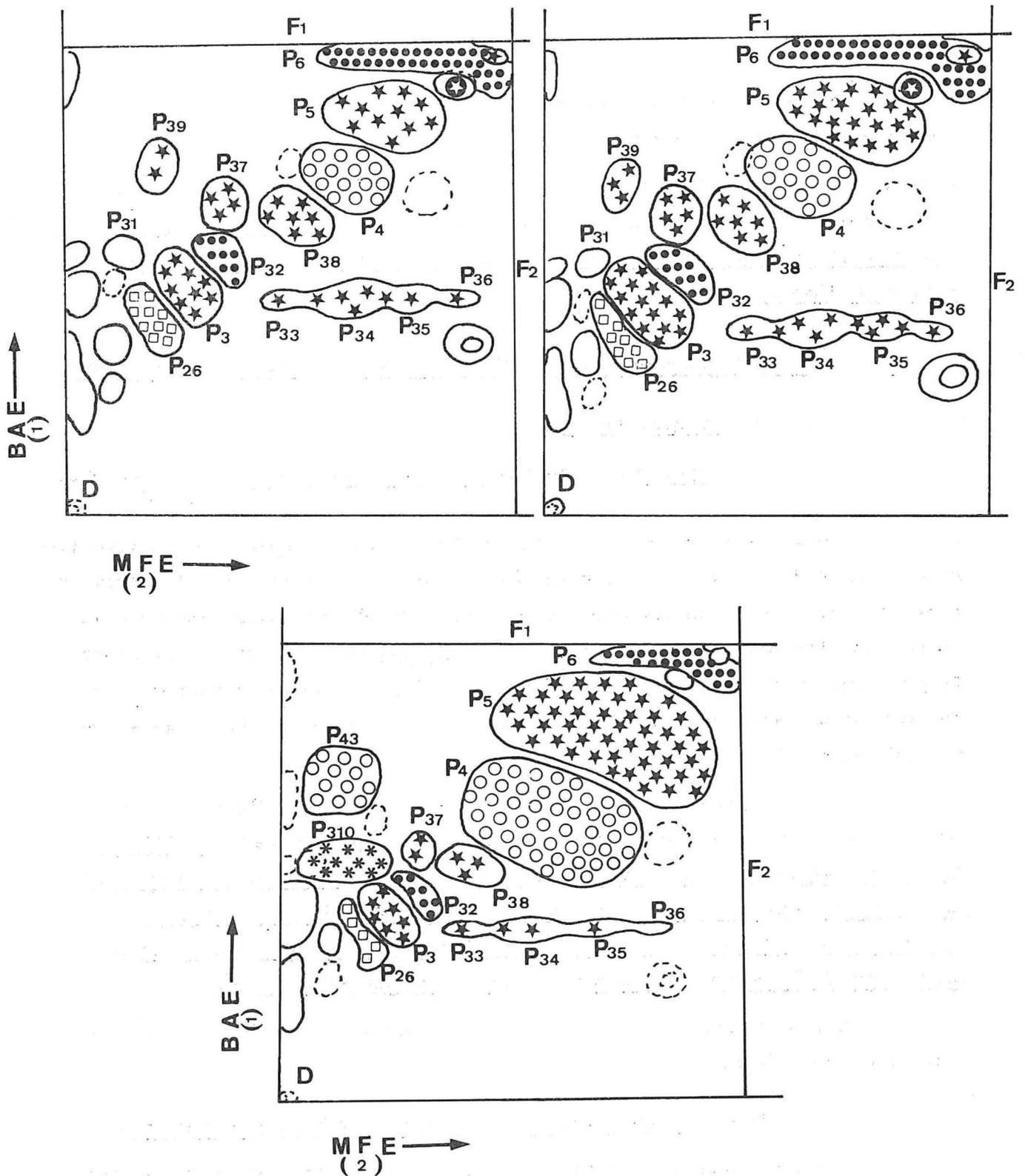


Fig. 36 - Chromatographie bidimensionnelle dans les solvants B.A.E. (4-1-5) M.F.E. (3-1-2) des extraits purifiés d'ananas.

A - frais (3/4 mûr)

B --- non bruni (ou sain) après conservation

C - bruni (B.I. = $1 \frac{1}{2}$ - 2) où il y a accumulation de

P₅ et de P₄, apparition de nouveaux composés : P₄₃, P₃₁₀ et diminution des autres dérivés hydroxycinnamiques.
Quantité déposée : 1 ml (2 g par ml d'extrait purifié)

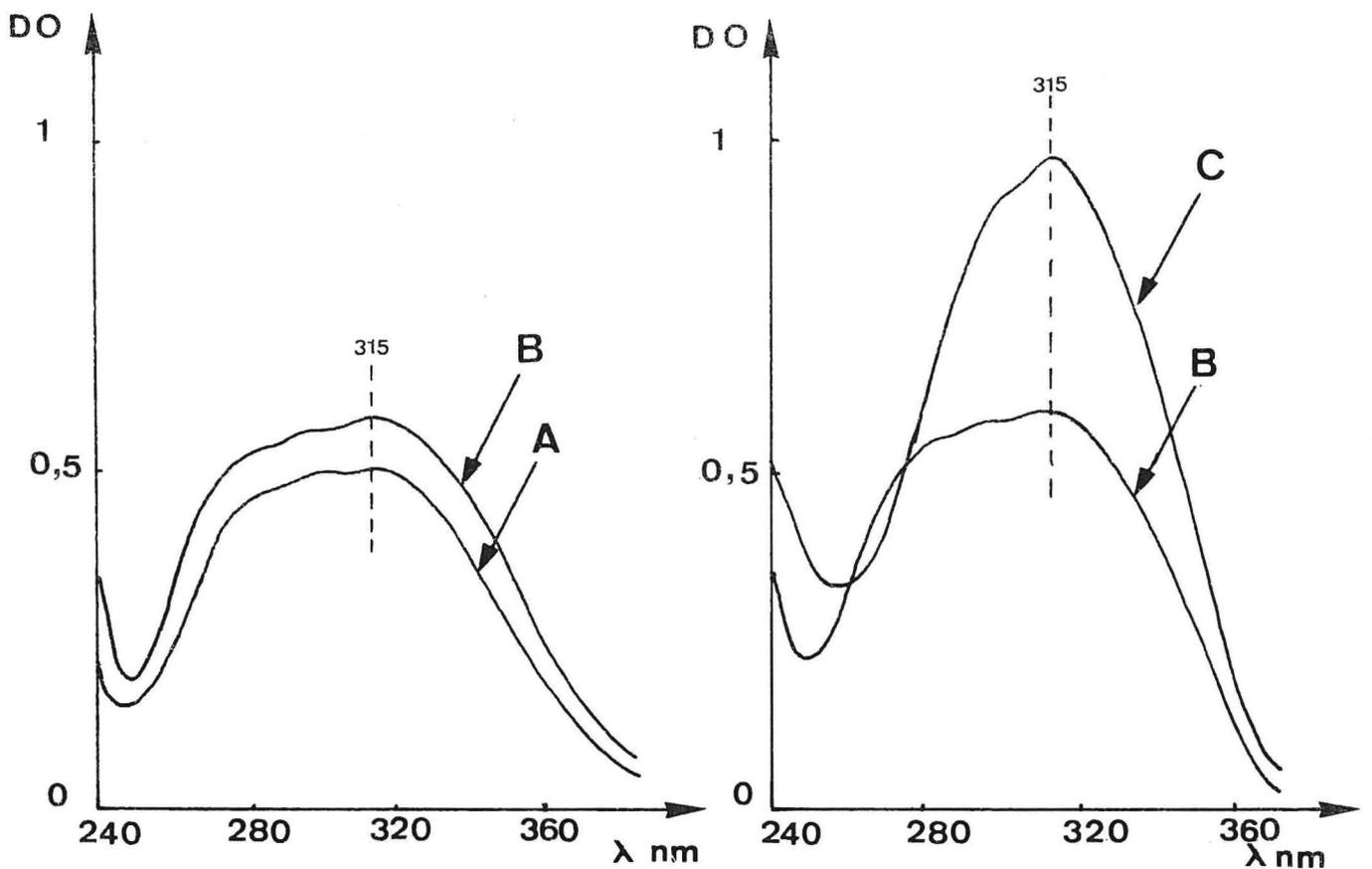


Fig. 36a - Spectres d'absorption comparés en U.V. d'extraits purifiés en milieu éthanolique à 20 % d'eau, d'ananas (zones 21)

A - frais (3/4 mûr)

B - non bruni après conservation

C - bruni (B.I. = $1 \frac{1}{2}$ - 2)

L'importance du maximum d'absorption vers 315 nm est une caractéristique spécifique de l'extrait de fruit bruni (parties brunies).

Tableau 22 : Caractéristiques de révélation des composés nouveaux apparus avec le B.I.

composés phénoliques	Révélation			
	visible	U.V.	U.V. + NH ₃	Benedikt
Plb	jp nF	jbr nF	br nF	<u>±</u> ?
P ₃₁₀	0	jp F	j.or. F	<u>±</u> ?
P ₄₃	0	bF	vj F	-

b : bleu ; j br : jaune brun ; br : brun

jp : jaune pâle ; vj : vert jaune

j.Or : jaune orange

F : fluorescent

nF : non fluorescent

P₄₃ : un o-diphénol, de mêmes colorations de fluorescence que P₄, semble être très proche de ce dernier.

P₃₁₀ : un produit d'oxydation.

Plb : ne s'extrait qu'à l'acétate d'éthyle et reste dans la phase aqueuse (de coloration brune) au cours de la purification de l'extrait hydroalcoolique brut. Pour une étude qualitative rapide, nous l'avons donc séparé par chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (20-7-10) (Fig. 37), à partir des extraits bruts d'ananas brunis. Sa caractérisation a fait l'objet d'une étude particulière.

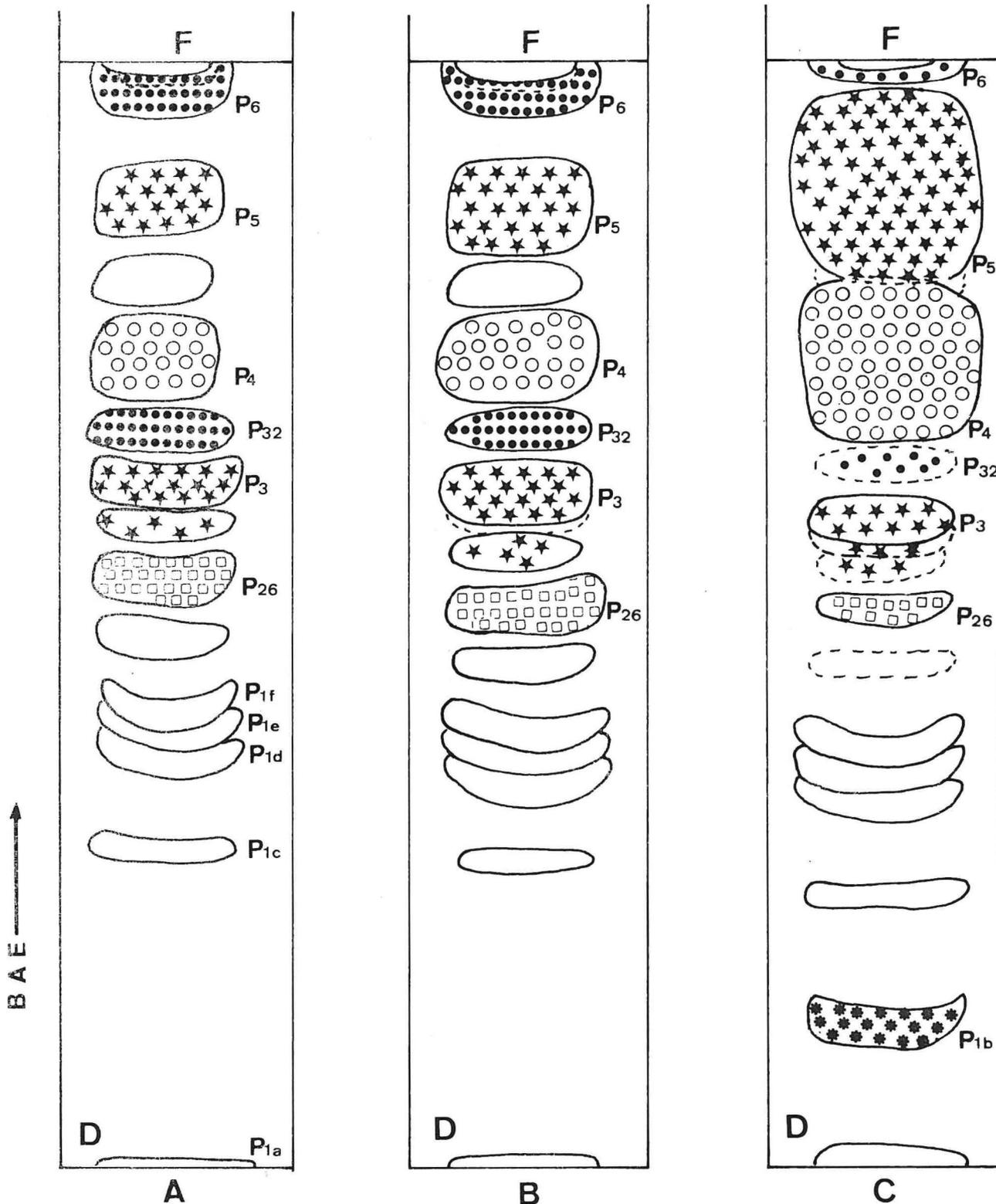


Fig. 37 - Chromatographie monodimensionnelle dans le solvant B.A.E. (4-1,4-2 ou 20-7-10) d'extraits bruts non purifiés d'ananas (A) frais ; (B) non bruni ; (C) bruni avec B.I. = $1 \frac{1}{2}$ -2 volume chromatographié : 1 ml (2 g par ml d'extraits bruts)

P_{1b} : est un produit de brunissement. Identification des spots : voir Fig. 8 et 8a
 F : Front du solvant
 D : dépôt

c - Nature des produits de brunissement (P_{1b})

L'idée du brunissement des tissus des organes végétaux à la suite de chélation de certains groupes de phénols à fonction o.dihydroxylée ou trihydroxylée, avec des ions métalliques, en donnant des complexes colorés (jaune, brun ...) suivant les ions impliqués (GEISSMAN, 1955 ; JURD et GEISSMAN, 1956 ; FIESER et FIESER, 1956 ; RIBEREAU-GAYON, 1968 ...), nous a conduit à étudier la nature des produits de brunissement de l'ananas.

- Importance des ions ferriques dans les extraits d'ananas brunis.

La mise en évidence des ions ferriques dans les extraits d'ananas brunis a été réalisée suivant le processus inspiré de la méthode de DE CLERCK (1963) sur deux extraits aqueux d'ananas non brunis et brunis :

50 μ l de Cl_3Fe à 5 % dans 2 ml d'eau bidistillée	+ 5 gouttes de Hcl concentré	+ 1 ml de KSCN à 20 %	→ coloration rose-rouge formation du complexe : $Fe[Fe(SCN)_6]$
2 ml d'extrait aqueux d'ananas non brunis	+ 5 gouttes de Hcl concentré	+ 1 ml de KSCN à 20 %	→ coloration rose-orangé
2 ml d'extrait aqueux d'ananas brunis	+ 5 gouttes de Hcl concentré	+ 1 ml de KSCN à 20 %	→ coloration rose-rouge (foncé)

La formation du complexe $Fe [Fe (SCN)_6]$ de coloration rose-rouge indique la présence des ions ferriques (Fe^{+++}) dans le milieu. Les extraits d'ananas brunis ont ainsi des colorations plus foncées que les extraits d'ananas non brunis ; ce qui montre que les ions du fer présents en quantité relativement importante dans les extraits d'ananas brunis, sont sous forme ferrique (Fe^{+++}). Le complexe rose-rouge peut être extrait en ajoutant à la solution colorée 3 ml d'éther éthylique. Après agitation et

repos pour séparation des phases, le complexe se trouve entièrement dans la phase étherée supérieure. Un dosage semi-quantitatif peut être effectué au spectrophotomètre dans le visible à 480 nm. Les extraits provenant d'ananas brunis possèdent 1,1 à 2,1 fois plus d'ions ferriques que les extraits d'ananas non brunis.

- Etude chromatographique.

En dehors de la séparation chromatographique directe à partir d'extrait brut d'ananas brun qui a conduit à l'obtention du composé P1b, nous avons voulu tester la présence d'ions ferriques dans le produit brun en réalisant une séparation sur résines cationiques et une étude chimique pour la détermination de la nature des substances phénoliques éventuellement impliquées.

- préparation de l'extrait aqueux.

Selon les techniques d'extraction déjà définies, 80 g de matériel végétal (fruits brunis) sont broyés en deux fractions dans 166 ml d'eau bidistillée. Les deux broyats sont rassemblés et filtrés sur verre fritté n° 4. Le filtrat est ensuite centrifugé à froid pendant 2 h. à 18000 t/mm. Le culot de couleur brun foncé est récupéré et lavé plusieurs fois à l'alcool 80° en remettant en suspension chaque fois. Dix lavages sont nécessaires pour débarrasser entièrement le culot des phénols "libres" et autres substances solubles, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation. La présence de ces phénols dans les alcools de lavage peut être contrôlée par mesure spectrophotométrique.

- préparation de l'éluat acide.

Une partie du culot brun est remise en suspension dans 50 ml d'eau bidistillée. Le pH_{5,7-6,3} de l'extrait ainsi obtenu est mesuré au pH-mètre. On le transfère quantitativement sur des résines cationiques fortes (DOWEX -X-8,100 mesh, sous forme H⁺) préalablement préparées dans une colonne de 1,5 cm de diamètre et de 15 cm de hauteur. Le débit est réglé à 1 goutte par 25 secondes.

Les composés phénoliques "libres" restant, passent dans le percolat. Afin d'éliminer leurs traces les résines sont lavées plusieurs fois (6 fois) à l'eau bidistillée. On les élue ensuite à l'acide Hcl 6N (50 ml) et on ramène

L'éluat obtenu au pli primitif en ajoutant NaOH 10N. Pour précipiter le NaCl formé, l'éluat est additionné d'un grand volume d'éthanol 95°. La solution trouble est alors laissée pendant 24 h. à -20°C puis centrifugée à froid en fin de sédimentation. Le surnageant est concentré sous vide à 30°C jusqu'à un volume minimum d'environ 1 ml et repris dans l'éthanol à 80 % en vue de l'étude chromatographique. Cet extrait sera appelé éluat acide (coloration jaune-brun).

Remarque :

Une bonne partie du produit brun reste en tête de colonne sans être entièrement élué. Il s'agit vraisemblablement des produits de brunissement polymérisés condensés.

- Résultats chromatographiques.

Une étude chromatographique monodimensionnelle dans le système de solvant B.A.E. (20-7-10) a permis de séparer 5 composés à partir de l'éluat acide dont trois de même caractéristique de fluorescence bleu-pâle aux U.V. virant au vert-jaune pâle en présence de vapeurs d'ammoniac et deux autres non fluorescents (S_1 et S_2) passent du jaune-brun au brun foncé. Le tableau 23 rapporte quelques réactions colorées spécifiques des ions ferriques dans lequel nous avons groupé les résultats sur les composés bruns et les différents fractionnements de l'extrait aqueux. La présence des ions ferriques dans les produits bruns P_{1b} et S_1 , est certaine.

Hydrolyse alcaline.

L'étude chimique de P_{1b} , S_1 , et du culot brun par hydrolyse alcaline selon les techniques décrites au Chapitre I, met en évidence dans les parties phénoliques ou aglycones, chromatographiées en présence des acides phénols témoins, la présence d'acide caféique et d'autres composés dont l'acide p-coumarique (faible) et l'acide férulique (très faible).

Les produits de brunissement P_{1b} , S_1 (et le culot) renferment donc des dérivés d'acides phénols tels que l'acide caféique, l'acide p-coumarique et d'autres, non oxydés.

L'hypothèse d'une oxydation de certains dérivés hydroxycinnamiques de l'ananas dont principalement P_4 (caféyl-quinique, un dicaféyl 1-4 quini-que) est très probable selon les réactions classiques dans lesquelles les

Tableau 23 - Réactions colorées des ions ferriques et des produits bruns du B.I.

Solution (ions Fe ⁺⁺⁺)	Réactifs chimiques	1 goutte de HCl concentré + 1 goutte de KSCN à 20 %	1 goutte de CH ₃ COOH monosulfo- à 30 % + 1 goutte de alizarine Na ₂ S ₂ O ₃ à 1 % + NH ₄ CH, 2N + 1 goutte de (jusqu'au virage)
	culot brun	rose (plus ou moins pâle)	violet (un peu pâle)
	P _{1b} *	rose	violet
	S ₁	rose-rouge	violet
	S ₂	incolore (ou jau- ne pâle)	incolore
	éluat acide	rose-rouge	violet
	Fe ⁺⁺⁺ (Cl ₃ Fe)	rose-rouge)	violet
	percolat	incolore	incolore
	Al ⁺⁺⁺ (Cl ₃ Al)	violet	rouge-orangé

* P_{1b} présente des colorations plus ou moins faibles suivant l'extrait d'ananas bruni.

o-diphénols sont transformés en quinones polymérisables et condensables pour former les complexes bruns. L'intervention des autres dérivés hydroxycinnamiques (dérivés p-coumariques, féruliques et autres) dans la formation de P_{1b} et S₁ pourrait être expliquée, soit par des phénomènes d'oxydations secondaires, soit par simple combinaison ou condensation sur les complexes déjà formés à partir de l'oxydation de P₄.

La complexation des dérivés hydroxycinnamiques avec les ions ferriques dont plus particulièrement des composés du type P₄ en donnant

des produits bruns est un fait courant observé dans d'autres organes végétaux. Divers auteurs (BROSSARD, 1958) et d'autres cités par VAN BUREN (1970) ont mis en évidence des chélates formés à partir des phénols à fonction o-dihydroxylée ou trihydroxylée avec des ions métalliques dont les plus caractéristiques donnant lieu à des complexes bruns sont la chélation de l'acide chlorogénique avec le fer (SWAIN, 1962 ; VAN BUREN, 1970 ...). HAYASHI (1962) a décrit des complexes contenant à la fois K, Mg et acide p-coumarique.

2 - Gradients comparés des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques dans les fruits non brunis et brunis (Fig. 38, 38bis, 39).

Nous avons comparé deux fruits de même degré de maturité (3/4 mûrs) à la récolte dont l'un a bruni en fin de conservation et l'autre n'a présenté aucune trace de B.I. dans les mêmes conditions. Le B.I. du fruit bruni est de $\frac{1}{12}$ selon le système de notation de l'I.R.F.A. (1975) dans lequel sont notés :

- B.I. = 0, les fruits qui n'ont pas bruni après conservation,
- B.I. = 1, les fruits dont le point d'attache des yeux sur l'axe cylindrique central présente un brunissement,
- B.I. = 2, les fruits avec un brunissement en forme de manchon autour de l'axe cylindrique central,
- B.I. = 3, les fruits dont l'axe cylindrique central est en plus affecté,
- B.I. = 4, les fruits affectés dans toute la partie centrale sauf les zones sous-corticales (TEISSON, 1972).

Dans le fruit non bruni P_5 , P_4 et P_3 varient "normalement" en augmentant de concentration quand on passe des zones moins mûres aux zones plus mûres et de l'axe cylindrique central vers la pulpe périphérique. P_3 reste cependant plus concentré dans l'axe cylindrique central et dans les zones plus mûres que partout ailleurs dans le fruit. Nous retrouvons ici les mêmes sens de variations de concentration des dérivés hydroxycinnamiques que dans les fruits en cours de maturation sur pied (voir Chap. III).

Les mêmes variations de teneurs sont observées dans le fruit bruni sauf dans les zones où il y a le B.I. Dans ces zones les teneurs en P_5 et P_4 sont respectivement 19 et 11 fois plus grandes par rapport à celles des zones

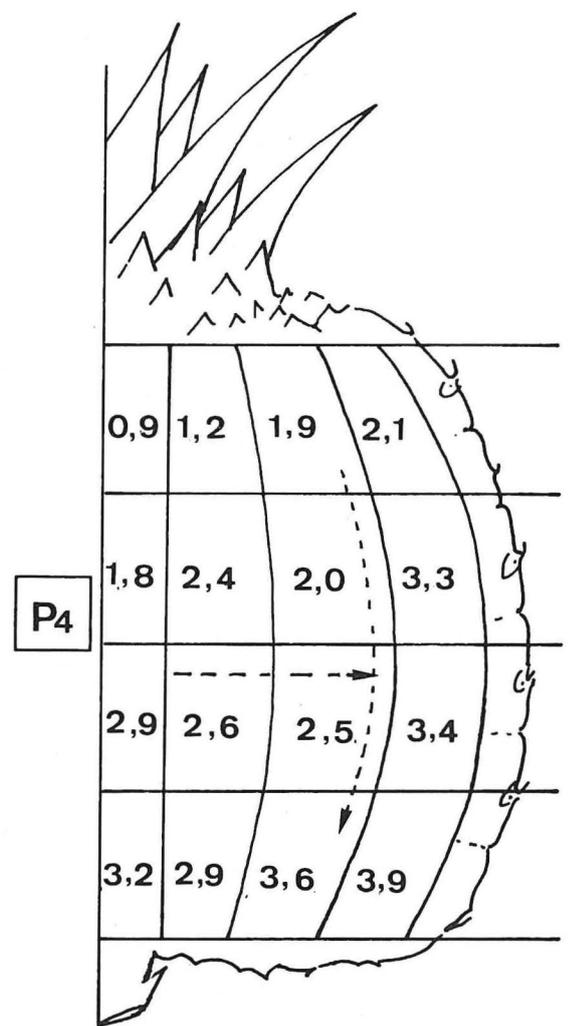
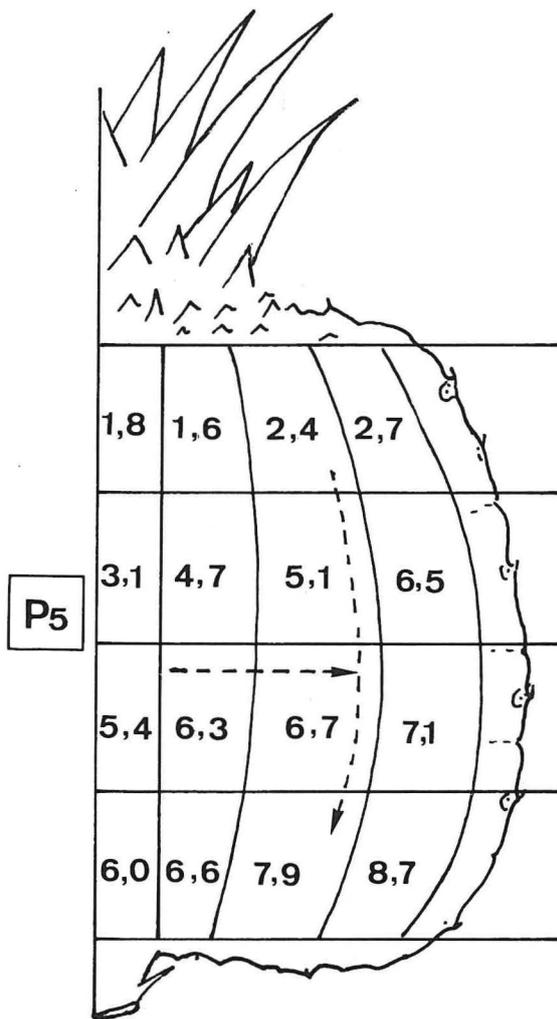
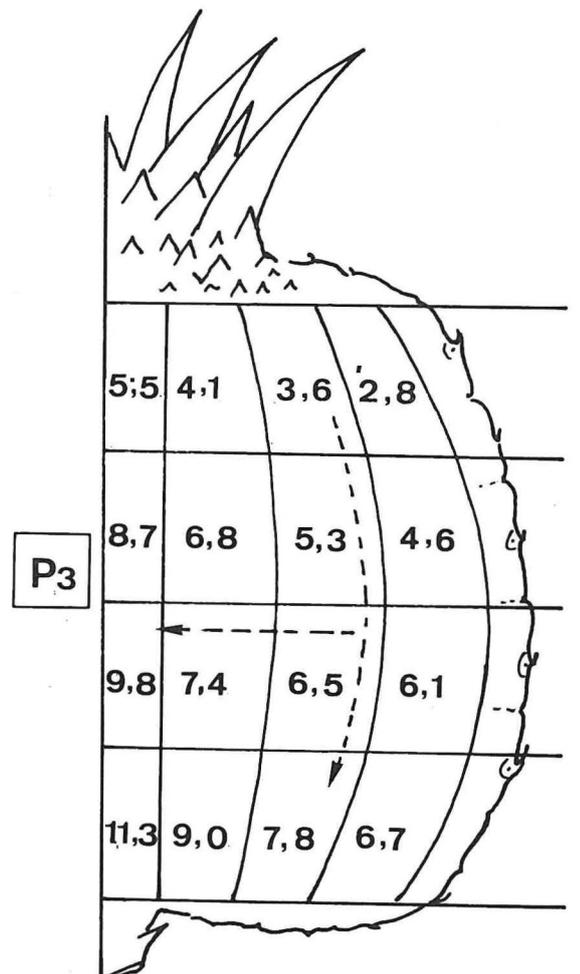


Fig. 38 - Gradients des teneurs en P₅, P₄ et P₃ dans un fruit non bruni après conservation.

Concentrations exprimées en μg par gramme de matière fraîche.

Les flèches indiquent le sens des gradients croissants.



