ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

THESE

présentée à l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER II** - SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
pour obtenir le **DIPLOME DE DOCTORAT**

Spécialité: Physiologie et Biologie des Organes et des Populations

Formation doctorale: Bases de la production végétale

MATURATION ET SENESCENCE DE L'ANANAS (*Ananas comosus* (L.) MERR) en Côte d'Ivoire

par

Alain SOLER

Soutenue le 25 novembre 1991, devant le Jury composé de:

MM.	J.D'AUZAC	Professeur USTL Montpellier	Président
	J.C.PECH	Professeur ENSA Toulouse	Rapporteur
	C.HARTMANN	Professeur Univ.Orléans	Rapporteur
	J.J.MACHEIX	Professeur USTL Montpellier	Examinateur
	E.LAVILLE	Directeur scientifique IRFA	Examinateur
	C.TEISSON	Directeur Lab. CIV GERDAT	Examinateur

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

THESE

présentée à l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER II** - SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
pour obtenir le **DIPLOME DE DOCTORAT**

Spécialité: Physiologie et Biologie des Organes et des Populations

Formation doctorale: Bases de la production végétale

MATURATION ET SENESCENCE DE L'ANANAS (*Ananas comosus* (L.) MERR) en Côte d'Ivoire

par

Alain SOLER

Soutenue le 25 novembre 1991, devant le Jury composé de:

MM.	J.D'AUZAC	Professeur USTL Montpellier	Président
	J.C.PECH	Professeur ENSA Toulouse	Rapporteur
	C.HARTMANN	Professeur Univ.Orléans	Rapporteur
	J.J.MACHEIX	Professeur USTL Montpellier	Examinateur
	E.LAVILLE	Directeur scientifique IRFA	Examinateur
	C.TEISSON	Directeur Lab. CIV GERDAT	Examinateur

Avant propos

Je voudrais, ici, remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail:

Qu'il me soit permis de remercier en premier lieu Messieurs D'AUZAC et MARCHAL.

Monsieur D'AUZAC a l'amabilité d'accepter de diriger ce travail et m'a apporté critiques et conseils déterminants dans sa réalisation.

Monsieur MARCHAL a eu l'amabilité de réaliser diverses analyses au laboratoire IRFA Montpellier, puis fait une critique détaillée du manuscrit qui a fortement contribué à la réalisation du document final.

Je remercie également mes collègues de Côte d'Ivoire et particulièrement les techniciens du "labo 102" pour leur appui de tous les jours.

Je suis particulièrement reconnaissant à Messieurs MACHEIX et MOURICHON qui m'ont reçu dans leur laboratoire pour me permettre d'utiliser des techniques qui m'ont été inaccessibles en Côte d'Ivoire (HPLC et microscopie électronique). Merci également à Madame MICHAUX-FERRIERE (laboratoire de cytogénétique GERDAT) et Monsieur CROS (IRCC) pour leur conseils concernant les résultats obtenus par ces techniques.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION 1

Chapitre I: Généralités 2

I-1 SITUATION DE LA PRODUCTION DE L'ANANAS 2
I-2 LA RECHERCHE SUR LA QUALITÉ DE L'ANANAS EN CÔTE D'IVOIRE 2

Chapitre II: Introduction bibliographique, L'ananas et sa culture 4

II-1 LA PLANTE 4
II-2 CONDITIONS DE CULTURE ET DE PRODUCTION DANS LE MONDE 8
II-3 CONDITIONS DE CULTURE EN CÔTE D'IVOIRE 10
II-3-1 Le milieu 10
II-3-2 Les techniques culturales 10
II-3-3 Conditions d'exportation 11
II-4 LE FRUIT 14
II-4-1 Anatomie 14
II-4-2 Développement 15
II-4-3 Composition 16
II-4-3-1 Généralités 16
II-4-3-2 Glucides 17
II-4-3-3 Acides organiques 18
II-4-3-4 Composés phénoliques 19
II-4-3-5 Acides aminés et protéines 20
II-4-3-6 Composition minérale 21
II-5 QUELQUES DONNÉES SUR LA MATURATION ET LA SÉNESCENCE DES FRUITS 22

Chapitre III: Objectifs de l'étude 25

III-1 MATURATION DE L'ANANAS: ÉLABORATION DE LA QUALITÉ ET SA VARIABILITÉ 26
III-2 LA SÉNESCENCE ET LE "JAUNE" DE L'ANANAS 27

DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODE

Chapitre I: Matériel végétal et techniques culturales 29

I-1 LA VARIÉTÉ 29
I-2 LE FRUIT 29
I-3 LES PARTIES VÉGÉTATIVES 29
I-3-1 Les feuilles 29
I-3-2 La tige 31
I-4 Techniques culturales 31
I-5 AUTRES TECHNIQUES 31
I-5-1 Applications des régulateurs hormonaux pour le contrôle de la maturation 31
I-5-2 Injection dans le pédoncule du fruit 31

Chapitre II: Les analyses chimiques quantitatives 33

II-1 LES ACIDES ORGANIQUES 33
II-1-1 L'acidité titrable 33
II-1-2 Dosages individuels des acides organiques 33
II-1-3 L'acide ascorbique (AA) et l'acide déhydroascorbique (DHA) 34
II-2 LES THIOLS 35
II-3 LES SUCRES 36
II-3-1 Estimation de la teneur globale par l'extrait sec soluble (ESS) 36
II-3-2 Les sucres individuels 37
II-3-3 L'amidon 38
II-4 LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES 38
II-4-1 Extraction 38
II-4-2 Les phénols totaux 39

II-4-3 Les ortho-diphénols 39
II-4-4 Chromatographie sur couche mince 39
II-4-5 Chromatographie liquide haute performance 41
II-5 LES PAROIS CELLULAIRES OU FIBRES 41
II-6 LES PROTÉINES 41
II-7 L'ÉTHYLÈNE 43
II-7-1 Extraction de l'atmosphère interne des fruits 43
II-7-2 Dosage de l'éthylène 43
II-8 LES ANALYSES MINÉRALES 44
II-8-1 L'azote total 44
II-8-2 Les autres éléments 44
II-9 DOSAGES DE L'ÉTHÉPHON 45
II-9-1 Principe de dosage et Extraction 45
II-9-2 Vérification de la validité des dosages 45

Chapitre III: Caractérisation des activités enzymatiques et détermination des conditions opératoires. 47

III-1 HYDROLASES ACIDES 47
III-2 PEROXYDASE (PEROX) 49
III-3 ASCORBATE PEROXYDASE (AA-PEROX) 51
III-4 CATALASE (CAT) 53
III-5 SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) 55
III-6 POLYGALACTURONASE (PG) 57
III-7 MONO DÉHYDROASCORBATE RÉDUCTASE 59
III-8 POLYPHÉNOLOXYDASE (PPOX) 61
III-9 ACIDE INDOLE ACÉTIQUE OXYDASE (AIA-OX) 63
III-10 GLUTATHION RÉDUCTASE (GSSG-R) 65
III-11 NADH QUINONES RÉDUCTASE (NQR) 65
III-12 ENZYME MALIQUE À NADP (MDH) 67

TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION

Introduction 69

A) HÉTÉROGÉNÉITÉ INTERPLANTS 70

A-1 Variabilité au stade végétatif 70
A-2 Variabilité au stade fin de floraison vraie 71
A-3 Variabilité au stade de récolte 73
A-4 Origines de la variabilité interplants dans la culture d'ananas

B) HÉTÉROGÉNÉITÉ INTERNE DU FRUIT 79

Chapitre I: Maturation de l'ananas 82

I-1 EVOLUTION BIOCHIMIQUE DU FRUIT (RÉCOLTE DE DÉCEMBRE), ESSAI D'INTERPRÉTATION DE QUELQUES ASPECTS DU MÉTABOLISME DU FRUIT 84
I-1-1 Analyses chimiques 84
I-1-1-1 Les sucres 84
I-1-1-2 Les acides organiques 84
I-1-1-3 Acide ascorbique et thiols 89
I-1-1-4 Les fibres 92
I-1-1-5 Composés phénoliques 92
I-1-1-5-1 Identification des phénols de la pulpe 92
I-1-1-5-2 Identification des composés phénoliques associés aux parois 94
I-1-1-5-3 Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation 96
I-1-1-6 Chlorophylles et carotènes de la peau 102
I-1-2 Protéines et activités enzymatiques 102
I-1-2-1 Polygalacturonases et hydrolases acides 102
I-1-2-2 Activités peroxydasiques et oxydasiques 107
I-1-2-3 Autres activités enzymatiques 112
I-1-3 Analyses de l'évolution des structures cellulaires par microscopie électronique 114
I-1-4 L'éthylène dans la pulpe 114
I-1-5 Conclusion sur l'évolution biochimique et le métabolisme du fruit 118
I-2 CONTRÔLE DE LA MATURATION 121
I-2-1 Rôle de l'éthylène dans la pulpe 121
I-2-2 Rôle de l'éthylène dans l'épiderme 127

I-2-3 Effets de régulateurs exogènes 128
I-2-4 Conclusion sur le contrôle de la maturation 133
I-3 LA VARIABILITÉ DES COMPOSANTES DE LA QUALITÉ 136
I-4 CONCLUSION DU CHAPITRE I: MATURATION DE L'ANANAS 140

Chapitre II: Sénescence et "Jaune" de l'ananas 141

II-1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU PHÉNOMÈNE 143
II-1-1 Importance du phénomène 144
II-1-2 Densité des fruits 145
II-1-3 Modifications ultrastructurales 147
II-1-4 Caractéristiques biochimiques générales 154
II-1-4-1 Acidité libre, Extrait sec soluble 154
II-1-4-2 Acide ascorbique et Thiols 155
II-1-4-3 Composés phénoliques 156
II-1-4-4 Ethylène 157
II-1-4-5 Modification de la perméabilité membranaire
II-1-5 Caractéristiques enzymatiques: comparaison des fruits mûrs, sénescents et translucides. 165
II-1-5-1 ACP1: toutes variables chimiques et enzymatiques 165
II-1-5-2 ACP2: variables enzymatiques seulement 168
II-1-5-3 Analyses discriminantes 174
II-1-5-3-1 AFD1: deux groupes: (stades de maturité) et (translucides) 174
II-1-5-3-2 AFD2: six groupes: 4 stades de maturité et 2 stades de translucidité 176
II-1-5-4 Analyse de variance et test de NEWMAN-KEULS 176
II-1-5-5 Conclusion analyses statistiques 180
II-2 COLORATION ARTIFICIELLE DE L'ÉPIDERME 186
II-2-1 Libération de l'éthylène à partir de l'éthéphon in vitro 186
II-2-2 Libération de l'éthylène in vivo 188
II-2-2-1 Absorption de l'éthéphon par l'épiderme du fruit 188
II-2-2-2 Evolution de l'éthéphon au contact du fruit en enceintes thermostatées 190
II-2-2-3 Essai de vérification de la stimulation de la synthèse d'éthylène par l'éthéphon 193
II-2-2-4 Evolution de l'éthéphon absorbé par l'épiderme du fruit avant récolte 196
II-2-3 Influence des facteurs température et pH sur l'efficacité des traitements à l'éthéphon (tests agronomiques) 198
II-2-4 Conclusion 200

II-3 ORIGINES POSSIBLES DU PHÉNOMÈNE 202
II-3-1 Relation avec le climat 202
II-3-1-1 Rayonnement global, Température maximale et Pluviométrie 202
II-3-1-2 Stress hydrique 203
II-3-2 Relation avec la nutrition 206
II-4 IMPACT DU JAUNE DE L'ANANAS SUR LA QUALITÉ 212
II-5 CONCLUSION SUR LA SÉNESCENCE ET LA TRANSLUCIDITÉ 216

QUATRIEME PARTIE: CONCLUSION 219

ANNEXE 1 225
ANNEXE 2 237

BIBLIOGRAPHIE 244

ABREVIATIONS

AAE	acétate d'éthyle-acide acétique-eau (66/14/20)
ABA	acide abscissique
ACC	acide 1-carboxylique 1-aminocyclopropane
ACP	analyse en composantes principales
AFD	analyse factorielle discriminante
AIA	acide indole acétique
AOA	acide oxaloacétique
AL	acidité libre titrable
ARNm	acide ribonucléique messager
AT	acidité totale
BAE	benzène-acide acétique-eau (24/28/9)
BI	brunissement interne
CCM	chromatographie sur couche mince
3CPA	acide 2,3 chlorophénoxy propionique
DCIP	dichlorophénolindophénol
DHA	acide déhydroascorbique
DL DOPA	DL dihydroxy phénylalanine
DNPH	dinitrophénylhydrazine
dDO	variation de densité optique
DTNB	acide 5,5'-dithiobis-(2-nitro)benzoïque
DTPA	acide diéthylènetriaminepentaacétique
EFE	ethylene forming enzyme
ESS	extrait sec soluble
FD	feuille D
HPLC	chromatographie liquide haute performance
IRFA	institut de recherche sur les fruits et agrumes
M	Molaire
mM	milliMolaire
µM	microMolaire
méq	milliéquivalent
NAD(P)H	nicotinamide adénine nucléotide (phosphate) forme réduite
SNA	sel de Na de l'acide naphtalène acétique
STS	silver thiosulfate
TIF	traitement d'induction florale
TCA	acide trichloracétique
tp	tampon

Abréviations utilisées pour désigner les variables dans les analyses statistiques:

variables chimiques:
- AL : acidité libre
- THI: thiols
- ESS: extrait sec soluble
- AA: acide ascorbique

variables enzymatiques:
- αGAL: α-galactosidase
- ßGAL: ß-galactosidase
- αMAN: α-mannosidase
- PHO: phosphatase
- NAG: N-acétylglucosaminidase
- AIA-OX: AIA oxydase
- AA-PEROX: ascorbate peroxydase
- PEROX: peroxydase
- PG: polygalacturonase
- PPOX: polyphénoloxydase
- MDH: enzyme malique
- NQR: NADH quinone réductase
- GSSG-R: glutathion réductase
- CAT: catalase
- SOD: superoxyde dismutase

PREMIERE PARTIE:
INTRODUCTION

Chapitre I: Généralités

I-1 SITUATION DE LA PRODUCTION DE L'ANANAS

La production mondiale d'ananas atteint près de 11 000 000 de tonnes en 1989. Si le premier producteur est la Thaïlande avec 1,9 million de tonnes, le premier exportateur mondial serait les Philippines (154 864 tonnes) et le second, après avoir occupé le premier rang, est la Côte d'Ivoire (132 000 tonnes exportées pour 265 000 produites), (GUINCHARD, 1990).

L'évolution de la production de la Côte d'Ivoire a été extrêmement rapide avec 16 000 tonnes en 1970, 80 000 en 1975 et 160 000 en 1985. L'exportation se fait essentiellement sur l'Europe, en fruits frais. Face à la concurrence mondiale, la Côte d'Ivoire essaie de jouer la carte de la qualité en profitant des acquis techniques de haut niveau obtenus par la recherche agronomique, à l'IRFA notamment. C'est un des pays où la technicité est la plus élevée. Les planteurs utilisent couramment des techniques sophistiquées comme le suivi de la croissance des plants, avec l'appui du diagnostic foliaire. L'induction florale artificielle ou la coloration artificielle par traitement à l'éthéphon sont pratiquées systématiquement. Bien utilisées, elles permettent d'obtenir une qualité plus homogène. La Côte d'Ivoire s'attache à promouvoir l'image d'un fruit bien mûr, sucré avec une belle coloration externe.

I-2 LA RECHERCHE SUR LA QUALITÉ DE L'ANANAS EN CÔTE D'IVOIRE

L'objectif des producteurs et de la recherche à l'IRFA est d'améliorer la qualité du fruit et pour ce faire, d'essayer de comprendre comment elle s'élabore. Cette notion de qualité du fruit englobe des aspects pré-récolte et post-récolte.

Les principaux critères de qualité avant ou au moment de la récolte sont le rendement de la culture et les qualités intrinsèques des fruits (qualités organoleptiques, présentation, aptitude à la conservation, ...). Les deux sont indissociables puisqu'il est vrai que la modification de

paramètres contrôlant le rendement (techniques culturales, climat...), entraîne généralement une modification de la qualité (taille et présentation des fruits, arôme...). Inversement, si on modifie des paramètres contrôlant la qualité (stade de maturité à la récolte pour améliorer l'aptitude à la conservation, protection contre le soleil...), il s'ensuit immédiatement un impact sur le rendement.

La qualité englobe également des aspects post-récolte: conservation, transport, emballage et présentation du fruit, transformation (conserve, jus et spécialement aujourd'hui les produits dits de quatrième gamme, prêts à être consommés).

Des actions de recherche ont déjà été menées dans le but d'améliorer la qualité du fruit:

- Diverses études permettent de mieux mesurer l'incidence des facteurs climatiques ou agronomiques (PY *et al*, 1984). Ces facteurs sont la cause directe ou indirecte d'une multitude de problèmes qui diminuent le rendement et les qualités organoleptiques ou de présentation. Ils accroissent l'hétérogénéité de la production dans l'espace et dans le temps.

- Une étude approfondie a été faite sur les mécanismes enzymatiques d'une maladie physiologique, le brunissement interne (BI), responsable de lourdes pertes pendant la phase de commercialisation (TEISSON, 1977).

- Un programme génétique en cours, vise à obtenir des hybrides intégrant les meilleures caractéristiques organoleptiques, de présentation et de résistance aux maladies.

- La volonté actuelle d'exporter des fruits les plus mûrs possible a poussé les producteurs à étudier de nouveaux modes de conditionnement (emballages avec les fruits couchés) et de transport (palettisation) plus adaptés à ces fruits rendus plus fragiles.

Parallèlement, la recherche doit s'attacher à mieux connaître les processus de maturation, de sénescence et leurs déviations (Brunissement interne et Jaune de l'ananas) pour comprendre comment s'élabore la qualité du fruit et quelles sont les origines de sa variabilité. La comprendre nécessite l'intégration de l'effet de nombreux facteurs qui influent sur le métabolisme du plant et du fruit (climat, sol, facteurs biologiques, techniques culturales, maturation).

Chapitre II: L'ananas et sa culture

II-1 LA PLANTE

L'ananas est une monocotylédone, incluse dans l'ordre des Farinosae, de la famille des broméliacées, c'est un cas unique de plante de ce type, cultivée industriellement à une telle échelle.

Dans la classification actuelle le genre Ananas comporte 8 espèces, dont seule l'*Ananas comosus* est cultivée pour la consommation du fruit (SMITH, 1979). Mais dans une étude récente (LOISON-CABOT, 1988), suggère que le nombre réel d'espèces est plus restreint. La plupart de celles qui sont recensées, ne seraient que quelques unes des formes possibles issues de leurs croisements.

Cinq cultivars dont les origines ne sont pas ou mal identifiées, ont été regroupés au sein de l'espèce *Ananas comosus* (COLLINS, 1960; LEAL et ANTONI, 1980; PY *et al*, 1984). Leurs zones d'exploitation sont par contre bien localisées:

Le Cayenne, répandu dans toute la zone intertropicale, est probablement le plus utilisé en culture intensive.

Le Queen est exploité en Afrique du sud, en Australie, à la Réunion et en Malaisie.

Le Spanish est cultivé dans la zone des Caraïbes et en Malaisie.

Le Pernambuco se trouve surtout au Brésil, Vénézuéla, Amérique centrale mais aussi en Afrique occidentale.

Le Mordilona a une zone d'exploitation essentiellement américaine, Equateur, Colombie, Pérou, Vénézuéla et Amérique centrale.

Les caractéristiques des fruits et des feuilles de ces différents cultivars sont présentées dans le tableau 1.

La morphologie et le développement de la plante et de son inflorescence ont été décrits par divers auteurs (KRAUSS, 1948 et 1949; COLLINS, 1960; PY *et al*, 1965; OKIMOTO, 1948; TEISSON, 1973a).

La plante possède certains caractères épiphytes et présente un métabolisme crassulacéen qui lui permettent de s'adapter dans des milieux très divers. Les zones d'exploitation ne représentent qu'une partie de son aire d'extension. En revanche, elle est très sensible aux conditions du milieu qui affectent beaucoup son comportement. Le métabolisme crassulacéen de l'ananas

Tableau 1: Les 5 groupes horticoles d'*Ananas comosus*

(tableau d'après GARCIA, 1988)

GROUPES	Spanish	Queen	Perola ou Pernambuco ou Abacaxi	Cayenne "C"	Mordilona ou Perolera ou Malpura
Aspect du fruit					
Couleur de la peau	Jaune rougeâtre	Jaune franc	Juane verdâtre	Jaune orangé	Jaune rougeâtre
Couleur pulpe	Blanchâtre	Jaune franc	Blanchâtre à jaunâtre	Jaune pâle	Jaune à jaune pâle
Aspect pulpe	Plus ou moins translucide	Opaque	Translucide	Plus ou moins translucide	Opaque
Fibrosité	Fibreux	Peu fibreux	Non fibreux	Peu fibreux	Peu fibreux
Coeur	Grand	Petit	Petit à très petit	Moyen	Petit à moyen
Saveur	Acide épicé	Doux, moins acide que "C"	Doux	Moyennement acide	Moins acide plus acide que "C"
Feuilles	Epineuses mais mais existent clones inermes ou peu épineux	Ttès épineuses épines en crochet	Très épineuses	Extrémités épineuses	Type piping
Maladie (WILT)	Tolérant	Moins sensible que "C"	Moins sensible que "C"	Très sensible	Moins sensible que "C"

n'est pas strict. D'après NEALES *et al* (1968) l'assimilation carbonée est de type CAM complet (absorption du CO_2 de nuit, en début et en fin de photopériode), par opposition aux CAM strict et modéré (respectivement pas d'absorption de jour ou légère absorption de nuit). CREWS *et al* (1975), en mesurant les échanges gazeux (O_2-CO_2), montrent que l'ananas utilise aussi la voie d'assimilation de type C3. COTE (1988) à partir d'études du même type, trouve que pour des plants issus de culture in vitro, l'assimilation du CO_2 est principalement diurne aux premiers stades de développement. Par la suite la fixation devient surtout nocturne. Pour l'ananas, l'équilibre avec le type mésophytique dépendrait des conditions climatiques et plus particulièrement de l'amplitude thermique journalière (CHEN et LIAW, 1968; CONNELY, 1972 cité par AUBERT, 1973; BARTHOLOMEW et KADZIMIN, 1977; COMBRES, 1979).

Les floraisons naturelles peuvent être induites par une diminution de la température nocturne. Leur incidence est faible dans les pays chauds comme la Côte d'Ivoire puisque les variations de l'amplitude thermique sont faibles, mais elles ne sont pas rares. Dans ce pays, la période la plus propice est décembre, lorsque les température nocturnes peuvent descendre en dessous de 20°C pendant quelques jours, en raison d'un vent sec (Harmattan) annonçant le début de la saison sèche. En Martinique, où les écarts de températures et de durée jour/nuit sont plus marqués, les floraisons naturelles peuvent être plus massives. Cependant, en plantation, l'induction florale est artificiellement provoquée (TIF= traitement d'induction florale) par application d'éthylène gazeux ou d'éthéphon (mais aussi, expérimentalement, par divers générateurs d'éthylène, SOLER, 1985). D'autres substances sont largement utilisées dans les plantations comme l'acétylène (obtenu à partir du carbure de calcium et dont la structure moléculaire proche de celle de l'éthylène lui confère des propriétés mimétiques de ce dernier), ou des substances hormonales de type auxinique qui induisent la synthèse endogène d'éthylène (PY *et al*, 1984). Cette particularité que l'ananas partage avec les autres broméliacées, permet de programmer les récoltes tout au long de l'année. Selon le milieu de culture ou la demande du marché, elle peut être réalisée sur des plants d'âges différents car leur taille et leur croissance au TIF (mesurée par le rythme d'émission foliaire par exemple) déterminent fortement le poids du fruit (PY et LOSSOIS, 1962 et LACOEUILHE, 1976).

Enfin une des caractéristiques importantes de l'ananas est son mode de reproduction végétatif à partir de rejets de la tige (cayeux) ou du pédoncule (bulbilles) ou de la couronne du fruit. Il est largement exploité en culture industrielle.

TABLEAU 2 : Caractéristiques du cycle de culture dans différents pays

(LACOEUILHE, 1982 ET 1990 ; BOUFFIN, 1990 ; VUILLAUME, 1986)

Localisation	Cultivar	Matériel végétal	Densité de plantation	Intervalle Plantation-TIF (mois)	Poids du fruit première récolte (kg)
Martinique					
Morne rouge (350 m)	cayenne	cayeu	66000	11	1.28
Basse pointe (60 m)	cayenne	couronne	55000	10	2
Lamentin (20 m)	cayenne	cayeu	51000	10	1.85
Côte d'Ivoire					
Bonoua	cayenne	cayeu	51000	11	1.8
Angué dé dou	cayenne	cayeu	51000	9	1.8
Yamoussoukro	cayenne	cayeu			
Australie					
Yeppoon	cayenne et queen	bulbille	36000 50000	12 à 16	1.65
Hawaï					
Wahiawa	cayenne	bulbille	43000	14	2.36
Taiwan					
Touliu	cayenne	bulbille	44444	16	1.62
Venezuela					
Sarara (Lara)	R.S.	bulbille	27780		1.49
Brésil					
Carrim verde (sp)	cayenne	bulbille	55600	14	1.6
Coraçao de maria (ba)	perola	cayeu	27500	10	1.36
Cameroun					
Nyombé	cayenne	cayeu	61500	6	1.6
Colombie					
Cali	perolera	bulbille	49300	16	1.67
Afrique du sud					
East london	queen	cayeu/couronne		16-17	
Zululand	queen et cayenne	cayeu/couronne	120000 50000	moins de 10	moins de 1
reste	queen	cayeu	25000		0.6
Réunion	queen	cayeu	66000	"9-10	

cayeu = rejet de tige
bulbille = rejet de pédoncule

II-2 CONDITIONS DE CULTURE ET DE PRODUCTION DANS LE MONDE

Les conditions de culture dans le monde sont très variables. Les zones d'exploitation s'étendent grossièrement de 31° latitude nord (Inde) à 34° latitude sud (BARTHOLOMEW et KADZIMIN, 1977). Les conditions climatiques varient donc beaucoup d'une zone à l'autre. Les techniques culturales changent également d'un pays à l'autre ainsi que leur adéquation au milieu (grande variabilité de la technicité des producteurs).

Il en résulte que la comparaison du potentiel de production entre zones d'exploitation est difficile. LACOEUILHE (1982) souligne que si les rendements varient de 30 à 100 tonnes par hectare, ils intègrent des densités de plantation très différentes et des longueurs de cycles variables. Il propose donc de faire la comparaison sur la base de la durée de la phase végétative et du poids du fruit. La fructification a une durée qui varie peu par rapport à la phase végétative, sauf dans les zones où les saisons sont très différenciées. La seconde, plus longue et plus variable, est fortement influencée par les conditions du milieu. Le poids du fruit obtenu dépend beaucoup du poids du plant et de sa croissance au TIF.

Le tableau 2, d'après LACOEUILHE (1982) avec quelques compléments, permet de mesurer la variété des cycles de culture et des rendements dans diverses zones de production. Il en résulte une grande variabilité de qualité du fait de la grande sensibilité de la plante à son milieu. Les zones équatoriales favorisent la vitesse et la quantité de production, les zones plus tropicales permettent d'obtenir des fruits avec de meilleurs niveaux de sucres et d'acides organiques (PY *et al*, 1965 et 1984; GUYOT *et al*, 1974; BARTHOLOMEW et PAULL, 1986).

Fig.1 : DONNEES METEO ANGUEDEDOU
Moyennes mensuelles 1978-1990

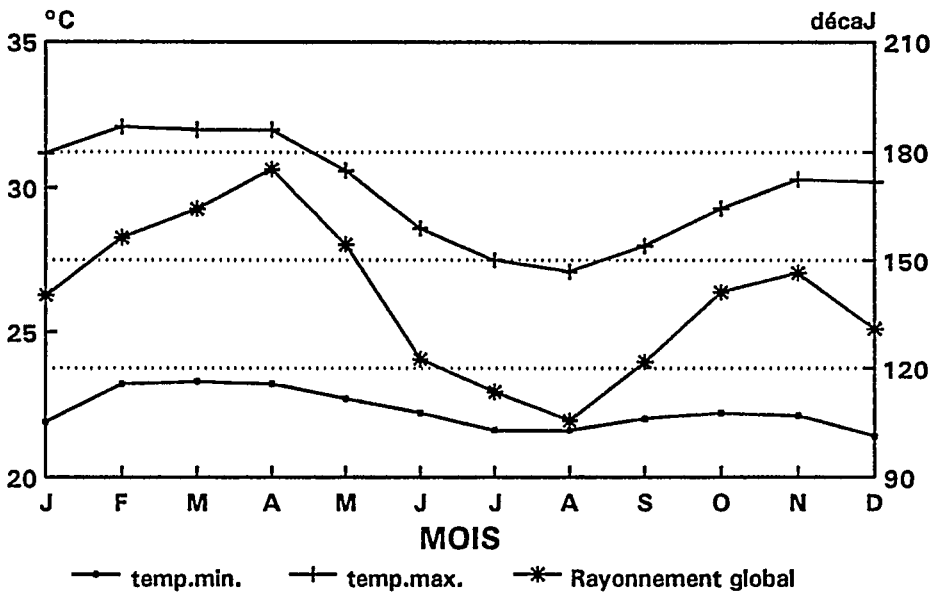
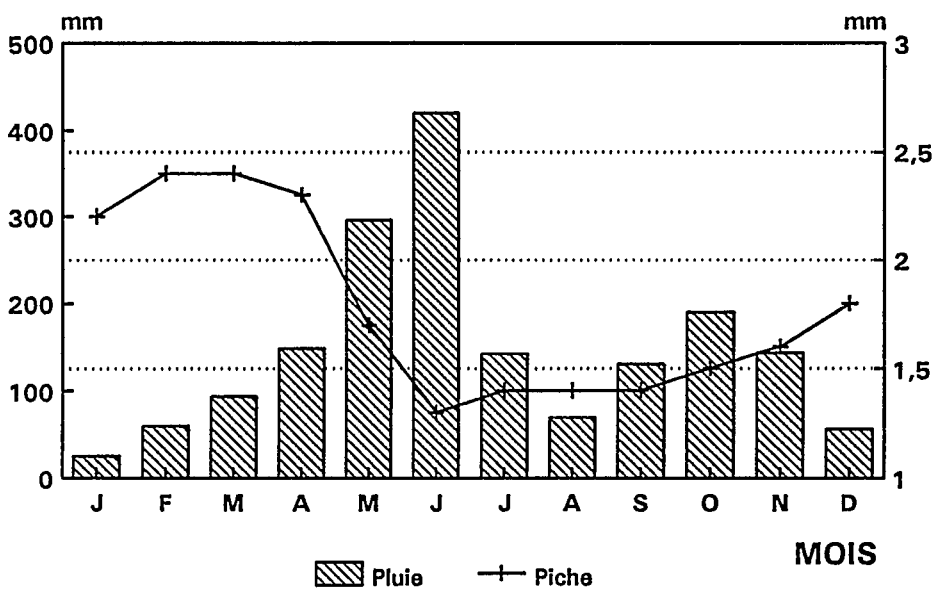


Fig.2 : DONNEES METEO ANGUEDEDOU
Moyennes mensuelles 1978-1990



II-3 CONDITIONS DE CULTURE EN CÔTE D'IVOIRE

II-3-1 Le milieu

La zone de production de la Côte d'Ivoire, entre 5° et 6° de latitude nord, a un caractère nettement équatorial. On y distingue traditionnellement deux régions, la première, côtière autour et à l'Est d'Abidjan et la seconde, plus à l'intérieur des terres, vers Tiassalé et Agboville.

La faible amplitude thermique et les températures moyennes de l'ordre de 27°C seraient responsables d'une faible acidité. La faiblesse de l'ensoleillement, surtout sur la côte, nuirait à la coloration des fruits. La répartition des pluies dans l'année détermine deux saisons humides et deux saisons sèches d'inégales durées. Les précipitations sont plus abondantes sur la côte (2000mm) que vers l'intérieur (1500mm) où les plantations subissent une sécheresse beaucoup plus forte de décembre à février. Mais il semble que ces dernières années la zone des déficits hydriques forts s'étende vers la côte (MALEZIEUX, 1990a).

Les figures 1 et 2 résument les caractéristiques climatiques mesurées sur la station de l'IRFA Anguédédou de 1978 à 1990, lieu de la majorité de nos expérimentations (THIBAUD, 1990).

Les sols de Côte d'Ivoire sont généralement de nature ferralitique mais sur la côte se trouvent surtout des sables tertiaires très pauvres et perméables. Vers l'intérieur ils sont plus argileux, issus de schiste ou de granit. Ils sont souvent gravillonnaires et moins pauvres (plus de calcium et de magnésium). Ils peuvent même être relativement riches dans les plantations nouvellement installées sur défriche de forêt.

II-3-2 Les techniques culturales

La culture d'ananas en Côte d'Ivoire est réalisée pour l'essentiel par des planteurs de haute technicité qui maîtrisent des techniques sophistiquées.

La croissance rapide des plants autorise des cycles courts, 12 à 16 mois pour la récolte du fruit plus 6 à 8 mois pour la récolte des rejets de tige. Ces derniers constituent le matériel de plantation, 55 000 à 60 000 rejets/ha). Une calibration assez fine en classes de 100g, depuis 300 jusqu'à 700g, est faite pour améliorer l'homogénéité des parcelles.

La plantation se fait souvent sur billon pour protéger le système racinaire fragile des plants. Cette technique permet aussi d'incorporer au sol une partie de la fumure (par plant: P_2O_5= 2g, CaO= 5 à 7g, MgO= 3g). Le reste

est appliqué par pulvérisation foliaire (par plant: N= 4 à 6g, K_2O= 10 à 14g). Il n'y a pas d'apport d'engrais après la floraison car ils n'ont qu'une faible incidence sur le fruit (TISSEAU, 1971; TEISSON, 1973b). Contrairement aux pratiques d'autres pays, il n'y a pas d'application de fer ou de zinc en raison de la nature des sols (Hawaï, PY *et al*, 1957 et AUBERT, 1973; Australie, VUILLAUME, 1986; Afrique du Sud, BOUFFIN, 1990). L'efficience des pulvérisations foliaires est augmentée par la forme des plants en rosette. Ils sont capables de retenir un volume de solution de l'ordre de 50ml, ce qui correspond à une pluie de l'ordre de 0,25mm avec les densités utilisées (LACOEUILHE, 1978). Cela représente un volume de 2500 $l.ha^{-1}$ qui est le volume moyen utilisé pour les traitements faits par pulvérisation.

Divers traitements phytosanitaires sont employés contre les principaux parasites (adventices, nématodes et symphyles et assez souvent champignons, notamment sur sol peu acide ou après traitement d'induction florale par le carbure de calcium qui élève fortement le pH au coeur du plant).

Vers 9 mois, en fonction de la taille des plants, le traitement d'induction florale artificielle (TIF) est fait avec de l'éthylène ou de l'acétylène. Il permet de synchroniser la floraison et de réduire l'hétérogénéité à la récolte. Néanmoins, celle-ci s'étale sur 2 semaines.

Dans le mois précédant la récolte, la couronne est réduite manuellement pour limiter son développement. Cette réduction consiste à détruire le méristème apical de la couronne à l'aide d'une gouge métallique. Les fruits sont protégés du soleil durant cette même période.

Quelques jours avant la récolte, une application d'éthéphon (15 à 20ml d'une solution d'éthéphon à 1g $m.a.l^{-1}$ pulvérisée fruit par fruit) permet d'accélérer et d'homogénéiser la coloration des fruits (AUDINAY, 1970; POIGNANT, 1971). Les fruits sont récoltés avant d'avoir atteint l'optimum des qualités organoleptiques, en raison de leurs propriétés mécaniques. Bien mûrs, ils ne peuvent supporter les manipulations du conditionnement et le transport, sauf en cas d'exportation par avion.

II-3-3 Conditions d'exportation

La Côte d'Ivoire s'est dotée d'une réglementation normalisant les caractéristiques de qualité des fruits et de leur conditionnement pour l'exportation depuis 1971. Bien que cette réglementation soit toujours en vigueur, les impératifs du marché et la volonté de proposer des produits de meilleure qualité ont fait évoluer les normes et l'usage actuel est le suivant:

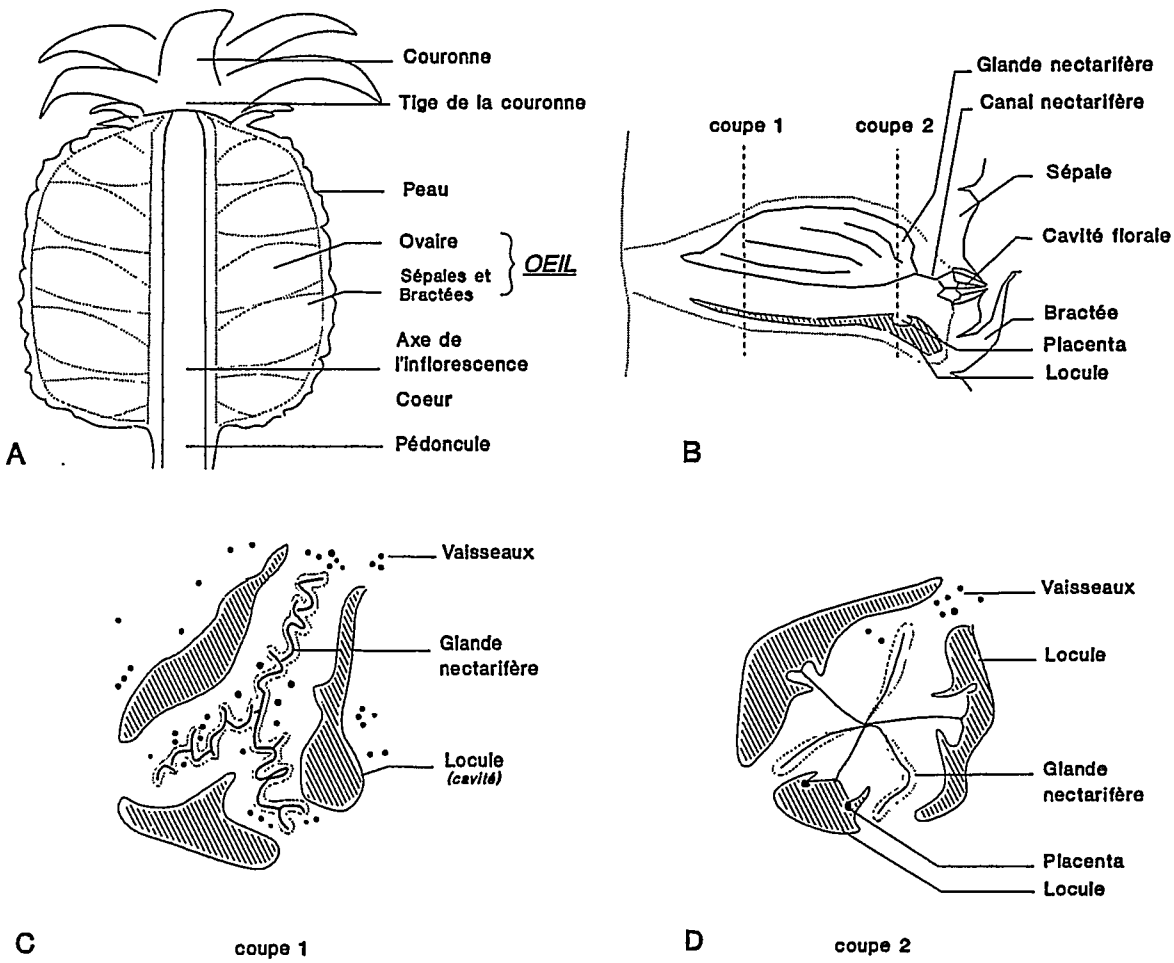
Calibrage des fruits: Les producteurs ont l'autorisation d'exporter les fruits des calibres A, B et C (de 0,9 à 2,3kg). Les fruits de moins de 0,9kg ne sont plus autorisés.

Coloration des fruits: Trois "maturités" étaient distinguées en fonction de la coloration externe et autorisées à l'exportation, M1 (début de coloration à la base du fruit), M2 (fruits à demi colorés) et M3 (fruits complètement colorés). Actuellement seuls les fruits bien colorés sont exportés (M2 et M3).

Conditionnement: A côté du transport en carton traditionnel à logettes verticales, se développe le carton avec les fruits à plat. La palettisation qui réduit les manipulations, diminue beaucoup les risques de chocs à l'origine des pourritures.

Fig.3 : MORPHOLOGIE ET ANATOMIE DE L'ANANAS

(D'après OKIMOTO, 1948)



A: coupe longitudinale d'un fruit entier

B: coupe longitudinale d'un fruit individuel *(OEIL)*

C et D: coupes transversales d'un fruit individuel à deux niveaux indiqués dans B

cavités

II-4 LE FRUIT

II-4-1 Anatomie

OKIMOTO (1948) a réalisé une étude très complète de l'anatomie et de l'histologie de l'ananas. Le fruit auquel on donne le nom de sorosis ou de syncarpe, est issu d'une inflorescence comprenant de nombreuses fleurs sessiles, trimères et complètes. Elles sont disposées en 8 spirales autour de la tige. La partie comestible de l'ananas est composée des ovaires, une partie des sépales et bractées de chaque petit fruit individuel (appelé OEIL par la suite) et le coeur (fig.3A et 3B d'après OKIMOTO, 1948). Celui-ci est un prolongement du pédoncule, très fibreux, il contient les vaisseaux correspondant à chaque oeil. Ceux-ci se sont soudés au cours du développement phylogénétique. Mais il existe des variétés où l'individualisation des yeux est encore très marquée (Cultivar TW12 de la collection IRFA qui est un hybride d'*Ananas comosus* d'origine indéterminée et dont les caractéristiques sont proches du cultivar Pernambuco).

Chaque oeil comprend 3 locules, cavités s'enfonçant profondément vers le cylindre central (fig.3C et 3D). Le volume qu'elles représentent correspond à environ 10% du volume total du fruit en début de maturation et 6% dans le fruit mûr. Ce peut être une donnée importante en terme d'échanges gazeux puisque la respiration est l'activité métabolique principale des fruits. D'autre part, lors de la croissance du fruit, ces zones vides constituent un espace essentiel à l'augmentation de la taille des cellules. Le "remplissage" de ces locules, à maturité, est un critère d'appréciation de la qualité du fruit. Ils jouent un rôle important dans la densité apparente du fruit qui est une mesure d'une grande utilité pratique pour le producteur (voir Troisième Partie, page 145).

Enfin, le fruit est surmonté d'une couronne qui est une structure végétative assez semblable au plant mère et qui peut servir de matériel de plantation.

La pulpe contient de très nombreux vaisseaux qui la rendent fibreuse. Autour de ces vaisseaux, les cellules de type parenchymateux de grandes tailles ont des parois très fines (planche 1, page 149-150), lesquelles sont en partie à l'origine de la grande fragilité du fruit. Celles-ci sont distendues à maturité et les cellules atteignent des dimensions importantes, $19.10^{-4}mm^3$ (SINGLETON, 1965). La vacuole occupe l'essentiel du volume des cellules même dans les fruits encore verts. Les espaces intercellulaires représentent une part non négligeable du volume total bien que difficilement chiffrable. L'air qui y est contenu, est en partie responsable de la densité apparente du fruit et de la translucidité plus ou moins grande de la pulpe.

II-4-2 Développement

Les variétés cultivées sont autostériles et le développement du fruit est parthénocarpique. Les croisements intervariétés sont, par contre, tout à fait possible, par fécondation artificielle on peut obtenir un grand nombre de graines dans un seul fruit. La division des cellules est terminée au moment de l'anthèse comme pour la plupart des fruits (BOLLARD, 1970). Le grossissement du fruit au cours de son développement ultérieur (plus de 20 fois en masse) résulte donc de l'élargissement des cellules.

Les yeux conservent une autonomie certaine au cours de leur développement, ils ont des maturités différentes. La maturation progresse de bas en haut et détermine une hétérogénéité interne qui s'ajoute à celle résultant de la structure du fruit. Cet aspect du fruit sera présenté plus en détail, page 78.

La durée de développement de l'inflorescence varie selon les conditions de culture mais moins que celle du plant. Elle dépendrait essentiellement du régime thermique (FLEISH et BARTHOLOMEW, 1987), mais aussi du poids du fruit et donc de l'âge des plants au moment du TIF (TEISSON, 1977). En Australie WASSMAN (1989) cite des intervalles TIF-récolte (ITR) de 200 à 300 jours. Ils peuvent aller de 180 à 255jours jours aux îles Hawaï (KERNS *et al*, 1936; FLEISH, 1988) avec un climat moins chaud et moins humide qu'en Côte d'Ivoire où l'intervalle moyen TIF-récolte varie de 156 jours (TIF de février) à 167jours (TIF de janvier), (MALEZIEUX, 1990b).

Les courbes de croissance globale du fruit, ou pour chacune de ses composantes, sont de type sigmoïdal (BARTHOLOMEW et PAULL, 1986). Un stade particulier du développement est atteint quinze à vingt jours avant la récolte du fruit mûr. Il se produit alors une série de modifications morphologiques et physiologiques plus ou moins synchronisées qui pourrait être le signal du début de la maturation (SINGLETON, 1965; GORTNER et SINGLETON, 1965; TEISSON, 1973a). On note l'arrêt de croissance de la couronne et le flétrissement du pédoncule. L'acidité titrable du jus passe par un maximum, la synthèse des caroténoïdes de la pulpe s'accélère et l'augmentation de la teneur en saccharose ralentit fortement. Dans l'épiderme, les chlorophylles commencent à être dégradées.

Les études détaillées sur la physiologie de l'ananas sont peu nombreuses et les auteurs se réfèrent souvent au travail de GORTNER *et al* (1967) pour la description des évolutions biochimiques du fruit.

La coloration de l'épiderme est due à la disparition des chlorophylles sans qu'il y ait synthèse importante de carotènes. On ne fait qu'accélérer le processus naturel lorsqu'on applique de l'éthéphon en

pulvérisation avant la récolte. Mais on peut, aussi, désynchroniser les évolutions chimiques de la pulpe et la coloration de l'épiderme, si le traitement est fait trop tôt. La liaison entre la maturité réelle de la pulpe et la coloration naturelle de l'épiderme n'est pas stricte. Elle dépend des conditions climatiques, de la fumure et de la taille du fruit (PY *et al*, 1965). A l'extrême, le fruit peut ne pas se colorer alors que la pulpe est déjà sénescente: il s'agit du **phénomène de translucidité, ou "jaune" de l'ananas, une des 2 déviations physiologiques les plus courantes chez l'ananas** (HUET, 1953). Les gros fruits, dont les plants ont reçu une forte fumure ou déséquilibrée (trop riche en azote par rapport à la potasse), ont leur chair qui devient sénescente alors que les chlorophylles de leur épiderme ne peuvent être dégradée même sous l'action d'éthylène exogène. Le phénomène est liée à des températures élevées associée à de fortes précipitations. Inversement, pour des petits fruits ayant reçu une forte fumure potassique et magnésienne, ou récoltés en période sèche et fraîche (MARTIN PREVEL *et al*, 1961 et 1962), la coloration de la peau est très avancée par rapport à la maturité réelle de la chair.

La seconde déviation métabolique importante économiquement est le Brunissement interne (BI) étudié par TEISSON (1977). Une faible acidité des fruits, en particulier en acide ascorbique, sensibilise les fruits au froid, qui induit la formation de brunissements de la pulpe après conservation.

A ces différentes caractéristiques s'ajoute le fait que l'ananas ne présente pas de crise respiratoire, c'est un fruit non climactérique. Bien que pour la variété KEW, BOSE et LODH (1962) rapporte l'existence d'une telle crise. Il n'y a donc pas de repère fiable pour déterminer le stade mûr. C'est une des nombreuses sources de la variabilité de la qualité de l'ananas.

GORTNER, en se basant sur l'évolution des paramètres biochimiques, propose une terminologie pour les différentes phase de développement du fruit: prématuration, maturation puis sénescence. Le stade mûr se situe en fin de phase de maturation. La sénescence est l'ensemble des processus qui suivent la maturité physiologique (WATADA *et al*, 1984).

II-4-3 Composition

II-4-3-1 Généralités

TEISSON (1977) souligne que peu d'études détaillées sur la composition de l'ananas sont disponibles et la plupart portent sur la variété Cayenne lisse. Elles ont été réalisées aux Hawaï. Une des plus récentes porte sur la variété Kew en Inde (KERMASHA *et al*, 1987). La majorité traite seulement des caractéristiques classiquement mesurées: Extrait sec soluble (estimation des sucres), acidité libre et parfois acide ascorbique.

Quelques caractéristiques générales des fruits mûrs sont présentées dans le tableau 3 (d'après DULL, 1971: variété Cayenne lisse et KERMASHA *et al*, 1987: variété Kew). On y a ajouté les moyennes globales des mesures effectuées sur d'autres variétés de la zone Caraïbe et Floride, ainsi que les minima et les maxima observés, JOHNSON (1903), rapportés par HUET (1958).

Tableau 3: Caractéristiques chimiques globales de la pulpe d'ananas mûr pour 2 des principales variétés cultivées et moyennes globales sur les variétés de la zone caraïbe

En % de la matière fraîche	Cayenne lisse (Hawaï)	Kew (Inde)	Mesures globales pour diverses variétés		
			moyennes	maxi	mini
Eau	81,2 - 86,2	94,4	85,8	89,2	81,1
Acidité titrable	0,6 - 1,62	1,4	0,60	0,85	0,30
Extrait sec soluble, (jus)	10,8 - 17,5	12,5	12,7	17,0	9,8
Protéine (Nx6,25)		0,21	0,42	0,57	0,21
Cendres	0,3 - 0,42		0,4	0,55	0,27

Le tableau 3 permet d'avoir une idée générale de la variabilité des caractéristiques chimiques de l'ananas. Mais il intègre beaucoup de facteurs responsables de leurs variations (variété, climat, techniques culturales et probablement stade de maturité).

II-4-3-2 Glucides

Le saccharose représente 60 à 70% des sucres, le reste étant du glucose et du fructose (tableau 4, selon DULL, 1971 et KERMASHA *et al*, 1987). Les valeurs obtenues par KERMASHA sur la variété Kew paraissent particulièrement faibles.

Tableau 4: Glucides de la pulpe d'ananas mûr

	Teneurs en % du poids frais	
	Cayenne lisse	Kew
Saccharose	5,9 - 12,0	0,63
Fructose	0,6 - 2,3	0,05
Glucose	1,0 - 3,2	0,48
Amidon	< 0,002	

Les sucres représentant l'essentiel des substances solubles du jus, on estime habituellement leur teneur par l'extrait sec soluble exprimé en % et mesuré par l'indice réfractométrique du jus.

Il faut noter que l'ananas ne contient pas de réserves amylacées

susceptibles de se transformer après récolte en sucres. La maturation se fait donc sur pied et il est important de maîtriser les facteurs qui déterminent la teneur en sucre des fruits (climat, nutrition notamment potassique). C'est le principal critère de la qualité gustative (CROCHON *et al*, 1981). Selon MARTIN PREVEL *et al* (1961) et TISSEAU (1963), elle a tendance à diminuer en saison sèche ou lorsque l'alimentation potassique est insuffisante. L'ion K^+ a un rôle physiologique important: il participe à l'établissement d'un osmoticum permettant le maintien de la turgescence cellulaire; il active l'ATPase plasmalemmique, laquelle crée une force motrice protonique (FMP) énergisant les influx actifs des solutés cellulaires; il est largement impliqué dans le chargement actif du phloème contenant majoritairement du saccharose, du K^+ et des acides aminés (HO, 1988).

L'effet saisonnier sur l'ESS est faible (PY *et al*, 1984; MALEZIEUX, 1990b), l'écart maximal ne dépasse pas 2%.

II-4-3-3 Acides organiques

L'acidité libre (AL) des fruits qui représente environ 70% de l'acidité totale, est due pour l'essentiel à deux acides: l'acide citrique (80% de l'AL) et l'acide malique (20%). L'acide ascorbique, ou vitamine C, ne représente qu'une faible part de l'acidité libre (0,1 à 0,2%). D'autres acides ont été détectés en faible quantité, acide oxalique (DULL, 1971), acide galacturonique provenant probablement de la dégradation des pectines pendant la maturation, acide succinique et malonique (CHAN *et al*, 1973).

Au cours de la maturation, seules les évolutions des acides citrique, malique et ascorbique ont été étudiées (SINGLETON, 1965 et GORTNER, 1967, variété Cayenne lisse; MAURYA, 1988, variété Kew). Les principales variations, augmentation jusqu'à un maximum puis chute en fin de maturation, sont dues à l'acide citrique. L'étude de ces variations a été faite dans les conditions ivoiriennes (voir page 84). Pour la majorité des fruits, l'acidité diminue avant la maturation (ULRICH, 1970; DULL, 1971), et de ce point de vue l'ananas se comporte de façon particulière.

L'AL, plus que l'ESS, est sensible aux facteurs du milieu biologique. L'effet saisonnier est très marqué, (PINON, 1981 cité par PY *et al*, 1984; MALEZIEUX, 1990b, en Côte d'Ivoire; WASSMAN, 1989, en Australie) sur Cayenne lisse mais aussi sur la variété KEW (AHMED, 1989). L'acidité diminue en saison sèche quand le rayonnement et la température sont plus forts, inversement, elle augmente en saison humide quand ils diminuent. Ce même type de relation existe entre l'AL et le rayonnement, la température et l'humidité lorsque ces derniers varient en fonction de la situation géographique de la culture. Par exemple, en altitude où les températures sont plus fraîches, les fruits sont plus acides (Martinique, LACOEUILHE et GICQUIAUX, 1971; Hawaï, COLLINS, 1960; AUBERT, 1973).

Alors que l'évolution de la teneur en acide citrique semble liée surtout au stade de maturité, celle de l'acide malique pourrait être déterminée par l'évapotranspiration cumulée sur quelques jours, mais avec un décalage d'une semaine (GORTNER, 1962). Cet auteur suggère une relation avec le métabolisme crassulacéen. D'une façon générale on peut dire que le rôle du malate et des enzymes associées à son métabolisme dans les cellules est particulier. Ils interviennent dans de nombreux processus physiologiques dont la maturation et la sénescence des fruits (fonctionnement de l'enzyme malique en tant que source de pouvoir réducteur sous forme de NADPH, HARTMANN, 1983; possibilité d'oxydation du malate dans les mitochondries indépendamment de la charge énergétique puisque l'enzyme malique est étroitement associée à la voie alternative d'oxydation insensible au cyanure, LANCE, 1981). L'acide malique régule le pH du cytosol (pH-stat, DAVIES, 1977). Enfin le métabolisme crassulacéen est évidemment un des processus où l'acide malique joue un rôle majeur en servant de métabolite primaire de l'assimilation du CO_2 atmosphérique.

L'évolution de la teneur en acide ascorbique est fortement corrélée à celle de l'acidité totale en phase finale de maturation (HAMNER et NIGHTINGALE, 1946). Les teneurs sont variables et le Cayenne lisse est une des plus pauvres parmi les variétés cultivées d'ananas (LOISON-CABOT, 1990). Il jouerait un rôle important dans la pulpe de l'ananas en retardant l'apparition des phénomènes de brunissement, en particulier le Brunissement Interne (TEISSON, 1977). Cependant, la variété Victoria, riche en acide ascorbique, est très sensible au BI.

La nutrition minérale peut aussi modifier l'acidité des fruits. Le potassium l'augmente fortement, surtout sous forme de chlorure de potasse (MARTIN PREVEL *et al*, 1961; GAILLARD, 1970), la cellule compensant probablement l'accumulation de charges positives (K^+) par la synthèse d'anions organiques. Le principal effet d'une forte nutrition azotée est de diminuer l'acidité libre (PY *et al*, 1984; LACOEUILHE, 1978).