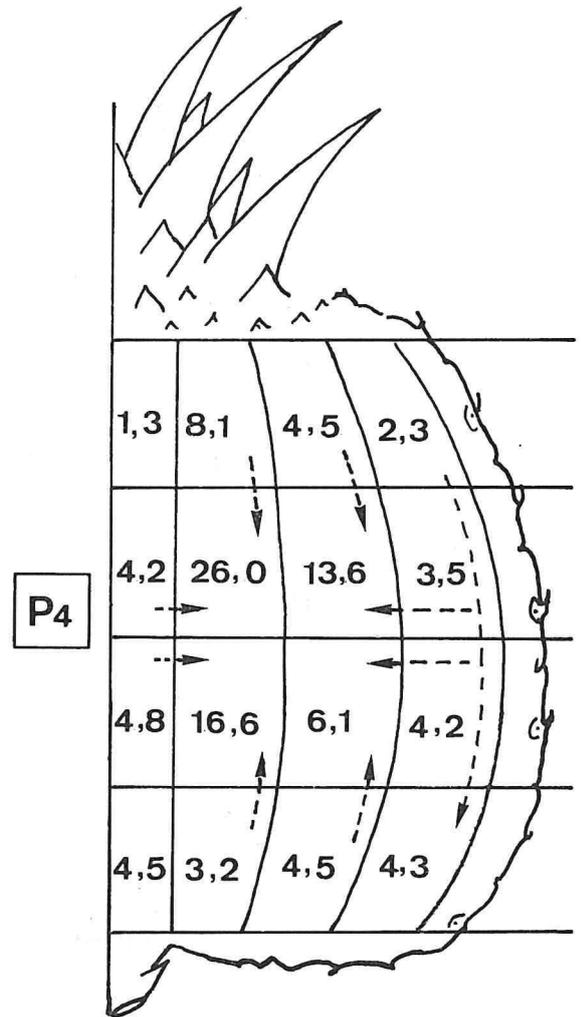
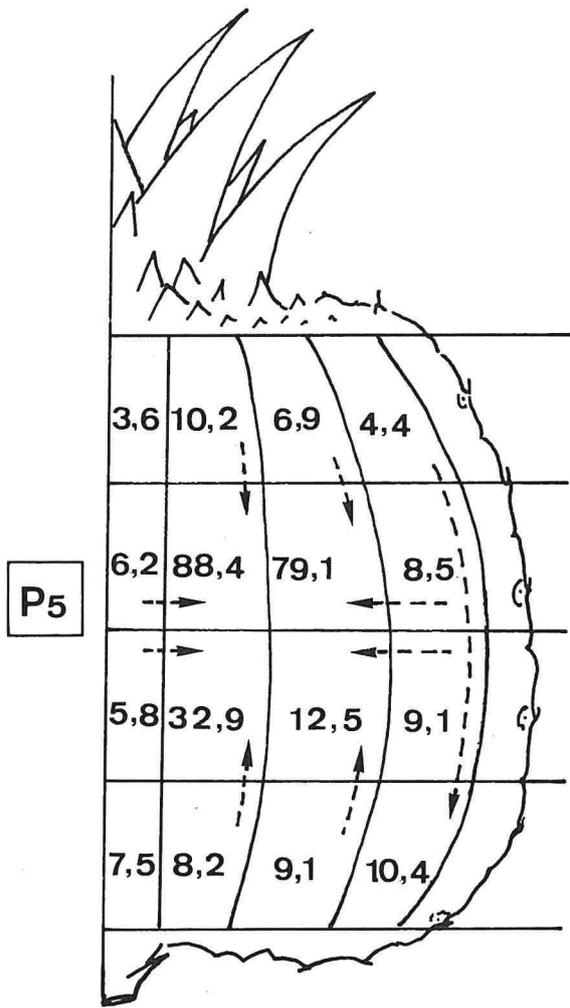
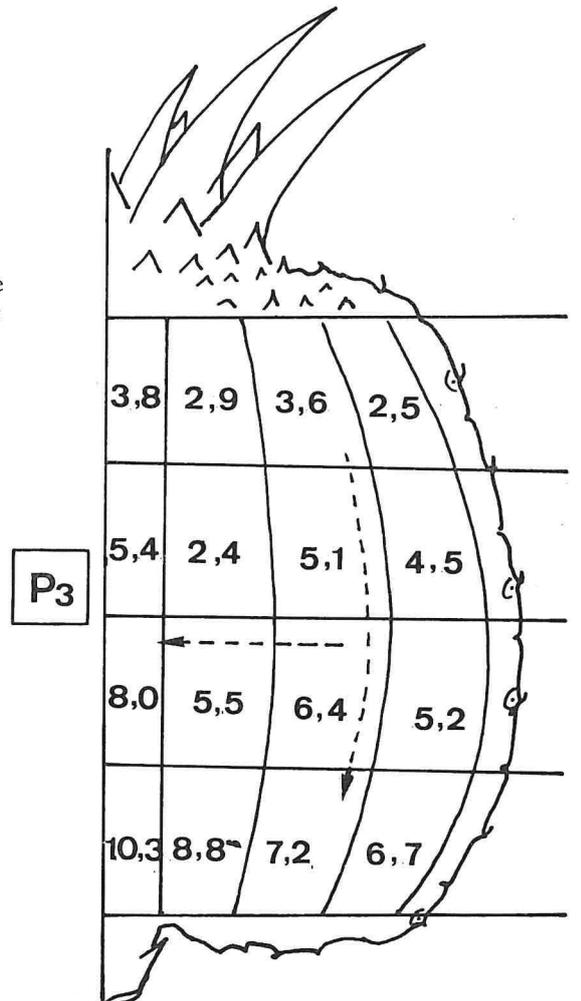


Fig. 38bis - Gradients des teneurs en P₅, P₄ et P₃ dans un fruit bruni (B.I. = 1 - 1 ½)

concentrations exprimées en µg par gramme de matière fraîche. Les flèches indiquent le sens des gradients croissants.



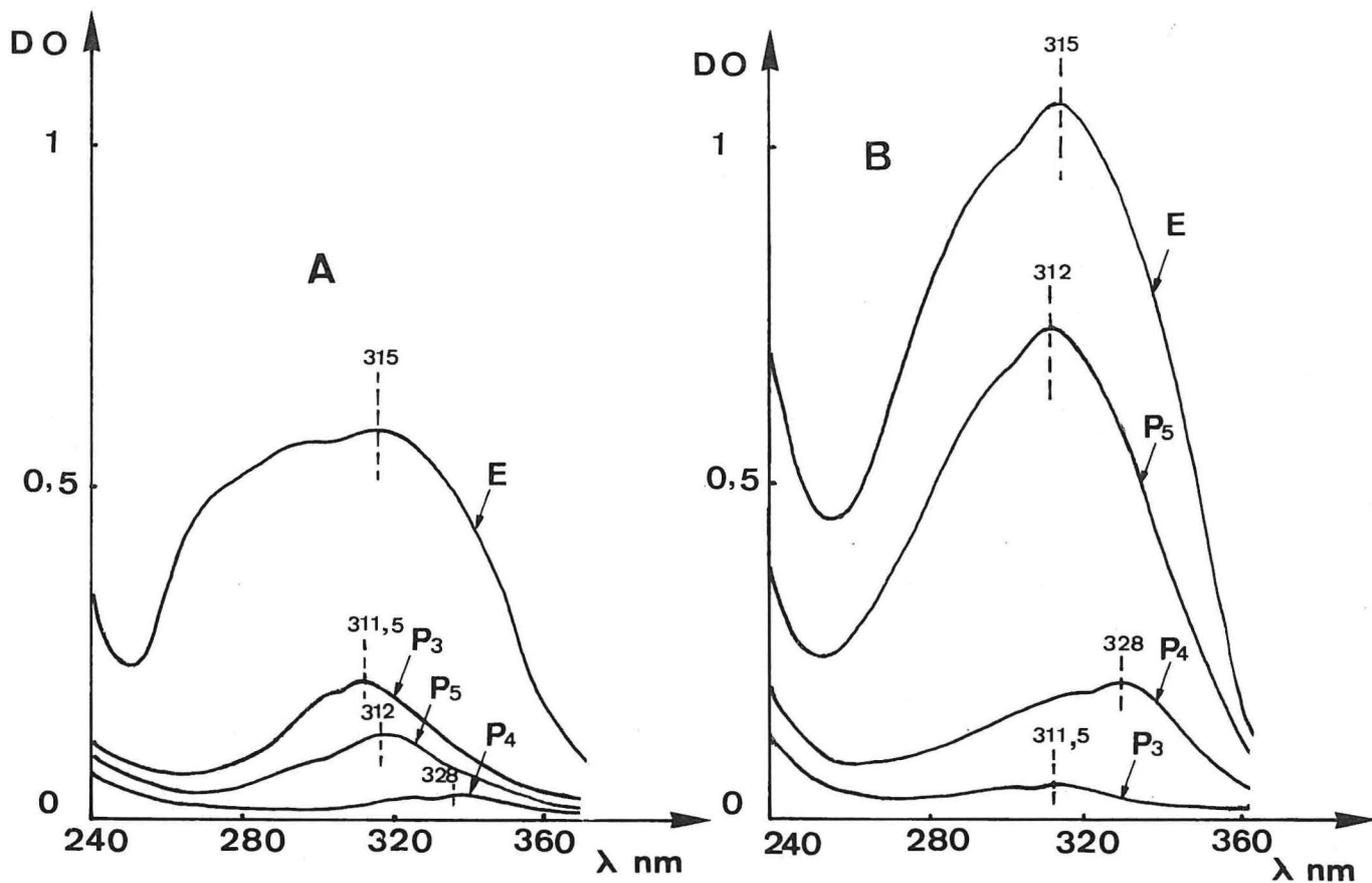


Fig. 39 - Spectres d'absorption comparés en U.V. des extraits purifiés (E) et des éluats de P₅, P₄ et P₃ en milieu éthanolique à 20 % d'eau :

- (A) : Ananas non bruni (zone 21)
- (B) : Ananas bruni (zone 21)

Remarque : l'importance du maximum d'absorption vers 315 nm des extraits de fruits brunis est due essentiellement à l'accumulation des composés P₅ (di p.coumaryl-1,4-quinique) et P₄ (caféyl-quinique, un di-caféyl-1,4-quinique ?)

correspondantes dans le fruit non bruni, alors que celles de P₃ diminuent sensiblement.

Remarque :

Bien que cela n'a pu être chiffré nous avons observé sur des chromatogrammes révélés une diminution de P₃₇, P₃₈, P₃₂, P₂₆, P₆ dans le fruit bruni, par rapport aux teneurs normales dans le fruit non bruni.

3 - Etude quantitative .

Le B.I. de l'ananas entraîne des variations quantitatives au niveau de la plupart des dérivés hydroxycinnamiques étudiés. Les uns augmentent de teneurs (P₅ et P₄) par contre, d'autres diminuent de teneurs (P₆, P₃₇, P₃₈, P₃₂, P₂₆ ...). Nous avons alors estimé leurs teneurs en les dosant au spectrophotomètre après séparation chromatographique. Par ailleurs, nous avons calculé le rapport $r = \frac{D.O. \text{ à } 315 \text{ nm}}{D.O. \text{ à } 280 \text{ nm}}$, dans le cas des fruits étudiés, à partir des extraits hydroalcooliques bruts.

a) Dosage des principaux dérivés hydroxycinnamiques (Tableau 17).

Trois catégories d'extraits purifiés ont été étudiées :

- 3 extraits provenant de 3 fruits non brunis,
- 3 " " " " brunis avec B.I. = $\frac{1}{2}$
- 3 " " " " " avec B.I. = $1 \frac{1}{2}$

Les résultats rapportés dans le tableau concernent les composés P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆.

Alors que dans les fruits non brunis les teneurs de ces composés restent à des niveaux normalement modestes, l'apparition du B.I. s'accompagne dans les fruits atteints :

- d'une diminution de teneurs de certains composés dont P₆, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂, P₂₆ ...
- d'une importante augmentation de teneurs en P₅ et en P₄. Ces deux caractéristiques semblent être fortement exprimées avec l'intensité du B.I.

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer les variations de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques dans les fruits brunis :

- L'accumulation de P₅ et P₄ pourrait être due à un contact direct entre enzymes de synthèse et substrats, ce qui supposerait une rupture des structures membranaires par différents facteurs dont le froid, selon la théorie de LYONS (1973). Cette hypothèse semble être probable quand on sait que dans la pomme par exemple, bien que cela n'a pas été démontré par ailleurs dans le cas de l'ananas, les phénols se trouvent essentiellement dans les vacuoles alors que les enzymes, en l'occurrence les P.O., se localisent dans le protoplasme, soit à l'état soluble, soit sous forme combinée à des organites, chloroplastes, mitochondries (BENDALL et GREGORY, 1963 ; HAREL et al., 1964 ..). Dans une étude récente, TEISSON (1977) a montré que l'activité oxydative des jus bruns d'ananas brunis est plutôt due à des peroxydases du type A.I.A. oxydase, qu'à des phénoloxydases classiques. On peut rapprocher à cette activité oxydative le fait que P₅ en s'accumulant dans le fruit brun, pourrait jouer un rôle dans l'activation des peroxydases. Rappelons que P₅, un dérivé p-coumarique, pourrait bien être un co-facteur de l'A.I.A. oxydase (GORTNER et al., 1968).

- La diminution des autres composés P₆, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂, P₂₆ ..., serait due à leur utilisation, soit dans le phénomène du brunissement comme substrats éventuels, soit comme des métabolites intermédiaires actifs, tout au moins P₃₇ (p-coumaryl-glucose) et P₃₈ (p-coumaryl-quinique) pour la synthèse des molécules plus complexes : P₅ (di-p-coumaryl-1,4 quinique) et P₄ (caféyl-quinique, un acide di p-caféyl-1,4 quinique ?). La diminution de teneur en P₆ (ferulyl-glucose) a été mise en évidence (voir Chap. III) au cours de la maturation de l'ananas sur pied. Il est vraisemblable que cette baisse de teneur, que l'on peut observer également dans les fruits brunis, ne puisse pas avoir un rapport avec le phénomène du B.I. La diminution de P₃, P₃₂, P₂₆ semble avoir un rapport avec le B.I., les deux derniers devenant extrêmement faibles en concentration quand le brunissement interne s'intensifie.

b) Etude du rapport
$$r = \frac{\text{D.O. à } 315 \text{ nm}}{\text{D.O. à } 280 \text{ nm}}$$

Les spectres d'absorption en lumière ultra-violette des extraits bruts tels que nous les avons vus précédemment, présentent des caractéristiques différentes suivant qu'il s'agit des fruits non brunis ou des fruits

brunis. Le tableau 24 rappelle les différents points particuliers de ces spectres :

Tableau 24 : Caractéristiques spectrales des extraits bruts d'ananas non bruni et bruni, dans l'éthanol à 80 %

origine de l'extrait brut	Maximum et minimum d'absorption en U.V. (λ en nm)
Ananas non bruni	245-247* 270-280*** 310-315**
Ananas bruni	252-256* 300** 315-320***

* : minimum d'absorption

** : épaulement

*** : maximum d'absorption

L'accumulation des composés P₅ (λ max = 312 nm) et P₄ (λ max = 328 nm) dans l'extrait d'ananas bruni entraîne un léger déplacement bathochromique. Dans ce cas le maximum d'absorption vers 315 nm est si important que le pic vers 280 nm est complètement masqué. Cependant, il semble qu'il y ait une diminution de la D.O. à 280 nm (voir paragraphe recherche de corrélation).

Remarque :

Les extraits d'ananas verts, 3/4 mûrs à la récolte, 4/4 mûrs (surmaturation sur pied) ont les mêmes caractéristiques spectrales que les extraits d'ananas non brunis.

Le rapport r, des densités optiques (D.O.) mesurées à 315 nm et à 280 nm, pourrait donc constituer un paramètre permettant d'apprécier la teneur en dérivés hydroxycinnamiques notamment P₅ et P₄, à partir directement des extraits bruts, d'autant qu'il évolue non seulement en fonction de la teneur globale, mais surtout en fonction de celles de P₅ et de P₄, quand l'intensité du B.I. augmente (Tableau 25).

Tableau 25 : Quelques valeurs du rapport r calculées à partir d'extraits d'ananas non brunis (5 fruits) et d'ananas brunis (8 fruits).

Origine de l'extrait brut	Note de B.I	$r = \frac{D.O. \text{ à } 315 \text{ nm}}{D.O. \text{ à } 280 \text{ nm}}$
Ananas non brunis	0	0,55 0,46 0,57 0,54 0,47 $M = 0,52 \pm 0,06$
Ananas brunis	$\frac{1}{2}$	0,90 0,87 0,85 0,86 $M = 0,87 \pm 0,03$
Ananas brunis	$1 \frac{1}{2}$	1,27 1,23 1,35 1,19 $M = 1,21 \pm 0,14$

avec un coefficient de sécurité de 95 %

Une étude de corrélation sera faite, dans un paragraphe ultérieur entre r , les deux termes du rapport et l'intensité du B.I. On peut déjà constater, d'après les résultats du tableau 25, qu'il existe une corrélation positive entre r et l'intensité du B.I.

CONCLUSION.

Il ressort de ces études que les dérivés hydroxycinnamiques interviennent dans le phénomène du B.I. de l'ananas à plusieurs titres comme :

- produits d'accumulation (P_5 et P_4) résultant d'une activité synthétique accrue anormale par rapport à celle observée dans les fruits non brunis. Il est cependant certain qu'aucune augmentation excessive des dérivés hydroxycinnamiques présents ne soit décelée avant l'apparition des premiers symptômes, pouvant prédisposer le fruit au B.I. L'accumulation de P_5 et de P_4 est un phénomène concomitant au B.I et s'intensifie avec le B.I.

- substrats (P_6 , P_3 , P_{37} , P_{38} , P_{32} , P_{26} ...) utilisés vraisemblablement dans des phénomènes d'oxydation ou dans le brunissement ou dans la synthèse d'autres composés tels que P_5 ou P_4 . De par sa nature o-diphénolique, P_4 serait un meilleur substrat oxydable par les P.O, à un degré plus élevé que les autres dérivés dont P_5 , P_3 , P_{37} , P_{38} ...

- produits d'oxydation : P_{43} et P_{310} sont les seuls composés nouveaux décelables n'existant que dans les fruits brunis.

- produits de brunissement (P_{1b} , S_1) dans lesquels P_4 est impliqué en chélatant avec les ions ferriques. D'autres dérivés tels que les dérivés p-coumariques, féruliques, semblent participer à cette complexation. SHON KUNG SUN (1971) en exposant des tranches d'ananas à des températures alternées de 12° et 30°C observe la formation des "grains de mélanine" dans les cellules des fruits atteints de B.I., d'autant plus importante que l'incubation se fait en présence de tyrosine. Il conclut que la formation de la "mélanine" provient d'un substrat naturel dérivant de la tyrosine. Cette hypothèse semble bien correspondre d'une part aux caractéristiques des dérivés hydroxycinnamiques (P_4 , dérivés p-coumariques, féruliques, ...) impliqués dans nos produits (P_{1b} , S_1) de brunissement et, d'autre part à l'utilisation possible du "pool phénolique" (P_6 , P_3 , P_{37} , P_{38} , P_{32} , P_{26} ...) présent dans le fruit comme source endogène de métabolites actifs aux réactions d'oxydation ou de brunissement.

II - VARIATIONS des TENEURS en DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES
au COURS de la CONSERVATION de l'ANANAS.

Nous avons mis en évidence dans le paragraphe I précédent l'importance quantitative des dérivés hydroxycinnamiques chez l'ananas bruni comparé à l'ananas frais et à l'ananas sain après conservation. Une évolution semble donc avoir lieu au cours de la conservation conduisant, avec l'apparition du brunissement interne, à l'accumulation de quelques-uns d'entre eux (P_5 et P_4) et à la diminution de teneurs d'autres (P_8 , P_{37} , P_{38} ...).

Dans le but de rechercher un indice qui prédisposerait sur le plan des composés phénoliques, le fruit au brunissement interne, nous avons suivi l'évolution des principaux dérivés hydroxycinnamiques précédemment identifiés (voir Chap. II), au cours de la conservation de l'ananas.

A - FRUITS UTILISES.

Pour faire cette étude nous avons réalisé des expériences de simulation de conservation sur des fruits 3/4 mûrs à la récolte. Nous entendons ici par conservation, l'ensemble des différentes phases de transport à 8°C et de commercialisation à 20°C. Les conditions d'expérimentation

et de prélèvement d'échantillons adoptées sont celles décrites au Chap. I.

Deux types d'échantillons ont été considérés :

- des broyats de pulpe de fruits groupés en lots de 2 à 6 fruits, suivant leurs caractéristiques (jour de prélèvement, note de B.I. éventuelle ...). Ce type d'échantillonnage a été utilisé par l' I.R.F.A. comme nous l'avons signalé au Chap. I. Les broyats nous parvenaient à l'état congelé. Ils sont décongelés seulement au moment de l'extraction.

- des échantillons par zones de fruits, préparés selon les techniques décrites au Chap. I. Nous étudierons principalement les zones 21, zones de localisation habituelle des premiers symptômes du B.I et éventuellement les zones 41 où il n'y a généralement pas de B.I.

Remarques sur les fruits brunis après simulation de conservation et les fruits du commerce.

Les résultats de simulation de conservation obtenus, au point de vue phénomène de brunissement, sont semblables à ceux des fruits du commerce qui présentent un B.I. Nous avons vérifié cette similitude en dosant dans les deux cas, les composés P₅ et P₄ qui sont significativement caractéristiques du B.I., comme nous l'avons vu précédemment par leur accumulation importante dans les fruits atteints.

Dans le Tableau 26 sont représentées quelques valeurs provenant des fruits simulés et achetés dans le commerce dont le pays d'origine est la Côte d'Ivoire. L'ensemble des résultats montre qu'il y a bien accumulation de P₅ et P₄ avec le B.I. obtenu après simulation de conservation et que le phénomène est identique au B.I. classique.

Tableau 26 : Caractéristiques communes entre fruits brunis après simulation de conservation (S) et fruits brunis du commerce (C).

Années	1973		1975		1976	
	C	S	C	S	C	S
B.I composés	1/2 - 1	1 - 1 1/2	1	1 1/2 - 2	1/2	1 - 1 1/2
P ₅	35,8	41,5	61,1	87,5	49,4	79,5
	49,0	67,2		53,6		30,7
P ₄	19,3	37,3	52,6	36,4	26,7	40,6
	25,8	45,0		25,9		29,4
				44,2		

B - RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Les résultats sont exprimés en termes de concentration selon le mode d'expression adopté dans les dosages précédents (voir Chap. III) en μg par gramme de matière fraîche.

1 - Résultats sur broyats.

Les résultats exposés correspondent aux données d'un essai de l'I.R.F.A. de l'année 1974.

a - Teneur globale (Fig. 40).

Trois phases essentielles se dégagent de l'ensemble des résultats :

- pendant la mise au froid à 8°C (10 jours) la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques croît lentement. Considérée dans un intervalle de temps beaucoup plus réduit (de J à J + 5), cette croissance se compose d'une baisse de teneur d'abord, suivie d'une hausse ensuite. Les différences des moyennes comparées sont cependant non significatives, ce qui impliquerait que les fluctuations observées sont dues au hasard de l'échantillonnage. L'hypothèse d'une faible chute de teneur pendant la mise au froid n'est pas réellement à exclure car nous avons observé le phénomène, dans l'intervalle considéré, sur la plupart des résultats obtenus.
- la mise à la température de 20°C entraîne ensuite une augmentation plus ou moins importante de la teneur globale de J + 10 = I à I + 4.
- la troisième phase assez nette sur certaines courbes d'évolution correspond à une augmentation moins rapide de I + 4 à I + 8.

b - Teneurs individuelles (en P₅, P₄ et P₃) (Fig. 40)

Au niveau des composés individuels, notamment P₅ et P₄, les trois phases précédentes sont assez distinctes.

P₃ ne semble cependant pas varier beaucoup pendant la mise au froid à 8°C, par contre, il diminue de teneur à 20°C.

L'ensemble de ces observations nous permet de dégager quelques points intéressants :

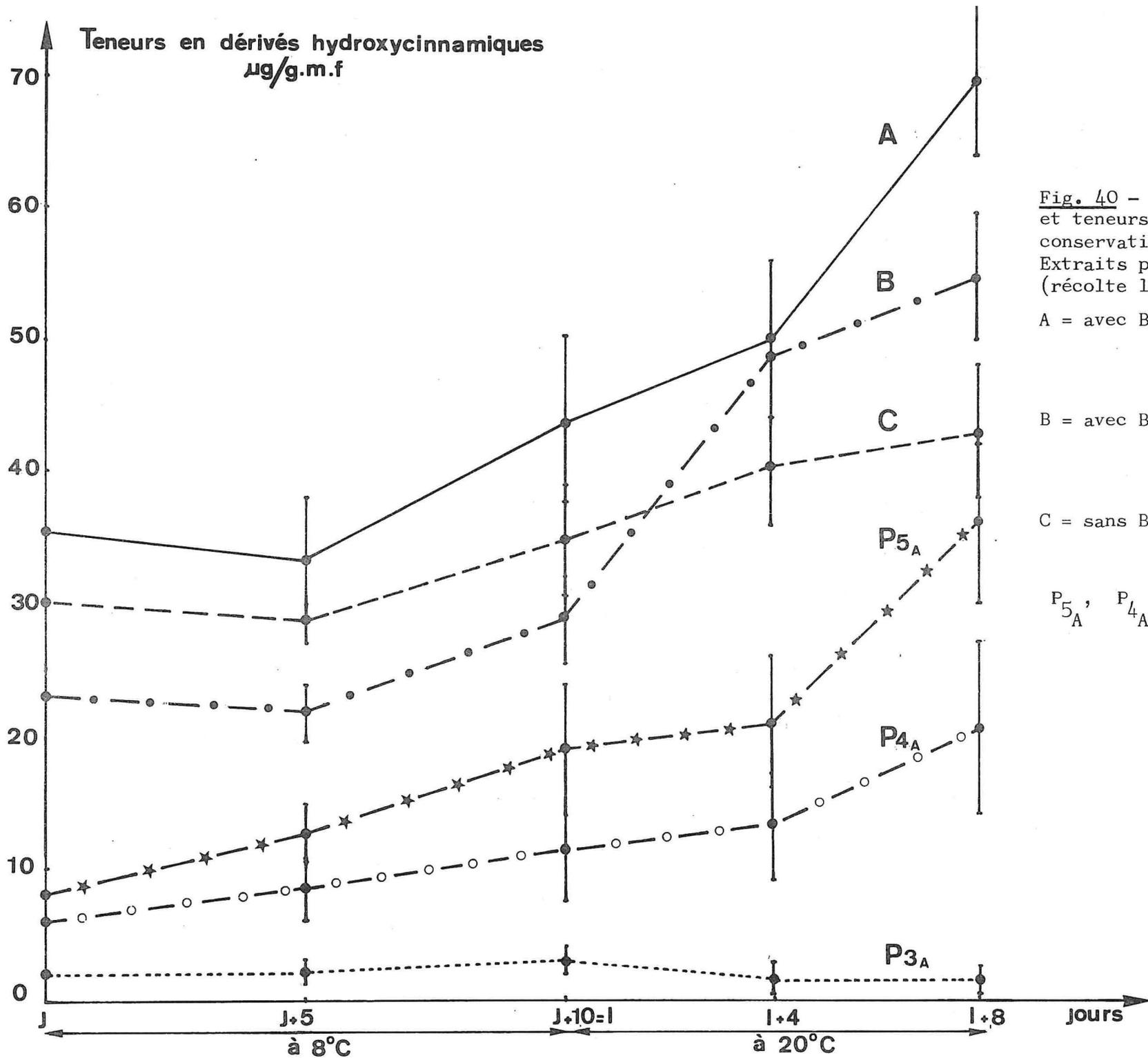


Fig. 40 - Variation des teneurs globales et teneurs individuelles au cours de la conservation.

Extraits provenant des broyats de fruits (récolte 1974).

A = avec B.I. aux jours I + 4 (traces $\frac{1}{4}$)
et I + 8 ($\frac{1}{2}$ à 2 %)
(Côte d'Ivoire)

B = avec B.I. aux jours I + 4 (traces $\frac{1}{4}$)
et I + 8 (tr - $\frac{1}{2}$)
(Martinique)

C = sans B.I. après conservation
(Martinique)

P_{5A} , P_{4A} , P_{3A} ont été dosés à partir des extraits A

- Les dérivés hydroxycinnamiques évoluent pendant la conservation en augmentant de teneur. Cette augmentation est sensiblement plus forte quand il y a un B.I. que quand il ne se présente aucun symptôme de B.I.

- Dans les deux cas (avec et sans B.I) l'augmentation globale observée est due à l'accumulation simultanée de certains dérivés hydroxycinnamiques dont principalement P₅ (un monophénol) et P₄ (un o-diphénol) tels que nous les avons identifiés au Chap. II. Le niveau de teneur en P₅ reste cependant, comme nous l'avons observé par ailleurs dans d'autres études, toujours supérieur à celui de P₄.

- Les composés qui diminuent de teneurs tels que P₃ n'ont aucune influence sur l'allure de la courbe d'évolution globale, à cause de l'importance quantitative de P₅ et P₄, en particulier chez les fruits brunis en fin de conservation.

Remarques :

Les teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques des broyats utilisés, au jour J (mise à 8°C), sont relativement plus faibles par rapport à celles des fruits individuels où les valeurs moyennes sont de 43 µg/g.m.f (zones 21 des fruits 3/4 mûrs) et de 53 µg/g.m.f (zones 21 des fruits 4/4 mûrs). Deux raisons sont possibles :

- Certains fruits constituant les lots peuvent être de maturité inférieure par rapport au stade 3/4 mûr (stade de récolte normale) généralement étudié, dans lequel cas on se trouverait entre fruits verts et fruits 3/4 mûrs (en restant plus près du stade 3/4 mûr). Comme nous l'avons vu précédemment (Chap. III) les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques sont dans ce cas, inférieures à celles des fruits 3/4 mûrs.

- Une dilution pourrait avoir lieu dans le broyat final, dans la mesure où des zones différentes des fruits plus ou moins riches en composés phénoliques seraient mélangés et broyés ensemble.

2 - Résultats sur fruits individuels.

Les résultats obtenus se rapportent aux fruits de la récolte 1976. Chacun des prélèvements effectués est constitué de 3 à 5 fruits. Les teneurs globale et individuelle en dérivés hydroxycinnamiques ont été déterminées selon les techniques de dosage déjà définies.

a - Teneur globale (zones 21) (Fig. 41).

Nous retrouvons les trois phases essentielles de la courbe d'évolution de la teneur globale :

- une lente et faible augmentation pendant la mise au froid à 8°C (10 jours) où les moyennes des valeurs mesurées passent de 41 à 46 $\mu\text{g/g.m.f.}$
- pendant les huit premiers jours suivant la sortie de 8°C (passage à 20°C) une importante augmentation dans laquelle la valeur moyenne de la teneur globale atteint 130 $\mu\text{g/g.m.f.}$ pour un B.I estimé entre l'état de traces et 1/4.
- la phase 3 correspond à une augmentation moins rapide que dans la phase précédente : la teneur globale devient 150 $\mu\text{g/g.m.f.}$, en moyenne, au bout du I + 8e jour, avec un B.I noté entre 1/2 et 1.

b - Teneur globale (zones 41) (Fig. 41).

Nous avons suivi parallèlement aux zones 21, l'évolution de la teneur globale dans les zones 41 (zones plus mûres des mêmes fruits) qui ne présentent, rappelons-le, aucun symptôme de B.I après conservation.

Les variations observées se traduisent par une très faible augmentation de la teneur globale (Fig. 41).

c - Teneurs individuelles (Fig. 42).

Nous avons étudié principalement les dérivés hydroxycinnamiques P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆. Les courbes d'évolution peuvent être rassemblées en deux groupes bien distincts.

- le premier groupe est formé par les composés qui évoluent suivant les caractéristiques des 3 phases observées précédemment. Il s'agit des composés P₅ et P₄ qui sont les seuls composés déjà existants dans les fruits à augmenter considérablement de teneurs. Leur augmentation est sensiblement plus accentuée du jour (I + 8) à la fin du (I + 15) jour à 20°C quand le B.I passe du stade (traces-1/4) au stade (1/2-1).

- dans le deuxième groupe de composés, caractérisé par des courbes d'évolution décroissante se trouvent les autres dérivés hydroxycinnamiques P₆, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ qui diminuent régulièrement de teneurs depuis la mise à 8°C et pendant toute la conservation des fruits. Nous avons observé la même baisse de teneur pour P₃, dans le cas des broyats.