II-4-3-4 Composés phénoliques

Les études des composés phénoliques de l'ananas sont peu nombreuses. DULL (1971) relie un problème de fragilité des fruits à la régulation de l'activité AIA oxydase et à la présence possible d'acide férulique, inhibiteur de l'activité enzymatique. DIEUDONNE (1977) a étudié la composition en phénols de l'ananas et son évolution en cas de brunissement interne du fruit. Les composés identifiés sont des dérivés hydroxycinnamiques (esters de l'acide quinique ou dérivés glucosés). L'essentiel des termes de la série hydroxycinnamique est représenté dans les fruits normaux (DIEUDONNE,

1977). Le composé spécifique des fruits bruns serait un complexe renfermant du fer et des esters des acides p-coumarique, férulique et caféique.

Le même auteur montre que leur évolution durant la phase finale de la maturation est purement quantitative, il n'apparaît pas de composés nouveaux dans les fruits mûrs. Après conservation au froid, il apparaît un composé spécifique des fruits atteints de brunissement qui est un complexe fer-dérivés hydroxycinnamiques. Un de ceux-ci est un ortho-diphénol proche de l'acide chlorogénique, substrat fréquent des brunissements dans les fruits.

II-4-3-5 Acides aminés et protéines

GORTNER et SINGLETON (1965) ont étudié l'évolution des teneurs en acides aminés au cours de la maturation du fruits. Ils notent une augmentation de la teneur en méthionine avec la maturation et au delà, une très forte augmentation de celles de la glycine et de l'alanine. KERMASHA *et al* (1987) sur la variété KEW rapportent des teneurs comparables mais pas d'évolution particulière pour les 3 acides aminés cités plus haut, par contre la teneur en acide aspartique augmente beaucoup en fin de maturation.

Peu d'études ont été réalisées sur les protéines enzymatiques du fruits. Elles concernent soit la broméline, protéase caractéristique des broméliacées et qui représente 0,2% du poids frais du fruit (HANSEN, 1970; MARCILLAT, 1974), soit les enzymes liés au brunissement interne, peroxydases et polyphénol-oxydases (TEISSON, 1977; VAN LELYVELD et DE BRUYN, 1977).

L'essentiel des activités oxydatives liées au brunissement est dû à des peroxydases. D'après TEISSON (1977), les polyphénoloxydases de l'ananas présentent des caractéristiques de pH optimum et de thermorésistance de peroxydases. L'AIA-oxydase présente comme particularité d'avoir pour cofacteur l'acide p-coumarique et requiert aussi la présence de manganèse (GORTNER et KENT, 1958 et TEISSON, 1977). L'acide férulique est par contre inhibiteur comme pour d'autres AIA oxydases (GELINAS, 1973). TEISSON rapporte également l'existence d'une activité catalasique, mais extrêmement variable en fonction des conditions d'extraction (pH), et une activité ascorbate oxydase uniquement dans les fruits atteints de brunissement interne. Cependant la nature exacte de cette activité n'est pas clairement définie.

II-4-3-6 Composition minérale

La composition minérale des fruits est très variable suivant les conditions du milieu et la fumure adoptée.

Le tableau 5 présente une comparaison des compositions de fruits ivoiriens et hawaïens. Les ananas ivoiriens sont plus pauvres en calcium, phosphore et fer, ce dernier étant employé sous forme de pulvérisations foliaires aux Hawaï. Par contre, ils sont plus riches en magnésium et manganèse peut être en raison de l'antagonisme très fort avec le fer (SIDERIS et YOUNG, 1949; MARCHAL, 1971).

Tableau 5 : Variations de la composition minérale de la pulpe d'ananas aux Hawaï et en Côte d'Ivoire.

Eléments minéraux	Fruits des Hawaï DULL (1971) $mg.100g^{-1}$	Fruits de Côte d'Ivoire MARCHAL (1990) $mg.100g^{-1}$
azote	0-120	73-78
calcium	7-16	5,3-11,5
chlore	46	
fer	0,3	0,21-0,29
iode	0,006-0,107	
magnésium	11	13-14
manganèse	0,03	0,1-0,18
phosphore	6-21	4,5-6,0
potassium	11-330	153-208
silice	11-69	
sodium	14	
soufre	7	

Le jus n'est pas très représentatif de la composition de la pulpe entière. Lors de l'extraction du jus, la moitié du fer reste incluse dans les résidus. Seuls le potassium, le magnésium et le manganèse dans le jus, sont bien représentatifs de la teneur de la pulpe.

II-5 QUELQUES DONNÉES GÉNÉRALES SUR LA MATURATION ET LA SÉNESCENCE DES FRUITS

La maturation des fruits est considérée comme faisant partie intégrante de la sénescence (WATADA *et al*, 1984). Plusieurs auteurs ces dernières années ont présenté des revues sur la maturation en essayant de proposer des schémas explicatifs de son contrôle, du rôle de l'éthylène et des hormones en général (McMURCHIE *et al*, 1972; TREWAVAS, 1983 et 1991; BRADY, 1987; HARTMANN *et al*, 1987; GUERN, 1987).

L'initiation et le déroulement des processus biochimiques et physiques qui s'y déroulent dépendraient de l'équilibre entre régulateurs de croissance. De fait, on peut les modifier en perturbant cet équilibre, soit en apportant des régulateurs exogènes, soit en jouant sur leur teneur endogène. Et parmi ceux-ci, l'éthylène semble jouer un rôle central quoiqu'encore obscur. S'il est indéniablement lié à la crise respiratoire des fruits climactériques, il n'est pas évident qu'il soit le signal primordial responsable de la maturation. Il initie certains des processus de la maturation mais d'autres paraissent en être indépendants chez la tomate ou la poire par exemple. D'autres marqueurs moléculaires de l'initiation de la maturation ont été identifiés: les ARNm (RATTAPANONE, 1978). Ils traduisent une capacité de synthèse protéique nouvelle, spécifique pour la maturation et la régulation au niveau génétique des processus. GRIERSON (1985) distingue 3 groupes d'ARNm au cours du développement et de la maturation de la tomate. Le premier comprend des ARNm présents à tous les stades d'évolution du fruit. Ils coderaient pour des protéines nécessaires au métabolisme général du fruit. Le second comprend des ARNm s'accumulant pendant le développement, puis disparaissant avant ou au début de la maturation. Certains, par exemple, ont pour origine le plastome et codent pour les enzymes de la photosynthèse (PIECHULLA, 1985). Enfin, le troisième comprend au moins 8 ARNm synthétisés de novo ou montrant un fort accroissement de synthèse pendant la maturation. Un de ces ARNm coderait pour la polygalacturonase chez la tomate (GRIERSON, 1985), chez l'avocat certains coderaient pour les cellulases (TUCKER et LATIES, 1984). GRIERSON (1986) rapporte qu'au cours de la maturation de la tomate, 19 ARNm augmentent quantitativement, dont 5 sont spécifiques de la maturation. Les produits de traduction de la plupart ne sont cependant pas identifiés. D'après le même auteur, les augmentations des teneurs en ARNm pourraient être dues à une stimulation de la transcription ou à une inhibition de leur dégradation.

Le mode d'action de l'éthylène n'est pas clair non plus. On distingue depuis longtemps fruits climactériques et non climactériques en prenant en compte la production autocatalytique d'éthylène associée à la crise respiratoire (BIALE, 1960 cité par BIALE et YOUNG, 1981; McMURCHIE *et al*, 1972). Cependant, ROMANI (1987) fait remarquer qu'on ne sait pas vraiment faire la différence entre les significations de l'augmentation de la

respiration, provoquée par l'éthylène, chez les fruits non climactériques ou les fruits climactériques immatures et celle qui se produit naturellement pendant la maturation de ces mêmes fruits climactériques.

HARTMANN (1987) propose un schéma à 3 niveaux de concentrations et de sensibilité à l'éthylène: niveau 1 pour initier la maturation, niveau 2 pour accélérer les processus (déclenchement de la production autocatalytique d'éthylène) et niveau 3, pour poursuivre le bon déroulement de la maturation. Au niveau 1 et 2, l'éthylène pourrait agir en accroissant les processus de transcription, au niveau 3, il aurait plutôt un effet protecteur pour les messagers de la transcription, ce qui reprend les suggestions de GRIERSON (1986) citées au paragraphe précédent.

Le mode d'action des hormones végétales n'est pas encore déterminé, celui de l'AIA est certainement le plus documenté actuellement. GUERN (1987) propose une analyse détaillée du problème de l'existence des hormones dans le développement des végétaux, on retiendra ici quelques unes des constatations qu'il fait. Un schéma d'action de l'AIA, basé sur ce qui est connu chez les animaux, pourrait être: 1) réception du signal hormonal par un récepteur membranaire, 2) transduction du signal vers le cytosol entraînant une augmentation de la teneur en Ca^{++}, 3) ce dernier entraîne une modification des phosphorylations de différentes enzymes et donc de leur activité. L'existence de récepteurs hormonaux est aujourd'hui reconnue et résulte de diverses observations: la spécificité des hormones vis-à-vis des sites de liaison; la constatation que les hormones les plus actives ont les plus fortes affinités sur les sites d'action. De même, il a été observé une compétition entre un anticorps spécifique pour un site de fixation sur le plasmalemme de mésocotyle de maïs et l'AIA, entraînant une inhibition de son élongation. Le mode de transduction du signal n'est pas connu, mais l'existence de métabolites du phosphatidylinositol impliqués dans la transduction du signal hormonal chez les animaux, a été prouvée chez les végétaux où ils pourraient y jouer un rôle similaire. Enfin, si l'influence du calcium sur la phosphorylation des protéines est bien connue (POOVAIAH, 1985; LESHEM *et al*, 1986), la démonstration directe du contrôle hormonal de la concentration en calcium cytosolique, n'en est qu'à ses premières approches.

Il paraît clair que les hormones peuvent agir en modulant la transcription, cependant le mécanisme d'action est encore inconnu. Toujours d'après GUERN (1987), l'augmentation de la transcription peut résulter d'une modulation de sa vitesse, d'une stabilisation des ARNm ou d'une dérépression (ou répression) de gènes, après activation d'un promoteur. D'autre part, la nature du signal chimique agissant au niveau de la transcription, n'est pas déterminée (complexes hormones-récepteurs ou messagers secondaires-récepteurs).

Une approche du concept multihormonal de la maturation consiste

à considérer non plus seulement les teneurs endogènes mais la sensibilité des tissus aux différentes hormones (TREWAVAS, 1983 et 1991) ainsi que la quantité ou l'affinité des récepteurs spécifiques de ces hormones. Cependant, un des problèmes de ce concept est d'expliquer la multiplicité des réponses aux hormones, avec un si petit nombre de substances reconnues comme telles (auxines, gibbérellines, cytokinines, acide abscissique et éthylène). En comparaison, les animaux disposent d'un nombre très supérieur d'hormones, mais les interactions entre hormones végétales pourraient partiellement contribuer à accroître la variété des réponses. D'autre part, de nouvelles substances possédant une action de type hormonal, des oligosaccharides libérés sous l'action des polygalacturonases endogènes, ont été découvertes. Ces substances, connues pour leur rôle dans les réactions de défense des plantes contre les parasites (DARVILL, 1984), sont capables de mimer, d'interagir ou d'être antagonistes des hormones classiques et pourraient constituer une nouvelle famille d'hormones végétales (BISHOP *et al*, 1984; GUERN, 1987; THAIN *et al*, 1990).

Enfin ROMANI (1987) en situant la maturation dans son contexte de la sénescence, propose de considérer comme élément directeur des recherches à mener, la capacité des cellules à maintenir leur équilibre vital. Les cellules sont capables de rétablir leur métabolisme après un stress, mais cette capacité diminue avec le vieillissement (ROMANI, 1975). Ce concept juxtaposant sénescence et homéostasie peut s'appliquer aussi bien aux fruits climactériques que non climactériques. La crise climactérique aurait pour but d'accélérer simplement et de synchroniser, plus ou moins, le déroulement des processus qui auraient lieu de toute façon un peu comme dans les fruits non climactériques. De ce point de vue, l'augmentation de la respiration serait un phénomène de compensation pour maintenir l'équilibre de la cellule au moment où elle commence son déclin vers la mort.

Chapitre III: Objectifs de l'étude

La maturation normale de l'ananas est susceptible de subir des déviations diverses. Le Brunissement interne est aujourd'hui assez bien maîtrisé et ses mécanismes biochimiques mieux cernés. Le phénomène du "jaune" de l'ananas ou "translucidité de la pulpe" est en revanche moins bien connu. Afin de comprendre les tenants et les aboutissants de ce processus, il sera procédé dans un premier temps à une étude de la maturation de l'ananas aux plans physiologique et biochimique. Par la suite on s'attachera à caractériser le "jaune de l'ananas" par une étude comparée de la maturation des fruits sains ou non.

III-1 MATURATION DE L'ANANAS: ÉLABORATION DE LA QUALITÉ ET SA VARIABILITÉ

En introduction au chapitre sur la maturation, on montrera une des principales difficultés de l'étude de l'ananas: **l'hétérogénéité des fruits.** Celle-ci résulte de l'hétérogénéité du peuplement végétal qui conduit, à partir de rejets (matériel végétatif utilisé pour la plantation) apparemment homogènes, à des plants et des fruits hétérogènes au sein d'une même parcelle. Il existe une autre hétérogénéité, interne au fruit, liée à sa structure composite. On montrera comment elle se manifeste pour les caractéristiques biochimiques mesurées dans la suite de l'étude.

L'amélioration de la qualité implique une bonne connaissance des composantes biochimiques du fruit, de leur évolution au cours de la maturation et de leur variabilité.

Le premier point étudié, a été l'évolution des principales caractéristiques biochimiques du fruit au cours de la maturation. L'acquisition de ces résultats, dans les conditions de Côte d'Ivoire, a été indispensable afin de pouvoir introduire la comparaison entre l'évolution normale du fruit et celle des fruits "jaunes". Les exportations de fruits de Côte d'Ivoire sont les plus importantes en décembre, puisque traditionnellement en Europe et particulièrement en France, l'ananas est consommé pour les fêtes de Noël. L'essentiel de l'étude a été réalisé pendant cette période. Le stade de maturité à la récolte est une notion particulièrement importante dans le cas de l'ananas. C'est un fruit non climactérique qui doit être cueilli mûr pour avoir les qualités optimales. De fait, il n'accumule pas de réserves susceptibles d'être converties en sucres après la récolte. Le problème qui se pose donc aux producteurs, est d'arriver à une bonne adéquation entre la nécessité d'obtenir un fruit mûr, pour pouvoir le commercialiser, et la nécessité d'avoir un produit suffisamment résistant pour supporter toute la chaîne de commercialisation entre la Côte d'Ivoire et l'Europe (minimum 15 à 20 jours).

On essaiera à partir de l'observation des évolutions biochimiques du fruit (épiderme et pulpe) et de certains des mécanismes qui les contrôlent, d'établir un parallèle avec les connaissances actuelles chez les autres fruits (les diverses observations ont été regroupées sous la dénomination "Discussion:", après la présentation des résultats obtenus sur ananas pour chacune des principales composantes biochimiques du fruit). Cette démarche est très spéculative mais étant donné le peu d'information disponible sur la physiologie de la maturation de l'ananas, elle peut permettre d'orienter des recherches futures.

On évoquera, enfin, les problèmes de la variabilité de la qualité. L'élaboration de la qualité du fruit dépend de nombreux facteurs. Le premier

est certainement le climat et les réponses induites au niveau de la physiologie du plant et de la maturation du fruit qui s'étale sur plus d'un mois. Les techniques culturale, et plus particulièrement la fumure, ont aussi un impact sur la qualité en modifiant directement certaines des composantes biochimiques (acidité ou sucres), ou en sensibilisant les fruits à certains problèmes (par exemple un déséquilibre K/N rend le fruit plus fragile et sensible au "jaune", ou la baisse de la teneur en acide ascorbique rend le fruit sensible au BI).

III-2 LA SÉNESCENCE ET LE "JAUNE" DE L'ANANAS

Dans cette deuxième partie, une maladie physiologique, le "jaune" de l'ananas, sera étudiée. C'est un cas particulier de sénescence accélérée liée au climat, aux techniques culturales et au facteur génétique. Celle-ci se traduit par une translucidité de la chair et une mauvaise coloration de l'épiderme à certaines époques de l'année. C'est un grave problème de qualité posé aux producteurs.

On caractérisera les évolutions chimiques et enzymatiques de la pulpe des fruits jaunes par rapport à celles des fruits sains. On étudiera également quelques aspects de la coloration artificielle de l'épiderme du fruit par l'éthéphon: métabolisme de l'éthéphon par le fruit puis relation entre les facteurs physiques, température des fruits et pH des solutions d'éthéphon, et l'efficacité du traitement, notamment en cas de jaune de l'ananas.

On discutera des origines possibles du phénomène et des facteurs qui contrôlent son expression, le climat étant probablement le principal. Les évolutions biochimiques qui se produisent dans le fruit atteint, pourraient traduire une simple dégénérescence des cellules ou être une réponse particulière à un stress climatique.

On étudiera enfin, l'impact du jaune sur la qualité du fruit, les qualités organoleptiques mais aussi l'aptitude à la conservation.

DEUXIEME PARTIE:
MATERIEL ET METHODE

Chapitre I: Matériel végétal et techniques culturales

I-1 LA VARIÉTÉ

La variété Cayenne lisse de l'espèce *Ananas comosus*, la plus cultivée dans le monde et en Côte d'Ivoire, a été utilisée dans cette étude.

I-2 LE FRUIT

La partie du fruit utilisée diffère quelque peu suivant le type d'analyses effectuées. Celles-ci sont faites soit sur le jus obtenu après broyage et filtration sur tissu (c'est à dire essentiellement le contenu vacuolaire), soit après extraction totale sur une partie précise de la pulpe. La matière sèche du jus (11 à 18% de MS), représente 80 à 95% de celle de la pulpe (DULL, 1971). Le plus souvent on utilise deux quartiers opposés du fruit pour faire les analyses de routine, acidité libre, extrait sec soluble et acide ascorbique. Les deux autres quartiers servent aux divers prélèvements nécessaires pour le reste des analyses. On veille tout particulièrement à respecter l'homogénéité du prélèvement dans le sens vertical en raison de la constitution même du fruit.

Dans le cas des analyses sectorielles, la découpe du fruit est faite suivant la figure 4A.

I-3 LES PARTIES VÉGÉTATIVES

I-3-1 Les feuilles

Des analyses minérales ont été faites sur deux types de feuilles. La première est la **feuille D (FD)** selon la définition de PY *et al* (1984) et elle est généralement utilisée pour le diagnostic foliaire durant les stades végétatifs. La seconde est **la feuille la plus longue à la base du pédoncule du fruit** et qui peut être considérée comme la dernière feuille à avoir eu une croissance normale avant l'induction florale et donc la dernière feuille D avant floraison (fig.4B).

Fig.4A: DECOUPE DU FRUIT PAR SECTEUR

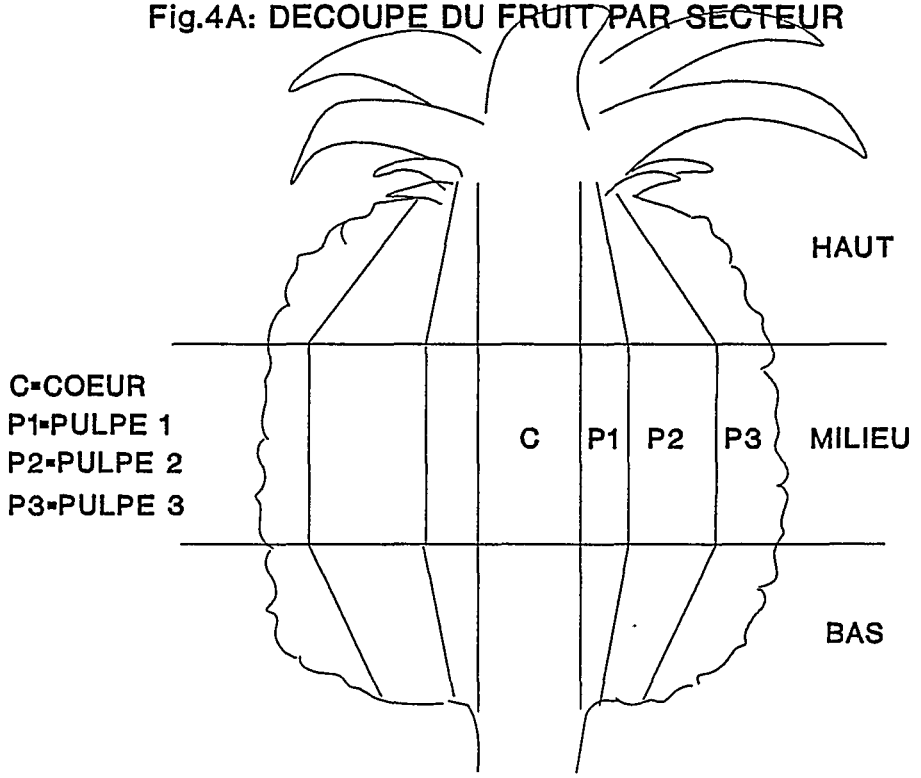
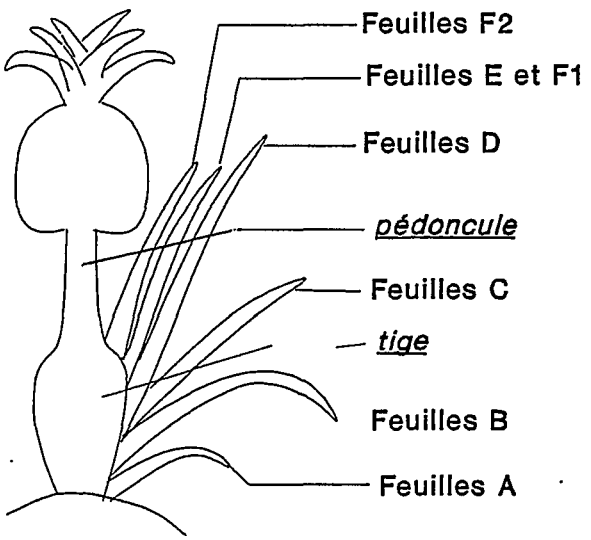


Fig.4B: Classification des feuilles du plant d'ananas

(selon PY, 1984)



F2: leur croissance a été diminuée ou stoppée par la floraison.

F1 et E: leur croissance n'était pas terminée avant la floraison.

FD: feuille la plus longue et terminant sa croissance, à un moment quelconque de la phase végétative.

FC: croissance terminée et totalement effectuée après plantation du rejet.

FA et B: croissance terminée mais partiellement (B) ou totalement (A) effectuée avant plantation du rejet.

L'échantillon à analyser est constitué, sauf spécifié dans le texte, d'une aliquote prélevée sur le broyat de plusieurs feuilles entières, séchées et provenant des différents plants d'un même traitement.

I-3-2 La tige

La tige (fig.4B) des plants aurait, entre autres fonctions, celle d'être un organe de réserves amylacées réutilisées par le fruit pendant son développement (PY *et al*, 1984). L'échantillon est constitué d'une fraction de 20g représentative de l'ensemble de la tige et prélevée après découpe de celle-ci en petits cubes de 1 à 0,5cm de côté.

I-4 TECHNIQUES CULTURALES

Les techniques culturales utilisées pour les expérimentations sont les mêmes que celles présentées dans le Chapitre "L'ananas et sa culture", page 10. Cependant, dans les expérimentations, les couronnes ne sont pas réduites et l'éthéphon n'est pas utilisé pour colorer les fruits avant récolte, sauf précisé dans le texte. Cette dernière modification est très importante puisqu'en l'absence du traitement à l'éthéphon, la corrélation entre la coloration externe du fruit et sa maturité réelle, est meilleure. On peut l'utiliser comme indicateur de récolte mais avec les réserves que nous verrons par la suite.

I-5 AUTRES TECHNIQUES

I-5-1 Applications des régulateurs hormonaux pour le contrôle de la maturation

Le traitement des fruits par les régulateurs hormonaux type éthéphon, gibbérellines ou auxines se fait, sauf indications contraires, par pulvérisation manuelle, fruit par fruit, à l'aide de pulvérisateurs à air comprimé. Le traitement classique à l'éthéphon consiste en l'application, sur l'épiderme du fruit exclusivement, de 15 à 20ml d'une solution diluée à $1gma.l^{-1}$.

I-5-2 Injection dans le pédoncule du fruit

Divers régulateurs du métabolisme du fruit ont pu être "injectés" directement dans le flux de sève du pédoncule pour être redistribués dans le plant. Une petite carotte du pédoncule est prélevée avec un emporte pièce, 10cm sous la base du fruit, pour permettre l'installation d'une pipette

Pasteur contenant 2,5 ml de la solution à injecter. Le flux de sève ascendant aspire la totalité de la solution en quelques heures. On a voulu visualiser la redistribution de la solution dans le plant en injectant du bleu de méthylène, sans préjuger du transport réel pour d'autres types de solution (planche 1, photo a). Le colorant se retrouve très nettement dans toutes les parties du plant, le long des vaisseaux. Dans le fruit, il se retrouve également essentiellement le long des vaisseaux, du coeur à l'épiderme. Cependant la répartition des vaisseaux colorés n'est pas homogène, elle dépend vraisemblablement des vaisseaux coupés par l'emporte pièce dans le pédoncule.

Chapitre II: Les analyses chimiques quantitatives

II-1 LES ACIDES ORGANIQUES

II-1-1 L'acidité titrable

L'acidité libre (AL) est mesurée en analyse de routine sur 10ml de jus filtré sur tissu, par neutralisation avec NaOH N/10 jusqu'à pH=8, en présence de phénolphtaléine. Le pH=8 correspond bien à la neutralisation du jus (TEISSON, 1977). Les résultats sont exprimés en milliéquivalents pour 100ml de jus (méq.$100ml^{-1}$).

L'acidité totale est mesurée sur 1ml de jus après passage sur résine échangeuse d'ions (Dowex 50) conditionnée sous forme H^+ et rinçage par 10ml d'eau.

II-1-2 Dosages individuels des acides organiques

Les dosages quantitatifs individuels des **acides organiques** ont été faits par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en Côte d'Ivoire ou par Chromatographie liquide haute performance (HPLC) à Montpellier. Seul le dosage de l'acide ascorbique n'a pas été réalisé par ces 2 méthodes, il fait l'objet du paragraphe suivant.

Conditions de l'analyse par CPG:

La méthode utilisée est classique (CHAN *et al*, 1972; MORARD et BOURRIER, 1971; SASSON *et al*, 1976): Le jus (2,5ml) subit préalablement une fixation alcoolique. Puis, après évaporation de l'alcool, addition de l'étalon interne (1mg d'acide adipique) et de 1ml d'NH_4OH 1N, il est congelé et lyophilisé. L'échantillon est traité par du BF_3 à 10% dans du méthanol (4ml de solution commerciale diluée au demi avec du méthanol) pendant 16h à 25°C, ce qui permet de méthyler les fonctions acides et de rendre plus volatils les acides organiques. A cette solution sont ajoutés 10ml de $(NH_4)_2SO_4$ 33% et 2ml

de chloroforme. Le sulfate d'ammonium permet une meilleure extraction des acides méthylés de la phase méthanolique, par le chloroforme. De 1 à 10µl de la phase chloroformique sont injectés dans une colonne en acier de 3m de long, de 3,2mm de diamètre, DEGS 15% (diéthylène glycol succinate) sur chromosorb W HMDS 60/80 mesh. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme sont respectivement 180°C et 220°C. Le four du chromatographe GIRDEL A 300 est réglé en mode isotherme à 170°C. La pression du gaz vecteur (N_2) en tête de colonne est de 0,2MPa, les débits d'hydrogène U et d'air dans le détecteur sont respectivement de 30 et 333ml.min^{-1}.