Fig. 41 - Variation de la teneur globale au cours de la conservation des fruits 3/4 mûrs à la récolte, dans les zones 21 (A) et 41 (B).
 B.I. : tr = traces

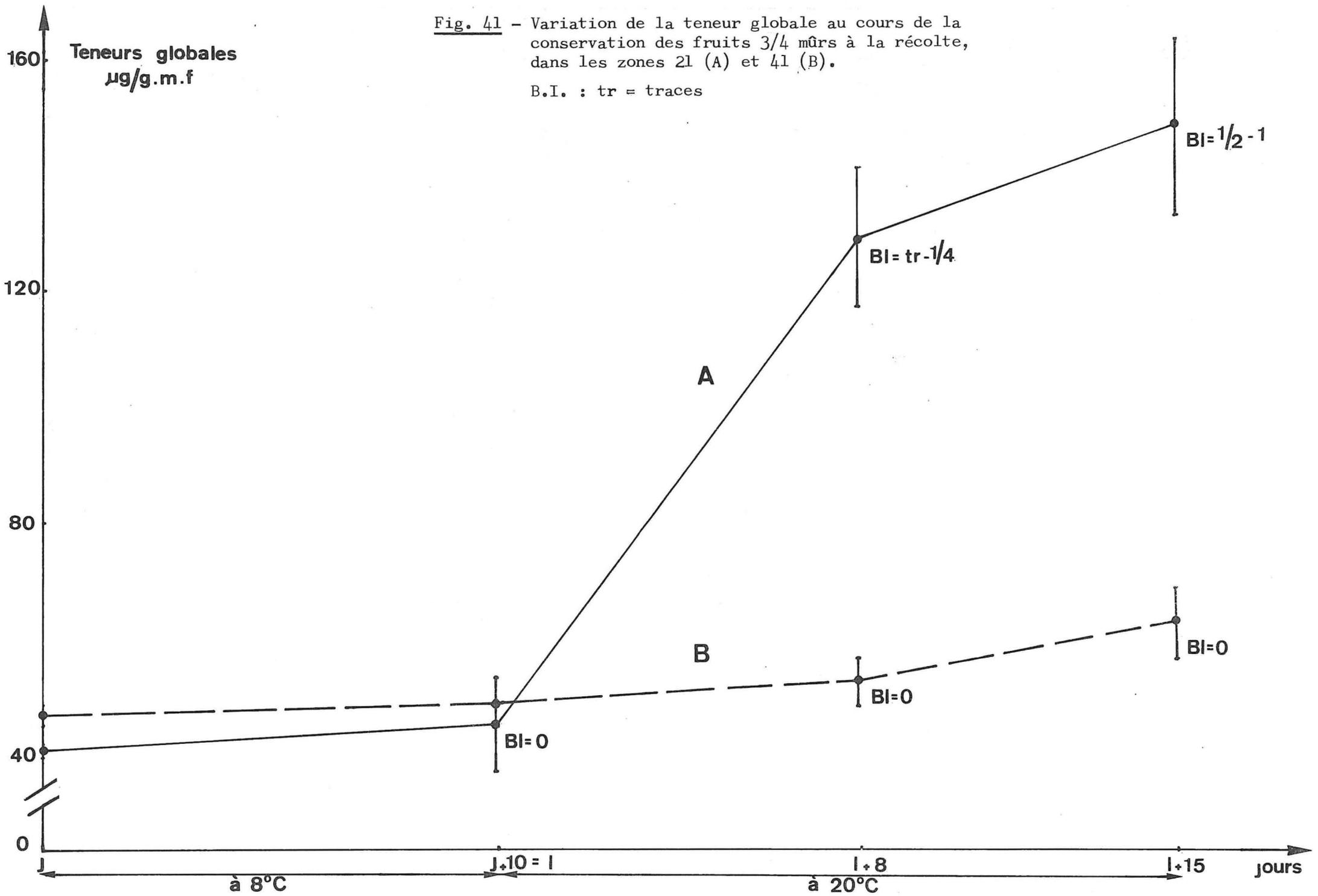
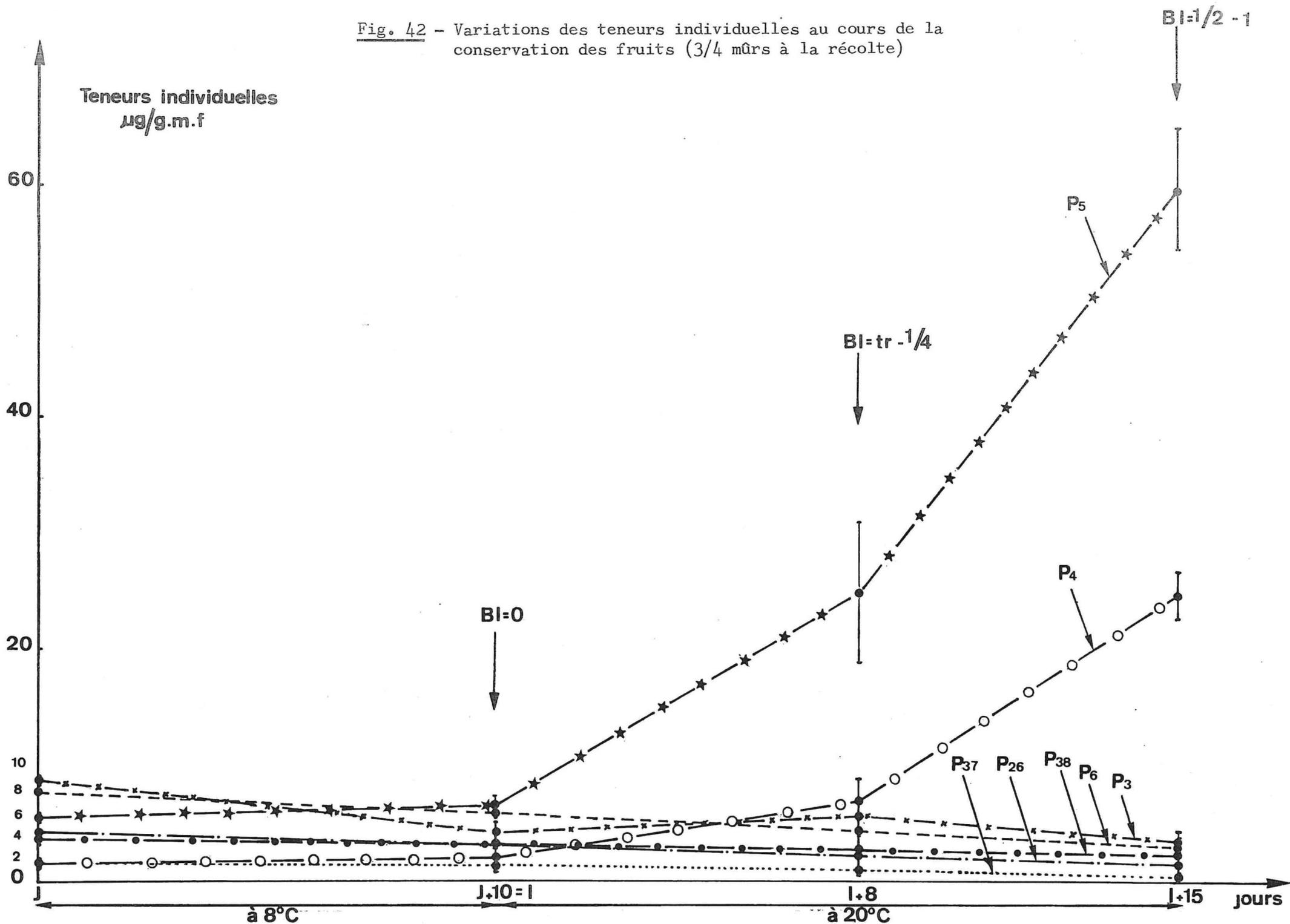


Fig. 42 - Variations des teneurs individuelles au cours de la conservation des fruits (3/4 mûrs à la récolte)



L'ensemble des observations concernant ces résultats concorde en plusieurs points avec nos conclusions, sur les broyats. Les variations sont vraisemblablement plus marquées et plus exprimées dans le cas des zones (21) qu'en considérant globalement toute la pulpe du fruit, le B.I étant un phénomène très localisé dans les fruits atteints.

3 - Interprétation des résultats.

a) Dans les parties non brunies des fruits brunis, telles que les zones 41 (zones plus mûres), l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques ne permet de distinguer qu'une faible augmentation des teneurs au cours de la conservation. Ces variations sont semblables à celles que nous avons mises en évidence au cours de la maturation du fruit sur pied et paraissent donc être liées au "phénomène de maturation" des fruits en cours de conservation. Par contre, dans les parties susceptibles de brunir et qui brunissent effectivement après conservation, à l'évolution précédente font place des variations quantitativement différentes par l'accumulation excessive de P_4 et P_5 d'une part et, d'autre part la diminution de teneurs en d'autres dérivés hydroxycinnamiques, et des modifications de coloration conduisant au brunissement des tissus, les trois phénomènes étant concomitants. Le développement des symptômes du B.I passerait donc par un certain nombre de phases. Il s'agirait dans un premier temps d'une phase préparative ou généralement appelée d'induction (I.R.F.A., 1975) qui correspondrait à la période de mise au froid à 8°C et une partie du temps du séjour des fruits à 20°C, jusqu'à l'apparition des premiers symptômes du B.I. La synthèse des composés phénoliques devrait s'effectuer normalement encore pendant cette période.

Dans une seconde phase il y aurait accélération de l'activité synthétique de P_5 et P_4 , diminution de teneur en P_3 , P_{37} , P_{38} , P_{32} , P_{26} et brunissement des tissus (oxydation des substrats de brunissement).

Chacun des facteurs de variation précédent (synthèse de P_4 et P_5 , baisse de teneur en P_3 ..., brunissement des tissus) se trouverait intensifié dans une troisième phase. L'importance des tissus brunis dans les zones affectées laisserait penser que les substrats de brunissement auraient été utilisés en majeure partie au cours du B.I et qu'il ne devrait vraisemblablement plus en rester dans le cas du B.I sévère. Cette hypothèse aurait été valable pour les composés P_6 , P_3 , P_{37} , P_{38} , P_{32} , P_{26} ..., qui diminuent de concentration avec le B.I. mais qui ne sont peut-être pas des substrats oxydables directs.

P₄, un o-diphénol, est un substrat oxydable. Contrairement à ce qu'on pourrait attendre, sa disparition par oxydation au cours du B.I, par exemple, P₄, s'accumule (avec P₅) et reste toujours à des niveaux de concentration de plus en plus élevés au fur et à mesure que le B.I augmente.

Il semble donc qu'au cours du phénomène de B.I., la synthèse de ces deux composés, P₄ et P₅, l'emporte sur leur utilisation éventuelle.

b) Un fait essentiel semble expliquer partiellement l'augmentation de teneurs en P₄ et P₅ :

- la présence particulièrement abondante de métabolites actifs intermédiaires tels que P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ susceptibles d'être utilisés pour la synthèse de P₄ et P₅ et la diminution de leur teneur au cours de la conservation (et plus tard avec le B.I).

Il est probable que P₅ et P₄ puissent être formés à partir principalement des unités activées (TOWERS, 1964 ; HALBROCK et GRISEBACH, 1970 ; WALTON et BUTT, 1971 ; RHODES et WOOLVERTON, 1973 ; STOCKIGT et ZENK, 1974) en particulier, P₃₇ et P₃₈ des esters p-coumariques respectivement avec le glucose et l'acide quinique.

Toutefois l'augmentation progressive conduisant à une accumulation importante de P₅ et de P₄ dans le cas du B.I., implique vraisemblablement l'intervention d'enzymes de synthèse de types PAL (phénylalanine ammonialyase et P.O. (phénoloxydase). Il serait donc intéressant de faire l'étude de la PAL, par exemple, comme test précoce d'apparition du brunissement. Divers auteurs ont observé par ailleurs l'augmentation de l'activité PAL dans des organes végétaux soumis à des traitements comme les infections et les maladies (MINAMIKAWA et URITANI, 1965 ; FRIEND et al., 1973), les blessures (MINAMIKAWA et URITANI, 1965 ; ZUCKER, 1965, 1968 ; CREASY, 1968 ; WONG et al., 1974 ; FLEURIET, 1975). L'activité des P.O. est faible dans les fruits frais et devient seulement dosable dans les fruits brunis (I.R.F.A., 1975). TEISSON (1977) a montré que l'activité oxydative des jus d'ananas brunis est plutôt due à des peroxydases.

Conclusion.

Il ressort de cette étude que les dérivés hydroxycinnamiques augmentent de teneur au cours de la conservation de deux manières différentes :

- normalement quand il n'y a pas de brunissement interne. Dans ce cas, les variations suivies sont généralement faibles et ne donnent lieu à l'apparition d'aucun symptôme de B.I.

- anormalement et d'une manière plus ou moins considérable quand il y a brunissement interne. L'augmentation concerne pour le pool phénolique déjà existant, strictement les composés P₅ et P₄ qui s'accumulent au fur et à mesure que le B.I. devient de plus en plus sévère.

La diminution de certains dérivés hydroxycinnamiques au cours de la conservation semble avoir un rapport avec le phénomène du B.I., vraisemblablement en tant que métabolites actifs intermédiaires pour la synthèse possible de P₅ et P₄ ou de substrats d'oxydation ou de brunissement.

Nous essayerons de préciser dans le paragraphe suivant la nature du ou des substrats du brunissement interne.

III - LES SUBSTRATS du B.I. de l'ANANAS

Nous avons vu que certains composés dont P_4 , participent à la formation du complexe brun par chelation avec les ions ferriques. Il est vraisemblable que cette réaction ne puisse être que partiellement responsable du brunissement interne de l'ananas et que le brunissement enzymatique y intervienne pour une bonne part, étant donné la présence quantitativement importante des dérivés hydroxycinnamiques susceptibles d'être oxydés par des phénoloxydases (P.O.) soit directement pour les o-diphénols tels que P_4 , soit indirectement par un phénomène d'oxydations induites (ROBERTS, 1957) pour les monophénols tels que P_5 , P_3 ... Par ailleurs, TEISSON (1977) a montré que les peroxydases pouvaient également intervenir en jouant comme oxydases.

Dans le but de préciser la nature des substrats du B.I., nous avons suivi par chromatographie quelques réactions enzymatiques pouvant utiliser les dérivés hydroxycinnamiques comme substrats d'oxydation.

1 - Effet de pulvérisation de préparations enzymatiques sur des chromatogrammes d'extraits d'ananas.

Des solutions de tyrosinase du commerce et de P.O. extraites des pêches ont été pulvérisées sur des chromatogrammes obtenus à partir d'extraits d'ananas non brunis et brunis. Dans les deux cas, avec incubation en atmosphère humide pendant 24 h. à 25°C selon les techniques de SIEGELMAN (1955b)

ou sans incubation à l'air ambiant, il apparaît au niveau du composé P₄ une coloration jaune-brun visible à l'oeil nu, beaucoup plus intense dans le cas de l'ananas bruni. Les autres dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₃ ..., P₃₂, P₂₆) n'ont donné lieu à aucune apparition apparente de coloration brune (Fig. 43). P₄ a donc été oxydé par la tyrosinase et les P.O des pêches en formant un produit de brunissement. Une réaction de décoloration est partiellement obtenue sur P₄ ainsi oxydé par pulvérisation de solution d'acide ascorbique qui réduit les quinones formés et peut faire régresser l'intensité du brunissement (ROUET-MAYER et PHILIPPON, 1974).

2 - Effet d'adjonction de solution de tyrosinase à des extraits tamponnés d'ananas.

Nous avons cherché à confirmer l'expérience précédente d'une part, et d'autre part à montrer qu'en dehors de P₄, d'autres dérivés hydroxycinnamiques peuvent être utilisés dans des conditions de pH, proche du pH optimum d'activité de l'enzyme.

a - Préparation de l'extrait tamponné et expérience.

Dans les deux cas de fruits, non bruni et bruni, 20 g de matériel végétal sont broyés en présence de tampon phosphate à pH₆ (0,1 M). Le volume est ajusté à 250 ml dans une fiole jaugée, avec du tampon, qui contient la solution de tyrosinase (50 U/ml). L'extrait tamponné est transvasé quantitativement dans un flacon et maintenu ensuite à 30°C dans un bain-marie en faisant barboter dans l'extrait de l'oxygène (0,2 l/mn). Un témoin préparé à partir du même matériel est broyé dans les mêmes conditions et immédiatement acidifié en vue de la purification à l'acétate d'éthyle.

Pour chaque essai des prélèvements (50 ml) sont effectués les premiers à 1/2 h., ensuite toutes les heures. De l'acide métaphosphorique à 20 % est ajouté à chaque prélèvement selon les techniques définies au Chap. I, pour arrêter l'action enzymatique et acidifier le milieu, comme précédemment, en vue de la purification de l'extrait.

Une étude chromatographique et spectrophotométrique sera faite sur chaque extrait purifié.

b - Résultats.

- Spectrophotométriques (Fig. 44). Après 1 h. d'incubation la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques a diminué de 5 fois par

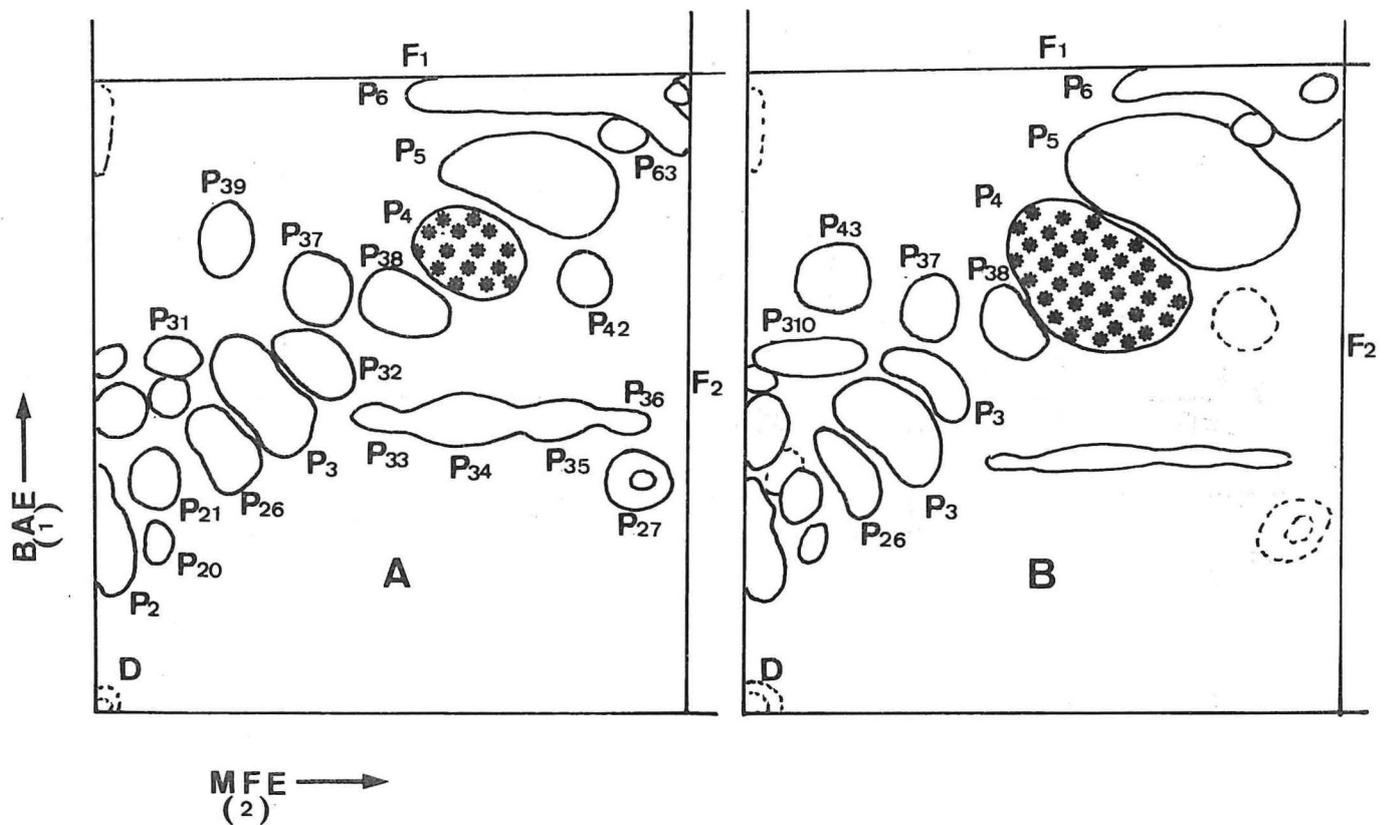


Fig. 43 - Pulvérisation de préparation de tyrosinase
ou de P.O. des pêches sur des chromatogrammes
de fruits A : non brunis après conservation
et B : brunis (B.I. = 1 1/2)

P₄ est le seul dérivé hydroxycinnamique qui
brunit.

Dépôt : D ; F₁ et F₂ fronts de solvants

Identification des spots, voir Fig. 8, 8a et 36.

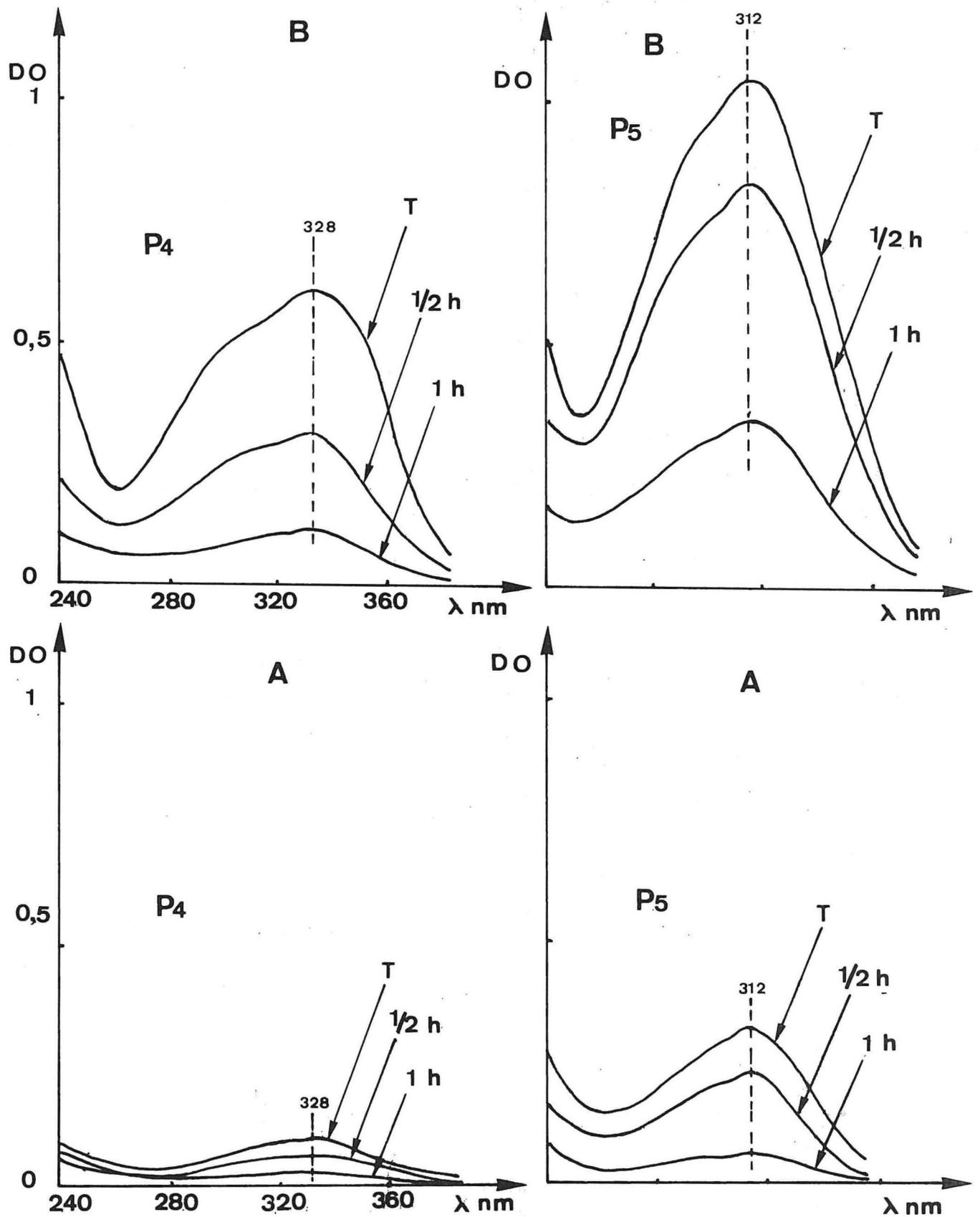


Fig. 44 - Brunissement, avec apport de tyrosinase, d'extraits tamponnés d'ananas. Spectres d'absorption en U.V. de P₄ et de P₅ obtenus à partir d'extraits de fruits brunis (B.I. = 1 1/2) : B, ⁴ et non brunis après conservation : A
 Temps d'incubation : 1/2 h. et 1 h.
 Témoin : T (P₄ ou P₅) au temps t = 0

rapport au témoin dans le cas de fruit bruni. Dans le même temps une diminution faible de la teneur globale est observée dans le cas de fruit non bruni. Ce qui suggère que quelques-uns des dérivés hydroxycinnamiques ont été consommés.

- Chromatographiques. L'observation en lumière ultraviolette des chromatogrammes préparés à partir des différents extraits précédents montrent que ce sont P₄ et P₅ principalement qui diminuent sensiblement de teneurs (P₄ 1 à 20 fois et P₅ 1 à 30 fois au bout de 1 h. d'incubation). Les autres dérivés hydroxycinnamiques dont P₃ diminuent également de concentration. Les mêmes chutes de concentration ont été observées pour l'extrait de fruit non bruni à des proportions vraisemblablement équivalentes aux précédentes (fruit bruni); les teneurs faibles en dérivés hydroxycinnamiques de l'essai ne permettent pas un dosage correct, particulièrement de P₅, P₄ et P₃.

L'utilisation de P₄, P₅ et autres dérivés hydroxycinnamiques (P₃, P₃₇, P₃₈, P₆, P₃₂, P₂₆) par la tyrosinase exogène, est certaine. Par rapport aux autres composés, en particulier P₄ et P₅ sont consommés plus vite.

3 - Brunissement réel, sans apport de tyrosinase (Fig. 45).

Des extraits préparés dans les mêmes conditions que l'expérience précédente (fruits non bruni et bruni) ont été incubés sans apport de tyrosinase. Les séparations chromatographiques et le dosage spectrophotométrique ont permis d'observer deux caractéristiques principales :

- une très faible variation de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques dans le cas de fruit non bruni. P₄ diminue faiblement alors que P₅ ne semble pas bouger au bout de 3 h. d'incubation.
- une diminution de teneur de (-44 %) par rapport au témoin pour le composé P₄. Par contre, P₅ augmente de concentration de (+ 23 %) dans le même temps (3 h. d'incubation) chez l'extrait de fruit bruni. Les autres dérivés hydroxycinnamiques dont P₃, ne varient pas de teneurs, sinon très faiblement.

L'ensemble de ces résultats a été obtenu à la suite de deux expériences identiques réalisées dans les mêmes conditions. Des vérifications devraient cependant être effectuées pour confirmer définitivement la diminution et l'augmentation de teneur respectives en P₄ et P₅.

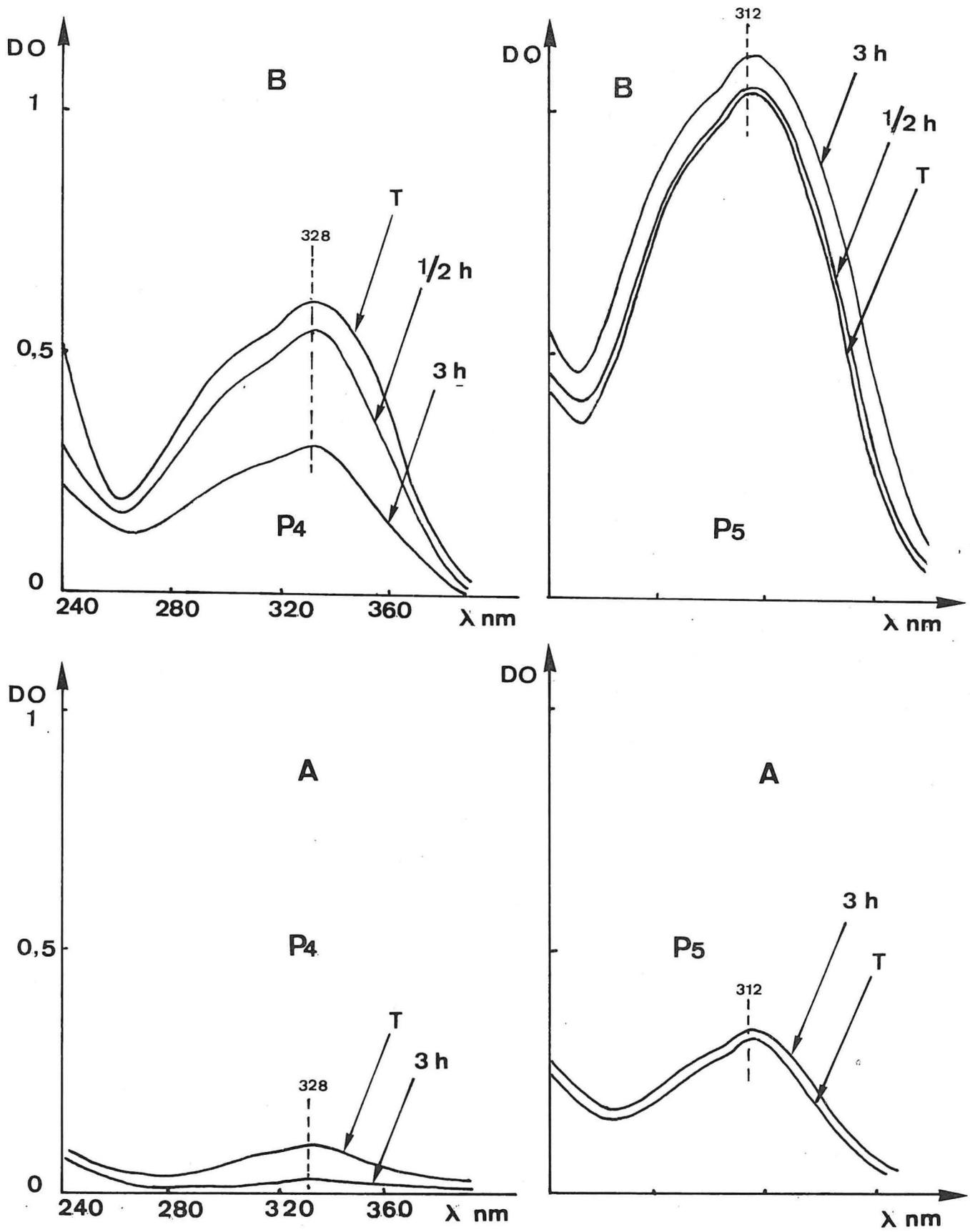


Fig. 45 - Brunissement réel (sans apport de tyrosine) d'extraits tamponnés d'ananas. Spectres d'absorption en U.V. de P₄ et de P₅ obtenus à partir d'extraits de fruits brunis (B.I. = 1 $\frac{1}{2}$) : B, et non brunis après conservation : A. Temps d'incubation : 1/2 h. et 3 h. Témoin : T (P₄ ou P₅) au temps t = 0

Il semble donc exister dans l'ananas bruni (très faible dans l'ananas non bruni) une activité phénoloxidasique comparable en certains points à celle de la tyrosinase, qui pourrait être l'activité oxydative des peroxydases mise en évidence par TEISSON (1977) et utilisant les mêmes substrats dont le principal est P₄ (caféyl-quinique, un dicaféyl-1,4 quinique ?). L'augmentation de teneur en P₅ si elle est significative, pourrait traduire une activité synthétique semblable à celle qui aurait conduit à l'accumulation de P₅ dans le cas du B.I "normal".

Nous n'avons cependant pas cherché à approfondir l'étude enzymatique du B.I. qui a fait l'objet d'un travail détaillé (TEISSON, 1977).

4 - Autres activités enzymatiques.

a - Apport de peroxydase et d'eau oxygénée exogènes.

Dans les mêmes conditions que les expériences précédentes (broyage, température d'incubation) mais en présence d'eau oxygénée à 0,25 % et de peroxydase commerciale (pH du tampon phosphate utilisé, 5,9-6, 0,1 M), 20 g de matériel végétal sont employés dans les deux cas de fruits non brunis et fruits brunis.

L'étude chromatographique et spectrophotométrique de chaque extrait provenant du prélèvement correspondant permet de constater que P₅ et P₄ ont été entièrement consommés au bout de 1/2 - 1 h. d'incubation alors que les autres dérivés hydroxycinnamiques (P₃, P₃₇, P₃₉, P₃₂, P₂₆, P₆ ...) le sont seulement après 3 h. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les extraits provenant des prélèvements de fruits non brunis (Fig. 46, 47).

b - Recherche d'une activité peroxydasique.

L'hypothèse d'une activité peroxydasique possible utilisant les dérivés hydroxycinnamiques étudiés comme la peroxydase du commerce tel que nous venons de le voir dans l'expérience précédente, nous a conduit à rechercher si cette activité existe dans nos extraits.

Pour sa mise en évidence nous avons réalisé des expériences simples en faisant une adjonction, uniquement d'eau oxygénée aux extraits tamponnés, selon le processus précédemment adopté.

Les résultats obtenus après étude chromatographique et spectrophotométrique, peuvent être résumés ainsi :

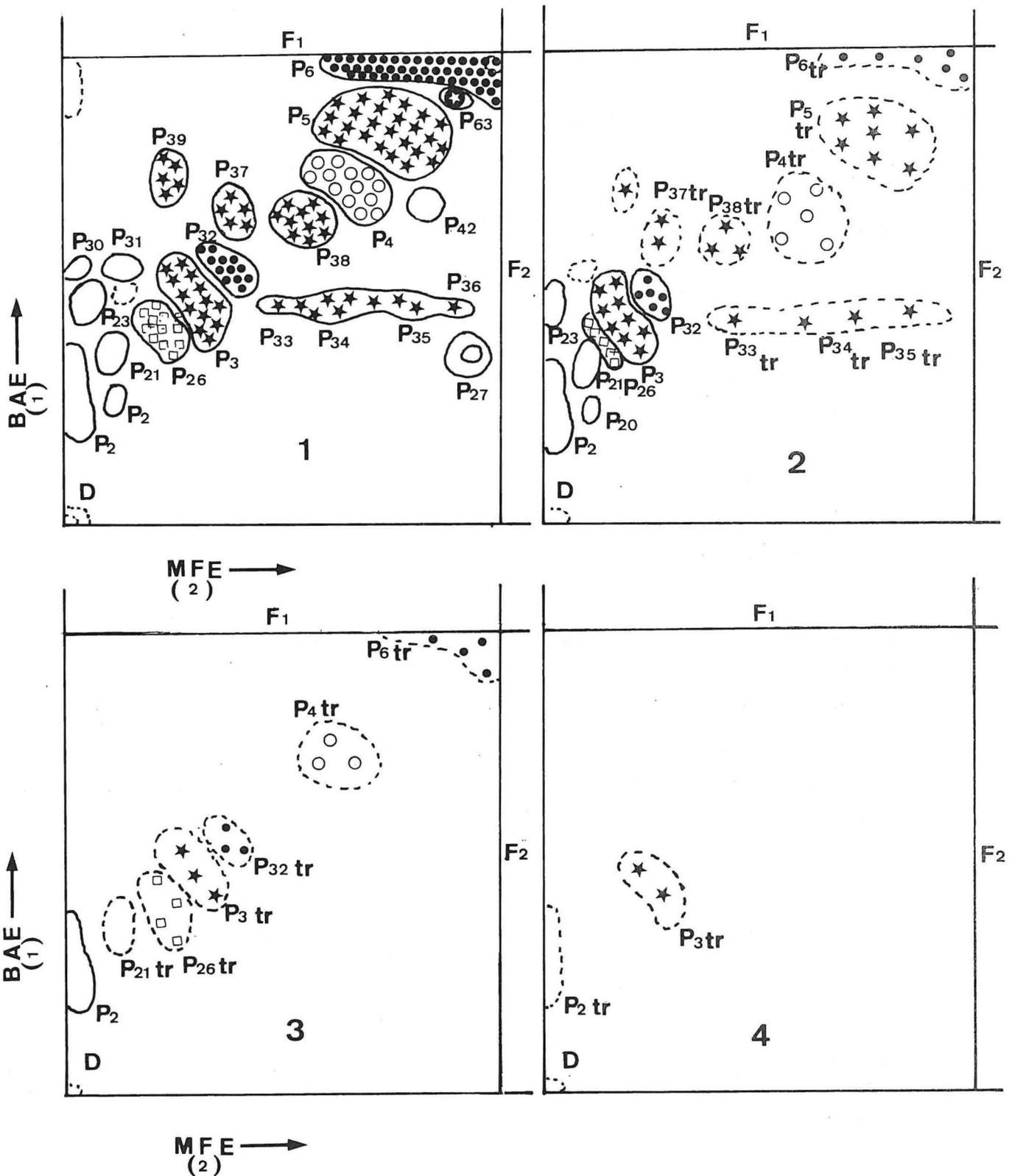


Fig. 46 - Chromatogrammes d'extraits d'ananas frais (tamponnés et additionnés de peroxydase et de H_2O_2 exogènes)

- 1 : témoin
- 2 : après $\frac{1}{2}$ h. d'incubation
- 3 : " 1 h. "
- 4 : " 3 h. "

La plupart des dérivés p.coumariques (P_5 , P_{37} , P_{38} ...) sont consommés après 1 h. d'incubation.

tr : traces

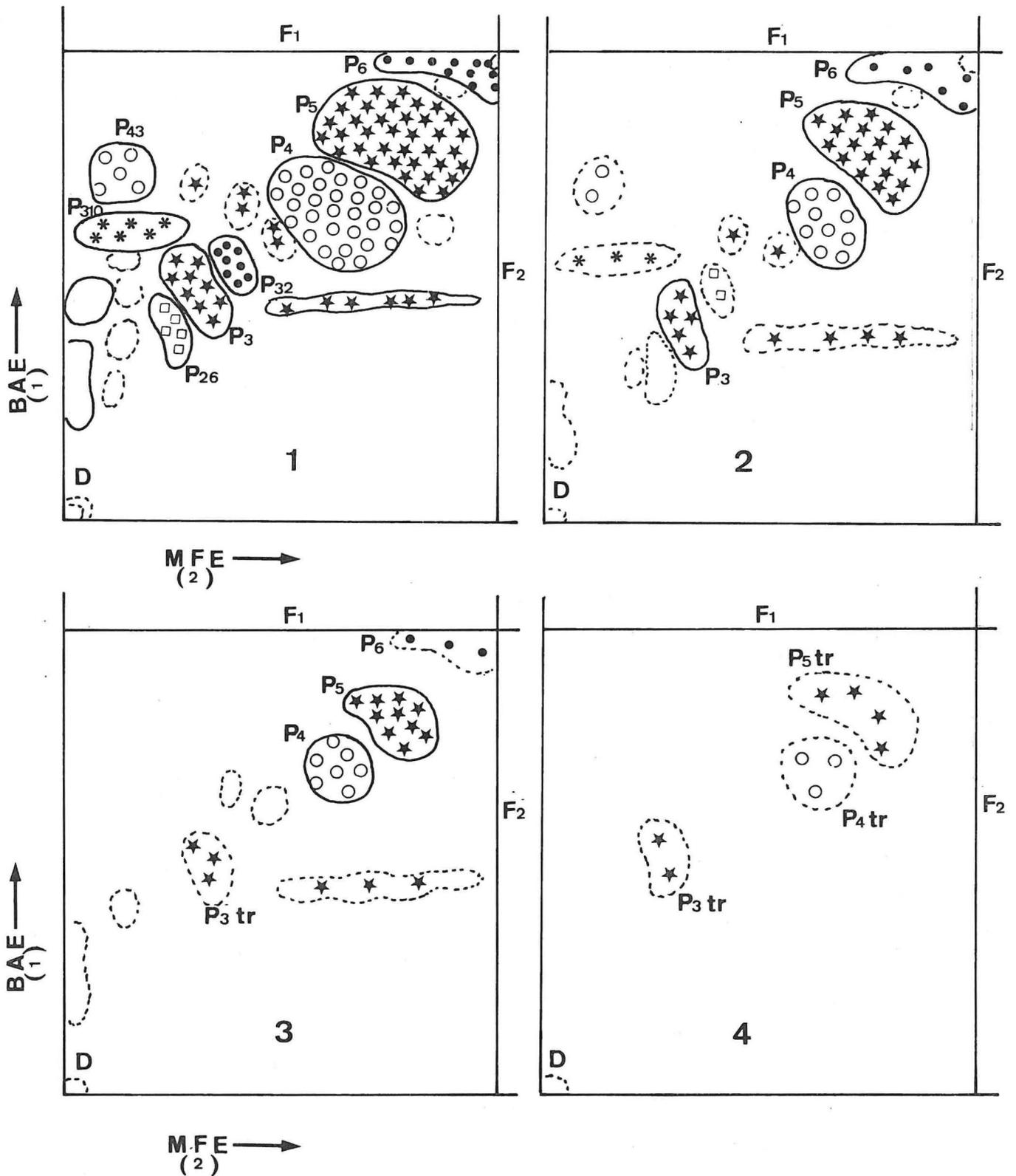


Fig. 47 - Chromatogrammes d'extraits tamponnés d'ananas bruni (B.I. = $1 \frac{1}{2}$) avec apport de H_2O_2 et de peroxydase exogènes

- 1 : témoin
- 2 : après $\frac{1}{2}$ h. d'incubation
- 3 : " 1 h. "
- 4 : " 3 h. "

P_4 , P_5 diminuent de concentration, régulièrement dans le temps.
tr : traces

P_4 et P_5 diminuent de concentration, respectivement de 1 à 1,5 fois et de 1 à 1,2 fois par rapport au témoin, au bout de 1 h. d'incubation des extraits de fruits brunis. Les autres dérivés hydroxycinnamiques (P_3 , P_{37} , P_{38} ...) diminuent aussi, mais d'une manière assez faible.

Les mêmes baisses de teneurs s'observent également chez les extraits de fruits non brunis, traités dans les mêmes conditions.

Dans les deux cas de fruits (non brunis et brunis) P_4 est utilisé plus vite que P_5 ou tout autre dérivé hydroxycinnamique présent.

Une activité peroxydasique semblable à celle de la peroxydase du commerce existe chez l'ananas, utilisant, dans les conditions expérimentales définies, la plupart des dérivés hydroxycinnamiques présents dont principalement P_4 (un o-diphénol). Cette activité oxydative sur les dérivés hydroxycinnamiques peut être rapprochée de celle des peroxydases du type A I A oxydasique mise en évidence par TEISSON (1977).

c - Autres activités enzymatiques des extraits d'ananas.

A partir des expériences classiques simplifiées, nous avons pu mettre en évidence une activité catalasique mesurable principalement dans les extraits d'ananas brunis.

5 - Action d'un inhibiteur de brunissement, l'acide ascorbique, sur les extraits d'ananas brunis (Fig. 48).

L'adjonction d'acide ascorbique à des extraits aqueux de fruits brunis permet d'avoir, au bout de 5 mn, un virage de coloration du brun au jaune. Sur le plan des composés phénoliques une augmentation de teneur en P_4 (de 1 à 2,1 fois) et simultanément une diminution en P_5 (de 1 à 2,3 fois) par rapport aux valeurs de P_4 et de P_5 dans la fraction de l'extrait sans adjonction d'acide ascorbique exogène et ayant servi de témoin. L'augmentation de teneur en P_4 (de l'extrait) est due à la réduction totale ou partielle par l'acide ascorbique de ses formes quinoniques ; alors que la baisse de teneur en P_5 résulte vraisemblablement de son utilisation dans une réaction d'oxydation, couplée peut-être à celle de P_4 (réduit) (oxydo-réduction).

L'ensemble de ces résultats permet de dégager quelques points intéressants sur le plan de la connaissance du rôle des dérivés hydroxycinnamiques dans le phénomène du B.I. de l'ananas :

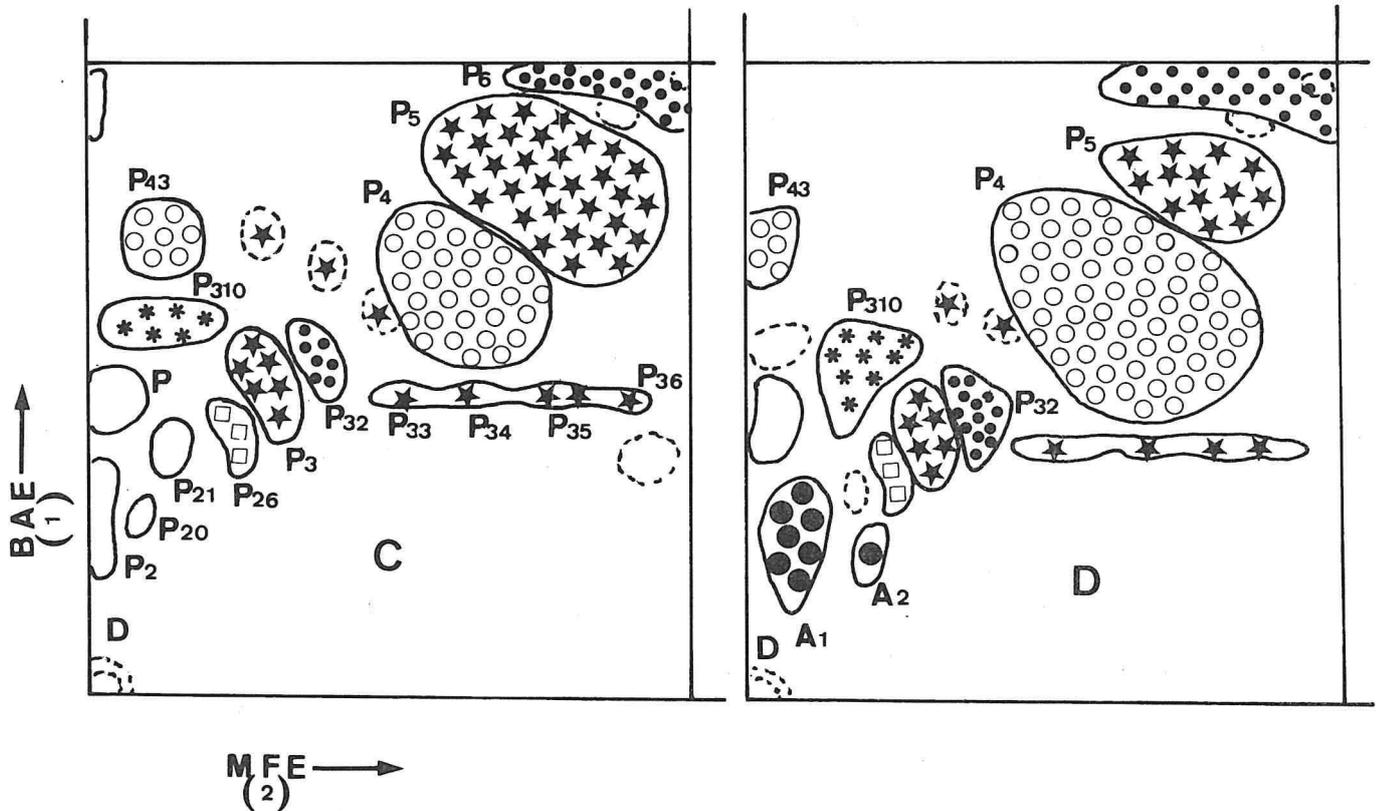
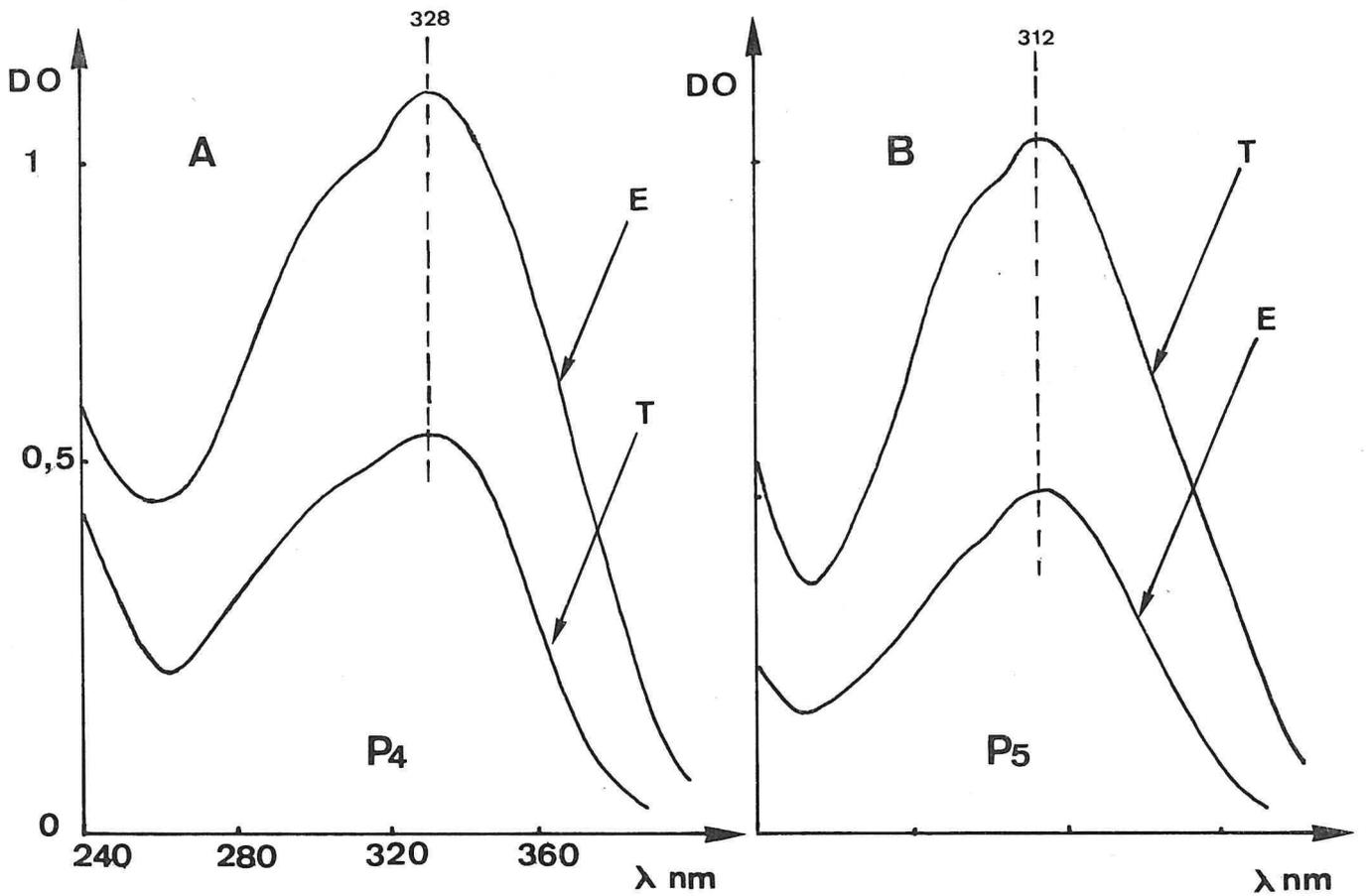


Fig. 48 - 1 - Spectres d'absorption en U.V. de P₄ (A) et de P₅ (B) provenant d'extraits aqueux d'ananas bruni (B.I. = 1 $\frac{1}{2}$) (T) et avec (E) addition d'acide ascorbique.

2 - Chromatogrammes des mêmes extraits (C) sans addition d'acide ascorbique, (D) avec addition d'acide ascorbique. Il s'est formé deux produits d'oxydation de l'acide ascorbique : A₁ et A₂ sombres non fluorescents aux U.V. à 256 nm et devenant jaune-brun à l'air (oxydation). Alors que P₅ diminue par contre P₄ augmente de concentration après adjonction d'acide ascorbique dans l'extrait de fruit bruni.

- P_4 (caféyl-quinique, un dicaféyl-1,4 quinique ?) est le principal substrat de brunissement dans le fruit bruni. Cette particularité rapproche le B.I. de l'ananas du point de vue substrats, aux brunissements enzymatiques classiques que l'on rencontre chez beaucoup de fruits et dans lesquels les substrats de brunissement sont généralement des esters quiniques de l'acide caféique tel que l'acide chlorogénique chez la pomme (WEURMAN et SWAIN, 1953). L'oxydation de P_4 est due à une activité phénol-oxydasique nulle ou faible dans les fruits non brunis mais, par contre quantitativement appréciable dans les fruits brunis. D'autres activités enzymatiques, dues à des peroxydases fonctionnent également dans les fruits brunis, utilisant en présence de H_2O_2 , P_4 et autres dérivés hydroxycinnamiques qui sont des donneurs d'hydrogène potentiels. Un rapprochement peut être fait ici sur le travail de MACHÁCKOVÁ et al. (1975) dans lequel ces auteurs rapportent qu'en présence de H_2O_2 exogène la peroxydase extraite des feuilles de jeunes plants de blé, oxyde l'acide férulique et l'acide p-coumarique. Des travaux récents sur le B.I. de l'ananas (I.R.F.A., 1975 ; TEISSON, 1977) ont montré une activité peroxydasique plus importante dans les zones brunes par rapport aux zones saines de l'ananas bruni.

- La présence d'inhibiteurs de brunissement enzymatique dont le principal sur le plan physiologique est l'acide ascorbique (BARUAH et SWAIN, 1953 ; BOGDANSKI, 1960 ; HENZE, 1956 ; TAUFEL et VOIGT, 1964 ; PIERPOINT, 1966 ...) peut jouer un rôle déterminant dans le phénomène du B.I. En effet en réduisant les quinones formés à partir des dérivés hydroxycinnamiques, notamment P_4 , il inhiberait le B.I. tout en favorisant l'utilisation dans des réactions d'oxydo-réduction, des composés tel que P_5 . L'I.R.F.A. (1975) et TEISSON (1977) rapportent que la teneur en acide ascorbique diminue sensiblement avec l'intensité du B.I. pour rester à un niveau à peu près constant ensuite (cas de B.I. sévères).

IV - RECHERCHE d'UNE CORRELATION entre l'INTENSITE du B.I.
et la TENEUR en DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES.

Nous avons vu dans les études précédentes que la teneur globale et les teneurs individuelles en P₄ (o-diphénol) et P₅ (monophénol) augmentent beaucoup dans les fruits brunis et que l'absorption importante vers 280 nm, caractéristique des spectres des extraits bruts de fruits frais ou sains après conservation, semble varier avec l'intensité du B.I.

Nous avons donc cherché à déterminer s'il existe des corrélations entre l'intensité du B.I. et ces différentes variables.

Pour réaliser cette étude nous avons groupé suivant le stade de B.I. ou note de brunissement attribuée, 101 extraits (extraits bruts et extraits purifiés à l'acétate d'éthyle) provenant de 101 fruits (zones 21) simulés des récoltes de 1974, 1975 et 1976. Rappelons que pour apprécier le B.I. nous avons adopté une échelle de notation arbitraire de 0 (B.I. nul) à 4 (B.I. noté 4) correspondant aux 4 stades de B.I. définis par TEISSON (1972). Les notes de B.I. intermédiaires entre deux stades ont été estimées suivant le critère basé sur le nombre d'yeux affectés et l'importance relative du brunissement sur chacun des yeux affectés. Ainsi dans le cas de B.I. faible, à l'état de traces, nous avons noté :

B.I. = 0, les fruits qui n'ont aucun oeil à base translucide.

B.I. = 1/64 # 0,02, les fruits qui présentent 5 à 10 yeux à base translucide, mais sans brunissement visible.

- B.I. = $1/32 \neq 0,03$, les fruits qui ont plus de 10 yeux à base translucide mais sans brunissement visible.
- B.I. = $1/16 \neq 0,06$, les fruits affectés, avec un brunissement visible dans certains vaisseaux des bases d'yeux translucides.
- B.I. = $1/8$ les fruits caractérisés par un début de brunissement visible généralisé à la base des yeux translucides.
- B.I. = $1/4$ les fruits avec un B.I. visible et assez net.

Nous avons rassemblé dans les tableaux 27 et 28, les caractéristiques des valeurs expérimentales dont nous utiliserons les moyennes pour le calcul statistique des coefficients de corrélation et l'établissement des équations des droites de régression, selon les méthodes préconisées par LAMOTTE (1957) pour les petits échantillons.

1 - Etude de corrélation entre l'intensité du B.I. et la teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques.

D'après les résultats des tableaux 29 et 30, la valeur 0,95 trouvée pour le coefficient de corrélation permet de conclure qu'aux forts brunissements internes correspondent des teneurs globales en dérivés hydroxycinnamiques élevées.

Nous avons déterminé les droites de régression théoriques selon les formules classiques (LAMOTTE, 1957). On peut constater sur la Fig. 49 que l'angle formé par les deux droites est faible, ce qui implique que la corrélation entre les deux variables y (teneur globale) et X (intensité du B.I.) est grande.

Pour un B.I. nul, la teneur globale théorique prend alternativement les valeurs 70 et 83 $\mu\text{g/g.m.f.}$ Ces valeurs se rapprochent de celles que nous avons trouvées chez des ananas 4/4 mûrs à la récolte (voir Chap.III) mais elles sont cependant nettement plus élevées que les teneurs globales observées chez des fruits frais 3/4 mûrs ou des fruits sains après conservation.

Tableau 27 - Caractéristiques des valeurs expérimentales groupées suivant le B.I. des fruits simulés (récoltes de 1974, 1975 et 1976).

Intensité de B.I.	Nombre d'ex-traites	valeurs expérimentales ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	Moyenne	Ecart-type de la moyenne	Intervalle de confiance (P = 95 %)	coefficient de variation (%)
0,02	7	33,2 34,4 35,1 32,5 35,7 34,4 36,3	34,5	1,239	$\pm 1,24$	3,6 %
0,03	4	40,2 38,9 38,3 37,6	38,8	0,9	$\pm 1,69$	2,4 %
0,06	6	43,4 44,6 51,0 53,6 43,6 47,2	47,2	3,9	$\pm 4,4$	8,2 %
0,125	12	95,6 81,6 86,1 66,3 64,5 63,1 63,8 69,6 76,5 79,1 67,6 66,9	73,4	9,9	$\pm 6,6$	13,5 %
0,25	6	106,5 105,3 116,0 99,5 104,6 115,3	107,9	4,2	$\pm 1,6$	3,9 %
0,38	4	133,9 131,3 127,5 128,8	130,4	2,45	$\pm 4,5$	1,9 %
0,50	6	139,6 140,3 154,8 154,3 139,0 146,6	145,8	6,6	$\pm 7,55$	4,5 %
0,75	7	220,6 205,3 216,1 207,8 200,2 216,8 202,7	209,9	7,2	$\pm 7,3$	3,5 %
1	7	252,5 247,4 244,8 242,3 249,9 247,4 241,0	246,7	3,8	$\pm 3,8$	1,5 %

Tableau 28 - Caractéristiques des valeurs expérimentales groupées suivant le B.I. des fruits simulés (récoltes 1974, 1975, 1976).

Intensité de B.I.	Nombre d'extraits	valeurs expérimentales ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	Moyenne	Ecart-type de la moyenne	Intervalle de confiance (P = 95 %)	coefficient de variation (%)
1,25	5	260,7 253,7 261,4 265,2 258,8	260	3,7	$\pm 5,2$	1,4 %
1,50	9	276,2 276,7 278,6 275,4 274,8 268,3 272,9 275,7 274,5	274,8	2,7	$\pm 2,2$	0,98 %
1,75	6	282,4 283,1 281,1 281,7 280,5 279,8	281,4	1,1	$\pm 1,29$	0,39 %
2	4	288,2 286,2 289,4 286,0	287,5	1,5	$\pm 2,8$	0,5 %
2,25	4	299 295,2 297,5 296,8	297,1	1,36	$\pm 2,5$	0,46 %
2,50	3	317,5 321,9 322,6	320,7	2,2	$\pm 6,86$	0,70 %
2,75	5	326,4 330,9 329,0 334,1 327,8	329,6	2,67	$\pm 3,7$	0,8 %
3	3	359,6 346,8 360,5	355,7	6,3	$\pm 19,3$	1,8 %
3,25	3	380,0 383,8 378,2	380,9	2,1	$\pm 6,5$	0,56 %

Tableau 29 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques. Calculs préliminaires.

B.I. (X)	Teneur globale (Y)	(X - \bar{X})	(Y - \bar{Y})	(X- \bar{X})(Y- \bar{Y})	(X - \bar{X}) ²	(Y - \bar{Y}) ²
0,02	34,5	- 1,278	- 177,9	227,356	1,633	31 648,41
0,03	38,8	- 1,268	- 173,6	220,125	1,608	30 136,96
0,06	47,2	- 1,238	- 165,2	204,518	1,533	27 291,04
0,125	73,4	- 1,173	- 139,0	163,47	1,376	19 321,00
0,25	103,9	- 1,048	- 108,5	113,708	1,098	11 772,25
0,38	130,4	- 0,918	- 82,0	75,276	0,843	6 724,00
0,50	145,8	- 0,798	- 66,6	53,147	0,637	4 435,56
0,75	209,9	- 0,548	- 2,5	1,37	0,300	6,25
1	246,7	- 0,298	- 34,3	- 10,221	0,089	1 176,49
1,25	260,0	- 0,048	47,6	- 2,285	0,002	2 265,76
1,50	274,8	0,202	62,4	12,605	0,041	3 893,76
1,75	281,4	0,452	69,0	31,188	0,204	4 761,00
2	287,5	0,702	75,1	52,720	0,493	5 640,01
2,95	297,1	0,952	84,7	80,634	0,906	7 174,09
2,50	320,7	1,202	108,3	130,177	1,445	11 728,89
2,75	329,6	1,452	117,2	170,174	2,108	13 735,84
3	355,7	1,702	143,3	243,897	2,897	20 534,89
3,25	380,9	1,952	168,5	328,912	3,812	28 392,25

$$\bar{X} = 1,298$$

$$\bar{Y} = 212,4$$

Tableau 30 - Corrélation entre intensité de B.I. et teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques.