L'étalonnage est fait à partir d'une gamme multiple reproduisant les proportions des différents acides dans le fruit et de l'étalon interne. Les concentrations sont calculées en faisant les rapports des surfaces des pics des acides organiques à celle de l'étalon interne (Intégrateur ICAP 5).

Remarque: La reproductibilité de la méthode n'est pas toujours très bonne car les pourcentages de méthylation varient suivant les acides organiques (SASSON *et al*, 1976). Nous avons gardé l'option de travailler sur des échantillons non purifiés suivant toujours en cela SASSON qui obtient ainsi de meilleurs résultats.

Conditions de l'analyse par HPLC:

Les extraits alcooliques obtenus à partir de la pulpe (≈100g frais), sont centrifugés, puis filtrés sur filtre en nitrate de cellulose (0,45µm). L'injection, sans autre préparation, est faite dans une colonne ION 300 (Interchim), la phase mobile est H_2SO_4 (0,008N) avec un débit de 0,4ml.mn^{-1} (isocratique) à une température de 35°C.

La détection des acides organiques est faite par un détecteur UV (VARIAN 2550) à 210nm. Un second détecteur (réfractomètre), monté en série permet de doser les sucres sur les mêmes échantillons.

II-1-3 L'acide ascorbique (AA) et l'acide déhydroascorbique (DHA)

L'acide ascorbique, forme réduite de la molécule, a été dosé selon la méthode de ROE et KUETHER (1943), déjà utilisé par TEISSON (1977) sur jus d'ananas, en raison de la simplicité de sa mise en oeuvre pour des analyses de routine, bien qu'elle ne soit pas sans critique.

A 4ml de jus filtré on ajoute, dès l'extraction, 4ml d'acide méta-phosphorique 2% qui limite la destruction enzymatique et chimique de l'acide

avant son dosage (DELAPORTE, 1967; DELAPORTE et MACHEIX, 1968). On effectue alors la titration par du dichlorophénol indophénol 200mg.l^{-1}. La gamme étalon est préparée avec 1 à 5mg d'acide ascorbique dans 8ml d'acide méta-phosphorique 1%.

L'acide déhydroascorbique, forme oxydée de la molécule, est dosée selon une méthode du même auteur. A 10ml de jus dilué, on ajoute 10ml d'acide méta-phosphorique 2% et 1.25ml de TCA 27.5%. Après centrifugation 4ml sont traités quelques minutes par 0,5g de charbon actif en suspension dans de l'acide phosphorique 2% (volume final 25ml). Cette dernière opération a pour but de transformer la totalité de l'acide ascorbique en déhydroascorbique. Le filtrat est utilisé pour le dosage avec un réactif à la dinitrophénylhydrazine (DNPH: 2g; thiourée: 4g; acide sulfurique 9N: qsp 100ml). A 2ml de filtrat, on ajoute 1ml de réactif et 2ml d'acide phosphorique 2%, puis les tubes sont placés dans un bain marie à 60°C pendant 1h30. On ajoute ensuite 5ml d'acide sulfurique 85%. La coloration orangée est mesurée après 30min pour permettre la dégradation des "osazones" instables formées par les sucres. La gamme étalon, entre 0 et 6µg/ml, est préparée à partir d'acide ascorbique réduit, traité dans ces mêmes conditions et en présence de saccharose en quantité équivalente à celle de l'échantillon. La densité optique à 540nm augmente de façon linéaire en fonction de la quantité d'acide ascorbique dans la gamme de concentration utilisée.

II-2 LES THIOLS

Le choix des méthodes de dosage des thiols réduits et oxydés a été fait sur la base de la comparaison entre les avantages et les inconvénients de différentes types de dosages existants (VINA, 1990).

Les thiols réduits ont été dosés par la méthode de ELLMANN (1959) basée sur une réaction des groupes -SH non protéiques avec l'acide dithio bis(2-nitro benzoïque), (DTNB).

$$DTNB^{2-} + RS^{-} \longrightarrow RSTNB^{-} + TNB^{2-}$$

En milieu alcalin le produit de réaction $RSTNB^{-}$ est jaune et peut être dosé par spectrophotométrie à 412nm.

Réactif: DTNB, 1,6mM dans du tampon phosphate 0,1M et le pH ajusté à 6,8.

Méthode d'analyse: A 5ml de jus, on ajoute immédiatement en fin d'extraction 0,5ml de TCA 27,5% pour limiter la dégradation des thiols. Après centrifugation, on ajoute à 1ml de surnageant 1ml de TCA 2,5%, 100µl de réactif au DTNB puis 1ml de TRIS 0,5M. La DO est lue à 412nm et la gamme

étalon est préparée avec du glutathion réduit, entre 0 et 0,2mM.

Remarque: La méthode n'est pas spécifique pour le glutathion et dans le jus d'ananas, d'autres types de thiols sont susceptibles de réagir, cystéine et composés apparentés (HUET, 1958). C'est cependant cette mesure que nous prendrons pour estimer la forme réduite du glutathion par rapport à la forme oxydée.

Les thiols oxydés ont été dosés par une méthode spécifique du **glutathion oxydé**. Elle est basée sur sa transformation en glutathion réduit par la glutathion réductase. La réaction étant pratiquement irréversible (MEISTER et ANDERSON, 1983), on peut après addition de glutathion réductase du commerce et de NADPH, doser les thiols totaux par le réactif au DTNB et obtenir par différence le glutathion oxydé.

A 2,5ml de jus centrifugé, on ajoute 2,1ml de tampon phosphate 0.25M pH=8 (le pH du jus ainsi dilué se trouve toujours entre 6,5 et 7, proche du pH optimum de l'enzyme). On ajoute également 100µl d'EDTA 150mM, 50µl de NADPH 7,5mM et 250µl de glutathion réductase du commerce.

Après quelques minutes on ajoute 500µl de TCA 27.5% et on procède à un dosage de thiols réduits avec le réactif au DTNB selon la procédure précédemment décrite.

Remarque: Si on ajoute du glutathion oxydé on constate que la transformation forme oxydée/forme réduite est complète pour la plupart des jus sauf lorsque les fruits sont très verts.

II-3 LES SUCRES

II-3-1 Estimation de la teneur globale par l'extrait sec soluble (ESS)

L'extrait sec soluble (ESS) du jus obtenu après broyage et filtration est mesuré par son indice réfractométrique au moyen d'un réfractomètre manuel à compensation de température. Cette mesure constitue un bonne approximation de la teneur en sucre (HUET, 1958). On peut améliorer la précision de l'approximation par la formule suivante, basée sur la composition moyenne du jus d'ananas au stade récolte:

Sucres = ESS - 3AL (BARTHOLOMEW et PAULL, 1986)
(valeurs exprimées en % de la matière fraîche)

II-3-2 Les sucres individuels

Le saccharose est hydrolysé par addition d'invertase du commerce, après dilution appropriée du jus dans du tampon acétate 0.05M pH=4,2. Le glucose libéré est dosé par une méthode enzymatique: glucose oxydase/peroxydase, au moyen du kit SIGMA.

Le glucose libre est dosé de la même façon.

La teneur en **fructose** libre est calculée par différence entre les sucres réducteurs et le glucose libre. Les sucres réducteurs (auxquels on assimile la somme glucose + fructose) sont mesurés après dilution appropriée du jus, par réaction avec le réactif à l'acide dinitrosalicylique (DNS).

Réactif:

Ac Dinitrosalicylique	1,0g
NaOH	1,6g
Dissolution par chauffage dans 50ml d'eau	
Après refroidissement,	
Tartrate double K,Na	30,0g
H_2O qsp 100ml	

Méthode d'analyse:

A 2ml de jus dilué de façon à obtenir une concentration finale proche de 0,1mg.ml^{-1}, on ajoute 2ml de réactif au DNS. Après 10min au bain marie bouillant les tubes sont refroidis rapidement dans la glace et on additionne 2ml d'eau froide. La DO de la solution est mesurée à 540nm et la concentration en sucres réducteurs calculée par rapport à une gamme étalon de glucose de 0,05 à 0,25mg.ml^{-1}.

Remarque: Pour les 2 méthodes de dosage, il peut y avoir des interférences avec des substances présentes dans l'ananas (ac ascorbique, cystéine, glutathion, ac galacturonique). Cependant les différences entre les concentrations des sucres et celles des substances interférant, sont suffisamment grandes pour considérer que les résultats obtenus sont corrects.

Certaines analyses ont été réalisées par HPLC au laboratoire de Montpellier.

Méthode d'analyse: (voir "acides organiques")

II-3-3 L'amidon

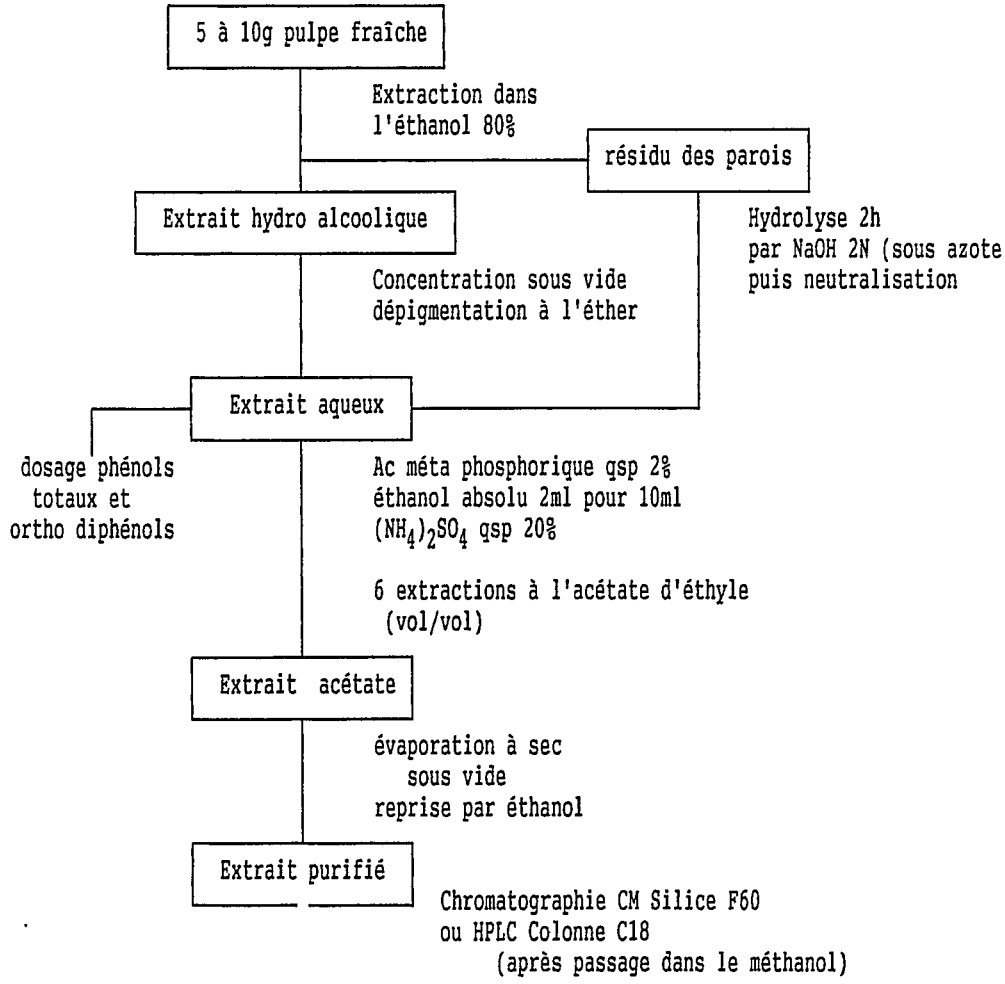
L'amidon est pratiquement absent de la pulpe (DULL, 1971) et les analyses n'ont été réalisées que sur les tiges du plant .

Après fixation alcoolique et extraction des substances solubles dans l'alcool, le résidu est séché puis broyé finement. Une prise d'essai de 50mg de résidu sec, mise en suspension dans l'eau, est autoclavée 2h à 120°C. Ensuite 0,5ml de la solution d'amidon sont traités 3h à 55°C, par 5ml de tampon acétate 0,1M pH=4,8 contenant de l'amyloglucosidase du commerce (ZINSOU *et al*, 1983; WILSON et BAILEY, 1971; DEKKER et RICHARDS, 1971). Le dosage du glucose libéré se fait comme décrit précédemment.

II-4 LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

II-4-1 Extraction

Le protocole d'extraction des **composés phénoliques**, dérivé de protocoles classiques (MACHEIX *et al*, 1990), est résumé dans le schéma suivant:



Dans la mesure du possible l'ensemble de l'opération se fait au froid et à l'abri de la lumière.

II-4-2 Les phénols totaux

Le dosage des **phénols totaux** est réalisé sur les extraits aqueux par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (dérivée de celle de RIBEREAU-GAYON, 1968) et adaptée à nos extraits.

A 3ml de Na_2CO_3, à la concentration de 5% dans l'eau, on ajoute 10µl d'extrait aqueux, 140µl d'éthanol 80% et 50µl de réactif de Folin concentré. Après 1h30 à 25°C, la DO est mesurée à 689nm maximum d'absorption de la solution. La gamme étalon est préparée à partir d'acide p-coumarique (10 à 150µl d'une solution à $2mg.ml^{-1}$).

II-4-3 Les ortho-diphénols

La méthode de dosage des **ortho-diphénols** est une adaptation de celle de MAPSON *et al* (1963) et TEISSON (1977).

A 2,5ml d'extrait aqueux on ajoute 2,5ml d'éthanol absolu et 1ml de solution de molybdate de sodium 5% dans l'alcool à 50%. La DO de la solution est mesurée 372nm. La gamme étalon est préparée à partir d'une solution d'acide chlorogénique à $2mg.ml^{-1}$.

II-4-4 Chromatographie sur couche mince

Les séparations chromatographiques sur couche mince, sont essentiellement destinées à une approche qualitative. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le gel de silice (F60 MERCK, traité ou non pour la fluorescence aux UV) aussi bien pour les esters des composés phénoliques que pour les acides phénols simples après hydrolyse. Les solvants de migrations proposés par DIEUDONNE (1977) ont été légèrement modifiés pour le gel de silice:

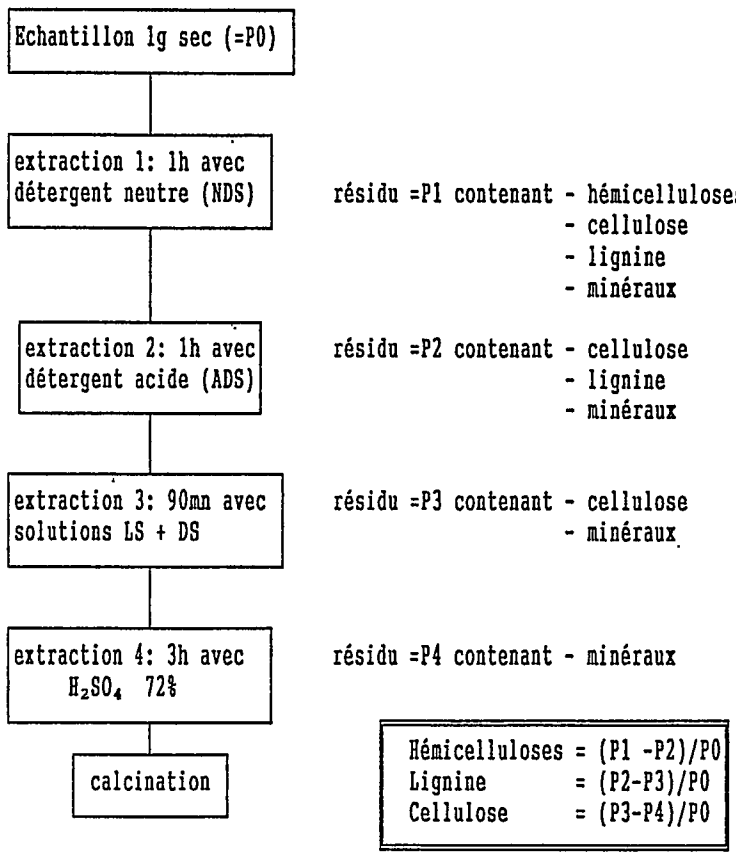
acides phénols: le meilleur solvant testé est un mélange benzène-acide acétique-eau (24-28-9).

esters: le meilleur solvant testé est un mélange acétate d'éthyle-acide acétique-eau (66-14-20).

Les observations se font sous UV à 254nm avec et sans vapeurs d'ammoniaque. Les différents spots sont récupérés et élués dans l'éthanol pour analyse spectrale.

Fig.5: SEPARATION DES COMPOSANTES DES PAROIS CELLULAIRES (HEMICELLULOSES, CELLULOSE ET LIGNINE)

(selon VAN SOEST, 1968)



Solvants d'extraction:

NDS:
18,6g EDTA (2 H_2O), 6,8g Disodium tétraborate (10 H_2O), 30,0g Sodium dodécylsulfate, 10ml éthoxy-2-éthanol, 4,0g disodium hydrogénophosphate, H_2O qsp 1l.

ADS:
20,0g N-cétyl-3N triméthyl ammonium bromure, 27,8ml H_2SO_4 36N, H_2O qsp 1l.

LS (2v/1v des solutions A et B suivantes):
sol.A: 50g permanganate de potassium, 50mg de sulfate d'argent, qsp 1l.
sol.B: 6g nitrate de fer (9 H_2O), 150mg sulfate d'argent, 5g acétate de potassium, 500ml acide acétique glacial, 400ml tertbutanol, H_2O qsp 1l.

DS (solution de déminéralisation):
50g acide oxalique, 700ml éthanol, 50ml HCl concentré, H_2O qsp 1l.

II-4-5 Chromatographie liquide haute performance

Des analyses semi-quantitatives ont été faites par HPLC après transfert des esters dans le méthanol et élimination de l'eau résiduelle par filtration sur filtre séparateur de phase eau/méthanol, Wattman 1PS.

On injecte 10µl d'échantillon dans un appareil à HPLC équipé d'une colonne silice greffée C18, et d'un détecteur à barrette de diodes UV. La séparation s'effectue par un gradient acétonitrile/eau acidifiée par 2% d'acide phosphorique, débit $1ml.min^{-1}$.

Gradient acétonitrile - eau acidifiée		
0-17min	8%	92%
17-24min	40%	60%
24-30min	80%	20%

II-5 LES PAROIS CELLULAIRES OU FIBRES

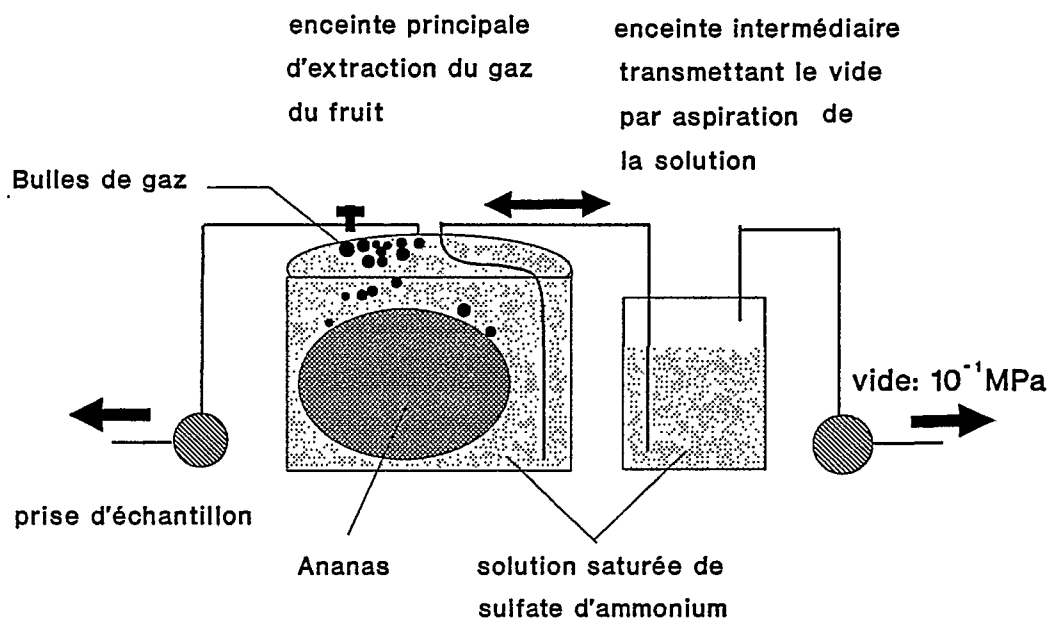
Les analyses de fibres ont été faites au laboratoire IRFA de Montpellier, sur des échantillons fixés à l'alcool en Côte d'Ivoire. Le principe consiste à traiter le résidu d'extraction alcoolique avec des solutions détergentes qui dissolvent spécifiquement les différents constituants (fig.5, VAN SOEST, 1968). Sont séparées ainsi les hémicelluloses, la lignine et la cellulose.

II-6 LES PROTÉINES

Les extraits protéiques sont obtenus par broyage (mixer Sorvall) de 50g de pulpe, en 2 étapes, dans 75ml de tampon TRIS-Maléate 0,2M pH=8,3 en présence de 1g Polyclar T, d'une concentration finale de NaCl de 1% et 50µl de mercaptoéthanol (étape 1), puis le résidu de filtration sur verre fritté et broyé une seconde fois, dans le même tampon mais dilué 10 fois. Les filtrats sont réunis et les protéines précipitées par saturation au sulfate d'ammonium. Après 12 heures de floculation, les protéines sont récupérées par centrifugation (1heure à $10000tr.min^{-1}$, centrifugeuse Sorvall RC5B). Les protéines sont transférées dans du tampon Phosphate 0,01M pH=7 et dyalisées sur membrane PM 10000 d'une cellule AMYCON, sous azote. La dyalyse est répétée 3 fois. Les extraits protéiques finaux sont amenés à une concentration de 1,5 à 2mg de protéines.ml^{-1}). L'ensemble des opérations est conduit en maintenant les extraits dans de la glace pilée.

Les dosages de **protéines** ont été effectués par la méthode de BRADFORD (1978) en raison de sa simplicité de mise en oeuvre. En outre, nous avons vérifié l'absence d'interférence avec les composés phénoliques de

Fig.6 : MONTAGE POUR L'EXTRACTION DU GAZ
DE LA PULPE DU FRUIT



l'ananas, au contraire de la méthode classique de LOWRY. La gamme étalon est préparée à partir d'un mélange albumine globuline *(SIGMA)*. L'albumine de sérum de boeuf seule, donne une réaction nettement plus forte que la plupart des autres protéines (DAWSON, 1982).

II-7 L'ÉTHYLÈNE

II-7-1 Extraction de l'atmosphère interne des fruits

Afin de déterminer la teneur en éthylène des fruits, l'atmosphère interne des fruits a été extraite. L'opération peut se faire fruit par fruit, une moitié est utilisée pour l'extraction du gaz et l'autre pour les analyses complémentaires. Elle peut aussi se faire par groupe de fruits, après découpe, pour les études plus fines par zones.

Le principe du montage pour l'extraction (fig.6) est similaire à celui proposé par BEYER et MORGAN (1970). Le fruit étant plongé dans une enceinte totalement remplie d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (saturer la solution par du sulfate d'ammonium, permet de limiter la perte d'éthylène par dissolution au cours de l'extraction; BANKS, 1983), on applique un vide de 10^{-2}MPa maximum, pendant 1 minute. Les bulles de gaz, rassemblées au sommet de l'enceinte, sont récupérées par aspiration. La totalité de l'extraction et de la récupération du gaz dure environ 4 minutes, non compris la préparation du fruit.

Les teneurs en éthylène de l'atmosphère interne des fruits, extraite par la méthode du vide partiel, conduisent habituellement à des valeurs un peu supérieures à celles obtenues par prélèvement direct (BANKS, 1983; BEYER et MORGAN, 1970). Ce dernier cite pour la pomme +20% et pour le melon +38%. Les mesures pourraient prendre en compte l'éthylène dissous et relargué dans la phase gazeuse par la dépression. Le vide ne doit pas dépasser 10^{-2}MPa pour ne pas extraire l'éthylène dissous. Dans le cas de l'ananas, on pense éviter ce problème, partiellement au moins, car les nombreuses cavités internes représentent un volume important et, en raison de la structure du fruit, le gaz est extrait très facilement par un vide assez faible, appliqué pendant un temps très court. Les teneurs ainsi mesurées, sont supérieures de 0 à 20% à celle obtenues par prélèvement avec une seringue.

II-7-2 Dosage de l'éthylène

La teneur en **éthylène** des échantillons est mesurée par chromatographie en phase gazeuse: chromatographe GIRDEL A300 à détecteur FID, équipé d'une colonne en acier remplie d'alumine modifiée (60/80 mesh), températures du four: 90°C, du détecteur: 150°C et de l'injecteur: 100°C. Chaque mesure est répétée au moins trois fois.

II-8 LES ANALYSES MINÉRALES

Les techniques d'analyses minérales détaillées ci-après, sont celles utilisées au laboratoire de pédologie de l'IRFA-CIRAD CI.

II-8-1 L'azote total

On minéralise 1g de matière fraîche par ébullition (3 à 4 heures) dans un matras de Kjeldahl, en présence de 10ml d'acide sulfurique concentré additionné de 1g du mélange sulfate de sodium-sélénium (100/2,5) et de 0,05g d'acide salicylique. Le mélange sert de catalyseur et l'acide salicylique permet la réduction des nitrites et nitrates en ammonium; limitant ainsi la perte sous forme d'oxyde d'azote. Après refroidissement, la solution est amenée à 250ml par de l'eau désionisée. L'azote est alors dosé par colorimétrie classique selon la méthode dite de BERTHELOT automatisée (auto analyseur Technicon). **L'azote ammoniacal** donne un produit de réaction bleu avec le phénol et l'hypochlorite de sodium en milieu fortement alcalin. La gamme étalon est préparée à partir de sulfate d'ammonium.

II-8-2 Les autres éléments

On minéralise à 520°C dans un four à moufle, 10g de pulpe pré-séchée au four (90-100°C) en capsule de silice. Après 1h30, les cendres sont reprises par 2ml d'acide chlorhydrique 6N qui est ensuite évaporé à sec pour insolubiliser la silice. Le résidu est repris avec de l'acide chlorhydrique dilué (N/10), puis filtré et amené à 50ml par les eaux de rinçage.

Les dosages de **K, Ca, Mg, Zn, Cu, Fe et Mn** sont faits par spectrophotométrie de flamme (absorption atomique, Techtron AA3) avec des lampes à cathode creuse spécifique à chaque élément. On utilise une gamme multiple reproduisant les fortes disproportions de concentrations entre éléments. La présence de lanthane est nécessaire pour les dosages de Ca et Mg, pour limiter les interférences spectrales.

Le dosage du **phosphore** est fait par colorimétrie automatique (Technicon), après formation de phosphomolybdate et réduction à l'acide aminonaphtosulfonique.

Seul le **bore** nécessite une calcination en milieu protégé par de l'oxyde magnésium, le résidu de calcination est repris par 10ml d'acide acétique à 25% et centrifugé. Le dosage est fait par colorimétrie automatique à l'azométhine.

II-9 DOSAGES DE L'ÉTHÉPHON

II-9-1 Principe de dosage et Extraction

Le dosage repose sur la transformation rapide, en milieu alcalin, de la molécule d'acide 2-chloroéthylphosphonique en éthylène et acide phosphorique.

L'éthéphon résiduel à la surface du fruit, après le traitement, est récupéré par 3 lavages successifs dans de l'acide chlorhydrique dilué (0,05N). L'éthéphon absorbé dans l'épiderme du fruit est mesuré sur une aliquote de 50g, après broyage et homogénéisation dans 200ml d'acide chlorhydrique 0,05N.

Dix ml de broyat d'épiderme ou de solution de lavage sont alcalinisés par 10ml de NaOH 2,5N, dans un flacon bouché de 250ml. L'éthylène libéré après 12h au bain-marie à 45°C, est alors dosé selon la technique exposée page 43.