Calcul du coefficient de corrélation :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum X = 1,298 \quad n = 18 \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum Y = 212,4$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})^2 = 1,16744 \quad \sigma_y^2 = \frac{1}{n} \sum (Y - \bar{Y})^2 = 12\,813,246$$

$$p = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) = 116,48727$$

(covariance)

$$r = \frac{p}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{116\,48727}{1,16744 \times 12813,246} = 0,95$$

(coef. de corrélation)

Détermination des droites de régression :

• Droite de régression de Y en X

$$Y - \bar{Y} = b_{y/x} (X - \bar{X}), \quad b_{y/x} = \frac{P}{\sigma_x^2} = \frac{116,48727}{1,16744} = 99,74$$

$$Y = \underline{99,74X + 82,9}$$

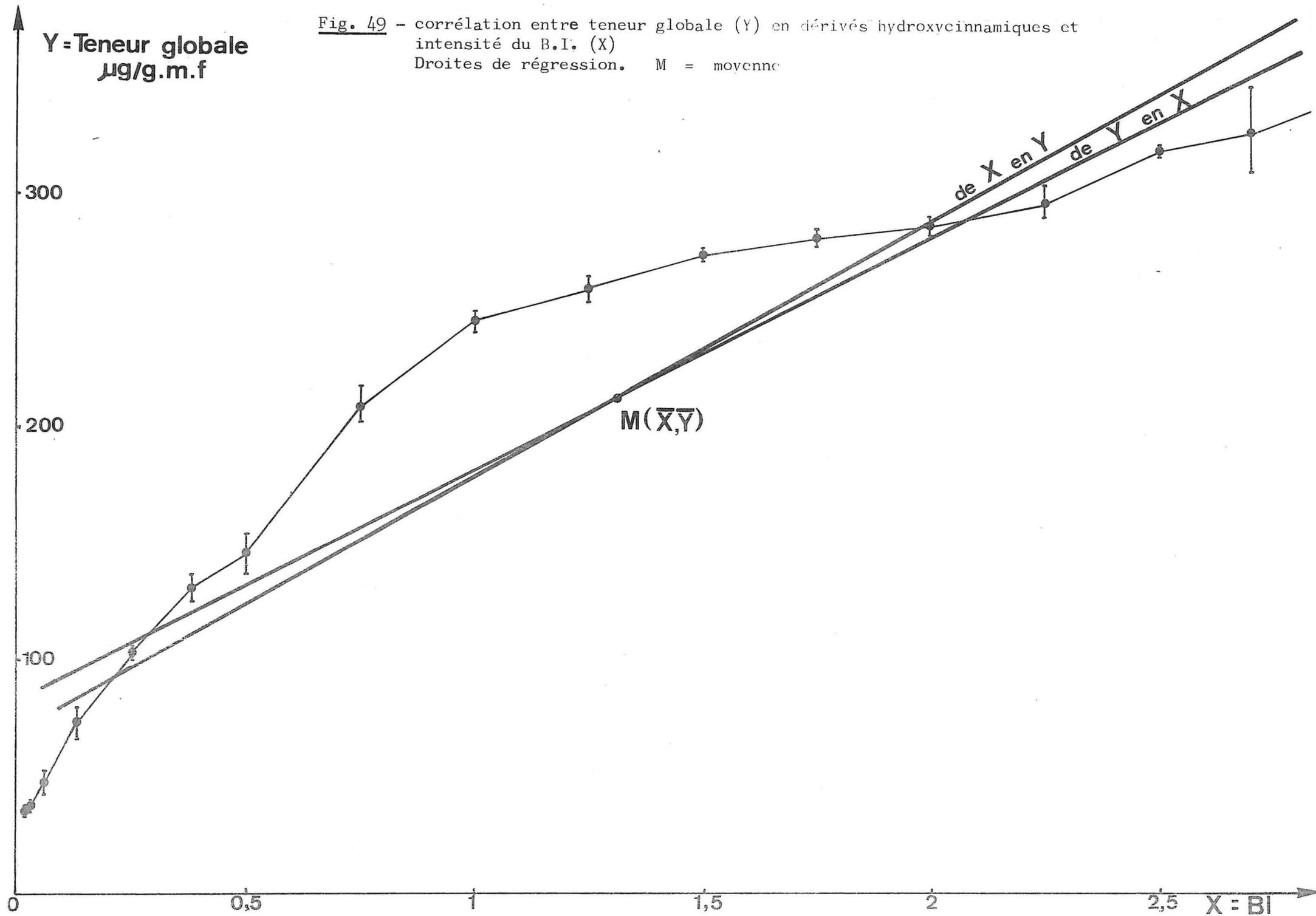
• Droite de régression de X en Y

$$X - \bar{X} = b_{x/y} (Y - \bar{Y}), \quad b_{x/y} = \frac{P}{\sigma_y^2} = \frac{116,48727}{12813,246} = 0,009$$

$$\underline{X = 0,009Y - 0,63}$$

Y = Teneur globale
μg/g.m.f

Fig. 49 - corrélation entre teneur globale (Y) en dérivés hydroxycinnamiques et intensité du B.I. (X)
Droites de régression. M = moyenne



2 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en o-diphénol (P_4).

Les résultats des calculs rapportés dans les tableaux 31 et 32 et sur la Fig. 50 montrent qu'il existe une corrélation positive, avec un coefficient de 0,99, entre l'intensité du B.I. et la teneur en o-diphénol P_4 . Les droites de régression déterminées permettent de calculer la teneur théorique en P_4 pour un B.I. nul : soit 1,7 et 2,4 $\mu\text{g/g.m.f.}$. Ces valeurs sont tout à fait compatibles avec celles que nous avons rencontrées chez les fruits 3/4 et 4/4 mûrs à la récolte ou chez les fruits sains après conservation (voir Chapitre III). Ce qui signifie qu'il n'y a aucune augmentation importante de P_4 avant le déclenchement visible du B.I. Nous reviendrons sur ce point particulier dans un paragraphe ultérieur.

3 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P_5

Les calculs effectués sur les valeurs de P_5 montrent qu'il y a une similitude entre les résultats obtenus sur P_4 et ceux sur P_5 (tableaux 33, 34, Fig. 51) :

- une corrélation positive avec le même coefficient de corrélation 0,99.
- pour P_5 , la pente de la droite de régression théorique de Y en X, est pratiquement le double de celle de P_4 correspondante ; inversement la pente de la droite de régression de X en Y est la moitié de celle de P_4 correspondante.

L'ensemble de ces caractéristiques communes montre encore une fois, comme nous l'avons déjà signalé dans les études précédentes, que l'augmentation de teneurs en P_5 d'une part et celle en P_4 d'autre part sont deux phénomènes simultanés et concomitants, corrélés positivement (coefficient de corrélation 0,99) avec l'intensité du B.I.

4 - Remarques sur les valeurs théoriques calculées.

Les valeurs théoriques obtenues sur les teneurs globales et individuelles (P_5 et P_4) pour les fruits sains après conservation, présentent un intérêt particulier en ce sens qu'elles sont très proches des valeurs réelles mesurées (voir Chapitre III). On peut admettre que théoriquement les niveaux des teneurs initiales pour qu'un fruit ne soit pas susceptible

Tableau 31 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P₄
Calculs préliminaires.

B.I. (X)	teneur en P ₄ Y (µg/g.m.f.)	(X - \bar{X})	(Y - \bar{Y})	(X- \bar{X})(Y- \bar{Y})	(X - \bar{X}) ²	(Y - \bar{Y}) ²
0,02	2,2	- 1,278	- 35,0	44,73	1,633	1225
0,03	3,1	- 1,268	- 34,1	43,2388	1,608	1162,81
0,06	3,9	- 1,238	- 33,3	41,2254	1,533	1108,89
0,125	5,2	- 1,173	- 32,0	37,536	1,376	1024,00
0,25	8,6	- 1,048	- 28,6	29,9728	1,098	817,96
0,38	10,4	- 0,918	- 26,8	24,6024	0,843	718,24
0,50	18,3	- 0,798	- 18,9	15,0822	0,637	357,21
0,75	26,8	- 0,548	- 10,4	5,6992	0,300	108,16
1	28,9	- 0,298	- 8,3	2,4734	0,089	68,89
1,25	39,3	- 0,048	2,1	-1,008	0,002	4,41
1,50	40,7	0,202	3,5	0,707	0,041	12,25
1,75	42,8	0,452	5,6	2,5312	0,204	31,36
2	47,6	0,702	10,4	7,008	0,493	108,16
2,25	68,0	0,952	30,8	29,3216	0,906	948,64
2,50	71,8	1,202	34,6	41,5892	1,445	1197,16
2,75	80,3	1,452	43,1	62,5812	2,108	1857,61
3	81,7	1,702	44,5	75,739	2,897	1980,25
3,25	89,1	1,952	51,9	101,3088	3,810	2693,61

$$\bar{X} = 1,298$$

$$\bar{Y} = 37,2$$

Tableau 32 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P₄

Calcul du coefficient de corrélation :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum X = 1,298 \quad n = 18 \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum Y = 37,2$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})^2 = 1,16794 \quad \sigma_y^2 = \frac{1}{n} \sum (Y - \bar{Y})^2 = 856,9227$$

$$p = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) = 31,352122$$

(covariance)

$$r = \frac{P}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{31,352122}{1,0871 \times 29,273243} = 0,99$$

(coef. de corrélation)

Détermination des droites de régression

- Droite de régression de Y en X

$$Y - \bar{Y} = b_{y/x} (X - \bar{X}), \quad b_{y/x} = \frac{P}{\sigma_x^2} = \frac{31,3521}{1,16794} = 26,84$$

$$\underline{Y = 26,8X + 2,36}$$

- Droite de régression de X en Y

$$X - \bar{X} = b_{x/y} (Y - \bar{Y}), \quad b_{x/y} = \frac{P}{\sigma_y^2} = \frac{31,3521}{856,923} = 0,0365$$

$$\underline{X = 0,0366Y - 0,063}$$

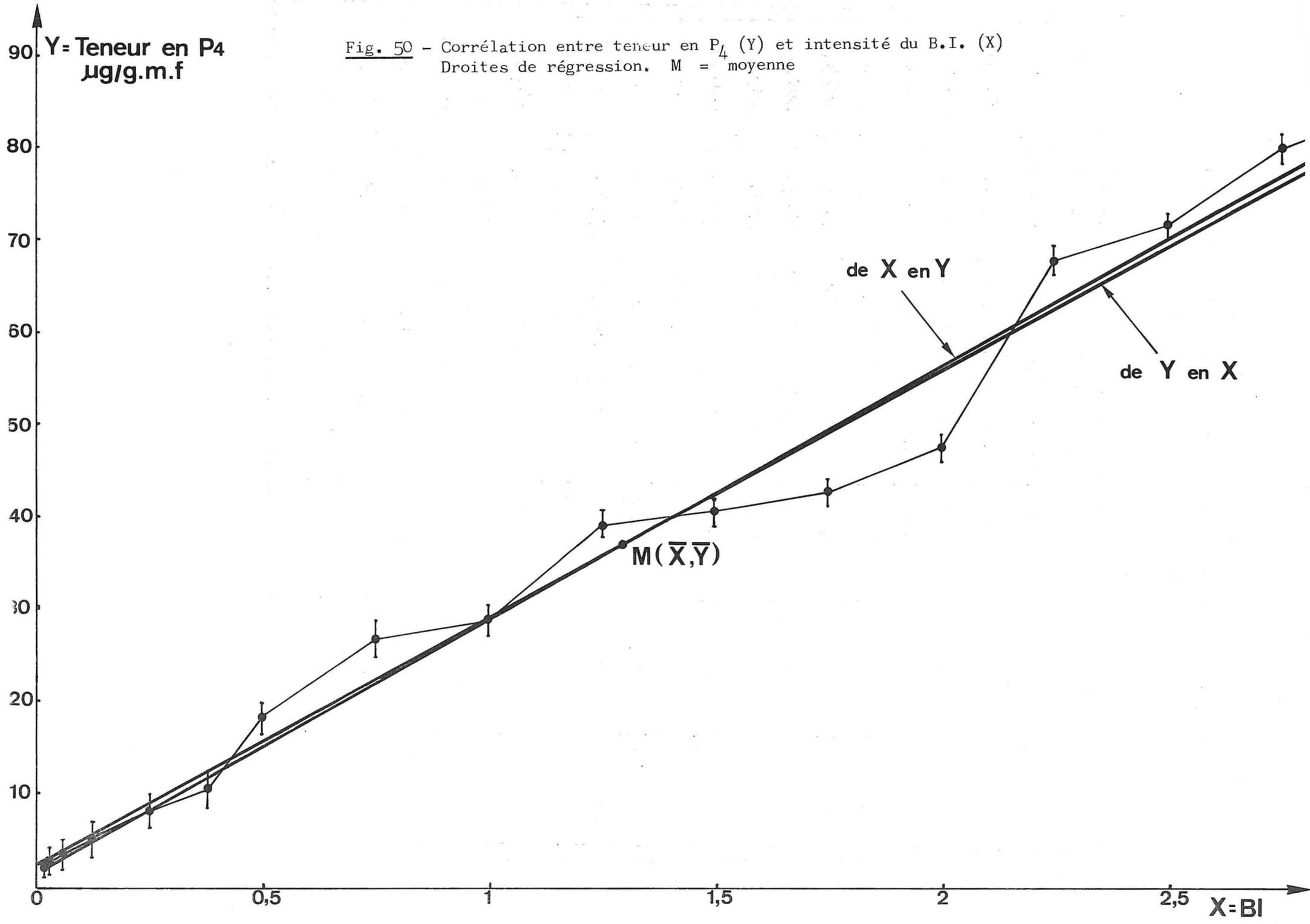


Fig. 50 - Corrélation entre teneur en P₄ (Y) et intensité du B.I. (X)
Droites de régression. M = moyenne

Y = Teneur en P₄
µg/g.m.f

de X en Y

de Y en X

M(X̄, Ȳ)

X = BI

Tableau 33 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P₅
(monophénol). Calculs préliminaires.

B.I. (X)	teneur en P ₅ Y (µg/g.m.f.)	(X - \bar{X})	(Y - \bar{Y})	(X- \bar{X}) (Y- \bar{Y})	(X - \bar{X}) ²	(Y - \bar{Y}) ²
0,02	6,8	- 1,278	- 75,9	97,0002	1,633	5760,81
0,03	9,3	- 1,268	- 73,4	93,0712	1,608	5387,56
0,06	14,2	- 1,238	- 68,5	84,803	1,533	4692,25
0,125	21,7	- 1,173	- 61,0	71,553	1,376	3721,00
0,25	26,2	- 1,048	- 56,5	59,2120	1,098	3192,25
0,38	39,0	- 0,918	- 43,7	40,1166	0,843	1909,69
0,50	53,1	- 0,798	- 29,6	23,6208	0,637	876,16
0,75	65,2	- 0,548	- 17,5	9,59	0,300	306,25
1,0	74,0	- 0,298	- 8,7	2,5926	0,089	75,69
1,25	81,2	- 0,048	- 1,5	0,072	0,002	2,25
1,50	85,7	0,202	3,0	0,606	0,041	9,00
1,75	91,8	0,452	9,1	4,1132	0,204	82,81
2,0	111,4	0,702	28,7	20,1474	0,493	823,69
2,25	132,3	0,952	49,6	47,2192	0,906	2460,16
2,50	144,1	1,202	61,4	73,8028	1,445	3768,96
2,75	157,3	1,452	74,6	108,3192	2,108	5565,16
3	178,9	1,702	96,2	163,7324	2,897	9254,44
3,25	196,5	1,952	113,8	222,1376	3,810	12950,44

$$\bar{X} = 1,298$$

$$\bar{Y} = 82,7$$

Tableau 34 - Corrélation entre intensité du B.I. et teneur en P₅

Calcul du coefficient de corrélation :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum X = 1,298 \quad n = 18 \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum Y = 82,7$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})^2 = 1,16794 \quad \sigma_y^2 = \frac{1}{n} \sum (Y - \bar{Y})^2 = 3379,9759$$

$$p = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{n} = 62,317177$$

(covariance)

$$r = \frac{p}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{62,317177}{1,0807 \times 58,13756} = 0,99$$

(coeff. de corrélation),

Détermination des droites de régression :

- Droite de régression de Y en X

$$Y - \bar{Y} = b_{y/x} (X - \bar{X}), \quad b_{y/x} = \frac{p}{\sigma_x^2} = \frac{62,317177}{1,1679442} = 53,3563$$

$$\underline{Y = 53,36 X + 13,44}$$

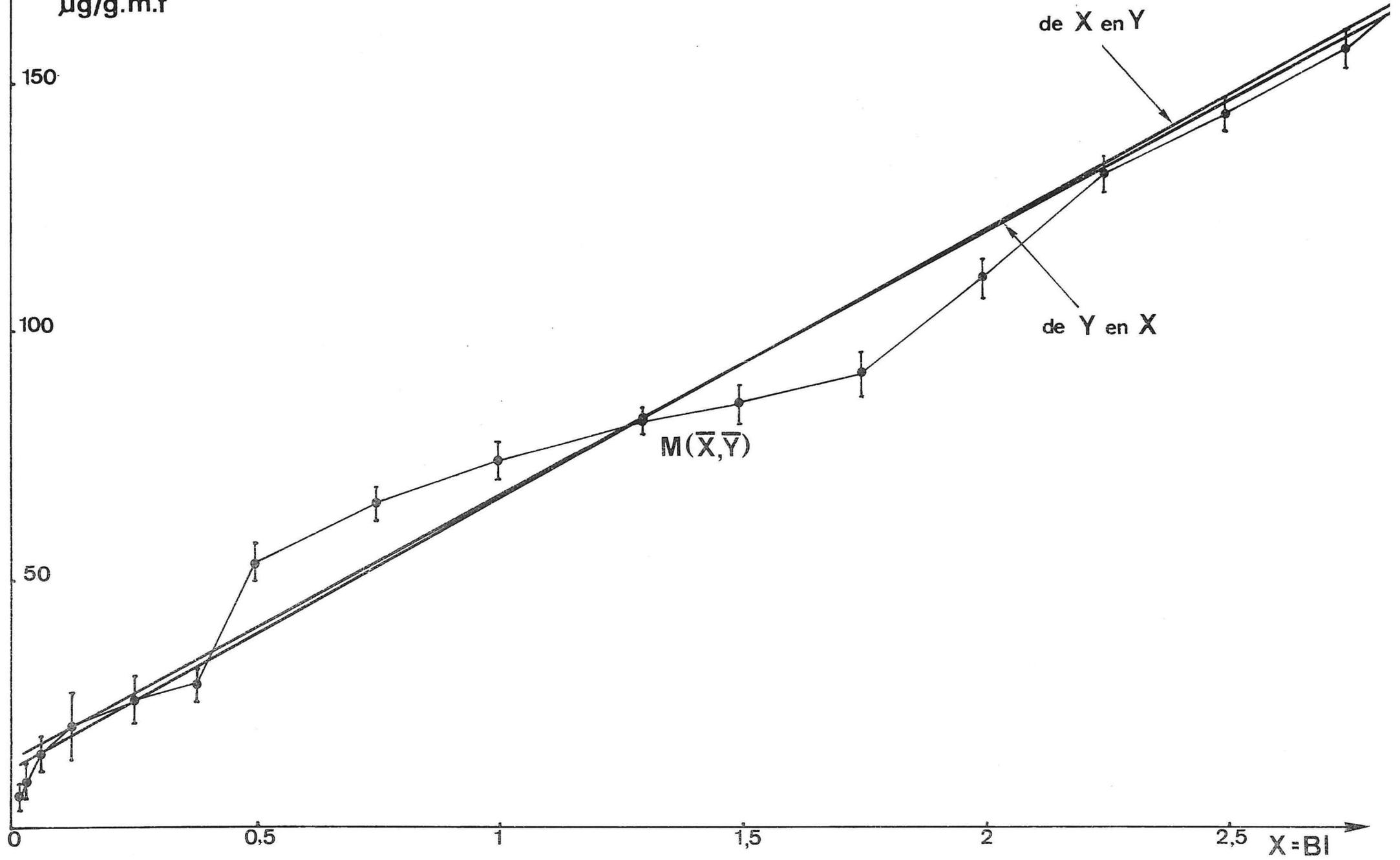
- Droite de régression de X en Y :

$$X - \bar{X} = b_{x/y} (Y - \bar{Y}), \quad b_{x/y} = \frac{p}{\sigma_y^2} = \frac{62,317177}{3379,9759} = 0,018$$

$$\underline{X = 0,018 Y - 0,227}$$

Fig. 51 - Corrélation entre teneur en P₅ (Y) et intensité du B.I. (X)
Droites de régression. M = moyenne

Y= Teneur en P₅
μg/g.m.f



de brunir au cours de la conservation, devraient être respectivement de :

- 70 à 83 $\mu\text{g/g.m.f.}$ pour la teneur globale
- 1,7 à 2,6 " " P_4
- 12,6 à 13,4 " " P_5

Pour atteindre ces valeurs il faudrait cependant laisser les fruits avoir une maturation plus avancée sur pied, comme nous avons pu le constater en étudiant les variations de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation (Chapitre III).

5 - Corrélation entre intensité du B.I. et D.O. à 280 nm de l'extrait de la phase aqueuse (P.A.).

Nous avons mesuré au spectrophotomètre les D.O. des extraits bruts et purifiés correspondant aux 101 fruits précédents en faisant la lecture à 280 nm (l'extrait initial de concentration 2 g/ml étant dilué de 1/51 dans l'éthanol à 80 %). Rappelons que presque la totalité des substances responsables de l'absorption vers 280 nm passent dans la phase aqueuse après purification de l'extrait brut (Chap. II) d'une part et que, d'autre part, la relation $D.O._{Ha}(280 \text{ nm}) = D.O._{AE}(280 \text{ nm}) + D.O._{PA}(280 \text{ nm}) + D.O._E(280 \text{ nm})$ reste toujours vérifiée dans chacun des cas d'extraits considérés (Chap. III). Partant des valeurs expérimentales obtenues par la mesure des $D.O._{Ha}(280 \text{ nm})$ et $D.O._{AE}(280 \text{ nm})$, nous avons donc déduit les valeurs calculées de $D.O._{PA}(280 \text{ nm})$ des 101 extraits précédents (Tableaux 35 et 36). $D.O._E(280 \text{ nm})$ est négligeable comme nous l'avons vu antérieurement.

La valeur du coefficient de corrélation trouvée -0,67 (Tableaux 31 et 32) permet de conclure qu'il y a une corrélation négative entre l'intensité du B.I. et la D.O. à 280 nm de l'extrait de la phase aqueuse (P.A.) : au fort B.I. correspond une D.O. à 280 nm faible. Il y a donc diminution de cette D.O. avec le B.I. (Fig. 52).

Cette diminution est spécifique des extraits de fruits brunis. En effet, dans le cas des extraits de fruits en cours de maturation sur pied, la $D.O._{PA}(280 \text{ nm})$ varie différemment : il y a une forte augmentation (+ 60%) quand on passe du stade vert au stade 3/4 mûr (récolte normale). Quand le fruit est en surmaturation sur pied, du stade 3/4 au stade 4/4 mûr, l'augmentation observée devient faible (+ 6%).

Tableau 35 - Corrélation entre intensité du B.I. et D.O. à 280 nm de l'extrait de la phase aqueuse (P A). Calculs préliminaires

B.I. (X)	D.O. P A à 280 nm (Y)	(X - \bar{X})	(Y - \bar{Y})	(X- \bar{X}) (Y- \bar{Y})	(X - \bar{X}) ²	(Y - \bar{Y}) ²
0,02	0,583	- 1,278	0,121	- 0,1546	1,633	0,01464
0,03	0,531	- 1,268	0,069	- 0,0875	1,608	0,00476
0,06	0,512	- 1,238	0,050	- 0,0619	1,533	0,00250
0,125	0,516	- 1,173	0,054	- 0,0633	1,376	0,00292
0,25	0,508	- 1,048	0,046	- 0,0482	1,098	0,00212
0,38	0,410	- 0,918	- 0,052	0,0477	0,843	0,00270
0,50	0,448	- 0,798	- 0,014	0,0112	0,637	0,00020
0,75	0,439	- 0,548	- 0,023	0,0126	0,300	0,00053
1	0,462	- 0,298	0,000	0,0000	0,089	0,0000
1,25	0,440	- 0,048	- 0,022	0,0011	0,002	0,00048
1,50	0,441	0,202	- 0,021	- 0,0042	0,041	0,00044
1,75	0,437	0,452	- 0,025	- 0,0113	0,204	0,00063
2	0,426	0,702	- 0,036	- 0,0253	0,492	0,00130
2,25	0,461	0,952	- 0,001	- 0,0010	0,906	0,00000
2,50	0,415	1,202	- 0,047	- 0,0565	1,445	0,00221
2,75	0,430	1,452	- 0,032	- 0,0465	2,108	0,00102
3,0	0,421	1,702	- 0,041	- 0,0698	2,897	0,00168
3,25	0,437	1,952	- 0,025	- 0,0488	3,810	0,00063

$$\bar{X} = 1,298$$

$$\bar{Y} = 0,462$$

Tableau 36 - Corrélation entre intensité du B.I. et D.O. à 280 nm
de l'extrait de la phase aqueuse (P A).

Calcul du coefficient de corrélation :

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum X = 1,298 \quad n = 18 \quad \bar{Y} = \frac{1}{n} \sum Y = 0,462$$

$$\sigma_x^2 = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})^2 = 1,16794 \quad \sigma_y^2 = \frac{1}{n} \sum (Y - \bar{Y})^2 = 0,002153$$

$$p = \frac{1}{n} \sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y}) = 0,03374$$

(covariance)

$$r = \frac{p}{\sigma_x \sigma_y} = \frac{-0,03374}{1,0807 \times 0,0464} = -0,67$$

Détermination des droites de régression :

• Droite de régression de Y en X :

$$Y - \bar{Y} = b_{y/x} (X - \bar{X}), \quad b_{y/x} = \frac{p}{\sigma_x^2} = 0,029$$

$$\underline{Y = -0,029X + 0,499}$$

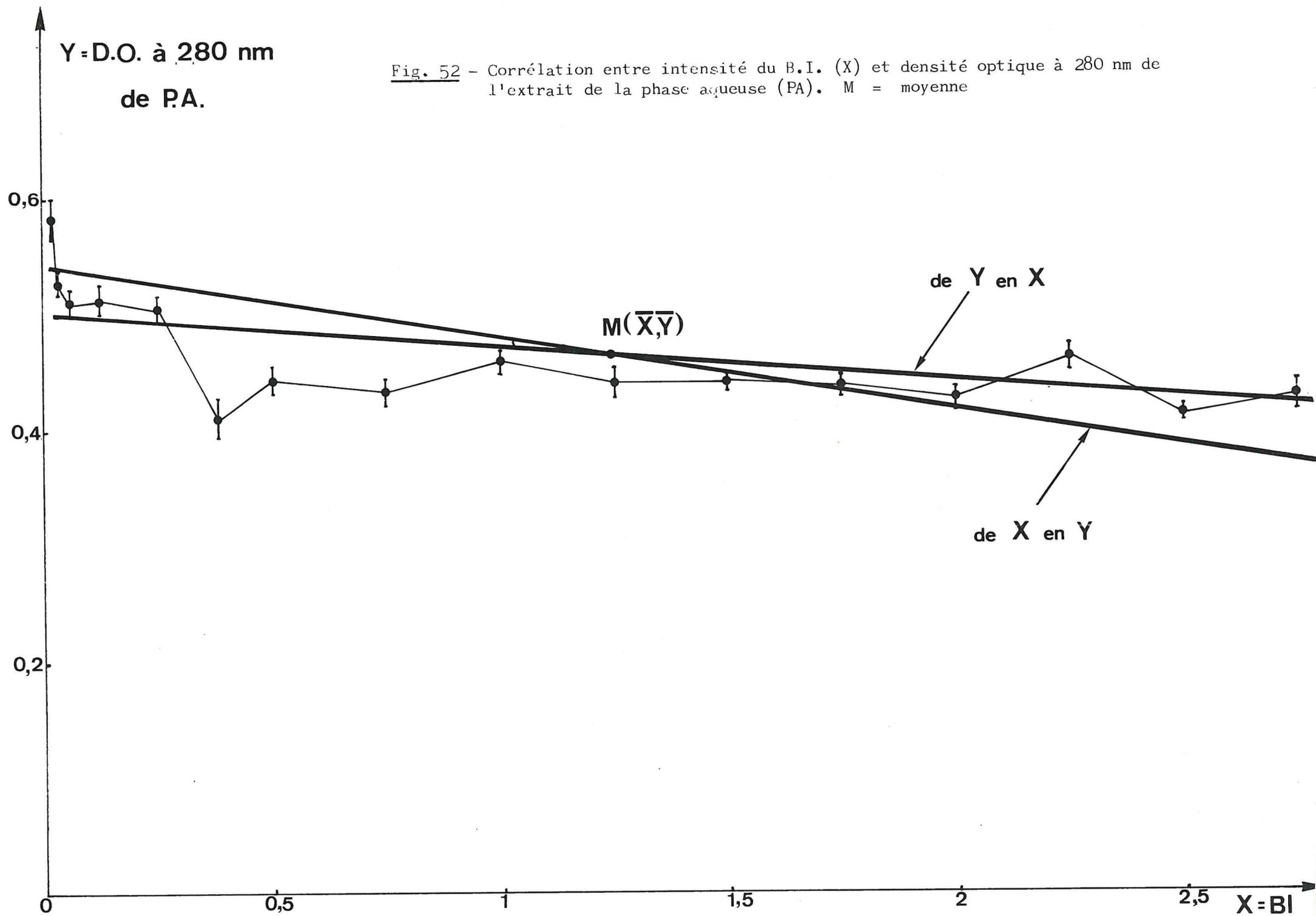
• Droite de régression de X en Y :

$$X - \bar{X} = b_{x/y} (Y - \bar{Y}), \quad b_{x/y} = \frac{p}{\sigma_y^2} = -15,67$$

$$\underline{X = -15,67Y + 8,54}$$

Y = D.O. à 280 nm
de P.A.

Fig. 52 - Corrélation entre intensité du B.I. (X) et densité optique à 280 nm de l'extrait de la phase aqueuse (PA). M = moyenne



Les composés, phénoliques ou non, qui absorbent vers 280 nm sont nombreux (voir Chap. II). Il est vraisemblable que l'acide ascorbique qui présente une bande d'absorption en lumière ultra-violette vers 265 nm prene part d'une manière significative dans cette absorption et que la diminution de sa concentration dans les fruits, comme l'ont mis en évidence I.R.F.A. (1975) ; TEISSON (1977) puisse être rapprochée de cette diminution de D.O. à 280 nm.

V - RECHERCHE d'une CORRELATION entre l'APPARITION du B.I. et l'EVOLUTION des O-DIPHENOLS.

Nous avons vu précédemment qu'il y a une concomitance entre le développement et l'intensification du B.I. d'une part et l'accumulation de P_4 (o-diphénol) et de P_5 (monophénol) d'autre part et que les deux phénomènes sont corrélés positivement.

L'examen des résultats rassemblés dans le Tableau 37 permet de constater que cette simultanéité est vérifiée à tout moment mais vraisemblablement à une échelle de temps légèrement décalée, par rapport à l'apparition des premiers symptômes du B.I. En effet, dans les tout premiers symptômes aucun brunissement n'est visible alors que quelques bases d'yeux deviennent translucides. Comparativement aux valeurs prises pour référence (valeurs de P_4 pour B.I. = 0), on observe une faible augmentation de teneur en P_4 mais il n'y a pas d'accumulation prépondérante pendant cette phase.

On peut remarquer que P_5 évolue également dans le même sens avec un taux d'augmentation de 27 à 35 % et P_4 de (+ 20 %) à (+ 30 %) avant l'apparition du brunissement visible. Par ailleurs, entre le stade de B.I. nul et le stade de quelques bases d'yeux translucides des fruits après conservation, il n'y a pratiquement aucune différence au point de vue valeur de P_4 . Par contre, P_5 double de teneur quand le B.I. est nul par rapport au stade d'yeux

Tableau 37 - Variations des teneurs en P_5 et P_4 liées à l'apparition du B.I. Les résultats rapportés représentent des moyennes de valeurs expérimentales (voir tableaux précédents). Pour le B.I. = 0 les valeurs de P_5 et P_4 proviennent de 3 dosages sur 3 fruits.

B.I.	Nombre de bases d'yeux translucides avec ou sans B.I	P_5 ($\mu\text{g/g.m.f.}$)	P_4 ($\mu\text{g/g.m.f.}$)
0	0	11,7	2,1
0 *		12,3 - 13,4 *	1,7 - 2,4 *
0,02	5 à 10 (sans B^t visible)	6,8	2,2
0,03	supérieur à 10 (sans B^t visible)	9,3	3,1
0,06	B^t visible dans certains vaisseaux des bases translucides	14,2	3,9
0,125	B.I. et bases d'yeux translucides	21,7	5,2
0,250	B.I.	26,2	8,6

* : valeurs théoriques calculées à partir des droites de régression.

B^t : brunissement

translucides et sans brunissement visible. Ce qui semble signifier que l'augmentation de teneur en P_4 (et le B.I. plus tard) dépendrait, entre autres facteurs, du niveau de teneur initiale en P_5 dans les fruits. Les premières traces de B.I. semblent apparaître spécifiquement dans les fruits en cours de conservation dont les teneurs en P_5 sont inférieures à la valeur de référence $11,7 \mu\text{g/g.m.f.}$ (pour B.I. = 0). La connaissance de la teneur en P_5 serait donc, peut-être, un indice qui permettrait de reconnaître les fruits qui pourraient ou non brunir.