II-9-2 Vérification de la validité des dosages (fig.7)

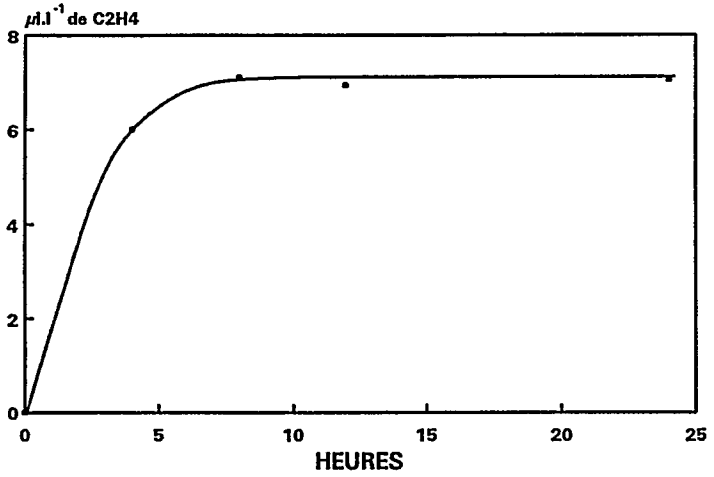
En raison de la nature gazeuse de l'éthylène et de sa solubilité en milieux aqueux, il a été nécessaire de vérifier l'absence de pertes importantes par solubilisation ou par adsorption sur les particules du broyat.

Les effets du pH et de la température sur la vitesse de réaction sont conformes à ceux de la littérature (BIDDLE *et al*, 1976). La solution doit être alcalinisée fortement (pH≥10), à une température de 40 à 50°C, mais pas au delà, pour limiter les problèmes d'étanchéité des flacons.

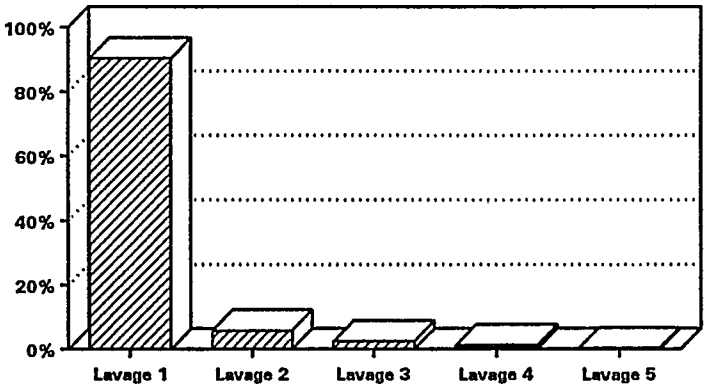
Après 12h de réaction, la concentration en éthylène dans le flacon est stabilisée. La récupération de l'éthylène à partir d'une solution d'éthéphon de titre connu ou des homogénéisats d'épiderme est supérieure à 99%.

Cette méthode permet, incidemment, de tester les teneurs en éthéphon des formulations commerciales utilisées pour les traitement des fruits.

Fig.7 CINETIQUE DE DEGAGEMENT DE C2H4 (A 43°C, BROYATS DE PEAU)

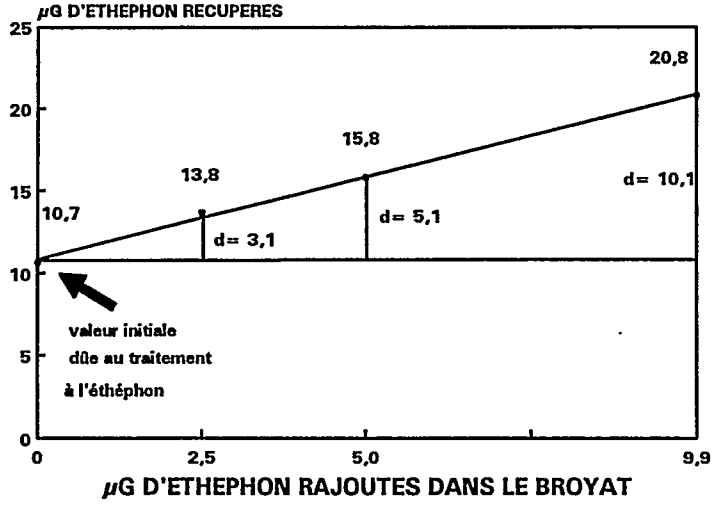


RECUPERATION DE L'ETHEPHON RESIDUEL A LA SURFACE DU FRUIT

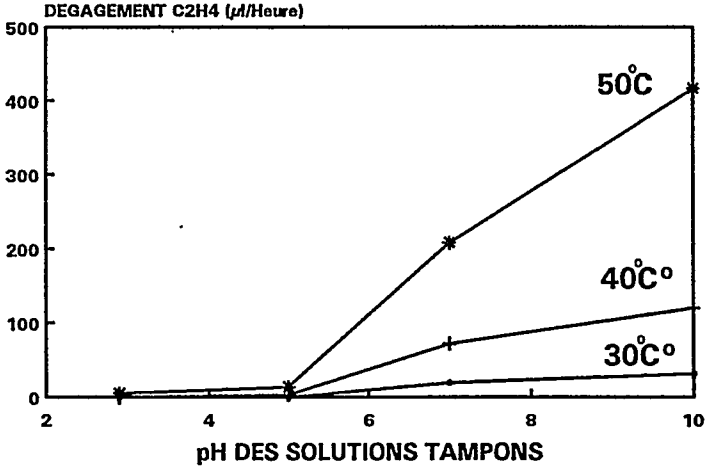


Lavages successifs de 5 fruits / 5 litres de solution HCl 0,05N

VALIDITE DU DOSAGE DANS LES BROYATS



EFFET pH et t° SUR LA REACTION DE DEGRADATION DE L'ETHEPHON



Chapitre III: Caractérisation des activités enzymatiques.

Trois caractéristiques des activités enzymatiques ont déterminé le choix des conditions opératoires: l'activité en fonction du pH, les concentrations saturantes en substrat et la linéarité de l'augmentation de l'activité en fonction de la quantité de protéines. Pour certaines enzymes, l'action d'effecteurs a été également prise en compte. Cette caractérisation a été faite avec les extraits de fruits mûrs qui sont en général très actifs.

III-1 HYDROLASES ACIDES

Les activités phosphatase (PHOS), α-mannosidase (αMAN), α-galactosidase (αGAL), ß-galactosidase (ßGAL) et N-acétylglucosaminidase (NAGL) conduisent toutes à la formation de p-nitrophénol, jaune en milieu alcalin, à partir des dérivés nitrophényls correspondants (respectivement p-nitrophényl phosphate, p-nitrophényl α-mannopyranoside, p-nitrophényl α-galactopyranoside, p-nitrophényl ß-galactopyranoside et p-nitrophényl N-acétylglucosamine).

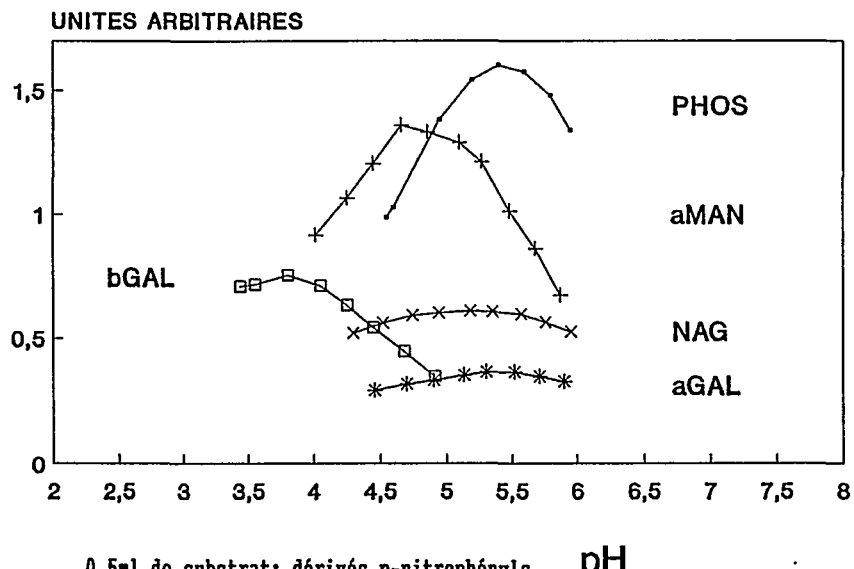
Le pH optimum de chaque activité enzymatique est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6: pH optimum des activités hydrolasiques

Activité	pH optimum
Phosphatase	5,4-5,6
α Mannosidase	4,5-4,7
α Galactosidase	5,3-5,5
ß Galactosidase	3,8-4,0
N acétylglucosaminidase	5,2-5,4

Les pH optima sont similaires à ceux obtenus sur d'autres matériels végétaux. Par exemple dans les vacuoles de protoplaste de pétale d'*Hippeastrum* c.v. Red Christmas Amaryllis (BUTCHER *et al*, 1977) les pH optima des activités PHOS et ßGAL sont respectivement 5,5 et 4,5 contre 5,5 et 3,9 chez l'ananas. Chez *Pisum sativum* (NEELY et BEEVERS, 1980) ceux des activités αMAN et NAGL sont un peu plus faibles que dans l'ananas, respectivement 4,2 et 4,6 contre 4,6 et 5,3. Les activités PHOS, αMAN et ßGAL sont plus fortement dépendantes des variations de pH que les activités αGAL et NAGL (fig.8). Pour

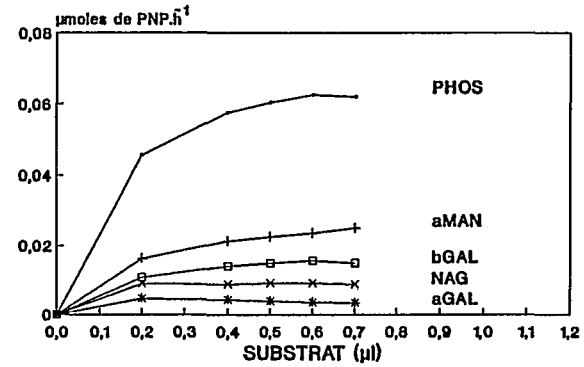
Fig.8: HYDROLASES ACIDES
(Activités en fonction du pH)



0,5ml de substrat: dérivés p-nitrophényls
0,75ml de tp citrate ou succinate 0,2M
20µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}

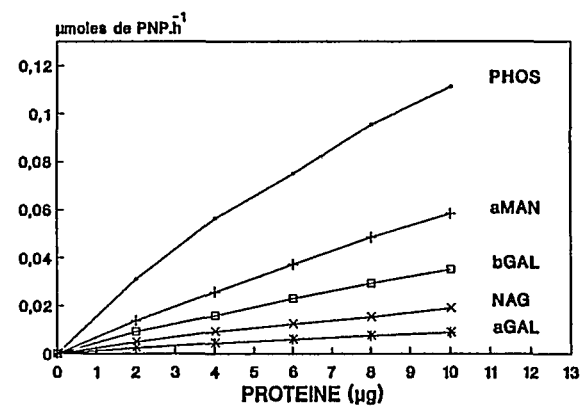
[subtrats]:	Abréviations enzymes:
- phosphatase= 6,3mM	PHOS
- α-mannosidase= 2,0mM	aMAN
- β-galactosidase= 2,0mM	bGAL
- N-acétyleglucosaminidase= 2,0mM	NAG
- α-galactosidase= 0,4mM	aGAL

Fig.9: ACTIVITES HYDROLASES ACIDES
(en fonction de la quantité de SUBSTRAT)



Substrat Phosphatase: solution 38mM de PNP-phosphate
substrat α-galactosidase: solution 2,5mM PNP-galactose
Autres substrats: solutions de 2mM des dérivés PNP correspondants
(PNP = p-nitrophényle)

Fig.10: ACTIVITES HYDROLASES ACIDES
(en fonction de la quantité de PROTEINE)



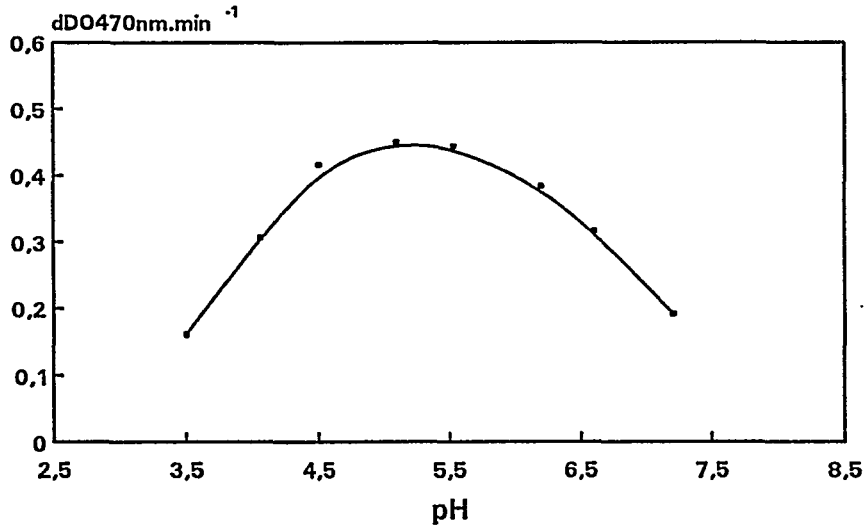
simplifier la méthode d'analyse nous avons donc utilisé le même tampon citrate/phosphate 0,2M pH=5 pour les activités αGAL, αMAN et NAGL. Celui-ci convient également pour l'activité ßGAL mais à pH=3,9. En ce qui concerne l'activité PHOS les meilleurs résultats ont été obtenus avec le tampon succinate 0,2M à pH=5,5.

Les milieux réactionnels contiennent environ 4µg de protéine (20µl d'extrait protéique à une concentration proche de 0,2µg.µl^{-1}). Dans ces conditions les concentrations saturantes en substrat sont de 6,3mM pour les PHOS, de 2mM pour les αMAN, les ßGAL et les NAGL. Celle des αGAL est plus faible: 0,4mM; on constate même une diminution sensible de l'activité pour des concentrations en substrat identiques à celles utilisées pour les autres hydrolases acides (fig.9).

Dans les conditions optimales de substrat et de pH, la variation des activités en fonction des quantités de protéine est linéaire (fig.10). Les quantités utilisées pour les mesures comparatives entre fruits vont de 5 à 10µg.

En résumé, les analyses des activités Hydrolasiques des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le mélange réactionnel comprend 500µl de substrat (6,3mM pour les PHOS, 2mM pour les αMAN, ßGAL et NAGL, 0,4mM pour αGAL), 750µl de tampon (succinate 0,2M Ph=5,5 pour PHOS, citrate/phosphate 0,2M pH=5 pour αMAN, αGAL et NAGL et même tampon mais à pH=3,9 pour ßGAL), et 20µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1} pour initier la réaction. Après 30min à 1h au bain-marie à 30°C pour PHOS (le double pour les autres activités), on ajoute du Na_2CO_3 à 50g.l^{-1} (qsp 3ml) et la DO à 410nm est mesurée contre un blanc sans substrat.

Fig.11: PEROXYDASE
(Activité en fonction du pH)



2,0ml de tp citrate 0,2M; pH=5,0; 1% Gaïacol
0,1ml extrait protéique 0,2µg.µl^{-1}
0,5ml H_2O_2 0,4%

Fig.12: PEROXYDASE
(Activité en fonction de [H2O2])

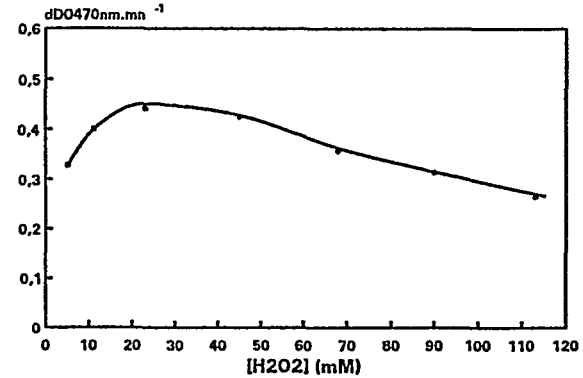
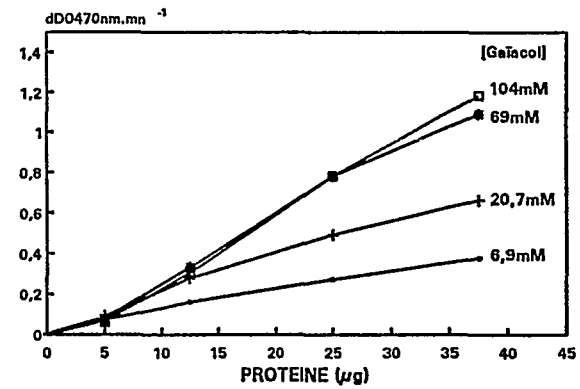
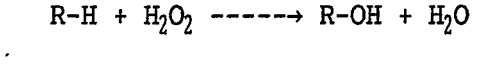


Fig.13: ACTIVITE PEROXYDASE
(En fonction de [GAIACOL] et [PROTEINE])



III-2 PEROXYDASE (PEROX)

Ces enzymes à fer hémique catalysent l'oxydation peroxydative de substrats donneurs d'hydrogène (souvent des phénols).



$$R\text{-}H + H_2O_2 \dashrightarrow R\text{-}OH + H_2O$$

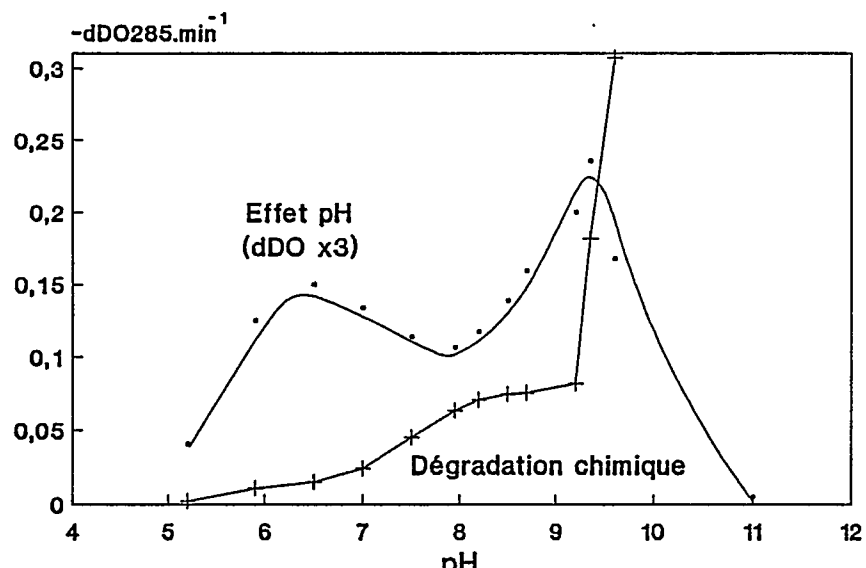
Au cours du processus, l'enzyme subit des interconversions entre différentes formes, correspondant à des niveaux différents d'oxydation du fer. La combinaison de l'enzyme avec le peroxyde conduit à la formation d'un composé I, lequel réagit avec le donneur d'électrons pour donner après transfert d'un atome d'hydrogène, le composé II. Celui-ci peut à son tour réagir avec le donneur (DUNFORD, 1986). Au cours de la réaction apparaîssent des formes radicalaires quinoniques. Leur condensation est à l'origine des formes polyphénoliques insolubles qui apparaissent dans le milieu réactionnel (mélanines).

La courbe d'activité en fonction du pH, avec le gaïacol pour substrat, montre un optimum moyennement marqué entre 5 et 5,5 (fig.11), comparable aux valeurs déterminées par TEISSON (1977). Notons que l'activité est loin d'être négligeable au pH (3,5) du jus de fruit. Le pH optimum est très voisin de ceux obtenus pour d'autres fruits comme la pêche, le raisin ou la banane (REYES, 1960; POUX, 1972; NAGLE, 1975, cités par TEISSON).

Dans nos conditions, la concentration optimale en gaïacol est pratiquement atteinte à 69mM et l'activité croît presque linéairement avec la quantité de protéine, de 5 à 40µg (fig.12). Avec 100µl d'extrait à 0.2µg.µl^{-1}, soit 20µg de protéine, la concentration optimale en H_2O_2 est de l'ordre de 23mM (fig.13) soit un rapport [gaïacol]/[H_2O_2]=3. Ce rapport optimal diffère quelque peu de celui obtenu par TEISSON (1977), rapport égal à 2, obtenu avec une concentration en gaïacol de 20mM et des extraits enzymatiques moins actifs. Au delà de 23mM en H_2O_2, l'activité diminue fortement.

En résumé, les analyses des activités enzymatiques des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le mélange réactionnel de 2,6ml, comprend du tampon citrate 0,2M à pH=5, du Gaïacol à la concentration finale de 69mM, 20 µg de protéine et H_2O_2 23mM, ajouté en dernier lieu pour initier la réaction. L'évolution de la DO à 470nm est enregistrée pendant 2min.

Fig.14: ACTIVITE ASCORBATE PEROXYDASE (en fonction du pH)



2,58ml de tp phosphate (K/Na), 0,07M, pH=6
0,5ml EDTA 150mM
0,1ml ac ascorbique 12,8mM
50µl H_2O_2 0,4% (1,7mM final)
250µl d'extrait protéique 0,2µg.µl^{-1}

La dégradation non enzymatique a été mesurée avec une concentration finale en H_2O_2 de 8,5mM au lieu de 1,7mM

Fig.15 :ACTIVITE ASCORBATE PEROXYDASE En fonction de [ASCORBATE] et [H2O2]

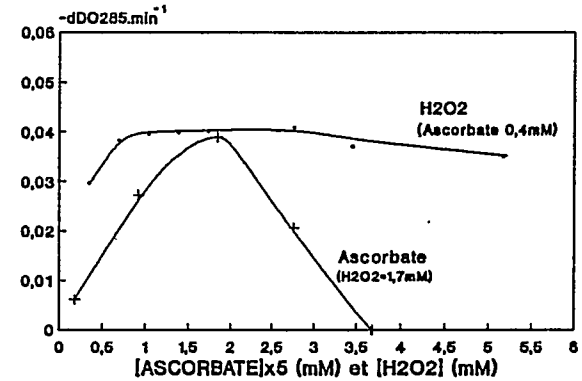
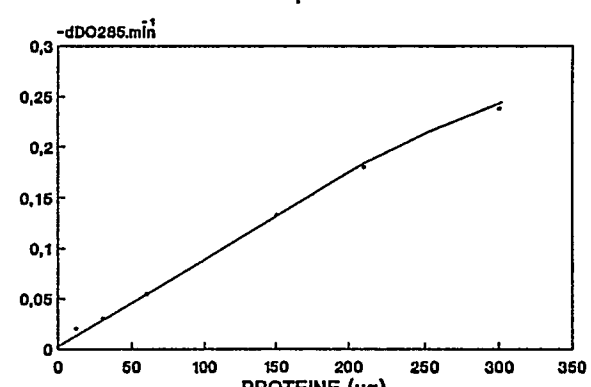


Fig.16: ACTIVITE ASCORBATE PEROXYDASE En fonction de la quantité de PROTEINE



III-3 ASCORBATE PEROXYDASE (AA-PEROX)

Cette enzyme catalyse la peroxydation de l'acide ascorbique en présence de H_2O_2, selon la réaction globale des peroxydase présentée au paragraphe précédent. L'activité AA-PEROX a été mesurée selon la méthode d'ASADA (1984) et modifiée par SMIRNOFF et COLOMBE (1988). La peroxydation de l'acide ascorbique en présence de H_2O_2 est mesurée à pH=6 au lieu de 7, par la diminution de DO à 285nm. Le DTPA (1mM) utilisé par SMIRNOFF pour réduire l'oxydation non enzymatique de l'acide, a été remplacé par de l'EDTA (21mM).

La courbe d'activité de l'AA-PEROX en fonction du pH présente 2 pics, vers 6,5 et 9,5 (fig.14). Mais nous avons choisi de travailler à pH=6 pour limiter l'autodestruction de l'acide ascorbique en présence de l'eau oxygénée et à pH plus élevé. Sur cette même figure 14, est représentée la destruction non enzymatique de l'acide ascorbique dans des conditions similaires à celles utilisées pour les mesures d'activité enzymatique mais avec une concentration plus forte en peroxyde (8,5mM au lieu de 1,7mM). La dégradation de l'acide s'accélère au-delà de pH=7 est devient même difficilement mesurable au delà de pH=9.

L'activité enzymatique est optimale avec une concentration en acide ascorbique de 0,3 à 0,4mM, pour 50µg de protéine (250µl d'extrait à $0,2\mu g.\mu l^{-1}$). Au delà et en-deçà de ces valeurs, l'activité diminue très rapidement (fig.15). Au contraire, la concentration optimale en H_2O_2 est atteinte dès 0,5mM et l'activité varie peu au delà.

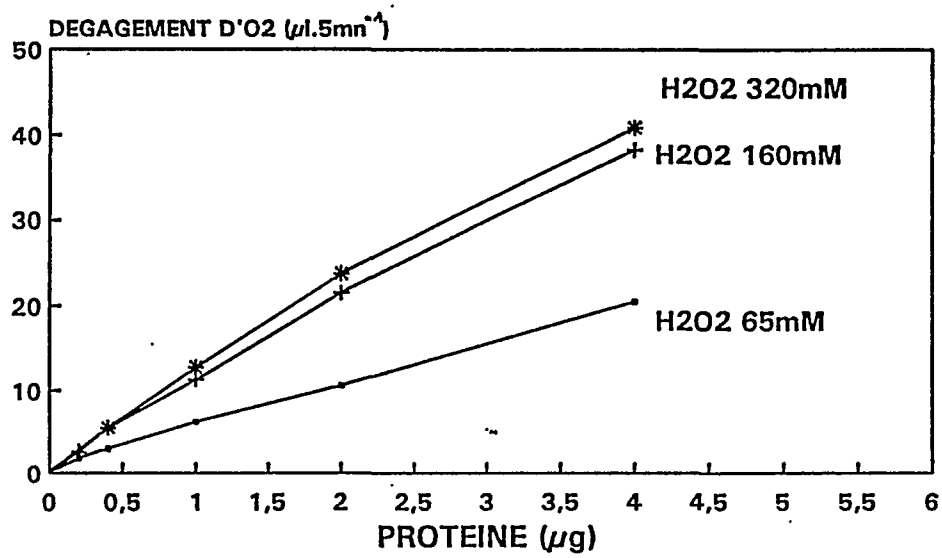
L'activité croît linéairement avec la quantité de protéine jusque vers 200µg (soit quatre fois celle utilisée pour les mesures) puis il se produit un léger infléchissement de la courbe (fig.16).

Etant donné la forte activité catalasique des extraits, il a été tenté d'inhiber l'activité catalase par l'hydroxylamine ou l'amizole (inhibiteurs classiques des catalases renfermant du fer à leur site actif SHONBAUM, 1976), pour limiter la destruction de H_2O_2 au cours de la réaction. L'adjonction de ces inhibiteurs des catalases dans le milieu, a entraîné une légère diminution de l'activité AA-PEROX (tableau 8). Ils n'ont donc pas été utilisés, et en conséquence les mesures ont été réalisées pendant des temps relativement courts de 2 à 3min.