De l'ensemble de ces observations, deux idées essentielles peuvent être dégagées :

1 - A l'apparition des premiers signes du B.I. (bases d'yeux translucides mais sans brunissement visible) il est possible que la synthèse de P_4 et de P_5 (en vue du B.I.) débute avant l'utilisation partielle de P_4 (brunissement), mais les faibles augmentations de teneur en P_4 et en P_5 observées au cours de cette phase, avant l'apparition du brunissement visible, montrent que le décalage de temps, s'il existe, semble être relativement faible. Le brunissement ne devient visible à l'observation qu'à partir d'une valeur égale à 1,9 fois la teneur "normale" en P_4 . On peut penser alors que le mécanisme du phénomène du B.I. procéderait pendant la phase de bases d'yeux translucide (sans brunissement visible) par une activation et des réactions d'initiation des enzymes de synthèse de type PAL (phénylalanine-ammonia-lyase) (MAIER et HASEGAMA, 1970 ; AOKI et al., 1971a, 1971b) et P.O à activité hydroxylante (CHALLICE et LIAMS, 1970 ; MACHEIX, 1974). Dans un second temps qui correspond à la phase de plus en plus active du B.I., l'activité synthétique (en P_4 et en P_5) telle qu'elle est suggérée par les résultats précédemment exposés, l'emporte sur l'activité oxydative utilisant les substrats oxydables dont le plus important est P_4 (o-diphénol).

Comme nous l'avons montré dans les études précédentes, l'intensité du B.I. varie directement en fonction de la concentration en P_4 (il en est de même pour P_5). Une bonne partie de P_4 "synthétisée" n'est cependant pas utilisée (oxydée), la partie dosée. Ce qui suggère que la potentialité de l'ananas en P_4 susceptible d'être oxydé est quantitativement limitée, autrement dit, le B.I. dépend principalement de la concentration en enzymes d'oxydation, vraisemblablement en peroxydases à activité oxydative (TEISSON, 1977).

Les substrats n'étant plus limitants, les enzymes le deviendraient.

2 - Contrairement aux résultats obtenus par TEISSON (1977) en ce qui concerne la teneur en o-diphénols totaux, et ceci a été observé et démontré lors des études précédentes, il n'y a pas d'accumulation importante en o-diphénols (P_4) avant l'apparition du B.I., ni pendant le développement des premiers symptômes (tissus translucides à la base des yeux). Les faibles augmentations de teneurs en P_4 (et en P_5) observées pendant cette phase du B.I., dues vraisemblablement aux réactions d'initiation des enzymes de synthèse, ne permettent pas, d'après les techniques de dosage mises en oeuvre, de trouver des teneurs en o-diphénols (P_4) extrêmement différentes de celles rencontrées classiquement dans nos résultats. Ces teneurs (en P_4) sont en moyenne de 2,2 μg par gramme de matière fraîche pour un B.I. = 0 et de 3,1 à 3,9 μg par gramme de matière fraîche lorsque le début de brunissement devient visible. Rappelons qu'il n'y a pas, non plus, de diminution de teneur en o-diphénols (P_4) au cours du brunissement, contrairement à ce qu'indique cet auteur. Il faut souligner deux points partiellement contradictoires et complémentaires dans le phénomène du B.I. : la synthèse importante de P_4 (et de P_5) d'une part, et d'autre part l'utilisation (oxydation) d'une partie de P_4 qui produit le brunissement. La première des deux activités est cependant, comme nous l'avons déjà signalé, prépondérante par rapport à la seconde.

En conclusion il semble donc qu'il existe une corrélation entre l'évolution des o-diphénols (P_4) et l'apparition du B.I. et que les activités enzymatiques (activités synthétique et oxydative) deviennent vraisemblablement le facteur déterminant du B.I.

VI - INFLUENCE de QUELQUES FACTEURS PHYSIQUES ou PHYSIOLOGIQUES
sur l'EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES
au COURS de la CONSERVATION de l'ANANAS
en RAPPORT avec l'APPARITION du BRUNISSEMENT INTERNE

L'importance du choc thermique dans l'induction des désordres physiologiques des organes végétaux, en particulier les fruits en cours de conservation, a été rapportée dans de nombreux travaux. On sait que d'autres facteurs de sensibilisation peuvent aussi s'ajouter à l'action de la température tels que la pratique culturale, la nutrition minérale, les conditions climatiques, la maturation (WILKINSON, 1970), l'âge physiologique de l'organe (WEURMAN et SWAIN, 1955). Les mêmes facteurs ont été étudiés et semblent intervenir dans le cas de l'ananas (I.R.F.A., 1975).

PLANK (1938, 1941) et DAVIES (1937), cités par LYONS (1973) ont tenté d'expliquer les désordres induits, par l'équilibre entre deux facteurs thermosensibles agissant en sens inverse : il y a augmentation de l'induction lorsque la température baisse et apparition des symptômes de plus en plus intenses au fur et à mesure que la température s'élève.

Le B.I. de l'ananas qui ne se manifeste généralement que pendant la phase de commercialisation du fruit, semble être un cas typique de cette double exigence.

Dans le but de déterminer l'influence de la température et du stade de maturation sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques, en rapport avec l'apparition du B.I., nous avons réalisé sur différentes catégories de fruits quelques expériences de simulation de conservation. Les conditions expérimentales sont identiques à celles définies dans le Chapitre I.

Pour cela nous avons étudié plus particulièrement les variations de teneurs en P_5 , P_4 et P_3 , liées au phénomène du B.I. (en $\mu\text{g/g.m.f.}$).

A - INFLUENCE de la TEMPERATURE de CONSERVATION sur l'EVOLUTION des DERIVES HYDROXYCINNAMIQUES (P_5 , P_4 , P_3 ...).

La réfrigération de l'ananas à 8°C est considérée généralement comme la phase d'induction du phénomène du B.I. alors que la mise à 20°C comme la phase de développement du B.I. Dans les expériences réalisées nous avons utilisé ces deux températures, successivement au cours des mêmes manipulations et séparément dans des traitements différents.

1 - Conservation à deux paliers de température, à 8°C et à 20°C .

Cette expérience est identique aux simulations classiques de transport à 8°C et de conservation à 20°C (phase de commercialisation).

Les résultats attendus demeurent semblables à ceux déjà rencontrés dans les études précédentes.

Il n'y a , ni brunissement interne , ni variations de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques significatives pendant la mise à 8°C . Par contre, pendant la conservation à 20°C , un brunissement interne se déclenche et se développe progressivement dans le temps, accompagné d'une augmentation importante de teneurs en P_5 et en P_4 et d'une diminution significative de teneurs en P_3 et autres composés (Tableau 38).

Remarque :

Les brunissements obtenus ne sont cependant pas de même intensité dans chacun des cas considérés et il en est de même pour les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques correspondantes (variabilité liée au matériel, Chap. II).

Tableau 38 - Influence de la température sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) en rapport avec l'apparition du B.I. Conservation à deux paliers de température (8° et 20°C) des fruits 3/4 mûrs à la récolte. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$ Zones étudiées : Zones 21

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J mise à 8°C	0	4,2 4,9 M = 5,1 6,1	1,5 1,0 M = 1,2 1,2	5,5 7,0 M = 6,1 5,9
I = J = 10 sortie de 8°C et mise à 20°C	0	5,7 6,6 M = 6,1 6,0	1,6 2,0 M = 1,8 1,9	5,3 6,2 M = 5,7 5,7
I + 8 à 20°C	tr - $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{2}$	22,8 27,1 M = 30,1 40,4	6,8 7,9 M = 10,4 16,5	4,3 3,9 M = 3,9 3,5
I + 15 à 20°C	1 1 $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{2}$ - 1	76,2 82,3 M = 75,1 66,7	31,0 42,7 M = 33,9 28,2	2,7 2,1 M = 2,7 3,4

M = moyenne

tr = traces de B.I. (bases d'yeux translucides)

La note attribuée correspond au fruit entier.

Au fort brunissement interne correspondent toujours des teneurs élevées en P_5 et en P_4 , et parallèlement des teneurs faibles en P_3 et autres composés (voir études de corrélation du même Chap. IV).

2 - Conservation à température constante, à 8°C.

L'analyse des résultats présentés dans le Tableau 39 nous permet de faire les observations suivantes :

Il apparaît un brunissement interne faible, à l'état de traces, à partir du I + 8ème jour de conservation des fruits à 8°C et simultanément, par rapport aux valeurs initiales au jour J, il y a augmentation de teneurs en P_5 (+ 64 %) et en P_4 (+ 66 %) et diminution de teneur en P_3 (- 26 %) et autres composés.

Cette expérience semble donc prouver qu'à "basse température", telle qu'à 8°C, il y a évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P_5 , P_4 , P_3 ...) en rapport avec l'apparition d'un brunissement interne faible au point de vue intensité. En effet, comparativement aux fruits conservés à deux paliers de température (8°C et 20°C) précédents, on peut remarquer qu'il y a 2 fois moins de P_5 et P_4 à I + 8 et 3 fois moins à I + 15 quand les fruits sont maintenus constamment à 8°C.

3 - Conservation à température constante, à 20°C.

Les résultats du Tableau 40 montre qu'un B.I. fort apparaît assez tôt, dès le jour I = J + 10, avec une augmentation importante de teneur en P_5 (+ 95 %) et en P_4 (+ 94 %) et une diminution de teneur en P_3 (- 52 %).

Par rapport aux fruits maintenus constamment à 8°C on trouve dans les fruits conservés à 20°C :

12 fois plus de P_5 et 11 fois plus de P_4 , à I = J + 10, et
6 fois " et 7 " " à I + 8

La conservation à température constante, à 20°C, entraîne donc chez des fruits 3/4 mûrs à la récolte des variations quantitatives des dérivés hydroxycinnamiques (P_5 , P_4 , P_3 ...) très nettes et très significatives, liées à l'apparition d'un brunissement interne qui évolue progressivement dans le temps.

Tableau 39 - Influence de la température sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) en rapport avec l'apparition du B.I. chez des fruits 3/4 mûrs à la récolte et conservés à température constante à 8°C. Résultats exprimés en µg/g.m.f. Zones étudiées : zones 21.

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J mise à 8°C	0	5,2 4,6 M = 4,9 4,8	1,5 1,2 M = 1,5 1,8	6,4 5,9 M = 6,1 6,0
I = J + 10 à 8°C	0	6,1 5,5 M = 6,1 6,7	1,3 1,8 M = 1,6 1,7	5,2 5,7 M = 5,8 6,5
I + 8 à 8°C	tr tr tr	14,3 13,0 M = 13,7 13,7	3,3 4,7 M = 4,4 5,1	4,3 5,8 M = 5,1 5,1
I + 15 à 8°C	tr - $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$ tr - $\frac{1}{4}$	25,5 26,1 M = 25,1 23,7	10,2 8,7 M = 9,6 9,8	4,7 3,8 M = 4,5 5,0

M = moyenne

tr = traces de B.I. (bases d'yeux translucides)

La note attribuée correspond au fruit entier.

Tableau 40 - Influence de la température sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) en rapport avec l'apparition du B.I. Conservation à température constante à 20°C des fruits 3/4 mûrs à la récolte. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$
Zones étudiées : zones 21

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J mise à 20°C	0	4,3 5,7 M = 4,7 4,1	1,8 1,5 M = 1,7 1,7	5,7 6,0 M = 5,8 5,8
I = J + 10 à 20°C	$\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$ $\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$	68,1 71,5 M = 70,7 72,4	16,2 19,5 M = 16,9 15,1	4,1 3,6 M = 3,6 3,2
I + 8 à 20°C	$\frac{1}{2} - 1$ $\frac{1}{2} - 1$ 1 - 1 $\frac{1}{2}$	85,2 86,1 M = 86,7 88,7	39,4 25,8 M = 30,7 26,9	2,8 3,5 M = 2,8 2,0
I + 15 à 20°C		-	-	-

M = moyenne

Remarque : A I + 15, tous les fruits traités sont sénescents avec un B.I. "supérieur" à 1. A ce stade il est difficile de distinguer l'importance de l'un ou de l'autre phénomène. C'est la raison pour laquelle nous avons éliminé ces fruits de notre analyse.

Remarque :

Les deux expériences de conservation à températures constantes, à 8°C et à 20°C ont été réalisées une seule fois et bien que le nombre de fruits échantillonnés à chaque date de prélèvement ait été de 3 à 4, les résultats demanderaient à être confirmés.

L'ensemble des résultats obtenus par l'action de la température de conservation nous permet cependant de dégager trois points essentiels :

- La conservation à température constante, à 8°C retarde l'expression du B.I. (un B.I. à l'état de traces) et de ce fait l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques se trouve ralentie. L'augmentation de teneurs en P₅ et en P₄, caractéristique spécifique d'un brunissement interne, entre autres variations, est généralement faible en fin de conservation. Il semble donc que l'activité synthétique qui doit conduire à l'accumulation de P₅ et de P₄ dans le cas de B.I. normal, d'une part, et d'autre part, l'activité oxydative qui utilise partiellement P₄ pour le produit de brunissement, seraient fortement influencées par les basses températures.

- L'effet de la conservation des fruits à 20°C est de favoriser d'une part l'augmentation importante de teneurs en P₅ et en P₄ et la diminution d'autres composés (P₃ ...) et, d'autre part le développement d'un B.I. qui devient de plus en plus intense pendant toute la durée de la conservation.

- La notion d'induction du B.I. à 8°C est tout à fait relative puisque le B.I. apparaît aussi bien à 8°C qu'à 20°C. La seule différence se situe dans le délai d'expression et l'intensité du phénomène. Autrement dit la mise à la température de 8°C n'est pas une condition nécessaire pour que le phénomène du B.I. se produise normalement à la température de 20°C. Le maintien à la température de 20°C semble par contre sensibiliser plus l'ananas au B.I. que la réfrigération constante à 8°C. Il est probable que la température de 20°C soit déjà suffisamment basse pour permettre l'induction et le développement du B.I. si l'on tient compte du fait qu'au champ la température à l'intérieur du fruit peut varier de 22 à 34°C et celle des zones sous-corticale peut atteindre 50°C (I.R.F.A., 1975). AKAMINE et al. (1975) en faisant subir aux fruits (Ananas Comusus L. Merr. cv. Smooth Cayenne) des traitements thermiques à 32,3 - 37,8°C,

avant ou après la réfrigération à 7,2°C, obtiennent une réduction sensible de l' "endogenous brown spot". Bien que cela n'a pas été explicité dans les conclusions de ces auteurs, on peut penser que le faible brunissement (et vraisemblablement les faibles variations des dérivés hydroxycinnamiques), qu'ils ont obtenu dans les deux types de traitements thermiques, serait dû à l'induction par le froid (réfrigération à 7,2°C).

Le choc thermique dû aux basses températures ne serait peut-être qu'un des aspects du mécanisme inducteur dans lequel pourraient intervenir d'autres facteurs liés à certains phénomènes physiologiques (maturation, âge physiologique, survie du fruit, ...), métaboliques (ralentissement de certaines activités métaboliques, activités enzymatiques, fonctionnement des systèmes de régulation, potentialité en substrats phénoliques oxydables, ...).

Il est à noter que certains fruits ne présentent aucun symptôme de B.I. après la conservation. Sur le plan des composés phénoliques leurs teneurs en dérivés hydroxycinnamiques restent "normales" (voir Chap. III). Cette situation se rencontre surtout chez des fruits complètement mûrs avant la conservation (I.R.F.A., 1975 ; observations personnelles).

B - INFLUENCE de la MATURATION sur l'EVOLUTION des DERIVES HYDROXY-CINNAMIQUES (P₅, P₄, P₃, ...) LIEE à l'APPARITION du B.I.

Les différentes zones de l'ananas atteignent au moment de la coupe un stade de maturation bien déterminé. Le bas ou zone 4, qui mûrit en premier, ne présente aucun symptômes de B.I. chez les fruits dits "mûrs" (généralement 3/4 mûrs), quelles que soient les conditions thermiques de conservation. Y a-t-il un rapport entre la maturation et la capacité du fruit à brunir ?

Pour essayer de répondre à cette question nous avons étudié l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) liée à l'apparition du B.I., chez des fruits 4/4 mûrs et verts à la récolte en réalisant dans chacun des cas des simulations de conservation à des conditions de température différentes.

1 - Fruits 4/4 mûrs à la récolte.

Les fruits qui nous sont parvenus (récolte 1976) étaient en réalité au stade 7/8 mûrs : 2 à 3 rangées circulaires d'yeux sous-jacentes à la couronne

tournaient encore du vert au jaune au début de l'expérimentation.

a - Conservation à deux paliers de température (8°C et 20°C).

D'après les résultats rapportés dans le Tableau 41 un brunissement faible à l'état de traces apparaît dès le jour I + 8, à 20°C, et ne devient visible qu'à partir de I + 15. Conjointement l'évolution quantitative de P₅, P₄ et P₃ reste modeste sinon faible.

Par rapport à des fruits 3/4 mûrs à la récolte, traités dans les mêmes conditions thermiques, les fruits 4/4 mûrs à la récolte accusent 3 fois moins de P₅ et 4 fois moins de P₄ avec un brunissement interne nettement plus faible.

b - Conservation à température constante, à 8°C.

Dans le cas des fruits maintenus constamment à 8°C, il n'y a pas de variation significative en P₅ et en P₄. Les autres dérivés hydroxycinnamiques (P₃ ...) ne semblent subir aucune modification d'ordre quantitatif. Parallèlement aucun symptôme de B.I. n'apparaît pendant toute la durée de la conservation (Tableau 42).

c - Conservation à température constante, à 20°C (tableau 43).

Contrairement à l'expérience précédente, la conservation à 20°C conduit à une augmentation très significative de teneurs en P₅ (+ 89 %) et en P₄ (+ 91 %) et à une diminution de P₃ (- 27 %) à I + 8 auquel correspond un brunissement faible. Les résultats ainsi obtenus sont cependant deux fois moins forts que ceux des fruits 3/4 mûrs à la récolte, traités et analysés dans les mêmes conditions.

D'après ces résultats il est donc clair que l'augmentation de teneurs en P₅ et en P₄ et la diminution d'autres dérivés hydroxycinnamiques, liées à l'apparition du B.I. qui est faible en général, soient moins importantes, contrairement au cas classique chez les fruits 3/4 mûrs à la récolte.

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le faible B.I. observé :

- Il n'y a pas d'augmentation spectaculaire de teneurs en P₅ et P₄, susceptibles de conduire à un B.I. fort. Ce qui semble supposer l'existence de faibles activités synthétique et oxydative de ces deux composés au cours de la conservation des fruits 4/4 mûrs à la récolte.

Tableau 41 - Influence de la maturation sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) liée à l'apparition du B.I. Conservation à deux paliers de température : 8°C et 20°C de fruits 4/4 mûrs à la récolte. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$ Zones étudiées : zones 21

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J mise à 8°C	0	- 5,7 M = 6,0 6,3	2,5 2,1 M = 2,2 1,9	7,2 6,5 M = 7,2 8,0
I = J + 10 sortie de 8°C mise à 20°C	0	4,8 6,1 M = 5,5 5,5	1,7 2,2 M = 1,8 1,5	6,3 7,9 M = 7,1 -
I + 8 à 20°C	0 f.tr. f.tr.	6,9 11,5 M = 9,4 9,8	1,8 2,7 M = 2,6 3,2	5,7 7,3 M = 7,2 8,6
I + 15 à 20°C	tr tr - $\frac{1}{4}$ tr - $\frac{1}{4}$	18,4 25,2 M = 22,7 24,6	5,1 6,8 M = 6,9 8,8	4,9 5,5 M = 5,5 6,1

M = moyenne

f.tr.= faibles traces de B.I.

tr. = traces de B.I. (bases d'yeux translucides)

La note attribuée correspond au fruit entier.

Tableau 42 - Influence de la maturation sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) liée à l'apparition du B.I. Conservation à température constante, à 8°C, des fruits 4/4 mûrs à la récolte. Résultats exprimés en µg/g.m.f.
Zones étudiées : zones 21

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J mise à 8°C	0	6,2 5,8 M = 6,2 6,5	1,6 2,4 M = 2,0 2,0	6,8 6,2 M = 6,9 7,9
I = J + 10 à 8°C	0	5,4 6,0 M = 5,5 5,2	1,3 1,8 M = 1,8 2,2	5,3 7,5 M = 6,5 6,6
I + 8 à 8°C	0	7,0 6,3 M = 6,6 6,5	2,5 1,4 M = 1,9 1,8	8,1 6,2 M = 7,1 7,0
I = 15 à 8°C	0	8,6 10,9 M = 9,7 8,0	1,7 2,0 M = 2,1 2,6	6,8 6,1 M = 6,9 7,8

M = moyenne

Tableau 43 - Influence de la maturation sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P_5 , P_4 , P_3 ...) liée à l'apparition du B.I. Conservation à température constante, à 20°C des fruits 4/4 mûrs à la récolte. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$ Zones étudiées : zones 21

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P_5	P_4	P_3
J mise à 20°C	0	4,5	1,6	6,9
		5,9 M = 4,9	2,3 M = 1,9	5,5 M = 6,4
		4,2	1,9	6,7
I = J + 10 à 20°C	f. tr.	13,8	5,8	6,1
	f. tr.	12,7 M = 13,5	6,2 M = 5,5	5,9 M = 6,1
	tr.	14,1	4,4	6,4
I + 8 à 20°C	$\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$	46,3	20,3	5,2
	$\frac{1}{4}$	43,8 M = 45,1	22,8 M = 20,7	4,3 M = 4,7
	$\frac{1}{4} - \frac{1}{2}$	45,2	19,2	4,6
I + 15 à 20°C		-	-	-

M = moyenne

f.tr. = faibles traces de B.I.

tr. = traces de B.I. (bases d'yeux translucides)

La note attribuée correspond au fruit entier.

Remarque : A I + 15, les fruits sont plus sénescents que brunis.
(B.I. inférieur à 1)

- Du point de vue physiologique, il est vraisemblable que les fruits 4/4 mûrs à la récolte, ait atteint un âge physiologique beaucoup plus avancé ou une constitution tissulaire beaucoup plus ferme qui leur permettraient peut-être de mieux résister à l'action des facteurs inducteurs du B.I. Il est à rapprocher de cette hypothèse le fait que les zones saines d'un fruit affecté par le B.I. qui sont généralement les zones plus mûres, possèdent une résistance électrique deux fois plus forte que les zones brunies (DEULLIN, 1975, cité par I.R.F.A., 1975). Sur le plan des composés phénoliques nous avons vu au Chap.III que les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques vont en croissant des fruits frais verts, 3/4 mûrs, vers les fruits frais 4/4 mûrs. Cette augmentation n'est cependant pas du même ordre de grandeur que celle observée lors du brunissement interne. Mais ce qui est remarquable est que plus on va vers les fruits plus mûrs, moins il semble se produire du B.I. Cette hypothèse paraît vraisemblable quand on observe que la maturation de l'ananas s'effectuant par le bas du fruit et gagnant progressivement le sommet, les zones 4 (zones plus mûres) des fruits 3/4 ou 4/4 mûrs à la récolte ne brunissent jamais après conservation, avec des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques légèrement plus élevées que celles des zones 4 des fruits frais.

Les ananas plus mûrs sont donc potentiellement plus riches en dérivés hydroxycinnamiques mais par contre ils semblent être moins sensibles au phénomène du B.I. Rappelons que cette richesse en dérivés hydroxycinnamiques traduit un état physiologique tout à fait normal et ne correspond nullement à une accumulation préparative ou précoce des substrats susceptibles d'être utilisés ultérieurement au cours d'un brunissement interne.

2 - Fruits verts à la récolte.

De nombreux auteurs dont I.R.F.A. (1975), TEISSON (1977) ont signalé la sensibilité des ananas verts au phénomène du B.I.

Sur le plan des composés phénoliques tel que nous l'avons vu au Chapitre III, les fruits verts sont cependant relativement "pauvres" en dérivés hydroxycinnamiques, vis-à-vis des fruits mûrs.

Nous avons essayé de mettre en évidence l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P_5 , P_4 , P_3 ...) liée à l'apparition du B.I. sur des fruits verts, cueillis 15 jours avant le stade de récolte normale, en déterminant éventuellement l'importance du B.I. déclaré par rapport à des cas classiques.

Conservation à deux paliers de température (8°C et 20°C.

Deux zones du même fruit traité ont été analysées : la zone 21 et la zone 41.

Les résultats consignés dans le Tableau 44, montrent que :

- Il y a un B.I. faible vers la fin de la mise à 8°C, devenant sévères à 20°C, non seulement dans la zone 21 mais également dans la zone 41. Le B.I. observé se développe sur toute la hauteur du fruit (B.I. en colonne).
- L'évolution des dérivés hydroxycinnamiques est très nette, à 20°C. Elle se traduit, dans la zone 21 et au jour I + 8, par une augmentation très significative de teneurs en P₅ (+ 97 %) et en P₄ (+ 99 %). Par contre, P₃ ne varie pas beaucoup en concentration. Une variation très légèrement inférieure s'observe dans la zone 41, avec (+ 95 %) et (+ 98 %) d'augmentation respectivement pour P₅ et P₄.

Comparés aux fruits étudiés précédemment, conservés dans les mêmes conditions expérimentales, les fruits verts à la récolte présentent au jour I + 8, à 20°C :

- 3 fois plus de P₅ et 4 fois plus de P₄ par rapport aux fruits 3/4 mûrs à la récolte, traités.
- 10 fois plus de P₅ et 17 fois plus de P₄ que les fruits 4/4 mûrs à la récolte, traités.

Il y a lieu de remarquer que le nombre d'échantillons utilisés est statistiquement faible et que les résultats exposés, obtenus à la suite d'une seule expérience, mériteraient d'être confirmés, ce qui n'enlève cependant en rien les caractéristiques originales des phénomènes observés.

Il semble donc que l'accumulation de P₅ et de P₄, qui accompagne le brunissement interne, est particulièrement plus importante chez les fruits verts traités que chez d'autres dans les mêmes conditions et s'exprime d'autant plus fortement que le B.I. devient sévère. Ce qui semblerait suggérer d'une part une potentialité très grande de synthèse de P₅ et P₄ liée peut-être au stade plus jeune des fruits et, d'autre part une activité oxydative plus intense.

Tableau 44 - Influence de la maturation sur l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques (P₅, P₄, P₃ ...) liée à l'apparition du B.I. Conservation à deux paliers de température : 8°C et 20°C, de fruits verts à la récolte. Résultats exprimés en $\mu\text{g/g.m.f.}$ Zones étudiées : zones 21 et 41 des mêmes fruits.

ZONES 21 :

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J (mise à 8°C)	0	2,9	0,4	2,1
		3,4 M = 2,8	0,6 M = 0,4	4,5 M = 3,5
		2,2	0,3	3,8
J + 10 = I sortie de 8°C mise à 20°C	tr	7,5	2,8	4,7
	tr	8,2 M = 7,9	4,6 M = 3,7	2,5 M = 3,6
I + 8 à 20°C	1 - 1 $\frac{1}{2}$	85,3	39,7	2,8
	2 - 2 $\frac{1}{2}$	97,0 M = 91,1	50,7 M = 45,2	2,0 M = 2,4

ZONES 41 :

Dates (prélèvements)	Note de B.I.	Dérivés hydroxycinnamiques		
		P ₅	P ₄	P ₃
J (mise à 8°C)	0	4,3	0,7	3,6
		5,1 M = 4,4	1,2 M = 0,8	4,9 M = 4,6
		3,8	0,5	5,3
J + 10 = I sortie de 8°C mise à 20°C	tr	9,3	3,2	4,0
	tr	11,0 M = 10,2	4,7 M = 3,9	3,5 M = 3,8
I + 8 à 20°C	1 - 1 $\frac{1}{2}$	92,8	30,6	2,5
	2 - 2 $\frac{1}{2}$	100,4 M = 96,6	49,2 M = 39,9	3,4 M = 2,9

M = moyenne

tr = traces de B.I. (bases d'yeux translucides)

B.I. = brunissement interne ; la note attribuée correspond au fruit entier.

Conclusion :

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de dégager quelques points intéressants :

- Les basses températures ont pour effet de ralentir l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques liée à l'apparition du B.I. et de retarder ainsi l'expression du B.I. En effet l'accumulation de P₅ et de P₄ et le phénomène du B.I. peuvent avoir lieu aussi bien à 8°C qu'à 20°C. Les seules différences qui existent résident dans le délai d'apparition et l'intensité du B.I. A 20°C, ces deux caractéristiques sont plus rapidement et plus fortement exprimées qu'à 8°C.

- Cette évolution est très variable suivant le degré de maturité des fruits. Il y a une faible accumulation de P₅ et P₄, liée à un faible brunissement interne chez les fruits plus mûrs. Par contre, l'augmentation de teneurs en ces deux composés devient quantitativement plus importante avec un B.I. sévère chez les fruits verts à la récolte traités dans les mêmes conditions. Une grande potentialité de synthèse de P₅ et P₄ et d'oxydation d'une partie de P₄ semble être liée au stade plus jeune et diminue du fruit vert au fruit 4/4 mûr.

- Le mécanisme inducteur du B.I. comprend vraisemblablement un certain nombre de facteurs de natures très diverses dont le froid (variations de température vers les températures basses ?), la maturation du fruit, la potentialité en dérivés hydroxycinnamiques oxydables. D'autres facteurs tels que les activités enzymatiques, phénoloxydasiques et peroxydasiques, les systèmes de régulation, la présence de certains co-facteurs et inhibiteurs de brunissement (l'acide ascorbique et autres), qui ont été sommairement présentés ou qui n'ont pas été abordés dans le cadre de ce travail, peuvent peut-être aussi intervenir.

CONCLUSIONS - DISCUSSION

Les résultats expérimentaux que nous venons d'exposer ont permis de préciser le rôle et le comportement des dérivés hydroxycinnamiques vis-à-vis du phénomène de brunissement interne de l'ananas.

Il nous apparaît donc indispensable de rappeler les points importants qui peuvent être dégagés de cette étude. Ils se rapportent aux techniques d'échantillonnage, à l'identification et à l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la maturation et de la conservation, à leur relation avec le B.I. et quelques facteurs physiques ou physiologiques.

1 - Les techniques d'échantillonnage par tranches et couronnes concentriques utilisées permettent de respecter très approximativement l'anatomie du fruit et tiennent compte des gradients de maturité qui existent, en groupant ensemble les zones de même stade physiologique. Si l'échantillonnage par broyage global de toute la pulpe du fruit constitue par contre une technique pratique, sur le plan d'analyse fine elle manque de rigueur et ne rend pas compte des variations qui peuvent avoir lieu dans les différentes parties du fruit : une dilution de teneurs en dérivés hydroxycinnamiques par les zones moins riches sur les zones plus riches, se produit au niveau de chaque échantillon. L'échantillonnage par fruits individuels ou yeux, isolés séparément de l'axe cylindrique central où ils sont insérés, serait sans doute souhaitable mais sa réalisation semble être difficile du fait de la texture ferme et fibreuse des tissus.

2 - L'étude qualitative par chromatographie sur papier a permis de réaliser d'excellentes séparations des 32 à 33 composés phénoliques présents dans l'ananas Comosus, variété Cayenne Lisse, dont 28 à 29 dérivés hydroxycinnamiques. Quinze composés ont pu être identifiés selon les techniques de révélation classiques et d'analyse chimique, parmi lesquelles :

- un ester cinnamique avec le glucose, P₆₃
- dix dérivés p-coumariques (P₅, P₃, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₃₇, P₃₈, P₃₉, P₆₂), dont :
 - un ester avec le glucose : P₃₇
 - deux esters "simples" avec l'acide quinique : P₃₈ et P₃₉
 - cinq esters quiniques isomères : P₃, P₃₃, P₃₄, P₃₅ et P₃₆
 - un dip-coumaryl.1-4 quinique complexe : P₅
 - un acide phénol libre, l'acide p-coumarique : P₆₂
- un ester quinique de l'acide caféique, complexe (di caféyl.1-4 quinique ?) le seul o-diphénol quantitativement appréciable : P₄
- deux esters féruliques avec le glucose, complexes : P₆ et P₃₂
- un ester sinapique avec le glucose, complexe : P₂₆

L'abondance particulièrement remarquable de certains d'entre eux, principalement : P₆, P₅, P₄, P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₂ et P₂₆ a pu être exploitée en mettant en oeuvre un dosage spectrophotométrique simple associée à une séparation chromatographique bidimensionnelle préalable dans les systèmes de solvants B.A.E. (4-1-5)/M.F.E. (3-1-2) directement à partir des extraits purifiés à l'acétate d'éthyle.