Tableau 8: Inhibition de l'activité AA-PEROX après adjonction d'inhibiteurs des catalases

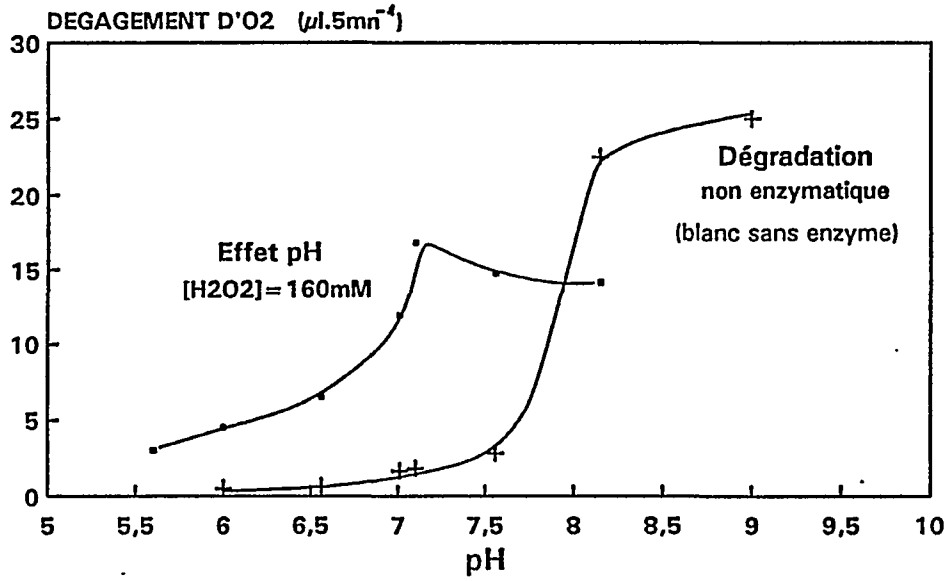
Inhibiteur (µl)	Hydroxylamine (100mM)	Amizole (70mM)
témoin	0,208 $dDO285nm.min^{-1}$	0,157
50	0,188	-
100	0,181	

Fig.17: ACTIVITE CATALASE
En fonction de la quantité de PROTEINE et de la [H2O2]



3ml de tp K/Na 0,1M (pH=7) désoxygéné; 65mM, 120mM ou 320mM H_2O_2
10µl extrait protéique 0,2µg.µl^{-1}

Fig.18: ACTIVITE CATALASE
En fonction du pH et dégradation non enzymatique



En résumé, les analyses des activités enzymatiques des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le volume réactionnel de 3,48ml comprend le tampon phosphate (K/Na) 0,067M, pH=6, de l'acide ascorbique 0,36mM, H_2O_2 1,7mM et de l'EDTA 21mM. La réaction est initiée par l'adjonction de 50µg de protéine et la diminution de la DO à 285nm, suivie pendant 2 à 3 minutes.

III-4 CATALASE (CAT)

Cette enzyme catalyse la dégradation de l'eau oxygénée selon la réaction globale:

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

L'O_2 libéré peut être mesuré à l'aide d'une électrode de Clark. L'activité catalase augmente fortement entre pH 6 et 7, l'optimum se situant vers 7,1-7,2. Elle diminue ensuite rapidement, mais au delà de 7,5, la mesure devient imprécise du fait de la forte dégradation de l'eau oxygénée en milieu alcalin (fig.18).

Trois concentrations en eau oxygénée ont été testées, 65mM, 160mM et 320mM (fig.17). Avec les quantités de protéine utilisées pour les mesures comparatives entre fruits (environ 2µg), les conditions de mesure de l'activité semblent optimales vers 160mM de H_2O_2, en prenant en compte la dégradation non enzymatique de l'eau oxygénée. En effet, à cette concentration, elle est déjà responsable de 10 à 50 pour cent du total de l'oxygène dégagé suivant les extraits utilisés. Ensuite, elle double pratiquement entre 160 et 320mM.

Avec 65mM d'eau oxygénée l'activité est proportionnelle à la quantité de protéine ajoutée dans le milieu réactionnel, entre 0 et 4µg. A 160mM et 320mM, l'activité augmente linéairement jusqu'à 2µg de protéine, la droite s'infléchit légèrement au delà.

L'enzyme est inhibée à 100% par 5µl d'hydroxylamine (NH_2OH) à 5%.

En résumé, les analyses des activités catalases des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: A 3ml de tampon phosphate (K/Na) 0,1M, pH=6, 160mM en H_2O_2 et maintenus sous barbotage d'azote désoxygéné (par passage dans une solution de pyrogallol 1M dans NaOH 2N), on ajoute 2µg de protéine pour initier la réaction. L'O_2 libéré est mesuré à l'aide d'une électrode de Clarck, à une température de 20°C.

III-5 SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)

Cette enzyme catalyse la dismutation rapide des anions superoxydes en eau oxygénée et oxygène selon la réaction:

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Cette activité n'a pas fait l'objet de caractérisation particulière. La méthode préconisée par BEAUCHAMP et FRIDOVICH (1971, cités par CHRESTIN, 1984), a été utilisée. **Les ions superoxydes sont générés par le système xanthine (10^{-4}M) - Xanthine oxydase, dans un tampon phosphate (Na/Na_2) 0,1M, pH=8,4. Ils sont détectés à 560nm, par la réduction du NBT (0,5mg.ml^{-1}) en formazan.**

La quantification de l'activité se fait en utilisant la relation linéaire entre la concentration en SOD et le rapport V/v selon l'équation:

$$V/v = 1 + K'[SOD]$$

V et v sont les vitesses d'apparition du formazan en absence et en présence de la SOD. La quantité K'[SOD]= (V/v) -1, égale à 1 lorsque la SOD réduit de 50% la vitesse d'apparition du formazan, peut être considérée comme l'unité SOD. Dans ces conditions, la quantité de SOD des extraits protéiques est déterminée à partir du rapport V/v:

$$\text{SOD } U.ml^{-1} = (V/v - 1) \times \text{dilution}$$

III-6 POLYGALACTURONASE (PG)

Deux méthodes de dosage des polygalacturonases, ont été testées. La première consiste à mesurer la quantité d'acide galacturonique libéré à partir de l'acide polygalacturonique, en dosant les fonctions réductrices par le réactif au DNS, précédemment décrit (dosage du glucose). Dans la seconde, la diminution de viscosité de la solution d'acide polygalacturonique est mesurée avec un viscosimètre d'Oswald.

La majorité des mesures d'activités Polygalacturonase a été effectuée selon la première méthode, avec le tampon citrate/phosphate 0.05M à pH=4,6 couramment utilisé (MALDONADO *et al*, 1989; MILL, 1966; LEE et MacMILLAN, 1968), et une concentration en acide polygalacturonique de 0,1%. La réaction est initiée par addition de 500µl d'extrait protéique à 1,5ml du mélange tampon-substrat, elle se poursuit pendant 2 à 3h au bain marie à 30°C. Elle est stoppée par addition de 2ml de DNS et portée au bain marie à ébullition pendant 5min. Après refroidissement rapide dans la glace, la solution est centrifugée 5min à 15000tr.min^{-1}, pour la clarifier et la DO lue à 450nm.

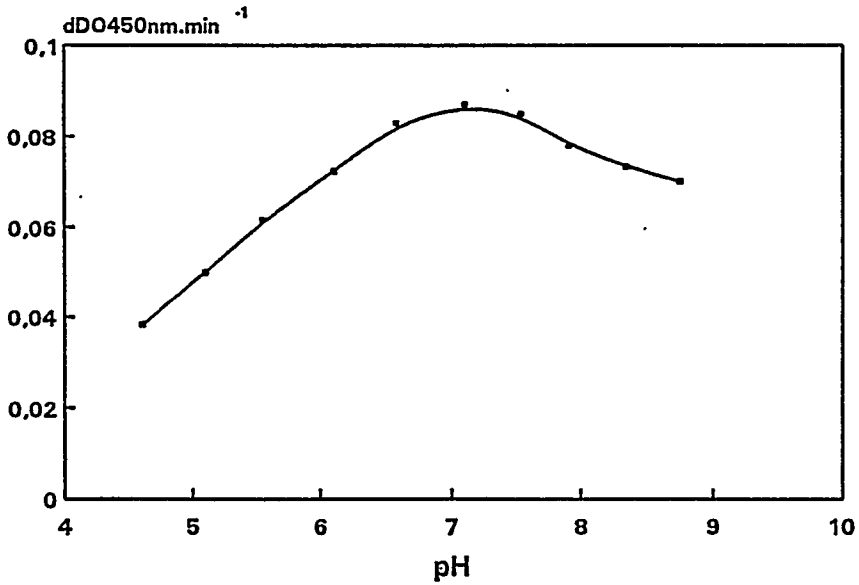
Il a été vérifié que la diminution de la concentration en acide polygalacturonique de 0,25 à 0,1% (poids/volume) ne modifie pas l'activité enzymatique; on peut ainsi supposer que la concentration en substrat est saturante.

Pour estimer l'activité PG par viscosimétrie, une solution d'acide polygalacturonique 5%, dont le pH est amené à 4,6 avec du tampon citrate/phosphate 0,2M (5ml de milieu d'incubation pour 500µl d'extrait protéique), est utilisée. La diminution de la viscosité du mélange est suivie pendant 3 heures à 30°C.

III-7 MONODÉHYDROASCORBATE RÉDUCTASE

HOSSAIN (1984) a montré que le radical monodéhydroascorbate est le produit primaire de l'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate peroxydase. La monodéhydroascorbate réductase, dépendant du NADPH, régénère l'acide ascorbique à partir du radical. Les mesures sont réalisées sur des extraits protéiques de feuilles d'ananas, l'enzyme n'a pas fait l'objet d'une caractérisation particulière. **On a utilisé la méthode de HOSSAIN (1984): le volume réactionnel de 2,87ml est constitué par un tampon TRIS-HCl, 50mM à pH=7,5, de l'EDTA 5mM, de l'acide ascorbique 2,5mM, de NADH 0,2mM, de 20µg de protéine et la réaction est initiée par addition de 0,2unités d'ascorbate oxydase (SIGMA). On suit, quelques minutes, l'oxydation du NADH à 340nm .**

Fig.19: ACTIVITE PHENOL OXYDASE
En fonction du pH



2,5ml de tp citrate 0,2M pH=7, 0,4% DL DOPA
50µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}

dans la fig.21:
les solutions mères d'effecteurs: 100mg.ml^{-1}
sauf pour l'acide caféique (50mg.ml^{-1},
mais les quantités sont doublées pour avoir
la même concentration finale)

Fig.20: ACTIVITE PHENOL OXYDASE
En fonction de la quantité de PROTEINE

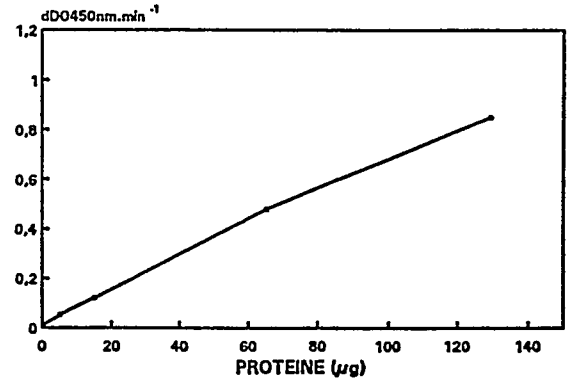
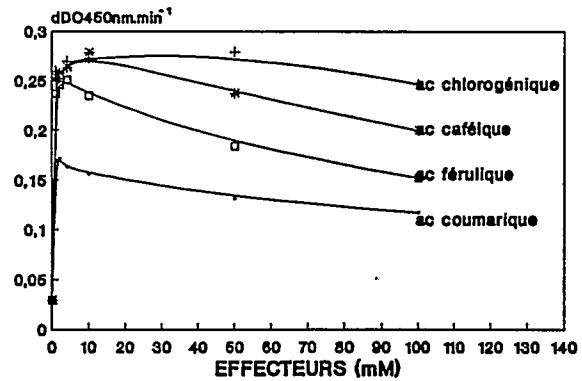


Fig.21: ACTIVITE PHENOL OXYDASE
(EFFECTEURS)



III-8 POLYPHÉNOLOXYDASE (PPOX)

L'activité orthodiphénoloxydase catalyse la transformation d'un orthodiphénol en orthodiquinone en présence d'oxygène. Pour déterminer cette activité, la méthode de LANCE (1963, cité par TEISSON, 1977) a été utilisée; l'oxydation du substrat, la dihydroxyphénylalanine (DL DOPA), en présence de $CaCl_2$, est suivie par l'augmentation de la DO à 450nm.

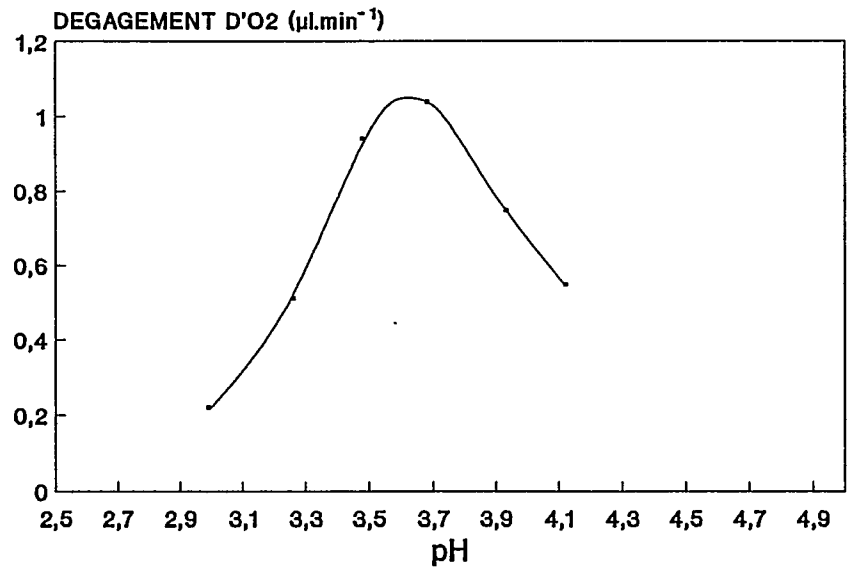
Le pH optimum de cette activité se situe autour de 7 (fig.19) mais il est assez peu marqué. Cette valeur diffère de celle trouvée par TEISSON (1977) dont le profil de pH montrait d'ailleurs deux optima à 5 et 6. La méthode de mesure étant identique, les variations observées sont sans doute imputables aux conditions d'extraction des protéines de la pulpe qui sont très différentes.

Avec les extraits à 0.2µg de protéine.μl^{-1}, la concentration saturante en substrat est de l'ordre de 0,8% de DL DOPA. Mais à cette concentration, il se pose des problèmes de conservation du mélange tampon citrate-substrat qui s'oxyde très vite. La concentration retenue a été 0,4% de DL DOPA.

Dans ces conditions l'activité augmente linéairement avec la quantité de protéine ajoutée (fig.20), même pour des valeurs largement supérieures à celles utilisées par la suite pour les mesures comparatives (5 à 10µg).

TEISSON (1977) a testé l'effet de divers cofacteurs phénoliques sur l'oxydation de la DL DOPA. Seul l'acide chlorogénique a un effet activateur entre 0,5 et 5mM, les autres phénols (voir ci-après) ont un effet inhibiteur à la concentration de 5mM. Cette observation a été vérifiée avec les mêmes composés phénoliques, proches de ceux extraits de l'ananas, acide p-coumarique, acide chlorogénique, acide férulique et acide caféique. L'effet des dérivés hydroxycinnamiques, extraits de fruits mûrs ou translucides, a été également mesuré (fig.21). Les quatre composés testés activent très fortement l'enzyme; les plus faibles concentrations utilisées, 2 à 5mM, étant les plus efficaces; l'activité sur la DL DOPA est multipliée par 10. L'acide chlorogénique reste le plus efficace aux concentrations élevées, mais à plus faible concentration, l'acide caféique a une action équivalente. L'acide férulique a un effet activateur proche des deux précédents aux faibles concentrations, mais il diminue rapidement ensuite. L'acide p-coumarique a un effet plus faible que les autres acides, l'activité étant multipliée seulement par 6. Les dérivés hydroxycinnamiques des fruits augmentent l'activité enzymatique, mais faiblement. A la concentration la plus forte, elle est multipliée par 2.

Fig.22: ACTIVITE AIA OXYDASE
En fonction du pH



3ml de tp citrate 50mM, pH=3,7; 250µM en $MnCl_2$
3mM ac p-coumarique
50µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}
80µl d'AIA 805mM dans l'éthanol

Fig.23: ACTIVITE AIA OXYDASE
(en fonction de la quantité de PROTEINE)

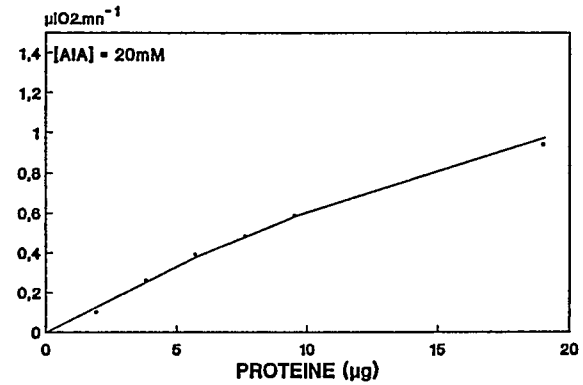
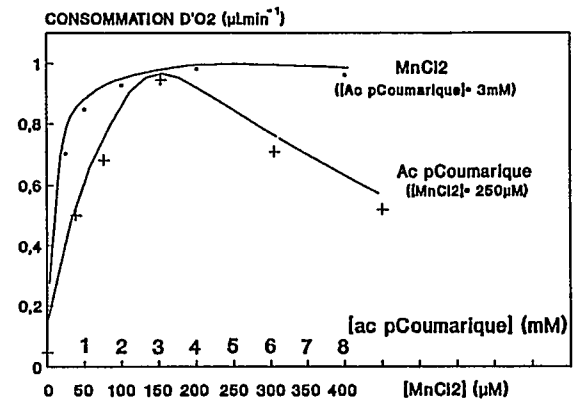


Fig.24: ACTIVITE AIA OXYDASE
(EFFECTEURS: Ac pCOUMARIQUE ET MnCl2)



En résumé, les analyses des activités polyphénoloxydases des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: A 2,5ml de tampon citrate 0,2M, pH=7 contenant 0,4% de DL DOPA et du $CaCl_2$ à la concentration de 5mM, on ajoute 50µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}. L'augmentation de la densité optique de la solution est suivie à 450nm, pendant quelques minutes.

III-9 ACIDE INDOLE ACÉTIQUE OXYDASES (AIA-OX)

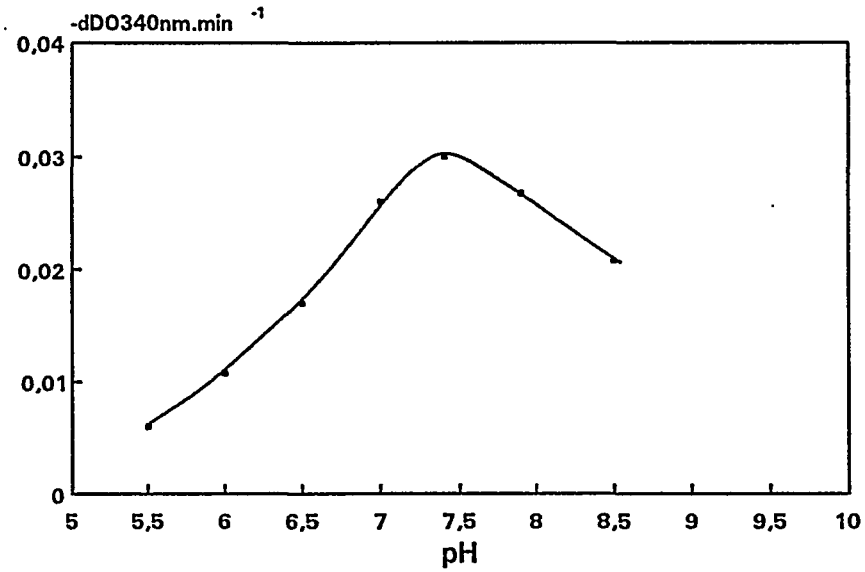
Il est établi que les AIA oxydases sont des peroxydases (GOVE et HOYLE, 1975). Elles sont capables d'oxyder l'AIA, en présence d'oxygène moléculaire et en l'absence de peroxyde. Le mécanisme, complexe, fait intervenir des interconversions de plusieurs formes de l'enzyme avec différents degrés d'oxydation du fer héminique et de l'AIA sous forme de radical libre. La réaction conduit à la formation de méthylèneoxindole et indole-3-aldéhyde et dans le cas de l'ananas, demande la présence de cofacteurs spécifiques, l'acide coumarique et l'ion Mn^{++}. On peut suivre la réaction à l'aide d'une électrode de Clark, pour mesurer la consommation d'oxygène.

L'activité AIA-OX est très dépendante du pH (fig.22) dont l'optimum est voisin de 3,6-3,7. Il est de 4 pour l'AIA-OX de la tige d'ananas selon GORTNER et KENT (1958). Ce pH est bas en comparaison de ceux trouvés avec d'autres matériels végétaux: 5 pour le raifort (YAMASAKI et YAMASAKI, 1973), 6 pour le blé (BOLDUC *et al*, 1970) et 6,6 pour le pois (GOLDACRE *et al*, 1953).

Le substrat de l'enzyme (AIA) est peu soluble dans le tampon utilisé, le seuil de solubilité est dépassé à des concentrations de l'ordre de 25mM. Une concentration d'AIA (20mM) a été fixée, et l'activité enzymatique mesurée avec des quantités croissantes d'extrait protéiques (fig.23), de 5 à 10µg de protéine.

L'AIA-OX de l'ananas fonctionne avec de l'acide coumarique comme effecteur et nécessite la présence de Mn (GORTNER, 1958). Les concentrations optimales pour chacun des 2 effecteurs, ont été déterminées (fig.24). Sans acide coumarique l'activité est pratiquement nulle. Elle est maximale avec 3mM d'acide coumarique en accord avec les résultats de TEISSON, mais au-delà de cette concentration, l'activité diminue très nettement. Sans Mn l'activité est très faible, la concentration optimale est pratiquement atteinte vers 100µM.

Fig.25: ACTIVITE GLUTATHION REDUCTASE
En fonction du pH



2,5ml de tp citrate 50mM, pH=7,5
0,1ml EDTA 30mM
0,1ml NADPH 7,5mM
0,25ml d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}
0,1ml Glutathion oxydé 60mM

Fig.26: ACTIVITE GLUTATHION REDUCTASE
En fonction des [GLUTATHION OXYDE]
et [NADPH]

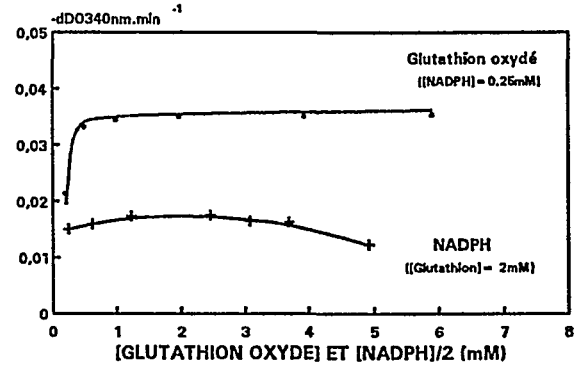
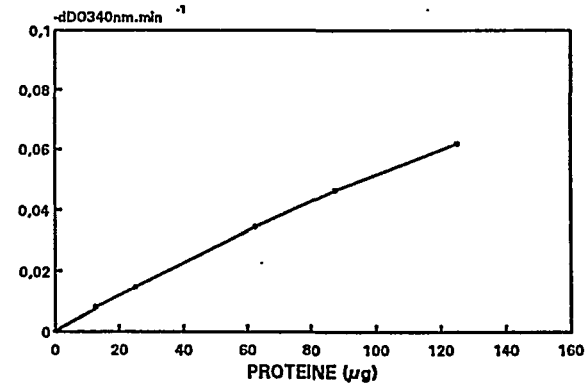


Fig.27: ACTIVITE GLUTATHION REDUCTASE
En fonction de la quantité de PROTEINE



En résumé, l'analyse des activités AIA oxydases des extraits protéiques des fruits, a été faite selon le protocole suivant: Le volume réactionnel de 3,13ml, comprend du tampon citrate 50mM, pH=3,7, de l'acide p-coumarique à la concentration de 3mM, du $MnCl_2$ (250µM) et 5 à 10µg de protéine. L'addition de 80µl d'AIA, 805mM dans l'éthanol et donnant une concentration finale de 20mM, initie la réaction. On mesure la consommation d'oxygène en déterminant le temps nécessaire pour diminuer de 100% à 50%, le degré de saturation en oxygène du milieu réactionnel.

III-10 GLUTATHION RÉDUCTASE (GSSG-R)

L'enzyme catalyse la réduction du glutathion oxydé en glutathion réduit, en présence de NADPH:

GSSG + NADPH ------→ 2 GSH + NADP

La méthode de mesure consiste à suivre la cinétique de disparition du NADPH, à 340nm (CHRESTIN, 1984), en présence d'EDTA.

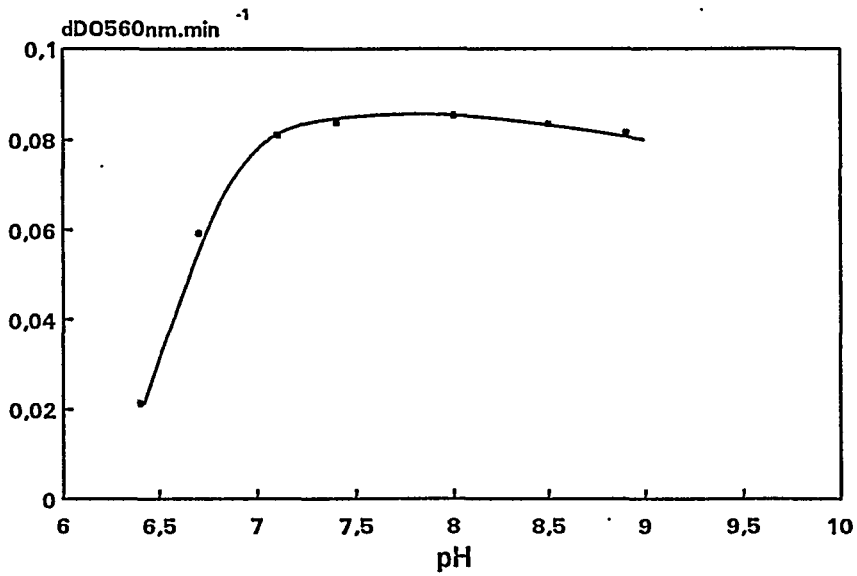
Le pH optimum de l'activité GSSG-R est moyennement marqué vers 7,5 (fig.25).

Avec 50µg de protéine (250µl d'extrait à 0.2µg/µl), la concentration saturante en GSSG est atteinte vers 1mM. L'activité n'est pas affectée par des concentrations plus fortes (fig.26). Elle varie un peu plus en fonction de la quantité de NADPH ajoutée dans le milieu. A 0,2mM l'optimum est pratiquement atteint, au delà de 0,4mM, elle diminue.

L'activité croît linéairement avec la quantité de protéine (de 10 à 130µg) (fig.27).

Les analyses des activités glutathion réductases des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le volume réactionnel de 3,05ml comprend le tampon citrate 50mM à pH=7,5, de l'EDTA 1mM, du NADPH 0,25mM et 50µg de protéine. Le glutathion oxydé, à la concentration finale de 2mM, est ajouté pour initier la réaction. On mesure la disparition du NADPH à 340nm, après 30 minutes de réaction contre un blanc sans glutathion.

Fig.28: ACTIVITE NADH QUINONE REDUCTASE
En fonction du pH, avec NBT



2,58ml de tp TRIS 50mM, pH=8
0,5ml NADH 2,5mM
0,1ml ménadione 50mg.ml^{-1}
20µl d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}

SANS NBT mesure de la disparition du NADH à 340nm
AVEC NBT mesure de l'apparition de formazan à 560nm

Fig.29: ACTIVITE NADH QUINONE REDUCTASE
En fonction de la quantité de PROTEINE

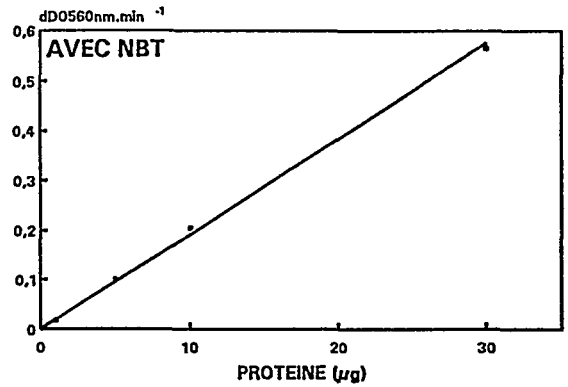
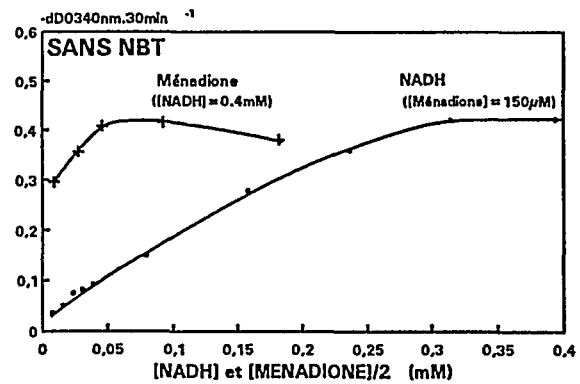


Fig.30: ACTIVITE NADH QUINONE REDUCTASE
En fonction de [NADH] et [MENADIONE]



III-11 NADH QUINONES RÉDUCTASE (NQR)

Cette enzyme catalyse la réduction des quinones en diphénols en présence de NADH (D'AUZAC *et al*, 1985). Cependant la réaction peut conduire à la formation de semi quinones dont l'autooxydation génère des ions superoxydes.

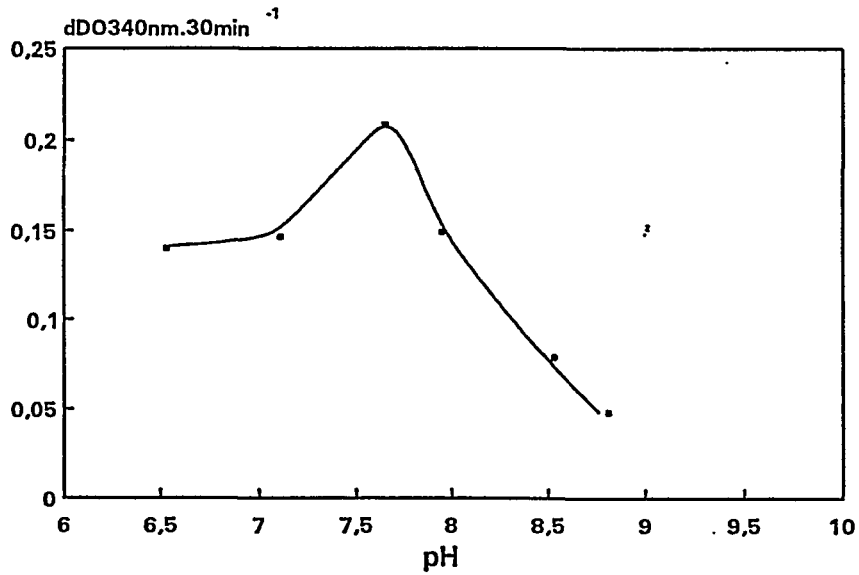
Cette activité peut être mesurée soit directement en suivant la disparition du NADH à 340nm en présence de ménadione, soit en suivant la réduction du NBT par les ions superoxydes et en présence de la même quinone (apparition de formazan mesurée à 540nm).

Le pH optimum déterminé par CHRESTIN est de 7,5. En présence de NBT, il se situe entre 7,5 et 8 (fig.28). La proportionnalité entre la quantité de protéine et l'activité mesurée en présence de NBT (fig.29), traduit aussi la proportionnalité entre la quantité d'enzyme et une production potentielle d'ions superoxydes toxiques.

Les comparaisons des extraits enzymatiques de fruits ont été faites sans NBT, par mesure de la disparition du NADH. Dans ces conditions, la concentration saturante en NADH est de l'ordre 300µM (fig.30). Le Km apparent (115µM) est du même ordre de grandeur que celui déterminé par CHRESTIN (45±11µM). La concentration en ménadione est optimale entre 100 et 200µM, au-delà l'activité diminue progressivement (fig.30).

Les analyses des activités NADH quinone réductases des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le volume réactionnel de 3,2ml comprend le tampon TRIS 50mM à pH=8, la ménadione à la concentration finale de 150µM et le NADH (400µM). La réaction est initiée avec 4µg de protéine, la variation de DO à 340nm est mesurée après 30 minutes.

Fig.31: ACTIVITE ENZYME MALIQUE à NADP
En fonction du pH



2,5ml de tp TRIS 0,1M, pH=7,5; 5mM en $MgSO_4$
0,3ml acide malique 0,25M (neutralisé)
0,1ml d'extrait protéique à 0,2µg.µl^{-1}
0,1ml NADP 50mM
mesure de l'apparition de NADPH à 340nm

Fig.32: ACTIVITE ENZYME MALIQUE à NADP
En fonction des [MALATE] et [NADP]

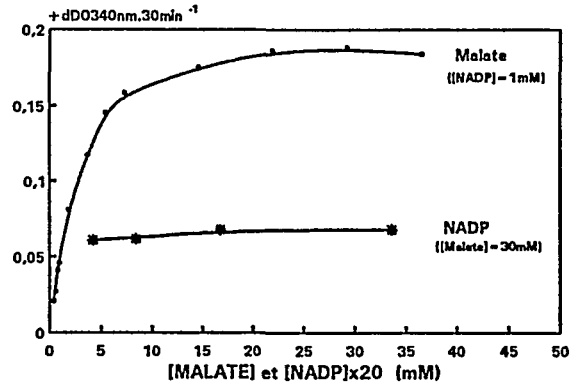
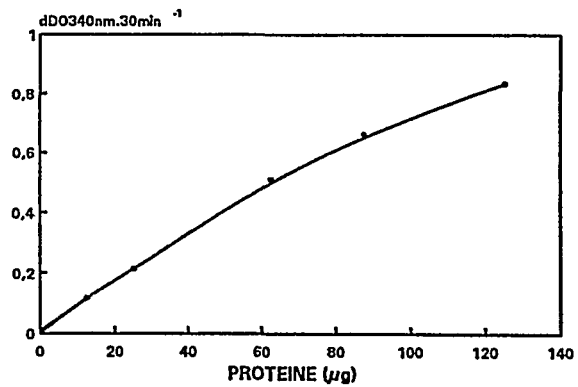
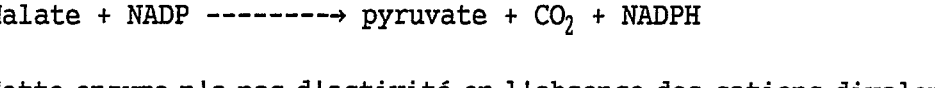


Fig.33: ACTIVITE ENZYME MALIQUE à NADP
En fonction de la quantité de PROTEINE



III-12 ENZYME MALIQUE A NADP (MDH)

L'enzyme malique à NADP catalyse la décarboxylation du malate en pyruvate, en présence de NADP:



$$\text{Malate} + \text{NADP} \longrightarrow \text{pyruvate} + CO_2 + \text{NADPH}$$

Cette enzyme n'a pas d'activité en l'absence des cations divalents Mn^{++} ou Mg^{++} (DROUET et HARTMANN, 1977). Elle fonctionne mieux avec Mn^{++} (1mM contre 5mM pour Mg^{++}), mais ce dernier entraîne la formation d'un léger trouble avec le tampon phosphate de dialyse et de dilution des extraits protéiques. Les mesures et la caractérisation ont donc été faites avec Mg^{++} 5mM.

Le pH optimum déterminé dans ces conditions se situe autour de 7,5 (fig.31). Pour la poire, il serait plus proche de 7 (DROUET et HARTMANN, 1977).

Avec les extraits protéiques des fruits (100µl à 0.2µg.µl^{-1} soit 20µg de protéine), la concentration saturante en malate est atteinte vers 25mM. Le Km apparent est de l'ordre de 2mM. Les concentrations de NADP testées vont de 0.2 à 1.7mM, pour lesquelles l'activité est constante (fig.32).

L'activité augmente linéairement avec la quantité de protéine ajoutée dans le milieu jusqu'à 65-70µg puis la courbe s'infléchit (fig.33). Les quantités de protéine utilisées pour les mesures comparatives entre fruits sont de l'ordre de 20µg.

Les analyses des activités NADH quinone réductases des extraits protéiques des fruits, ont été faites selon le protocole suivant: Le volume réactionnel de 3,0ml comprend le tampon TRIS 0,1M à pH=7,5, du $MgSO_4$ à la concentration de 5mM, du malate à la concentration de 25mM et 20µg de protéine. La réaction est initiée par l'addition du NADP (1mM final), l'augmentation de DO à 340nm est mesurée après 30 minutes.

TROISIEME PARTIE:
RESULTATS ET DISCUSSION

INTRODUCTION

Avant d'aborder l'étude de la maturation proprement dite, il est nécessaire de montrer quelques aspects de l'hétérogénéité de l'ananas, qui se traduit par une forte variabilité des mesures réalisées et, par conséquent, conditionne l'interprétation des résultats. Cette hétérogénéité se situe à 2 niveaux: entre les plants d'un même peuplement végétal et à l'intérieur d'un même fruit du fait de sa structure. Dans cette introduction, on s'attachera à montrer en premier lieu comment s'installe l'hétérogénéité entre les plants et l'impact au niveau de la mesure de quelques caractéristiques chimiques du fruit à la récolte. Cette hétérogénéité constitue une des difficultés majeures lors de l'échantillonnage des fruits sur les parcelles expérimentales. Ensuite, on montrera l'hétérogénéité interne du fruit pour les composantes chimiques qui seront analysées au cours des processus de maturation et de sénescence. Elle conditionne le procédé d'échantillonnage de la pulpe (page 29).

A- HÉTÉROGÉNÉITÉ INTERPLANTS

Le peuplement végétal d'ananas est hétérogène, même s'il est issu d'un matériel de plantation homogène en apparence. Les rejets possèdent des potentialités variables, génétiques ou en raison de leur passé agronomique. L'expression de ces potentialités dépendent des micro conditions du milieu dans lequel se trouve chaque plant (hétérogénéité de sol, parasitisme, etc). Cela se traduit par un étalement de la maturation des fruits malgré l'induction florale artificielle (TIF) qui synchronise la floraison des plants. Une autre conséquence est la variabilité des composantes de la qualité du fruit (poids de fruit, ESS et AL...). Cette hétérogénéité pose des problèmes difficiles à résoudre pour l'expérimentateur car certains paramètres mesurés (enzymes, phénols...) demandent une préparation longue et onéreuse qui limite le nombre de répétitions. Au producteur, elle pose des problèmes pour déterminer le stade de récolte d'une parcelle ou oblige à une préparation complexe et coûteuse de lots homogènes en qualité pour la commercialisation.

Les fruits utilisés pour les analyses proviennent en grande partie d'une parcelle de 1500 plants préparée manuellement. Le plus grand soin a été apporté à la calibration pondérale du matériel végétal de plantation (rejets de 410g ±10g), à la préparation du sol et aux divers traitements fertilisants et phytosanitaires. Malgré tous ces soins, une hétérogénéité importante s'installe entre les plants de la parcelle. L'analyse de quelques unes de leurs caractéristiques entre la plantation et le début des prélèvements des fruits (96 jours après TIF), le démontre. Il s'agit du poids des feuilles D, du nombre d'yeux des inflorescences et de la date de fin de floraison vraie.

Ces caractéristiques ont permis de sélectionner une centaine de fruits, les plus homogènes possible du point de vue de leur stade physiologique. Il subsiste, cependant, une variabilité résiduelle sur les poids de fruits et les ESS, AL et AA en fin de maturation; elle a été mesurée sur les différents échantillons de fruits prélevés pour les analyses. Enfin, il existe plusieurs explications possibles sur son origine qui seront détaillées.

A-1 Variabilité au stade végétatif

Sur les 1500 plants de la parcelle, 1000 ont été utilisés pour l'expérimentation, les autres servant de bordure. La croissance à été suivie individuellement pour chaque plant, par pesée de la feuille D (FD, voir fig.4B), 2, 4, 6 et 9 mois après plantation. Le poids de la FD présente une

bonne corrélation avec le poids du plant (PY et LOSSOIS, 1962).

L'étalement des poids de FD s'accroît avec l'âge (fig.34), mais la dispersion relative autour de la moyenne du poids de FD tend plutôt à diminuer (tableau 9). Les nombres de plants dont le poids de FD se situe dans les intervalles ±10% et ±20% autour de la moyenne, augmentent. L'hétérogénéité, mesurée par la FD, diminue donc un peu entre 2 et 9 mois. Mais à ce dernier stade, le poids de FD varie de 35 à 87g pour une moyenne de 61,3g.

Tableau 9: Evolution de l'hétérogénéité des poids des FD

Age des plants	2 mois	4 mois	6 mois	9 mois
Coef. de variation (écart type x100/ moyenne)	19,6%	20,1%	16,8%	15,5%
Nbre de plants des intervalles				
Moyenne ±10%	392	431	432	457
Moyenne ±20%	648	655	721	754

A ce stade, nous n'avons conservé que les plants dont le poids de la FD est dans l'intervalle ±10% autour de la moyenne (61,3g ±10%), soit 457 plants. Plus de la moitié des plants sont éliminés.

A-2 Variabilité au stade fin de floraison vraie

La fin de floraison vraie correspond à l'apparition des dernières fleurs au sommet du fruit, elle s'est étalée sur 10 jours (tableau 10). Le nombre maximum d'ananas à ce stade est enregistré le 3ème jour de comptage.

Tableau 10: Etalement de la floraison

Jour de comptage	1	3	5	7	10
Nbre de plants fleuris	102	334	297	134	48

Le jour de la fin de la floraison vraie a été retenu comme deuxième critère de sélection. Seules les inflorescences ayant atteint ce stade le 3ème jour de comptage, sont retenues. **Des 457 plants issus de la première sélection, il ne reste que 156 plants (15,6% du total).**

Fig. 34: ETALEMENT DU POIDS DES FEUILLES D

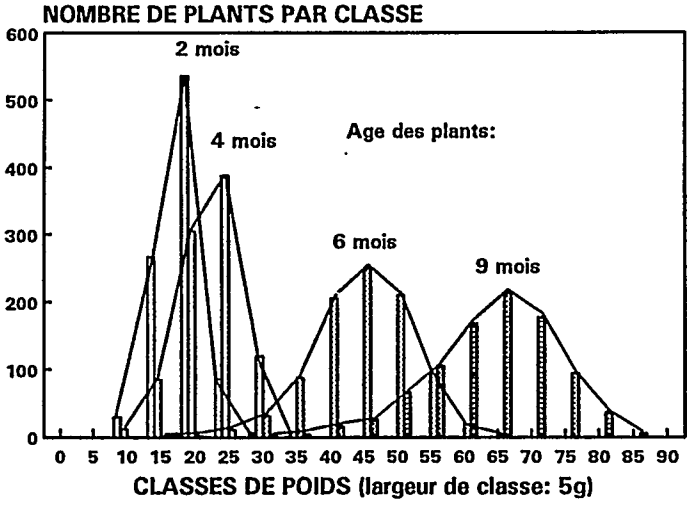


Fig.35: HETEROGENEITE DU NOMBRE D'YEUX (156 PLANTS CHOISIS SUR LA FD)

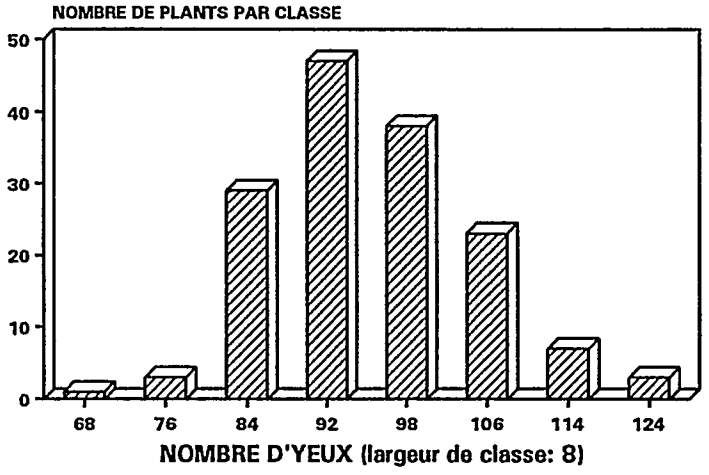


Fig.36: COEF. DE VARIATION DE NY ET PY (85 PLANTS CHOISIS SUR LA FD ET LE NY)

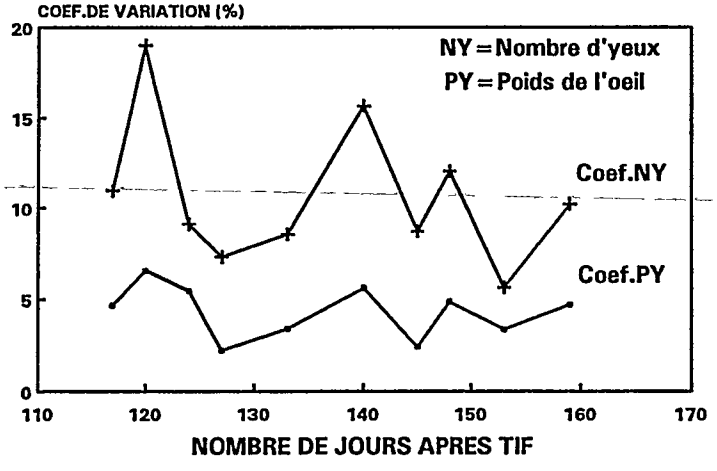
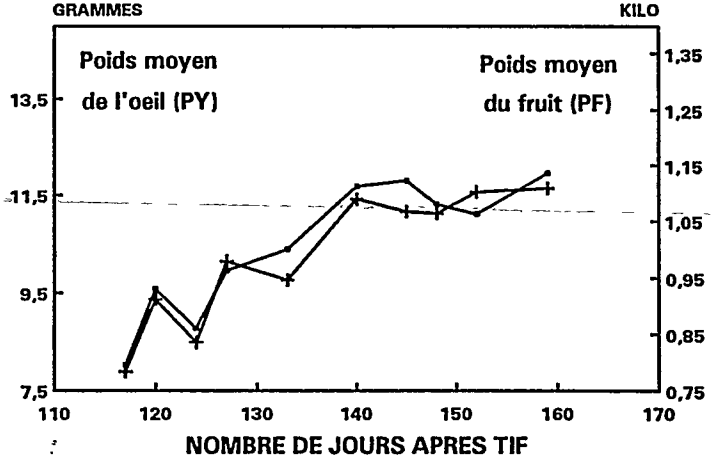


Fig.37: AUGMENTATION DE PY ET PF (85 PLANTS CHOISIS SUR LA FD ET LE NY)



Une dernière sélection a été basée sur le nombre d'yeux de l'inflorescence, déterminant pour une part importante le poids du fruit (LACOEUILHE, 1978). Les fruits sont classés selon le nombre d'yeux et sont retenus ceux correspondant aux deux classes les plus représentées, soit des fruits de 88 à 104 yeux (fig.35). Il reste à ce stade 85 fruits (8,5% du total) dont les dimensions sont 98,4 ±1,1mm pour la hauteur et 81,9 ±0,7mm pour la largeur. Les moyennes des 156 fruits étaient 99,4 ±1,4mm et 82,4 ±0,8mm.

Finalement alors que les dimensions des inflorescences varient peu dans le dernier échantillon de 85 fruits, le nombre d'yeux est moins homogène. A poids moyen d'oeil égal (environ 12g au stade mûr), la variation du nombre d'yeux des fruits (88 à 104) pourrait se traduire, théoriquement, par une différence maximale de poids fruit de l'ordre de 200g.

A-3 Variabilité au stade de récolte

Rappelons que le but de l'expérimentation est de suivre l'évolution des composantes biochimiques des fruits. Ils ont été récoltés 5 par 5, à quelques jours d'intervalle entre la fin de la floraison vraie et le stade très mûr. On dispose donc de peu de répétitions (5) pour juger de la variabilité finale aux différents stades de récolte.

Les coefficients de variation du nombre d'yeux (fig.36) sont assez faibles sauf pour deux stades (19,0% et 15,7%). Ils représentent simplement la répartition des inflorescences sélectionnées sur le nombre d'yeux, dans les différents échantillons de 5 fruits.

Les coefficients de variation du poids moyen de l'oeil sont faibles (2 à 7%) et ils varient d'un prélèvement à l'autre proportionnellement à ceux du nombre d'yeux. Evidemment, de ce fait l'augmentation du poids moyen du fruit est assez irrégulière (fig.37) et peu représentative de la croissance pondérale du fruit pendant la phase de maturation (PY et LOSSOIS, 1962). Mais l'expérimentation n'est pas conçue pour cela, le point important étant la comparaison de stades physiologiques différents. D'autre part, étant donnée la variabilité de poids de fruit intra-prélèvements, il est important de vérifier si celui-ci exerce une influence sur les composantes biochimiques. En effet, à "maturité" égale, une liaison entre le poids du fruit et l'AL existerait, les petits fruits étant plus acides. Par contre, l'ESS et l'AA seraient indépendants du poids du fruit (HUET, 1958).

On ne présente ici que les coefficients de variations correspondant aux 3 derniers prélèvements (tableau 11), ceux pour lesquels, a priori, la variabilité devrait être la plus forte puisque le temps entre le choix des inflorescences et la récolte est le plus grand.

RELATIONS ENTRE LE POIDS DES FRUITS EN FIN DE MATURATION ET LES CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU JUS

Fig.38a: RELATION POIDS/ESS

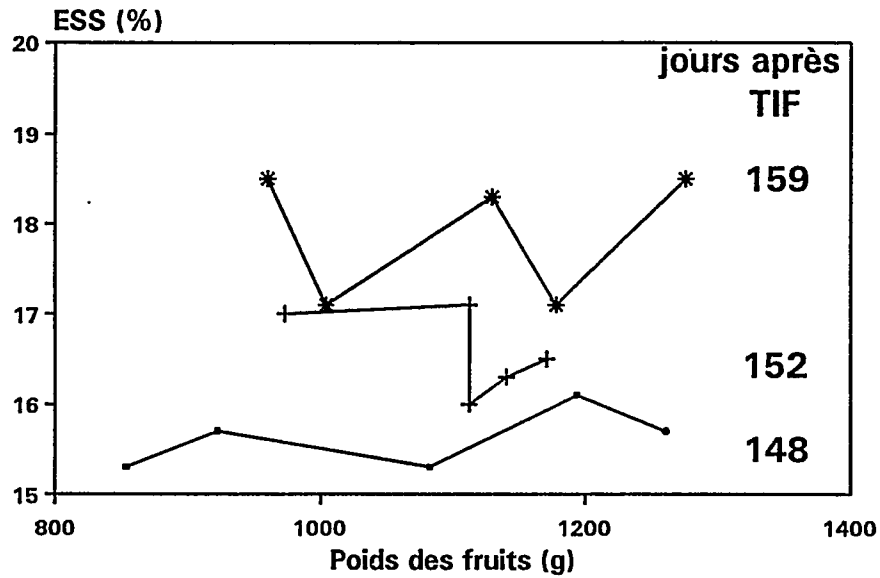


Fig.38b: RELATION POIDS/AL

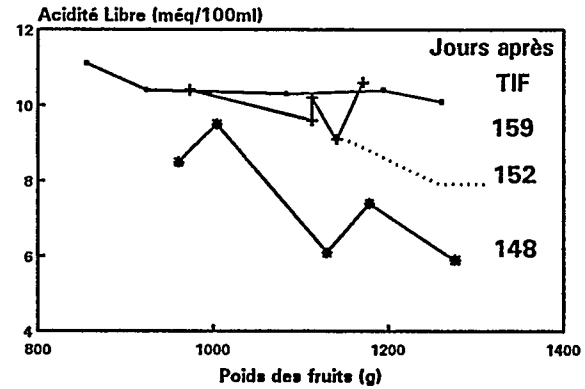
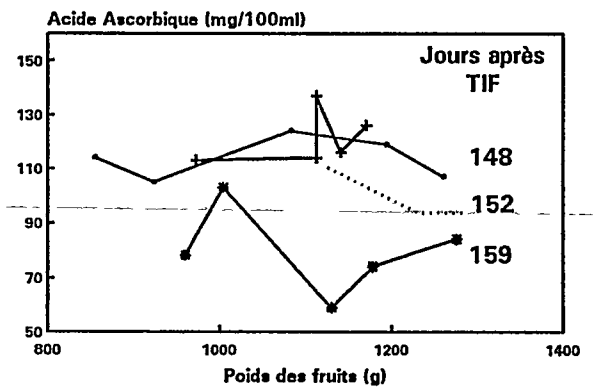


Fig.38c RELATION POIDS/AA



Les valeurs correspondant à une même date de récolte, donc d'un même échantillon, sont reliées entre elles. Pour une même date de récolte, donc pour une maturité théoriquement identique, le poids des fruits varie fortement, alors que les critères chimiques varient beaucoup moins. L'ESS du jus permet de classer les fruits en fonction de leur âge (148 à 159 jours), l'AL et l'AA permettent de distinguer respectivement les fruits les plus verts et les plus mûrs.

Tableau 11: Coefficients de variations des AL, ESS, AA et poids de fruits pour les 3 derniers prélèvements.

Variables observées	AL	AA	ESS	Poids
Jours après TIF				
148	3,2%	6,3%	1,9%	14,6%
152	5,3%	7,6%	3,8%	6,2%
159	5,7%	18,0%	3,7%	10,4%

En fait les coefficients sont faibles (<10%) pour les composantes chimiques et un peu plus forts pour les poids. Compte tenu du petit nombre de fruits pour chaque prélèvement on peut considérer que le mode de sélection a été efficace. Seul le coefficient de AA est élevé en fin de maturation (159 jours) mais cette caractéristique est assez fréquente avec le jus d'ananas (voir courbe d'évolution de l'acide ascorbique en fonction de la maturation, fig.42).

Pour ces 3 derniers stades de maturité, il est très intéressant de juger l'influence de la variabilité du poids des fruits sur les composantes chimiques. Le poids est alors relativement indépendant du stade de maturité, il n'augmente presque plus. Ce n'est évidemment pas le cas pour les stades immatures.

On a représenté les ESS, AL et AA en fonction du poids des fruits aux stades 148, 152 et 159 jours après TIF (fig.38). Il est clair que le stade de maturité est la cause des variations des composantes biochimiques, même si l'échantillon de 152 jours après TIF est moins homogène que les 2 autres. Dans le cas de l'acidité, on peut noter toutefois une légère tendance à diminuer quand le poids augmente. La variabilité du poids intra-prélèvement exerce donc peu d'influence sur les composantes biochimiques. Les écarts maxima de poids entre le plus petit et le plus gros fruit, sont d1= 406g, d2=198g et d3=315g, respectivement pour les prélèvements de 148, 152 et 159 jours. Sur ce plan l'hétérogénéité reste très forte à maturation complète.

La méthode de sélection des plants, bien qu'imparfaite, a permis d'obtenir des fruits avec des stades de maturité relativement homogènes en fin de maturation. Une méthode de sélection plus efficace, devrait permettre d'obtenir une meilleure homogénéité à la fois sur le stade physiologique mais aussi sur le poids et le nombre d'yeux des fruits.

A-4 Origines de la variabilité interplants dans la culture d'ananas

Dès le stade floraison, une grande hétérogénéité entre les plants est installée puisque les poids de feuilles D varient du simple au double (voir page 72) et l'étalement de la floraison est important (tableau 10).

Cependant, il est probable qu'une bonne part de cette hétérogénéité existe déjà avant 2 mois puisqu'entre 2 et 9 mois la dispersion relative entre les plants diminue légèrement. LACOEUILHE (1982) passe en revue les interactions de la plante avec son milieu et les facteurs qui contribuent à l'hétérogénéité d'un peuplement d'ananas:

1- Tout d'abord, faute d'avoir pu utiliser pour cette expérimentation des rejets issus d'un seul clone, il peut exister une certaine variabilité génétique dans la parcelle. L'expression de cette variabilité se manifeste au cours du développement des plants (croissance, vigueur des plants...). L'utilisation de clones est la première des mesures à prendre, quand c'est possible, pour lutter contre l'hétérogénéité.