Trois faits essentiels peuvent caractériser l'importance des dérivés hydroxycinnamiques chez l'ananas :

- la présence d'acide phénol libre (P₆₂, acide p-coumarique) et d'ester cinnamique (P₆₃, cinnamyl-glucose) en quantité non dosable dans le fruit mais suffisante pour être mise en évidence selon les techniques utilisées. Leur participation à la biosynthèse d'autres molécules phénoliques tels que les dérivés de chaque terme de la série cinnamique, est vraisemblable. L'acide p-coumarique à l'état libre (P₆₂) se trouve en quantité relativement importante dans le pédoncule de l'ananas. Son transfert et sa migration vers le fruit par

la sève semblent bien être possibles. Par ailleurs, un grand nombre de métabolites intermédiaires actifs tels que les dérivés cinnamiques (P₆₃) et p-coumariques (P₆₂, P₃₇, P₃₈, P₃₉, P₃ ...) peut conduire à la formation des dérivés plus complexes : di.p-coumarique (P₅), caféique (P₄), férulique (P₆, P₃₂), sinapique (P₂₆) estérifiés par l'acide quinique ou le glucose.

- tous les termes de la série cinnamique sont représentés, dont les plus abondants et les plus diversifiés sont les dérivés p-coumariques. Les teneurs apparaissent très variables d'un terme à l'autre : très élevées pour l'ensemble des dérivés p-coumariques, moyennes pour les dérivés féruliques et sinapiques, faible pour le seul dérivé caféique. Par ailleurs, les concentrations en dérivé cinnamique et en acide p-coumarique libre restent faibles dans le fruit.

- la diversité de combinaisons des acides phénols avec le glucose et l'acide quinique dans lesquelles sont présentes des liaisons esters. Suivant le terme de l'acide phénol, les deux types d'esters sont exprimés simultanément avec une proportion plus ou moins grande pour l'un ou pour l'autre (c'est le cas des esters p.coumaryl-quiniques qui sont particulièrement nombreux et abondants par rapport à l'ester p.coumaryl-glucose), ou un seul type se définit, c'est le cas des dérivés cinnamyl-glucose, caféyl-quinique, férulyl-glucose et sinapyl-glucose.

En milieu alcalin un déplacement bathochromique des maxima d'absorption s'observe pour tous les dérivés hydroxycinnamiques étudiés, ce qui indique que le radical hydroxyle OH, qui confère à leur noyau benzénique ses caractéristiques phénoliques, est libre.

Une orientation préférentielle de la biosynthèse de certains types d'esters existe chez l'ananas en rapport vraisemblablement avec des phénomènes physiologiques ou métaboliques telles que la croissance, la maturation.

3 - Au cours de la maturation du fruit sur pied les dérivés hydroxycinnamiques évoluent en augmentant de concentration du stade de fruits verts vers le stade de fruits mûrs. Cette augmentation concerne la plupart des composés identifiés dont :

- P₅, di p.coumaryl.1-4 quinique
- P₄, caféyl-quinique (di.caféyl-1,4-quinique)
- P₃ et P₃₈, p.coumaryl-quinique

P₃₇, p.coumaryl-glucose

P₃₂, férulyl-glucose

P₂₆, sinapyl-glucose

Les variations observées sont uniquement d'ordre quantitatif.

En effet les mêmes dérivés hydroxycinnamiques se retrouvent aussi bien chez les fruits verts, 3/4 mûrs, que chez les fruits 4/4 mûrs (en surmaturation sur pied).

Un seul dérivé hydroxycinnamique, P₆ (férulyl-glucose), semble varier inversement, en diminuant de concentration, au cours de la maturation.

4 - La répartition des dérivés hydroxycinnamiques dans l'ananas 3/4 mûr, n'est pas homogène. Il existe des gradients nets dans les fruits : les zones plus mûres ont des teneurs plus élevées que les zones moins mûres et ceci de façon croissante du sommet vers la base et de l'axe cylindrique central vers la pulpe périphérique. Un cas particulier est cependant observé pour le composé P₃ (p.coumaryl-quinique) qui, très abondant dans l'axe cylindrique central, diminue de teneur dans la pulpe périphérique.

Les mêmes gradients ont été observés avec des proportions faibles et élevées respectivement dans les fruits verts et 4/4 mûrs.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'importance des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques dans les zones plus mûres par rapport aux zones moins mûres :

- Tant que le fruit reste sur pied, même jusqu'à un stade de surmaturation, les variations quantitatives se poursuivent normalement. Ce qui suggère deux voies possibles : une intense activité synthétique des dérivés hydroxycinnamiques in situ à partir des éléments simples (P₃₇, P₃₈, P₆₂, P₆₁ ...) existants d'une part et, d'autre part un transfert et une migration des métabolites intermédiaires provenant d'autres organes de la plante (feuille, tige) tels que, l'acide p.coumarique libre (P₆₂) et ses dérivés (P₅, P₃₇, P₃₈ ...). La première voie peut être toutefois la conséquence de la seconde.

- Il est probable que les stades physiologiques étudiés chez l'ananas correspondent à des états équivalents à ceux observés dans beaucoup de fruits, tels que la pomme, en phase de croissance où les dérivés hydroxycinnamiques, en particulier l'acide chlorogénique (MACHEIX, 1974), augmentent d'abord de

concentration pour diminuer ensuite. Au stade de maturation avancée de l'ananas sur pied, cette phase n'est peut-être pas encore atteinte, même dans le cas des fruits 4/4 mûrs (en surmaturation sur pied). Les dérivés hydroxycinnamiques continuent-ils à augmenter de teneurs dans le cas des fruits laissés en surmaturation tardive sur pied ? Ou s'agit-il là d'une évolution vers une forme de stockage d'esters d'acides phénoliques avec les sucres et l'acide quinique dans le fruit ?

Dans les conditions d'observation des fruits étudiés, l'augmentation des teneurs en dérivés hydroxycinnamiques résulte d'un phénomène naturel au niveau du métabolisme des composés phénoliques et est liée étroitement au processus de la maturation de l'ananas.

4 - Sur le plan des composés phénoliques les différences existant entre fruit sain ou non bruni et fruit bruni sont d'ordre qualitatif et quantitatif :

- Trois composés nouveaux apparaissent avec le B.I. :

- un o.diphénol, vraisemblablement un produit d'oxydation de P₄ (caféyl-quinique, un dicaféyl-1,4-quinique ?) : P₄₃
- un produit d'oxydation, à fonction monophénolique : P₃₁₀
- un produit de brunissement constitué de dérivé caféique (P₄) qui chélate des ions ferriques et d'autres dérivés hydroxycinnamiques.

- Le B.I. se caractérise par une accumulation extrêmement importante de P₄ (caféyl-quinique, un dicaféyl-1,4-quinique ?) et de P₅ (di p.coumaryl-1,4 quinique) dont les proportions varient respectivement de 1 à 30 fois et de 1 à 65 fois par rapport aux teneurs normales, suivant l'intensité du B.I., alors que tous les autres composés (P₃, P₃₇, P₃₈, P₃₉, P₃₂, P₃₃, P₃₄, P₃₅, P₃₆, P₂₆, P₆ ...) diminuent sensiblement de concentration parallèlement et simultanément. Comme dans le cas des fruits frais ou des fruits non brunis après conservation, les teneurs en P₅ restent toujours à des valeurs nettement plus élevées que celles de P₄ dans les fruits brunis. La proportion inverse en faveur de P₄ est rarement observée.

- L'importance du maximum d'absorption des extraits d'ananas brunis vers 315 nm est due à l'abondance de P₄ et de P₅ qui absorbent respectivement à 328 nm et à 312 nm en milieu éthanolique à 20 % d'eau. Par contre, le pic

d'absorption vers 280 nm, qui caractérise le spectre en U.V. des extraits de fruits frais ou fruits non brunis après conservation baisse légèrement de niveau dans le cas des extraits de fruits brunis. La connaissance du rapport $r = \frac{\text{D.O. à } 315 \text{ nm}}{\text{D.O. à } 280 \text{ nm}}$, pourrait donc permettre de suivre l'évolution du B.I.

L'accumulation de P₅ et de P₄, et la diminution de teneurs d'autres dérivés hydroxycinnamiques (P₃, P₃₇, P₃₈ ...) dans les fruits brunis, ne peuvent se justifier que par une activité de synthèse et une activité de dégradation intenses in situ. Deux possibilités peuvent être envisagées :

- Par l'action du froid, rapporté par divers auteurs comme étant le facteur inducteur du B .I., selon la théorie de LYONS (1973) une rupture des structures membranaires se produit ayant pour conséquence la mise en contact des substrats et des enzymes. Une voie de synthèse et de dégradation concomitante, peut-être avec une différence de vitesse, s'établirait aussitôt à partir des éléments présents, en l'occurrence les dérivés hydroxycinnamiques (P₆₂, P₃₇, P₃₈, P₃ ...) et autres, conduisant préférentiellement à la synthèse accrue et à l'accumulation de P₅ et de P₄ d'une part et à la disparition progressive des autres composés utilisés, d'autre part.
- En admettant l'hypothèse d'un transfert et d'une migration de métabolites tel que l'acide p.coumarique libre (P₆₂) provenant d'autres organes (feuilles, tige), le fruit coupé (de sa tige) se trouverait dépourvu de sources d'acides p.coumarique et utiliserait alors la réserve du pool phénolique in situ pour la synthèse de P₅ et de P₄.

5 - Les dérivés hydroxycinnamiques sont impliqués dans le phénomène du B.I. de l'ananas, à deux titres :

- En tant que produits de synthèse (P₅ et P₄) dont l'accumulation est en rapport avec l'apparition du B.I. Il y a une très bonne corrélation positive entre l'augmentation de teneur globale en dérivés hydroxycinnamiques, de teneurs en P₅ et en P₄ et l'intensité du B.I. L'accumulation de ces deux composés ne précède pas, au moins avec la précision de la fréquence des points apportés, l'apparition des premiers symptômes du B.I. mais l'accompagne. A l'état de traces de B.I., les teneurs en P₅ et en P₄ sont à peine supérieures aux teneurs "normales" observées dans les fruits frais ou fruits non brunis

après conservation. Par contre, par rapport aux mêmes fruits les teneurs en P_5 et en P_4 deviennent extrêmement élevées lorsque le B.I. s'intensifie. Ce qui tend à montrer que l'évolution des o-diphénols (P_4) et du monophénol (P_5) est liée à l'apparition du B.I.

Il est très intéressant de voir l'activité d'une enzyme comme la P.A.L. (phénylalanine-ammonialyase) dont l'augmentation d'activité précoce est vraisemblable et dont la mesure de l'activité pourrait donner un test précoce de préparation du B.I.

Par ailleurs, il existe une corrélation négative entre la densité optique des extraits mesurée à 280 nm et l'intensité du B.I. Les substances responsables de l'absorption en U.V., vers 280 nm, sont nombreuses, phénoliques ou non. Il est vraisemblable que l'acide ascorbique qui absorbe, dans les mêmes conditions vers 265 nm, prend part d'une manière significative à cette absorption.

- En tant que substrats de brunissement. En effet, l'étude enzymatique, qui a été très sommairement abordée dans ce travail a permis de mettre en évidence une activité oxydative, faible chez les fruits non brunis et grande chez les fruits brunis, semblable à la fois à celles de la phénoloxydase de la pêche, de la tyrosinase et de la peroxydase commerciales, utilisant la plupart des dérivés hydroxycinnamiques dont P_4 et P_5 .

Par ailleurs, l'addition d'inhibiteurs de brunissement, tel que l'acide ascorbique, aux extraits aqueux de fruits brunis, a pour effet de faire régresser l'intensité du brunissement en réduisant les formes quinoniques polymérisables des composés oxydés. Parmi les composés présents après adjonction d'acide ascorbique, seul P_4 augmente de concentration. Ce point particulier montre que P_4 est le substrat principal du B.I.

Par contre, P_5 diminue de concentration dans les mêmes conditions. Il s'agit vraisemblablement d'une réaction chimique d'oxydo-réduction entre d'un côté, P_4 oxydé qui se réduit et de l'autre, P_5 qui s'oxyde.

Il semble donc que le rôle des substances réductrices, telles que l'acide ascorbique, présent dans l'ananas, pourrait être déterminant dans le déclenchement du B.I.

Deux faits essentiels caractérisent donc le phénomène du B.I. de l'ananas : l'activité stimulée des enzymes de synthèse conduisant à l'augmentation de teneurs en P_5 et en P_4 et l'utilisation d'une partie de P_4

produisant le brunissement, deux activités simultanées, mais vraisemblablement avec une différence de vitesse, évolutives dans le temps.

La disparition totale de P₄ (o.diphénol) ne peut être envisagée du fait de son importante accumulation en rapport direct avec l'intensité du B.I. (corrélation positive) d'une part et, d'autre part même dans le cas de B.I. sévère, il reste du P₄ non oxydé, la partie dosable, dont la teneur se situe toujours à un niveau nettement plus élevé que ceux des stades de B.I. intermédiaires. Le facteur limitant sur le plan de brunissement n'est donc pas la teneur en substrats oxydables, puisque ceux-ci se forment et ne s'oxydent que partiellement avec le B.I. et que par ailleurs, il n'y a pas d'accumulation importante de P₄ (ni de P₅) avant l'apparition des premiers symptômes du B.I., mais plutôt les activités enzymatiques responsables de la synthèse de P₄ et de P₅ et de l'utilisation partielle de P₄, d'où l'intérêt qu'il y aurait à étudier quelques systèmes enzymatiques, par exemple la PAL.

6 - La conservation entraîne chez les fruits deux types d'évolution des dérivés hydroxycinnamiques :

- Le premier quand il n'apparaît aucun symptôme de B.I. (fruits non brunis après conservation) correspond à une faible augmentation de teneurs de la plupart des dérivés hydroxycinnamiques, dans le même ordre de grandeur que celui observé chez des fruits en cours de maturation sur pied.

- Le second est lié à l'apparition du B.I. dans laquelle classiquement il y a augmentation progressive de teneurs en P₅ et en P₄ et accumulation importante de ces deux composés avec le B.I. alors que les autres dérivés hydroxycinnamiques diminuent de teneurs parallèlement.

7 - L'étude de quelques facteurs physiques ou physiologiques a permis de mettre en évidence une évolution des dérivés hydroxycinnamiques liée à l'apparition du B.I., significativement influencée par la température de conservation et le stade de maturation du fruit.

A basses températures (à 8°C) il y a une lente expression du B.I. et une augmentation de teneurs en P₅ et en P₄, faible. Par contre, à températures élevées (à 20°C) les phénomènes observés sont vite exprimés et très accentués. Il est donc clair qu'un des effets des basses températures sur le fruit est de ralentir l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques et de ce fait, l'expression du B.I.

L'induction du B.I. à températures élevées (à 20°C) paraît très possible. Ces températures sont-elles déjà suffisamment "basses" par rapport aux températures normales du fruit au champ, pour qu'il y ait peut-être induction du phénomène de B.I. dès les premières variations de température subies par le fruit après la coupe ?

Il est classiquement observé chez les fruits verts et mûrs, en conservation, une différence de sensibilité au B.I.

L'évolution des dérivés hydroxycinnamiques étudiée dans ces fruits tend à montrer que, sur le plan métabolique, l'augmentation de teneurs en P₅ et en P₄ et la diminution de teneurs en d'autres composés (P₃, P₃₇, P₃₈...) en rapport avec l'apparition du B.I. devient de moins en moins importante dans le sens du fruit vert, 3/4 mûr, vers le fruit 4/4 mûr à la récolte.

Les résultats qui viennent d'être rapportés soulèvent de nombreux problèmes intéressants relatifs à la connaissance des dérivés hydroxycinnamiques et du phénomène de B.I. de l'ananas.

D'un point de vue physiologique un certain nombre de questions restent encore sans réponse quant à l'évolution des dérivés hydroxycinnamiques depuis la floraison, pendant la croissance et la surmaturation tardive du fruit sur pied.

D'un point de vue métabolique de diverses voies de recherche peuvent être abordées :

- la détermination des structures chimiques des dérivés hydroxycinnamiques non encore précisées,
- l'étude enzymatique de certaines voies métaboliques conduisant à la biosynthèse de quelques uns d'entre eux,
- l'étude de quelques systèmes d'enzymes dont l'activité est vraisemblablement liée au phénomène du B.I., telle la PAL.

D'un point de vue technologique l'application de certains résultats obtenus devrait permettre de déterminer les valeurs optimales de quelques paramètres physiques ou physiologiques, tels que la température, le stade de maturation, afin de mieux contrôler le B.I. de l'ananas.

B I B L I O G R A P H I E

- AKAMINE E.K. et GOO T. (1971) - "Controlled atmosphere storage of fresh pineapple : Ananas Comosus L. Merr. Smooth Cayenne, Hawaii Agric. Exp. St. Res. Bull. n° 152, p. 1-8.
- AKAMINE E.K., GOO T., STEEPY T., GREIDANUS T., IWAOKA N. (1975) - Control of endogenous brown spot of fresh pineapple in post harvest handling. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 100, n° 1, 60-65.
- ALESSANDRO A., MAZZA P., SANSONI A. - Determination of cynarin and chlorogenic acid in the artichoke. G. Med. Mil., 1975, 125 (5-6), 369-374. Chem. Abst., 1976, 85, 9, 61485.
- ALIBERT G. (1968) - Les acides phénoliques chez Quercus pedunculata Ehrh. Thèse Doct. spécialité, Toulouse, 87 p.
- AOKI S., ARAKI C., KANEKO K. et KATAYAMA O. (1971a) - Occurrence of L-phenylalanine Ammonia-lyase activity in peach fruit during growth. Agric. and Biol. Chem., 34, 5, 784-787.
- AOKI S., ARAKI C., KANEKO K. et KATAYAMA O. (1971b) - L. phenylalanine Ammonia-lyase activities of Japanese Chestnuts, strawberries, apples and brackens. Nihon Skokuhin Kogyo Gokkai-Shi, 17, 505-511. Dans Chem. Abstr., 1972, 76, n° 1827 f.
- AVADHANI P.H. et TOWERS G.H.N. (1961) - Fate of phenylalanine ⁻¹⁴C and cinnamic acid⁻¹⁴C in Malus in relation to phloridzin synthesis. Can. J. Biochem. Physiol., 39, 1605-1616.
- BARBER G.A. et CHANG M.T.Y. (1968) - The enzymic glucosylation of quercetin to quercitrine. Phytochem., 7, 35-39.
- BARLOY H.M., FELDMAN J.R. et WHITE W.V. (1950) - Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies. J. Amer. Chem. Soc., 72, 4178-4182.

- BARUAH F. et SWAIN T. (1953) - The effect of the ascorbic acid in vitro activity of polyphenoloxidase from potato. Biochem. J., 55, 392.
- BATE-SMITH E.C. (1954) - Flavonoids compounds in foods. Adv. Food Res. V, 261-300.
- BATE-SMITH E.C. (1956) - The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution. Sci. Proc. R. Dublin Soc., 27, 165-176.
- BATE-SMITH E.C. (1964) - Paper chromatography of phenolics. In Methods in polyphenol Chemistry, PRIDHAM J.B. éd., 73-79, Pergamon Press, Londres.
- BAUERNFEIND J.C., JAHNS F.W., SMITH E.G., SIEMERS G.F. (1946) - Vitamin C stability in frozen fruit processed with cristalline l-ascorbic acid. The fruit products journal and american food manufacturer, 25, 324-347.
- BAUERNFEIND J.C. et PINKERT D.M. (1970) - Food processing with added ascorbic acid. Adv. in Food Research, 18, 219-315.
- BENDALL D.S. et GREGORY R.P.F. (1963) - Purification of phenol oxidases. In Enzyme Chemistry of phenolic compound. PRIDHAM J.B. éd., Pergamon Press, Londres, 7-32.
- BEZANGER-BEAUQUESNE L. (1971) - La chromatographie des flavonoïdes. In Chromatographie, Electrophorèse, Symposium VI, Presses Académiques Européennes S.C., Bruxelles, 3-13.
- BJÖRKMAN O. et HOLMGREN P. (1960) - Polyphenols and polyphenol oxidases in leaves of *Solidago vigaures*. Physiol. Plant., 13, 582-594.
- BLAKE M.A. et DAVIDSON O.W. (1941) - Some results of acidity and catechol tannin studies of peach fruits. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 39, 201-204.
- BOGDANSKI C.A. (1960) - Localisation du pouvoir réducteur dans la pomme en relation avec sa tenue au cours de l'entreposage frigorifique. Rev. Gén. du Froid, 455-463.
- BOLDUC R.J., CHERRY J.H. et BLAIR B.O. (1970) - Increase indoloacetic acid oxidase activity of winter wheat by cold treatment and gibberellic acid. Plant Physiol., 45 n° 4, 461-464.

- BRADFIELD A.E., FLOOD A.E., HULME A.C. et WILLIAMS A.H. (1952) - Chlorogenic acid in fruit trees. Nature, 170, 168.
- BROSSARD J. (1958) - Contribution à l'étude des réactions tanins-fer. Phénomènes de noircissement dans la "crème de marrons". Thèse d'Ing. C.N.A.M., Paris, 75 p.
- BROWN S.A. et NEISH A.C. (1959) - Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon.
VIII. Isolation of radioactive hydrogenolysis products of lignin. J. Amer. Chem. Soc., 81, 2419-2424.
- BUREAU-BERTHAULT D. (1975) - Relation entre la teneur en o-diphénols et l'aptitude au brunissement de différentes variétés de pêches destinées à la congélation. Mémoire Ing. C.N.A.M., Paris.
- BYRDE R.J.W., FIELDING A.H. et WILLIAMS A.H. (1960) - The role of oxidized polyphenols in the varietal resistance of apples to brown rot. In Phenolics in plants in health and disease. PRIDHAM J.B. éd., Pergamon Press, Londres, 95-99.
- CARTWRIGHT R.A. et ROBERTS E.A.H. (1955) - Theogallin as a galoyl ester of quinic acid. Chem. and Ind., 230-231.
- CHALLIS B.C. et BALLETT C.D. (1975) - Possible cocarcinogenic effects of coffee constituents. Nature, 254, 532-533.
- CHALLICE J.S. et WILLIAMS A.H. (1970) - A comparative biochemical study of phenolase specificity in Malus Pyrus and other plants. Phytochem., 9, 1261-1269.
- CHASSEVENT F. (1969) - L'acide chlorogénique, ses actions physiologiques et pharmacologiques. Ann. Nutr. Alim., 23, 1-14.
- CHUNG J.I., LUH B.S. (1972) - Brown discoloration in canned peaches in relation to polyphenoloxidase activity and anthocyanin. Confructa, 17, n° 1, 8-15.
- COLONNA J.P. (1969) - Sur une méthode de séparation et de dosage des acides monocaféoyl-D-quiniques du caféier. Applications. C.R. Acad. Sci., Paris, 269
- COLONNA J.P. et BOUDET A. (1971a) - Contribution à l'étude des acides monocaféyl-quiniques et de leur biosynthèse chez les végétaux supérieurs. Collection Terre Malgache, Spécial n° 12. Université de Madagascar.

- COLLINS J.L. (1960) - The pineapple. Ed. L. HILL, London, 294 p.
- CÔME D. (1967) - L'inhibition de germination des graines de pommier (Pirus Malus L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires. Thèse Fac. Sci., Paris, 123 p. et Ann. Sci. Natur. Bot., 12ème sér., 8, 371-478.
- CONSTANTINIDES S.M. (1967) - Multiple forms of phenoloxidase. J. Food Sci., 32, 446-450.
- CORNER J.J. et HARBORNE J.B. (1960) - Cinnamic acid derivatives of potato berries. Chem. and Ind., 76.
- CORNER J.J. et SWAIN T. (1965) - Enzymatic synthesis of the sugar esters of hydroxy-aromatic acids. Nature, 207, 634-635.
- CORSE J. (1953) - A new isomer of chlorogenic acid from peaches. Nature, 172, 771-772.
- CORSE J., LUNDIN R.E. et WAISS A.C. (1965) - Identification of several components of isochlorogenic acid. Phytochem., 10, 2705-2711.
- CREASY L.L. (1968) - The increase in PAL activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoids synthesis. Phytochem., 7, 441-446.
- DAVIES W.N., ORPHANOS P.I. et PAPACONSTANTINO (1971) - Changes in polyphenolics in ripening of selected pear varieties. J. Sci. Food Agric., 22, 83-86.
- DE CLERCK J. (1963) - Cours de Brasserie. Ed. Université de Louvain. Institut Agronomique. Heverlee-Louvain. vol. 2, p. 512.
- DILLEY D.R. (1970) - Enzymes. In the Biochemistry of fruits and their Products. volume 1, HULME A.C. éd., Academic Press, Londres, 179-205.
- DUBOUCHET J. (1972) - Quelques aspects de la structure et des fonctions des peroxydases végétales. Ann. Scient. Univ. Besançon, 3ème sér. Bot., fasc. 12, 103-112.
- DULL C.G., YOUNG R.E. et BIALE J.B. (1967) - Respiratory patterns in fruit of pineapple, *Ananas Comosus*, detached at different stages of development. Physiol. Plant., 20, 1059-1065.
- DULL C.G. (1971) - The pineapple : General. In The Biochemistry of fruits and their products. HULME A.C., éd., Academic Press, New-York, London, vol. II, 303-324.

- DUPAIGNE (1953) - Les différences d'indice de maturité entre les diverses parties des fruits (organes et ananas). C.R. Ac. Agric., 39, 737-740.
- FIDLER J.C. et COURSEY D.G. (1969) - Low temperature injury in tropical fruit. Trop. Products Inst. Conf., 103-110.
- FIESER L.F. et FIESER M. (1956) - Organic chemistry. Reynhold Publishing Corporation, New-York.
- FINKLE B.J. et NELSON R.F. (1963) - Enzyme reactions with phenolic compounds a-meta-O-methyl transferase in plants. Biochim. Biophys. Acta. 78, 747-749.
- FISCHER H.O.L. et DANGSCHAT G. (1932) - Konstitution der chlorogensäure. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 65, 1037-1040.
- FISHER D.J. (1965-1966) - Phenolic compounds of the fruit cuticle. A.R. Long Ashton Agric. Hort. Res. Stat., 255-258.
- FLEURIET A. (1975) - Effet des blessures et de l'anaérobiose sur les composés phénoliques des fruits de tomate (*Lycopersicon esculentum*, var. cerasiforme). Thèse Doct. 3ème cycle, Paris, 70 p.
- FLEURIET A. et MACHEIX J.J. (1972) - Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. J. Chromatogr., 74, 339-345.
- FRIEND J. REYNOLDS S.B. et AVEYARD M.A. (1973) - Phenylalanine ammonia-lyase chlorogenic acid, and lignin in potato tuber inoculated with *Phytophthora infestans*, Physiological Plant Pathol., 3, 495-507.
- GAZAVE J.M., ROGER C., ACHARD M., PARROT J.L. (1974) - Polyphenols et résistance capillaire. Compte-rendu de l'Assemblée Générale du Groupe Polyphenols, Lyon, 5.
- GEISSMAN T.A. (1955) - in Modern Methods of Plant Analysis. Vol. III, K. Peach et V. Tracey éditeurs, Springer Verlag, Berlin.
- GEISSMAN T.A. et SWAIN T. (1957) - Biosynthesis of flavonoid compounds in higher plants. Chem. and Ind., 984.
- GOLDACRE P.L., GALSTON A.W. et WEINSTRaub R.L. (1953) - The effect of substituted phenol on the activity of the indoleacetic acid oxidase of peas. Arch. Biochem. Biophys. 43, 358-373.

- GOLDSCHMID O. et HERGERT H.L. (1961) - Examination of western hemlock for lignin precursors (*Tsuga heterophylla*) T.A. P.P.I. U.S.A., 44, n° 12, 858-870.
- GOODWIN T.W. (1965) - Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press, Londres.
- GORTNER W.A. (1963) - Tissue hydroxy-cinnamic acids and soil moisture stress. Nature, London vol. 197, n° 4874, 1316-1317.
- GORTNER W.A. (1965) - Chemical and physical development of the pineapple fruit. IV. Plant pigment constituents. J. Food Sci. n° 1, 30, 30-32.
- GORTNER W.A. et KENT M.J. (1953) - Indoleacetic acid oxidase and an inhibitor in pineapple tissue. J. Biol. Chem. vol. 204 n° 2, 593-603.
- GORTNER W.A. et KENT M.J. (1958) - The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxidase. J. Biol. Chem. vol. 233 n° 3/4, 731-735.
- GORTNER W.A. et SINGLETON V.L. (1965) - Chemical and physical development of the pineapple fruit . III. Nitrogenous and enzyme constituents. J. Food. Sci., v. 30, n° 1, pp. 16-21.
- GRICE H.R., BROWN H.D., BURREL R.C. (1952) - Varietal characteristics influence Browning of frozen peaches. Food engineering, 24, 131-139.
- GRIFFITHS L.A. (1959) - Detection and identification of the polyphenoloxidase substrate of the banana. Nature, London, 184, 58.
- GRODZINSKA-ZACHWIEJA Z., KAHL W. et WARCHOL A. (1967) - Thin-layer chromatography of chlorogenic acid isomers. J. of chromatogr., 29, 362-368.
- GUADAGNI D.G. et NIMMO C.C. (1953) - Effect of growing area on tannin and its relation to astringency in frozen Elberta peaches. Food Tech., 7, 59-61.
- GUADAGNI D.G., SORBER D.G., WILBUR J.S. (1949) - Enzymatic oxidation of phenolic compounds in frozen peaches. Food Technol., 3, 359-364.
- HAHLBROCK K. et GRISEBACH H. (1970) - Formation of coenzyme A esters of cinnamic acids with an enzyme preparation from cell suspension cultures of parsley. FEBS Letters, 11, 62-64.

- HANSON K.R. et ZUCKER M. (1963) - The biosynthesis of chlorogenic acid and related conjugates of the hydroxycinnamic acids chromatographic separation and characterization. J. Biol. Chem., 238, 1105-1115.
- HANSON K.R. (1966) - Chlorogenic acid biosynthesis. Incorporation of (¹⁴C) cinnamic acid into the cinnamoyl and hydroxycinnamoyl conjugates of the potato tuber. Phytochem., 5, 491-499.
- HARBORNE J.B. (1964) - Phenolic glycosides and their natural distribution. In Biochemistry of phenolic compounds, HARBORNE J.B., éd., Academic Press, Londres, 129-169.
- HARBORNE J.B. (1967) - Comparative biochemistry of flavonoids. Academic Press, Londres.
- HARBORNE J.B. et SHERRAT H.P.A. (1957) - The identification of sugars of anthocyanins. Biochem. J. 65, 23 P
- HARBORNE J.B. et CORNER J.J. (1961) - Plant polyphenol-4-hydroxycinnamic-acid-sugar derivatives. Biochem. J., 81, 242-250.
- HAREL E., MAYER A.M. et SHAIN Y. (1964) - Phenolases from apples, their properties subcellular location and inhibition. Physiol. Plant., 17, 921-930.
- HAREL E., MAYER A.M. et SHAIN Y. (1966) - Catechol oxidase, endogenous substrates and browning in developing apples. J. Sci. Food Agri., 17, 389-392.
- HASEGAWA S. et MAYER V.P. (1972) - Cinnamate hydroxylation and the enzymes leading from phenylpyruvate to p-coumarate synthesis in grapefruit tissues. Phytochem., 11, 1365-1370.
- HAYASHI K. (1962) - The anthocyanins, in The Chemistry of flavonoid compounds. T.A. GEISSMAN, éditeur, Pergamon Press, Oxford, p. 248-285.

- HENZE R.E. (1956) - Inhibition of enzymic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. Science, 123, 1174-1175.
- HERRMANN K. (1958) - Über oxydation ferment und phenolische substrate in gemuse und obst : Catechin, oxyzintsäure und o-phenol oxydase. Z. Lebensmittel Unters.u.Forsch., 108, 152-157.
- HERRMANN K. (1973) - The phenolics of fruit. I. Our knowledge of occurrence and concentration of phenolics and of their variations in the growing fruit. Z. Lebensm. Unters.u.Forsch., 151, 41-51.
- HIGUCHI T. et BROWN S.A. (1963) - Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenyl propanoid system in lignification. Can. J. Biochem. and Physiol., 41, 621-628.
- HOEPFNER W. (1932) - Zwei nene Reaktionen fur kaffesäure und chlorogensäure. Chemiker-Zeitung, 56, 991.
- HUET R. (1958) - La composition chimique de l'ananas. Fruits, vol. 13, 5, 183-197.
- HUET R. et TISSEAU M.A. (1959) - Observation sur l'évolution de l'ananas après la coupe. Fruits, vol. 14, 6, 271-274.
- HULME A.C. (1958a) - Transformation des constituants phénoliques de la "peau" des pommes et des poires pendant la croissance et la sénescence. Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 4, 43-50.
- HULME A.C. (1958b) - Some aspects of the biochemistry of apple and pear fruits. Adv. Food Res., 8, 297-413.
- HULME A.C. et EDNEY K.L. (1960) - Phenolic substances in the peel of Cox's Orange Pippin apples with reference to infection by *G. perennans*. In Phenolics in plants in Health and Disease. PRIDHAM J.B., éd., Pergamon Press, Londres, 87-94.
- HULME A.C. et RHODES M.J.C. (1971) - Pomme fruits; In The Biochemistry of fruits and their Products, vol. 2, HULME A.C. éd., Academic Press, Londres, 333-373.
- HULME A.C. et WOOLTORTON L.S.C. (1957) - The organic acid metabolism of apple fruit : changes in individual acids during growth on the tree. J. Sci. Food Agric., 8, 117-122.

- IBRAHIM R.K. et TOWERS G.H.N. (1960) - The identification by chromatography of plant phenolic acids. Arch. Bioch. Bioph., 87, 125-128.
- INGRAHAN L.L. et CORSE J. (1951) - Enzymic browning of fruits. I. Autoxidation of chlorogenic acid. J. Amer. Chem. Soc., 73, 5550-5553.
- I.R.F.A. - Institut de Recherches sur les Fruits et Agrumes. Le Brunissement interne de l'ananas en Côte d'Ivoire, 1975. Documents Internes, 156 p.
- IVANOFF S.S. (1946) - Deteriario inter no parasitario de la pina. Rev. Appl. Mycol., 25, 126-127.
- JEAN J. et REID W.W. (1959) - The chlorogenic acids of tabacco. Chem. and Ind., 655-656.
- JOSLYN M.A. et PONTING J.D. (1951) - Enzyme catalysed oxidative browning of fruit products. Adv. Food Res., 3, 1-44.
- JOSLYN M.A. et GOLDSTEIN J.L. (1964) - Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. Adv. in Food Research, 13, 179-217.
- JURD L. (1957) - The detection of aromatic acids in plants extracts by the ultra-violet absorption spectra of their ions. Arch. Biochem. and Biophys., 66, 284-288.
- JURD L. (1962) - Spectral properties of flavonoids compounds. In The Chemistry of flavonoid compound, GEISSMAN T.A. éd., Pergamon Press, Oxford, 107-155.
- JURD L. (1969) - Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and Structural correlations. Phytochem., 8, 445-462.
- JURD L. et GEISSMAN T.A. (1956) - Absorption spectra of metal complexes of Flavonoid compounds. J. Org. Chem., 21, 1395-1401.
- KAY E., SHANNON L.M. et LEW J.Y. (1967) - Peroxidase isozymes from horse-radish roots. II. Catalytic properties. J. Biol. Chem. vol. 242, 10, 2470-2473.

- KOJIMA M., MINAMIKAWA M., HYODO H. et URITANI I. (1969) - Phytopathological Chemistry of sweet potato with black rot and injury. LXXV. Incorporation of some possible radioactive intermediates into chlorogenic acid in sliced sweet potato tissues. Plant and Cell Physiol., 10, 471-474.
- KOJIMA M. et URITANI I. (1972b) - Elucidation of the structure of a possible intermediate in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue. Plant and Cell Physiol., 13, 1075-1084.
- KOJIMA M. et URITANI I. (1973) - Studies on chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue in special reference to the isolation of a chlorogenic acid intermediate. Plant Physiol., 51, 768-771.
- KRAUSS B.H. (1948) - Anatomy of the vegetative organs of the pineapple "Ananas Comosus" . II. The leaf. Bot. Gaz., 110, n° 2, 159-217.
- KRAUSS B.H. (1949) - Anatomy of the vegetative organs of the pineapple "Ananas Comosus". II. The leaf. Bot. Gaz., 110, n° 3, 333-404.
- KOUKOL J. et CONN E.E. (1961) - The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of. Hordeum vulgare. J. Biol. Chem., 256, 2692-2698.
- LAMOTTE M. (1957) - Initiation aux méthodes statistiques en biologie. 144 p. éd. Masson et Cie.
- LAVOLLAY J., PARROT J.L. (1942) - Sur la nature de la vitamine P. Activité de la catéchine sur la résistance capillaire. C.R. Acad. Sci., Paris, 215, 496-498.
- LAVOLLAY J., PARROT J.L., SEVESTRE J. (1943) - Sur la nature de la vitamine P. L'épicatéchine, substance jusqu'ici la plus active sur la résistance capillaire. C.R. Acad. Sci., Paris, 217, 540-542.
- LAVOLLAY J., SEVESTRE J., DUSSY J. (1944) - Sur la présence de catéchines dans un certain nombre d'espèces végétales alimentaires. C.R. Acad. Sci., Paris, 218, 82-84.
- LAVOLLAY J., LEGRAND G., LEHONGRE G. et NEUMANN J. (1963) - Enzyme specificity in potato polyphenoloxidase. In Enzyme Chemistry of Phenolic compound. J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press, Londres, 33-36.

- LEDERER E. et LEDERER M. (1957) - Chromatography, a review of principles and applications. Elsevier Publishing company, Londres.
- LEVITT J. (1972) - Réponses of plants to environmental stresses. Acad. Press, New-York, London, 697 p.
- LEVY C. et ZUCKER M. (1960) - Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. J. Biol. Chem., 235, 2418-2425.
- LEWIS D.A. (1956) - Protoplasmic streaming in plants sensitive and insensitive to chilling temperatures. Science, 124, 75-76.
- LIEBERMAN M., CRAFT C.C., AUDIA W.V. et WILCOX M.S. (1958) - Biochemical studies of chilling injury in sweet potatoes. Plant Physiol., vol. 33, 5, 307-311.
- LINDET L. (1895) - Sur l'oxydation du tanin de la pomme à cidre. C.R. Acad. Sci., Paris, 120, 370.
- LINFORD M.B. (1932) - Endogenous or non parasitic brown spot. Pineapple Quart. vol. II, 46-58.
- LINFORD M.B., SPIEGELBERG C.H. et OKIMOTO M.C. (1944) - Pineapple fruit disease blemishes and deformities in the Hawaiian Islands. P.R.I. Spec. Rep., 17, 1-63.
- LOCHE J. (1966) - Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac. Thèse publiée dans "Ann. de la Direction des Etudes et de l'Equipe" 3-1966, section 2 (SEITA Inst. de Bergerac), 11-113.
- LOCHE J. et CHOUTEAU J. (1963) - Incidence des carences en Ca, Mg ou P sur l'accumulation des polyphénols dans la feuille de tabac. C.R. Acad. Agric., Paris, 1017-1026.
- LUH B.S., HSU E.T. et STACHOWICZ K. (1967) - Polyphenolic compounds in canned cling peaches. J. Food Sci., vol. 32, 251-257.
- LYONS J.M. (1973) - Chilling injury in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol., vol. 24, 445-466.
- LYONS J.M. et RAISON J.K. (1970) - Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissue sensitive and resistant to chilling injury. Plant Physiol., vol. 45, 386-389.

- MABRY T.J., MARKHAM K.R. et THOMAS M.B. (1970) - The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New-York.
- MACHÁČKOVÁ I., GANCEVA K. et ZMRHAL Z. (1975) - The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat. Phytochemistry, 14, 1251-1254. Pergamon Press, printed in England.
- 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, 3010-3013.
- MACHEIX J.J. (1968) - Quelques observations sur les composés phénoliques des pommes. Recherches préliminaires à une étude particulière de l'acide chlorogénique. Fruits, 23, 13-20.
- MACHEIX J.J. (1970) - Rôle de divers facteurs intervenant dans le brunissement enzymatique des pommes pendant la croissance. Physiol. Vég., 8, 585-602.
- MACHEIX J.J. (1971) - Présence dans la pomme de plusieurs dérivés de l'acide para-coumarique. C.R. Acad. Sci., Paris, 272, 1097-1100.
- MACHEIX J.J. (1974) - Les esters hydroxycinnamiques de la pomme : identification, variations au cours de la croissance du fruit et métabolisme. Thèse Doct. d'Etat (Sc. Nat.), Université de Paris VI, 168 p.
- MACHEIX J.J., RATEAU J., FLEURIET A. et BUREAU D. (1976) - Métabolisme des esters hydroxycinnamiques dans les fruits. Colloque de la Société Française de Physiologie Végétale.
- MACLEOD N.J. et PRIDHAM J.B. (1965) - Observations on the translocation of phenolic compounds. Phytochem., 5, 777-781.
- MAIER V.P. et HASEGAWA S. (1970) - L. Phenylalanine Ammonialyase activity and naringenin glycoside accumulation in developing grapefruit. Phytochem., 9, 139-144.
- MAIER V.P. et METZLER D.M. (1965) - Changes in individual date polyphenols and their relation to browning. J. Food Sci., 30, 747-752.

- MAIER V.P., METZLER D.M. et HUBER A.F. (1964) - 3-o-caffeoyl shikimic acid (dactylifric acid) and its isomers, a new class of enzymic browning substrates. Biochem. Biophys. Res. Comm. 14, 124-128.
- MAJAK W. et TOWERS G.H.N. (1973a) - Methods for the isolation and purification of ethanol insoluble phenolic esters in *Mentha arvensis*. Phytochem., 12, 1141-1147.
- MANAI H. (1973) - Variations du taux d'acide chlorogénique et de rutine chez *Nicotiana tabacum cultivae* "Maryland Mammoth et *Nicotiana sylvestris* en fonction du traitement photopériodique. Thèse 3ème cycle, Université d'Orléans, 72 p.
- MANCINI M., ORIENTE P., D'ANDREA L. - Therapeutic effect of 1,4-dicaffeoylquinic acid, the active principle of the artichoke. Minerva med. 51, 2460-2463, 1960. Chem. Abst., 55, 12632, 1961.
- MAPSON L.W. et MEAD A. (1968) - Biosynthesis of ethylene. Dual nature of cofactor required for the enzymic production of ethylene from methional. Biochem. J., 108, 875-881.
- MAPSON L.W. et WARDALE D.A. (1967) - Biosynthesis of ethylene. Formation of ethylene from methional by a cell free enzyme system from cauliflower florets. Biochem. J., 102, 574-585.
- MAPSON L.W. et WARDALE D.A. (1968) - Biosynthesis of ethylene. Enzymes involved in its formation from methional. Biochem. J., 107, 433-442.
- MAPSON L.W. (1970) - Vitamins in fruits. In : The biochemistry of fruits and their products. A.C. HULME, Academic Press, 1, 369-384.
- MARTIN-TANGUY J., MARTIN C. et GALLET M. (1973) - Présence de composés aromatiques liés à la putrescine dans divers *Nicotiana virosés*. C.R. Acad. Sci., Paris, 273, 1433-1435.
- MASON H.S. (1955) - Comparative biochemistry of the phenolase complex. Adv. in Eng., 16, 105-184.
- MATHEW A.G. et PARPIA H.A.B. (1971) - Food browning as a polyphenol reaction. Afre., 19, 75-145.

- MAYER A.M., FRIEND J. (1960) - Properties and solubility of phenolase in isolate chloroplasts. Nature, 185, 464-465.
- MEHERIUK M. et PORRITT S.W. (1968) - Chlorogenic acid levels of McIntosh apples with sunscald. Can J. Plant Sci., 48, 6, 621-623.
- MELIN C. (1976) - Les composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation de la cerise, Prunus avium L., variété "Bigarreau Napoléon". Thèse de Doct. de 3ème cycle, Université Orléans, 160 p.
- MILLER E.V. (1951) - Physiological studies of the pineapple "Ananas Comosus L. Herr". with special reference to physiological breakdown. Plant Physiol., 26, 66-75.
- MILLER E.V. et HEILMAN A.S. (1952) - Ascorbic acid and physiological breakdown in the fruits of pineapple. Science, 116, 505-506.
- MILLER E.V. et MARSTELLER R.L. (1953) - The effect of parachlorophenoxyacetic acid on physiological breakdown of the fruits of the pineapple "Ananas Comosus L. Merr.". Food Res., 18, 421-425.
- MINAMIKAWA T. et URITANI I. (1965) - Phenylalanine ammonialyase in sliced sweet potato roots. J. Biochem., Tokyo, 47, 678-688.
- MITJAVILA S. (1973) - Effet de l'acide tannique sur la perte d'azote fécal endogène chez le rat. Compte-rendu de l'Assemblée Générale du groupe Polyphénols, Pont de la Morge, 4.
- MONTIES B. (1966) - Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme. Ann. Physiol. Vég., 8, 49-73.
- MORRISON M. (1961) - Biological oxidations. Ann. Rev. Biochem., 30, 11-44.
- MOSEL H.D. et HERRMANN K. (1974) - changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. J. Sci. Food Agric., 25, 251-256.
- MOTAWI K.E.D.H. (1966) - Enzymatic systems and substrates involved in freestone peach browning. Ph. D., thesis Michigan State University, Department of Food Science, 82 p.
- MURATA T. (1969) - Physiological and biochemical studies chilling injury in bananas. Physiol. Plant., 22, 401-411.

- NAKABAYASHI T. (1953) - Browning of apple fruit. I. Isolation and estimation of L-epicatechin in apple. Journ. Agr. Chem. Soc. Japan, 27, 813-818.
- NEISH A.C. (1964) - Major pathways of biosynthesis of phenols. In Biochemistry of phenolic compounds, HARBORNE J.B., éd., Academic Press, Londres, 295-359.
- NELSON R.F. et FINCKLE B.J. (1964) - Enzyme reactions with phenolic compounds : effects of o-methyl-transferase and high pH on the polyphenol oxidase substrates in apple. Phytochem., 3, 321-325.
- NITSCH J.P. et NITSCH C. (1962) - Composés phénoliques et croissance végétale. Ann. Physiol. Vég., 4, 211-225.
- NITSCH J.P. (1970) - Hormonal factors in growth and development. In The Biochemistry of fruits and their products, vol. I, HULME A.C., éd., Academic Press, Londres, 427-472.
- PANIZZI L. et SCARPATI M.L. (1954) - Constitution of cynarine the active principle of the artichoke. Nature, 194, 1062.
- PICTET G. et BRANDENBERGER H. (1960) - Substances polyphénoliques des plantes. II. Séparation des acides phénoliques du café vert et du café rôti. J. of Chromatogr., 4, 396-409.
- PIERPOINT W.S. (1966) - The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. Biochem. J., 98, 567-580.
- PILET P.E. (1964) - Effect of chlorogenic acid on the auxin catabolism and the auxin content of root tissues. Phytochem., 3, 617-621.
- PONTING J.D. (1960) - The control of enzymatic browning of fruits. In "Food Enzymes", SCHULTZ H.W. éd., The Avi Publ. Company, Inc., Westport, Connecticut, 105-124.
- PONTING J.D. et JOSLYN M.A. (1948) - Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Arch. Biochem., 19, 47-63.
- PRIDHAM J.B. (1965) - Low molecular weight phenols in higher plants. Ann. Rev. of Plant Physiol., 16, 13-36.
- PY C. et TISSEAU M.A. (1965) - L'Ananas. Ed. MAISONNEUVE et LAROSE, Paris, 291 p.

- RAHE J.E., KUC' J. et CHIEN-HEI CHNANG (1970) - Cinnamic acid production as a method of assay for phenylalanine ammonialyase in acetone powders of *Phaseolus vulgaris*. Phytochem., 9, 1009-1015.
- RAMIREZ-MARTINEZ J.R. et LUH B.S. (1973) - Phenolic compounds in frozen avocados. J. Sci. Food Agric., 24, 219-225.
- RANADIVE A.S. et HAARD N.F. (1971) - Changes in polyphenolics on ripening of selected pear varieties. J. Sci. Food Agric., 22, 86-89.
- RANDERATH K. (1971) - Chromatographie sur couches minces. Ed. Gauthier-Villars, Paris, 398 p.
- REYES P. et LUH B.S. (1960) - Characteristics of browning enzymes in Fay Elberta freestone peaches. Food Technol., 14, 570-575.
- REYES P. et LUH B.S. (1962) - Ascorbic and isoascorbic acids as antioxidants for frozen freestone peach. Food Technol., 16, 116-118.
- REZNIK H. et EGGER K. (1961) - Benedikts reagens als Indicator für phenolische ortho-dihydroxygruppen. Zeitschrift für Anal. Chem., 183, 196-199.
- RHODES M.J.C., GAILLARD T., WOOLTORTON L.S.C. et HULME A.C. (1968) - The development of a malate decarboxylation system during the ageing of apple peel disks. Phytochem., 7, 405-408.
- RHODES M.J.C. et WOOLTORTON L.S.C. (1973) - Formation of CoA esters of cinnamic acid derivatives by extracts of *Brassica napo-brassica* root tissue. Phytochem., 12, 2381-2387.
- RIBEREAU-GAYON P. (1963) - Les acides phénols de *Vitis vinifera*. C.R. Acad. Sci., Paris, 256, 4108-4111.
- RIBEREAU-GAYON P. (1965) - Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. C.R. Acad. Sci., Paris, 260, 341-343.
- RIBEREAU-GAYON P. (1968) - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, éd., Paris.
- ROBERTS E.A.H. (1957) - Oxidation-reduction potentials in tea fermentation. Chem. and Ind., 1354-1355.

- ROBERTS R.J. et VAUGHAN P.F.T. (1971) - Hydroxylation of kaempferol, dihydrokaempferol, and naringenin by a phenolase preparation from spinach beet. Phytochem., 10, 2649-2652.
- ROUET-MAYER M.A., PHILIPPON J. (1974) - Reversibilité du brunissement des pêches congelées. Communication présentée au IVème Congrès International des Sciences et de la Technologie alimentaire, Madrid.
- RUIS H. (1972) - Particulate and soluble forms of o-diphenol oxidase from potato tubers. Phytochem., 11, 53-58.
- RUNECKLES V.C. (1963) - Tobacco polyphenols. II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. Can J. of Bioch. and Biophys., 41, 2249-2258.
- RUNECKLES V.C. et WOOLRICH K. (1963) - Tobacco polyphenols. I. The biosynthesis of O-glucosides and O-glucose esters of hydrocyxinnamic acids. Phytochem., 2, 1-6.
- RUSSEL D.W. (1971) - The metabolism of aromatic compounds in Higher plants. X. Properties of cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolism and developmental control. J. Biol. Chem., 246, 3870-3878.
- RUSSEL D.W. et CONN E.E. (1967) - The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. Arch. Biochem. Biophys., 122, 256-258.
- RYUGO K. (1969) - Seasonal trends of titratable acids, tannins and polyphenolic compounds and cell wall constituents in Oriental Pear fruit (Pyrus serotina, Rehd). J. Agric. Food Chem., 17, 43-47.
- SACHER J.A., TOWERS G.H.N. et DAVIES D.D. (1972) - Effect of light and ageing on enzymes particularly phenylalanine ammonia-lyase, in discs of storage tissue. Phytochem., 8, 2383-2392.
- SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H. (1971) - Lignins : occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience, Londres.
- SATO M. (1969) - The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. Phytochem., 8, 353-362.

- SATO M., KATO N. et HASEGAWA M. (1968) - Metabolism of phenolic substances by chloroplasts. IV. Conversion by chloroplasts of several monohydric phenols to o-dihydric phenols. Bot. Mag., Tokyo, 81, 356-361.
- SCARPATI M.L. et ESPOSITO P. (1963) - Neo-chlorogenic acid and "Band 510" structure. Tetrahedron Letters, 18, 1147-1150.
- SEIKEL M.K. (1962) - Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compound. In The Chemistry of flavonoid compounds, GEISSMAN T.A. éd., Pergamon Press, Oxford, 34-69.
- SEIKEL M.K. (1964) - Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials. In Biochemistry of phenolic compounds, HARBORNE J.B., éd., Academic Press, New York, 33-76.
- SHANNON C.T. et PRATT D.E. (1967) - Apple polyphenol oxidase activity in relation to various phenolic compounds. J. Food Sci., 32, 479-483.
- SHON KUNG SUN (1971) - A study of black heart disease of the pineapple fruits. Plant Prot. Bull., China, 13, 39-48.
- SIEGELMAN H.W. (1955a) - Quercetin glucosides of grimes Golden apple skin. J. Biol. Chem., 213, 647-654.
- SIEGELMAN H.W. (1955b) - Detection and identification of polyphenol oxidase in apple and pear skins. Arch. Biochem. Biophys., 56, 97-102.
- SIEGELMAN H.W. (1964) - Physiological studies on phenolic biosynthesis. In Biochemistry of phenolic compounds, HARBORNE J.B. éd., Academic Press, New-York, 437-456.
- SINGLETON V.L. (1957) - Pineapple research. Inst. of Hawaii, Res. Rep. n° 49.
- SINGLETON V.L. (1959) - Pineapple research. Inst. of Hawaii, Res. Rep. n° 69.
- SINGLETON V.L. (1965) - Chemical and physical development of the pineapple fruit. I. Weight per fruitlet and other physical attributes. J. Food Sci., 30, 98-104.
- SMITH W.H. (1940) - Further observations on physiological breakdown in stored plums. J. Pomol., 18, 74-87.

- SONDHEIMER E. (1958) - On the distribution of caffeic acid and the chlorogenic acid isomers in plants. Arch. Biochem. and Biophys., 74, 131-133.
- SONDHEIMER E. (1964) - The chlorogenic acid and related compounds. The Bot. Review, 30, 667-712.
- SONDHEIMER E., SZYMANSKI C.D. et CORSE J.W. (1961) - Isolation of chlorogenic acid and its isomers from coffee. Agric. Food Chem., 9, 146-149.
- STAFFORD H.A. et BRAVINDER BREE S. (1972) - Peroxidase isoenzymes of first internodes of Sorghum. Plant Physiol., 49, 950-956.
- STECK W. (1967a) - On the identification of some naturally occurring hydroxycinnamic acid derivatives. Anal. Biochem., 20, 553-556.
- STECK W. (1968) - Metabolism of cinnamic acid in plants. Chlorogenic acid formation. Phytochem., 7, 1711-1717.
- STOCKIGT J. et ZENK M.H. (1974) - Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. FEBS Letters, 42, 131-134.
- SUTHERLAND G.K. (1958) - Preliminary classification of some naturally occurring hydroxycinnamic acids through their ultra-violet spectra. Arch. Biochem. and Biophys., 75, 412-417.
- SUTHERLAND G.K. et GORTNER W.A. (1959) - Studies of quinyl-p-coumarate in the pineapple plant (*Ananas Comosus* var. Cayenne). Aust. J. Chem., 12, 240.
- SWAIN T. et GOLDSTEIN J.L. (1964) - The quantitative analysis of phenolic compounds. In Methods of polyphenol Chemistry, PRIDHAM J.B., éd., Pergamon Press, Londres, 131-146.
- SWAIN T. et HILLIS W.E. (1959) - Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenol constituents. J. Sci. Food Agric., 10, 63-68.
- SWAIN T. et WILLIAMS C.A. (1970) - The role of phenylalanine in flavonoid biosynthesis. Phytochem., 9, 2115-2122.
- SWAIN T. (1962) - Economic importance of flavonoid compounds : food stuffs. In The Chemistry of flavonoid Compounds. T.A. GEISSMAN, éd. Pergamon Press, Londres, p. 529 et 530.

- TANGUY J. (1970) - Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac. Thèse Fac. Sci., Paris, 136 p.
- TANGUY J. (1971) - Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les *Nicotiana* hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune (V.M.T.). Physiol. Vég., 9, 169-187.
- TANGUY J. et MARTIN C. (1972) - Sur quelques constituants phénoliques des feuilles cotylédonnaires de plantules de *Phaseolus vulgaris* variété Pinto. C.R. Acad. Sci., Paris, 274, 3402-3404.
- TATE J.N., LUH B.S. et YORK G.K. (1964) - Polyphenoloxidase in Bartlett pears. J. Food Sci., 29, 929.
- TAUFEL K. et VOIGT J. (1963) - Die Bedeutung der Polyphenole bei der enzymatischen Bräunung von Obst. Ernährungsforschung, 8, 406-416.
- TAUFEL K. et VOIGT J. (1964) - Zur inhibierenden Wirkung von Ascorbinsäure gegenüber der Polyphenoloxydase des Apfels. Z. Lebens. Unters. u. Forsch., 126, 19-24.
- TAYLOR A.O. (1965) - Some effects of photoperiod of the biosynthesis of phenylpropane derivatives in *Xanthium*. Plant Physiol., 40, 273-280.
- TEISSON Cl. (1972) - Etudes sur le brunissement interne de l'ananas. Fruits, 27, n° 9, 603-612.
- TEISSON Cl. (1973b) - Développement et croissance de l'inflorescence d'*Ananas Comosus*. Fruits, 28, n° 6, 433-439.
- TEISSON Cl. (1977) - Le brunissement interne de l'ananas. Thèse Doct. d'Etat. Université d'Abidjan (Côte d'Ivoire), 183 p.
- TING S.V. et ATTAWAY J.A. (1971) - Citrus fruits in : The Biochemistry of fruits and their products. HULME A.C., Academic Press, New-York, London, vol. 2, 107-169.
- TISSEAU R. (1963) - Variations de l'acidité et de l'extrait sec des jus frais d'ananas en basse Côte d'Ivoire au cours de la campagne 62-63. Doc. int. I.F.A.C., R.A., n° 4, 4 p. multigr.

- TISSEAU M.A. et TISSEAU R. (1970) - Problèmes de qualité de l'ananas.
Doc. int., I.F.A.C., n° 8.
- TOMASZEWSKI M. et THIMANN K.V. (1966) - Interactions of phenolic acids metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. Plant Physiol., 41, 1443-1454.
- TOWERS G.H.N. (1964) - Metabolism of phenolics in higher plants and microorganism. In Biochemistry of phenolic compounds, HARBORNE J.B., éd., Academic Press, Londres, 249-294.
- TRONCHET J. (1972) - Les dérivés flavoniques des fruits, localisation, répartition et évolution. Bull. Soc. Bot., 119, 29-40.
- ULRICH R. (1952) - La vie des fruits. Masson et Cie, éd., Paris.
- ULRICH R. (1954) - La conservation par le froid des denrées d'origine végétale. BAILLIÈRE éd., Paris, 328 p.
- ULRICH R. (1956) - Gradients physiques, chimiques et physiologiques des fruits. Fruits, 11, 239-244.
- ULRICH R. et MARCELLIN P. (1968) - Traitement des fruits et des légumes après récolte, à l'aide d'atmosphères spéciales. Ann. Nut. et Alim., 22, 13-74.
- VAN BUREN J. (1970) - Fruit phenolics. In The Biochemistry of fruits and their products, vol. 1, HULME A.C., éd., Academic Press, Londres, 269-304.
- VOIGT J. (1960) - Löslichkeit der chlorogensäure und einiger Oxyzimtsäuren bei 20°C. Ernährungsforschung, Dtsch., 5, 410-416.
- WAISS A.C., LUNDIN R.E. et CORSE J.W. (1964) - The N.M.R. spectra of chlorogenic acids. Chem. and Ind., 1984-1985.
- WALKER J.R.L. (1962) - Studies on the enzymic browning of apple fruit. N.Z.J. Sci., 5, 316-324.
- WALKER J.R.L. (1964) - Studies on the enzymic browning of apple fruit. II. Properties of apple polyphenoloxidase. Aust. J. Biol. Sci., 17, 360-371.

- WALKER J.R.L. et HULME A.C. (1966) - Studies on enzymic browning of apple.
III. Purification of apple phenolase. Phytochem., 5, 259-262.
- WALTON E. et BUTT V.S. (1971) - The demonstration of cinnamyl-CoA synthetase activity in leaf extracts. Phytochem., 10, 295-304.
- WARDALE D.A. (1973) - Effect of phenolic compounds in Lycopersicum esculentum on the synthesis of ethylene. Phytochem., 12, 1523-1530.
- WATTS J.H. et GRISWOLD R.M. (1953) - Enzyme and ascorbic acid content of fresh and frozen pineapple. Food Res., 2, 162-168.
- WEURMAN C. et SWAIN T. (1953) - Chlorogenic acid and the enzymic browning of apples and pears. Nature, Londres, 172, 678.
- WEURMAN C. et SWAIN T. (1956) - Changes in the enzymic browning of Bramley's Seedling apples during their development. J. Sci. Food Agric., 6, 186-192.
- WILLIAMS A.H. (1955) - Paper chromatography of cinnamic acid derivatives. Chem. and Ind., 29, 120-121.
- WILLIAMS A.H. (1957) - The simpler phenolic substances of plants. J. Sci. Food Agric., 8, 385-389.
- WILLIAMS A.H. (1958) - p-coumaroyl-quinic acid from apple fruit. Chem. and Ind. 1200.
- WILLIAMS A.H. (1960) - The distribution of phenolic compounds in apple and pear trees. In Phenolic in plants, in health and disease, J.B. PRIDHAM éd., Pergamon Press, Londres, p.4.
- WONG C.T., LUH B.S. et WHITAKER J.R. (1971) - Isolation and characterization of polyphenoloxidase isoenzymes of Clingstone peach. Plant Physiol., 48, 19-23.
- WONG P.R., ZUCKER M. et CREASY L.L. (1974) - Induction of phenylalanine ammonia-lyase in strawberry leaf disks. Action spectra and effect of wounding, sucrose and light. Plant Physiol., 54, 659-665.
- YAMAZAKI H. et YAMAZAKI I. (1973) - The reaction between indole-3 acetic acid and horseradish peroxidase. Arch. Biochem. Biophys., 154, 147-159.

- ZENK M.H. et 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. (1965) - Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. Plant Physiol., 40, 779-784.
- ZUCKER M. et AHRENS J.P. (1958) - Quantitative assay of chlorogenic acid and its pattern of distribution within tobacco leaves. Plant Physiol., 33, 246-249.
- ZUCKER M. et LEVY C. (1959) - Some factors which affect the synthesis of chlorogenic acid in disks of potato tuber. Plant Physiol., 34, 108-112.
- ZUCKER M., HANSON K.R. et SONDEHEIMER E. (1967) - The regulation of phenolic biosynthesis and metabolic roles of phenolic compounds in plants. In Phenolic compounds and metabolic regulation. FINCKLE B.J. et RONECKLES V.C., éd., Appleton Century Crofts, New-York, 68-93.