2- L'ananas est une plante à multiplication végétative et le matériel végétal à introduire au champ, est sélectionné en fonction de sa nature (rejets de tige), de son poids (calibration de 300 à 700g) et dans une moindre mesure de la longueur des feuilles. Cependant les études en milieu contrôlé ont montré que ces critères sont tout à fait insuffisants pour bien caractériser leur potentiel et leur état physiologique. Les rejets ont un potentiel d'émission racinaire qui s'exprimera plus ou moins, dans un milieu biologique hétérogène, même à l'échelle d'une parcelle de 1000 plants. Ce potentiel serait la principale cause de l'hétérogénéité entre les plants, avant même la plantation des rejets.

3- L'ananas a conservé certains caractères épiphytes. Son système racinaire se développe peu par rapport aux parties aériennes. Il est fragile et sensible aux "agressions externes" (parasitisme, stress hydrique...). Sa croissance, rapide au début, se ralentit très vite, au contraire des parties aériennes. Un système racinaire ayant subi des conditions défavorables au départ, ne peut rattraper son retard de croissance.

4- En raison de la croissance lente des plants, le sol reste découvert très longtemps (5 ou 6 mois suivant les conditions de croissance) et peut subir des modifications profondes et hétérogènes. La pluie érode les sols fragiles des billons (déchaussement des racines), change leur structure (les racines d'ananas sont très sensibles aux hétérogénéités de sol), peut lixivier les éléments minéraux. Les adventices n'ont pas de problème de compétition pour la lumière avec la culture principale pendant cette phase.

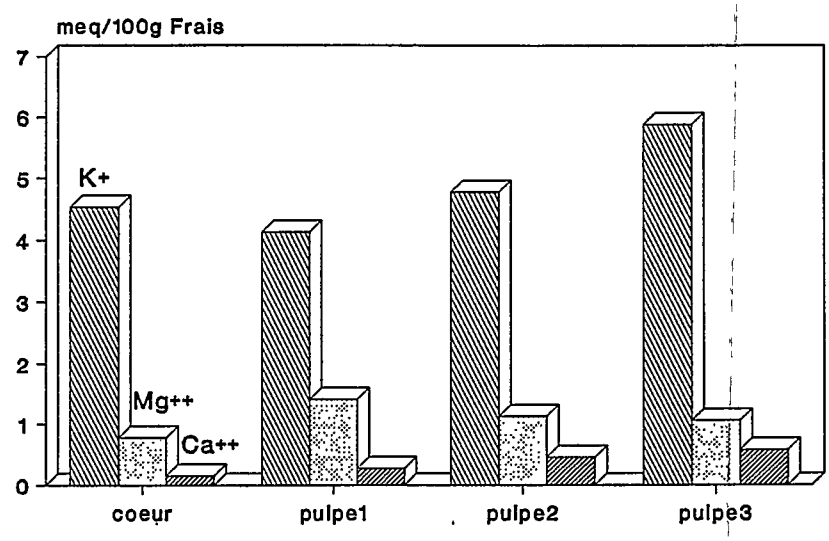
5- La compétition entre les plants accroît l'hétérogénéité de la parcelle. Elle paraît relativement moins importante pour les parties aériennes (BARTHOLOMEW et KADZIMIN, 1977) qu'au niveau du sol (large recouvrement des zones explorées par les systèmes racinaires de plants voisins).

Finalement, le développement végétatif des plants au moment du TIF

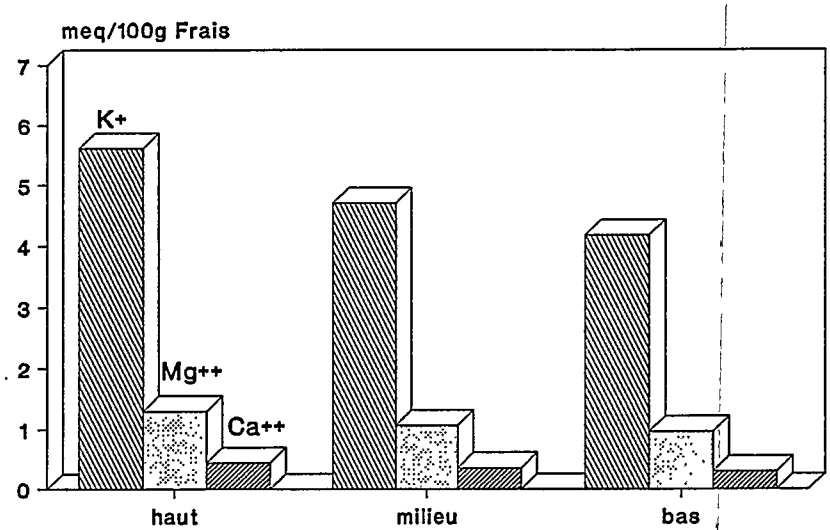
peut être considéré comme un potentiel de rendement dont l'expression dépend des conditions de croissance pendant la phase de fructification (MALEZIEUX, 1986). Elle se traduit dans le nombre d'yeux de l'inflorescence et le poids moyen de l'oeil, lequel est lié à l'équilibre photosynthèse-utilisation des réserves pour la formation du fruit. L'hétérogénéité acquise au stade végétatif se répercute donc sur le rendement mais probablement aussi sur les caractéristiques biochimiques du fruit. Peu de travaux ont été réalisés sur le déterminisme des composantes biochimiques du fruit (relation avec le métabolisme du plant, impact des conditions du milieu pendant la phase de fructification...). Les facteurs d'hétérogénéité influent sur les capacités photosynthéthiques, l'absorption racinaire et sur la constitution des réserves du plant. Or ces trois fonctions du plant sont logiquement responsables de l'élaboration de la qualité du fruit et aussi de son hétérogénéité.

Fig.39: GRADIENTS MINERAUX DANS LA PULPE

GRADIENT MINERAL HORIZONTAL
(K, Mg, Ca)



GRADIENT MINERAL VERTICAL
(K, Mg, Ca)



(découpe du fruit selon fig.4A)

B) HÉTÉROGÉNÉITÉ INTERNE DU FRUIT

La forte hétérogénéité, entre les plants ou les fruits, est un obstacle pour apprécier la date de récolte à l'échelon d'une parcelle, ou pour présenter des lots de qualités homogènes à la commercialisation. La structure interne complexe du fruit ne facilite pas non plus l'appréciation de la qualité à l'échelon du fruit.

L'ananas est issu d'une inflorescence et les fruits individuels (yeux) bien que soudés les uns aux autres, conservent une certaine autonomie, pour la maturation notamment. La chair comestible du fruit est constituée par le coeur fibreux qui est un prolongement du pédoncule, par les ovaires et une partie des sépales et des bractées qui devient charnue (fig.3). On peut donc s'attendre à une forte hétérogénéité interne de structure, de texture et de composition chimique.

HUET (1958), en Guinée, a mesuré des gradients d'ESS (>4°brix) et d'AL (>6méq.100ml^{-1}) qui existent de bas en haut, traduisant un retard de maturité du haut du fruit. Mais, ils sont plus importants du coeur vers l'extérieur du fruit que de bas en haut, sens de progression de la maturation.

Plusieurs caractéristiques chimiques des différentes zones du fruit ont été mesurées. La pulpe est subdivisée verticalement en 4 zones (fig.4). Les résultats obtenus pour les AL, AA et ESS sont similaires à ceux de HUET, (tableau 12). Le gradient intérieur-extérieur de l'acidité est plus fort que le gradient vertical (respectivement +5,7 et +1,2méq.100ml^{-1} en moyenne). Ceux des AA et Thiols sont similaires aux précédents, toutefois si la teneur en thiols est multipliée par 5, celle de l'AA n'augmente que de 20% horizontalement. L'ESS varie en sens inverse de l'acidité mais il chute très nettement dans la zone sous épidermique et les gradients sont moins forts . Il faut noter aussi que le coeur est notablement moins riche que la pulpe adjacente pour toutes ces composantes.

Les teneurs en protéines et les activités hydrolasiques mesurées présentent aussi des gradients similaires à ceux de l'AL.

Les teneurs en éléments minéraux majeurs ont aussi leurs gradients particuliers (fig.39). Les teneurs en K^{+}, Ca^{++} et Mg^{++} diminuent de bas en haut. Horizontalement les teneurs en K^{+} et Mg^{++} évoluent en sens inverse alors que celle du Ca^{++} augmente régulièrement du coeur vers l'épiderme.

Tableau 12: Gradients de quelques composantes biochimiques de la pulpe du fruit au stade récolte.

Analyses chimiques		AL	ESS	AA	PROTEINES	THIOLS
HAUT	coeur	9,0	12,5	125	0,10	0,06
	pulpe 1	14,9	12,8	140	0,24	0,13
	pulpe 2	15,5	12,4	151	0,26	0,25
	pulpe 3	16,7	10,4	146	0,26	0,26
MILIEU	coeur	11,8	14,1	128	0,09	0,05
	pulpe 1	13,9	16,5	133	0,21	0,08
	pulpe 2	14,6	15,5	152	0,26	0,16
	pulpe 3	15,7	12,3	158	0,27	0,27
BAS	coeur	9,4	15,5	130	0,07	0,06
	pulpe 1	12,8	19,6	119	0,21	0,08
	pulpe 2	14,1	17,7	132	0,24	0,12
	pulpe 3	14,9	13,7	150	0,27	0,20

AL= acidité libre en méq.100ml^{-1} de jus
ESS= extrait sec soluble en %
AA= acide ascorbique en mg.100ml^{-1} de jus
Protéines en mg.ml^{-1} de jus
Thiols en millimolaire

Activités hydrolasiques		Phos	αMan	αGal	diEst	NAG
MILIEU	coeur	19,7	13,2	6,9	17,9	4,9
	pulpe 1	27,7	22,0	8,9	24,4	7,4
	pulpe 2	43,1	-	13,6	37,1	13,3
	pulpe 3	40,7	35,2	15,1	39,6	10,1

Unités arbitraires

Après découpe (fig.4A), les zones homologues de 15 fruits sont rassemblées et le jus extrait en une seule opération. Les mesures sont réalisées à partir de ce jus "composite" y compris pour les activités enzymatiques, ce qui explique l'absence d'intervalle de confiance. Ce procédé est imposé par la petite quantité de jus extractible, notamment au niveau du coeur.

Cette hétérogénéité intrinsèque du fruit peut être accentuée par des facteurs externes. Par exemple une mauvaise protection du fruit peut entraîner un "coup de soleil" sur la face qui y est exposée et une modification de la pulpe sous-jacente. On perçoit donc toutes les précautions qu'il est nécessaire de prendre pour effectuer un échantillonnage lors de comparaisons entre fruits que ce soit au laboratoire ou dans la chaîne de commercialisation. Par exemple, l'adaptation des machines de contrôle de qualité automatique (ESS) est très difficile. La zone à prélever dans le fruit doit être la plus représentative du fruit, mais effectuer un prélèvement avec une texture aussi fibreuse s'avère particulièrement délicat (TISSEAU, 1986).

Dans le cas des analyses présentées par la suite, les prélèvements de pulpe sont toujours faits dans la zone médiane du fruit (milieu, pulpe 2 et 3). Les morceaux prélevés ont la forme de secteurs pour respecter la proportion partie interne/partie externe.

Chapitre I: Maturation de l'ananas

Au cours de la maturation de l'ananas, les évolutions chimiques et enzymatiques se traduisent par la transformation harmonieuse du fruit, lui conférant les qualités de présentation et organoleptiques du fruit mûr. Dans ce premier Chapitre seront analysées, en premier lieu, ces évolutions des composantes biochimiques du fruit au cours de sa formation et de sa maturation. Elles sont aussi le reflet de mécanismes et de leurs contrôles au niveau cellulaire qu'on essaiera d'expliciter (accumulation de divers composés dont les sucres et les acides, contrôle de la maturation...). On évoquera, enfin, le problème de la variabilité des composantes biochimiques, par conséquent de la qualité du fruit, et des facteurs qui la contrôlent.

Fig.40: EVOLUTION DES SUCRES DE LA PULPE DE L'ANANAS

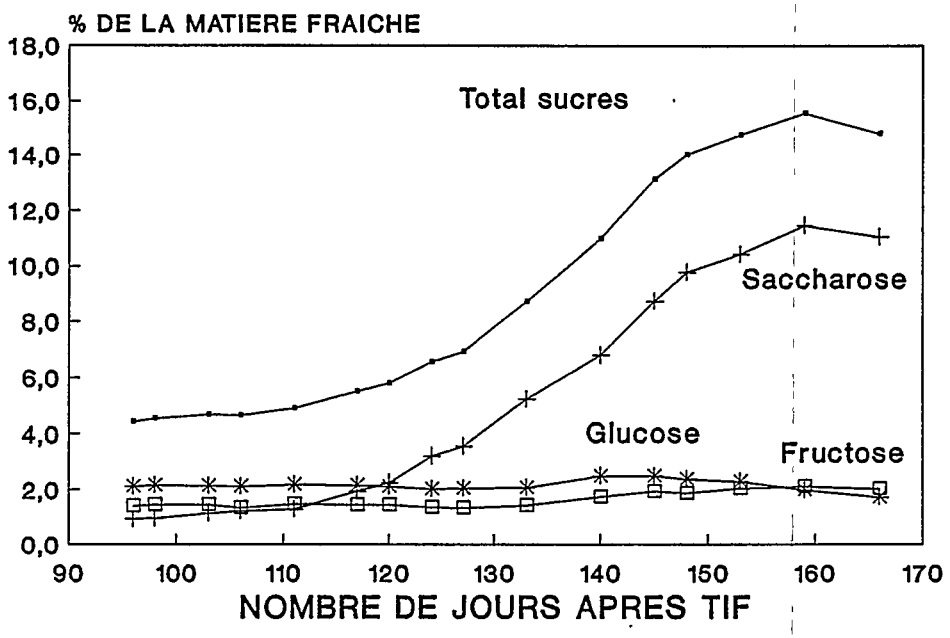
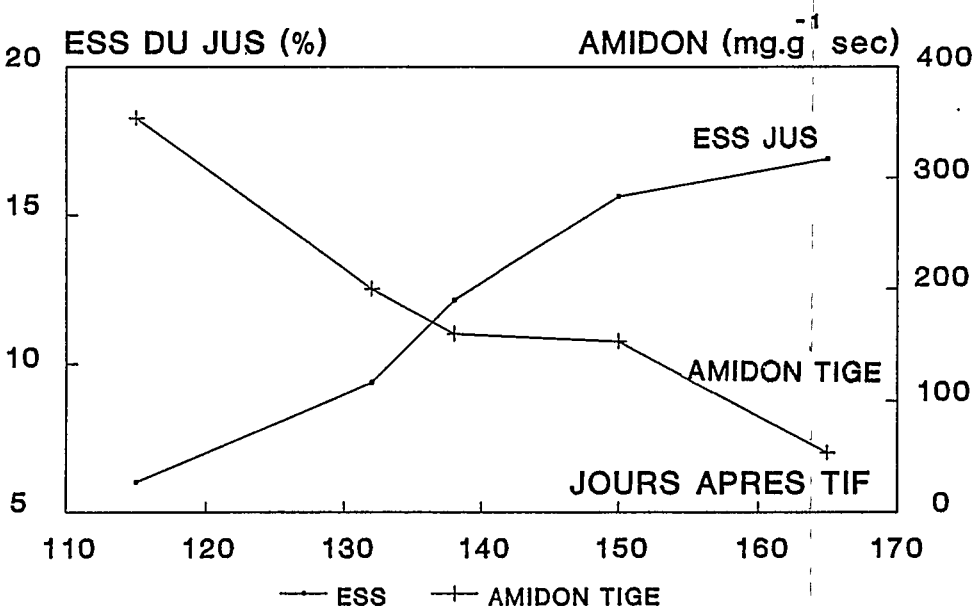


Fig.41: EVOLUTIONS COMPAREES DE L'ESS DU JUS (FRUIT) ET DE L'AMIDON DE LA TIGE



I-1 EVOLUTION BIOCHIMIQUE DU FRUIT (RÉCOLTE DE DÉCEMBRE), ESSAI D'INTERPRÉTATION DE QUELQUES ASPECTS DU MÉTABOLISME DU FRUIT

I-1-1 Analyses chimiques

I-1-1-1 Les sucres

La teneur en sucres de la pulpe augmente progressivement jusqu'à 125 jours après TIF puis beaucoup plus rapidement jusqu'à 145 jours, stade de début de coloration de l'épiderme. Ensuite l'accumulation se ralentit et stoppe à maturité complète. L'évolution de la teneur globale n'est due qu'au saccharose (fig.40), respectivement 4,5%, 6,5% et 15,5% pour 1%, 3,5% et 11,5% à 96, 125 et 160jours après TIF. Les deux autres sucres détectés sont le glucose et le fructose dont les teneurs n'augmentent que très faiblement avant maturité vers 2%. L'ESS du jus présente la même évolution que celle des sucres totaux (fig.42B). Parallèlement, on note que la teneur en amidon des tiges diminue pendant la formation du fruit (fig.41). L'augmentation de la teneur en saccharose des fruits résulte, au moins partiellement, de la mobilisation des réserves des parties végétatives.

I-1-1-2 Les acides organiques

Après une légère diminution au début du développement de l'inflorescence, l'acidité libre augmente très rapidement jusque vers 140 jours. Elle passe par un maximum à 145 jours, puis chute fortement pendant la phase finale de maturation.

L'acide citrique explique l'essentiel de la variation observée (fig.42A), alors que l'acide malique n'évolue que peu, sauf en fin de maturation où sa teneur diminue aussi fortement. En début de développement le rapport acide citrique/acide malique est de l'ordre de 0,5, il augmente jusqu'au maximum d'acidité libre (≈3) pour diminuer ensuite légèrement. A maturité on a 2/3 d'acide citrique pour 1/3 d'acide malique. Ce sont les 2 acides le plus fréquemment accumulés dans les fruits au cours de leur développement ou de leur maturation (ULRICH, 1970).

D'autres acides organiques ont été détectés mais en quantités faibles (résultats non montrés). Ce sont principalement ceux qui interviennent au niveau du cycle de Krebs: acides succinique, fumarique, cis et trans aconitique. D'autres acides ont été identifiés, oxalique ou malonique lequel sous forme de malonyl-CoA, peut être le point de départ de la synthèse des acides gras. Leurs évolutions sont faibles, l'acide succinique diminue assez tôt au cours du développement mais reste stable pendant le dernier mois de la

Fig.42A: EVOLUTIONS CITRATE-MALATE DANS LE JUS DE L'ANANAS

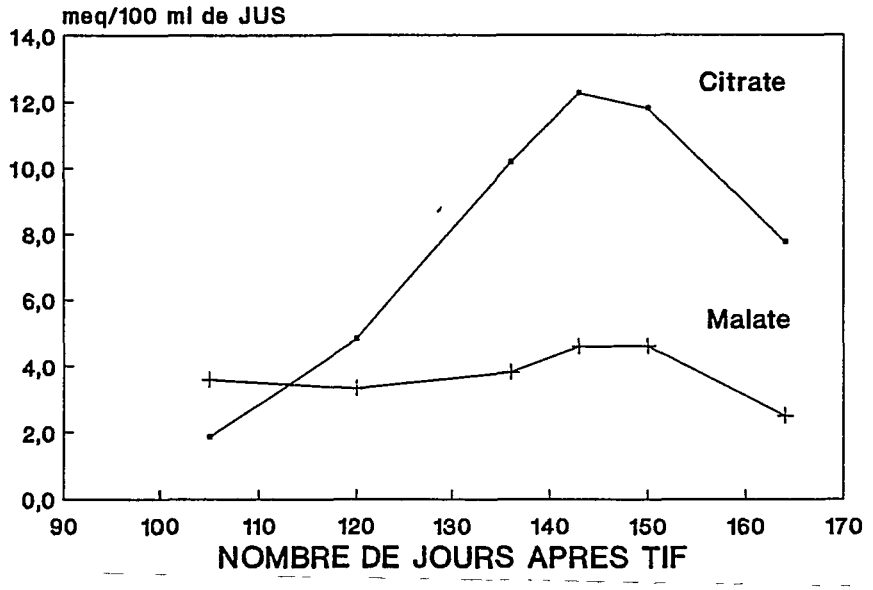


Fig.42B: EVOLUTION AL, ESS DU JUS ET AA (PULPE ET EPIDERME)

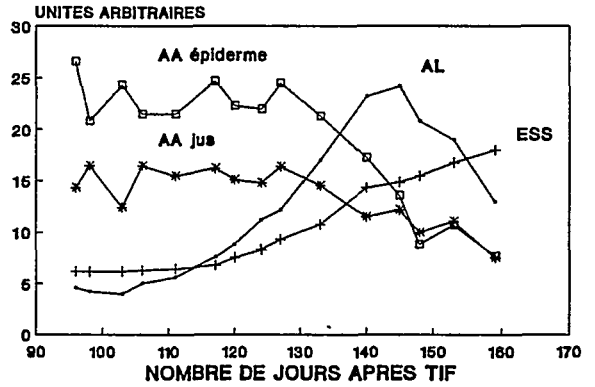


Fig. 42C: EVOLUTION DE L'AC ASCORBIQUE ET DES THIOLS REDUITS DU JUS

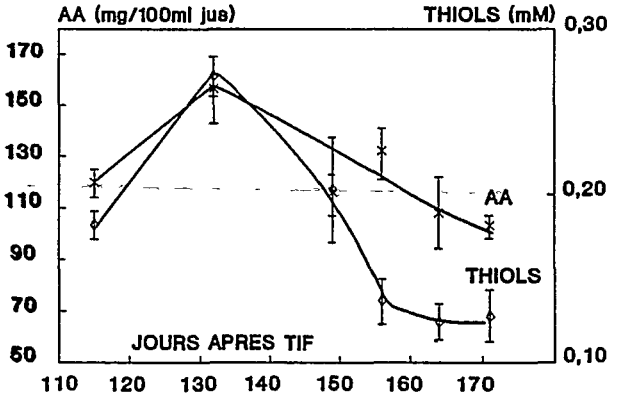


Fig.42A: Dosage des acides organiques (citrate et malate) par CPG après méthylation par le BF_3-méthanol (14%) directement sur jus filtré et centrifugé.

Fig.42B et C: Les mesures d'AA 'épiderme et jus' (dosage 'redox' par titrimétrie avec du DCIP) sont exprimées par rapport à la phase aqueuse du tissu, les unités bien qu'arbitraires, sont les mêmes pour les 2 dosages. Mesure des thiols, idem (dosage colorimétrique à 410nm avec du DTNB).

maturation, l'acide fumarique n'est détecté qu'à l'état de traces, les autres ne varient pratiquement pas jusqu'à maturation mais tous diminuent, comme l'AL, aux stades très mûrs. Le cas de l'acide ascorbique est traité plus loin.

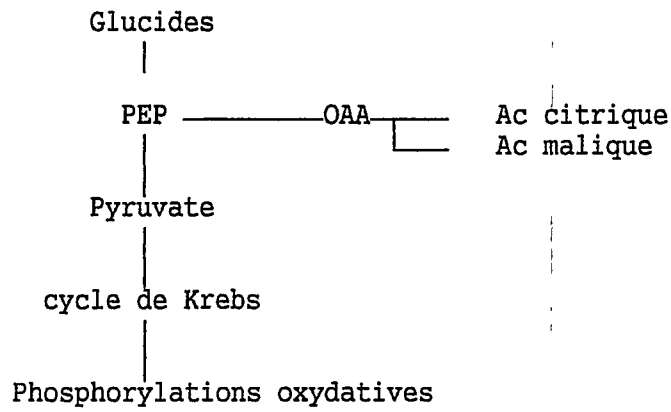
En résumé, les sucres et acides organiques évoluent dans les conditions ivoiriennes de façon très similaire à ce qui est observé dans des milieux biologiques très différents (GORTNER *et al*, 1967), ou même sur d'autres cultivars (LODH *et al*, 1972; MAYANS et PLANELLS, 1986; MAURYA, 1988).

Discussion:

Le catabolisme des acides organiques est le moteur de l'accumulation des sucres dans le fruit, fournissant l'énergie nécessaire. En effet, leur utilisation au niveau du cycle de Krebs puis les phosphorylations oxydatives, fournissent l'ATP impliqué dans l'accumulation de sucres ou acides organiques dans les cellules puis les vacuoles. L'origine des acides organiques peut être multiple (LESHEM *et al*, 1986): 1) la PEP carboxylase à partir du PEP (issu des premières étapes du catabolisme des glucides) et du CO_2 produisant l'AOA puis le citrate et le malate, lesquels contribuent au pH-stat de DAVIES (DAVIES, 1977) et à l'accumulation d'osmoticum; 2) le transfert à partir du plant; 3) la désamination d'acides aminés issus de la dégradation des protéines. La vitesse d'accumulation des acides dépend de l'équilibre entre les réactions anaboliques et cataboliques, lui même est fonction des besoins du fruit et des conditions du milieu et plus particulièrement la température. Les 3 possibilités existent pour l'ananas: le métabolisme crassulacéen de l'ananas, donne un rôle tout particulier à l'acide malique mais le fonctionnement du processus dans le fruit n'a pas été exploré; la forte diminution de la quantité de protéines (fig.47) au cours de la maturation, pourrait remettre à disposition du cycle de Krebs et de la respiration, des acides aminés transformés en acides organiques; notons, enfin, une forte acidification des fruits aux périodes de faible ensoleillement ou après ombrage artificiel des plants (TEISSON, 1979c), pourrait résulter d'un transfert des assimilats mais sous forme d'acides organiques au lieu de sucres, puisque paralèlement la teneur en sucres diminue fortement. Mais, si une telle possibilité existe, le mécanisme de remobilisation des acides stockés dans les vacuoles des feuilles et celui de leur transport serait à démontrer. Classiquement, les acides organiques sont utilisés par la respiration pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule et ils dérivent aussi du catabolisme des glucides (voir schéma ci-après). Il faut noter que le fruit a la capacité de synthétiser des acides organiques après la récolte, au cours de la

conservation à 8°C et à l'abri de la lumière (TEISSON, 1977), probablement à partir des glucides puisque l'ESS du jus diminue légèrement au cours de la conservation.

L'arrêt de l'accumulation des acides organiques, en fin de maturation, peut résulter d'un arrêt de leur synthèse, de leur transfert, ou de leur utilisation accrue par la respiration qui augmente en fin de maturation (DULL, 1971).



Les sucres continuent d'être accumulés pendant quelques jours (15 à 20) par rapport aux acides organiques, l'énergie nécessaire pour cette accumulation peut être fournie par l'utilisation de ces derniers, précédemment stockés dans la vacuole. Cette réutilisation expliquerait, en partie au moins, la chute de l'acidité du fruit. Celle-ci peut, ensuite, entraîner de profondes perturbations du métabolisme des cellules vieillissantes, notamment en raison du rôle des acides organiques dans le maintien des équilibres ioniques et du pH cellulaire.

Il est intéressant de noter la chronologie des modifications des teneurs en sucres et acides organiques à l'approche de la maturation. L'arrêt de l'augmentation de l'acidité, précède de peu le ralentissement puis l'arrêt de l'accumulation de saccharose dans les cellules. On peut faire un parallèle entre ces observations et les études réalisées par ailleurs sur le transport des sucres par l'intermédiaire du phloème depuis les organes "sources", comme les feuilles ou les tiges, vers les organes "puits" comme les fruits (HO, 1988). Le saccharose est la principale forme de transport du carbone assimilé, depuis les feuilles vers les organes de stockage. Les mécanismes de ce transport (chargement et déchargement du phloème, transport de cellule à cellule et stockage dans les vacuoles) consomment de l'énergie (GEIGER, 1975 cité par HO, 1988) fournie par la respiration dans les fruits. Ils feraient intervenir des ATPases membranaires pour le transport transmembranaire des sucres contre le gradient de concentration extérieur-intérieur de la vacuole. Chez la betterave rouge, le transport du saccharose à travers la membrane de vacuoles isolées est stimulé par l'ATP et le Mg-ATP (DOLL *et al*, 1979). Les

mécanismes de transport permettraient, ainsi, de maintenir le gradient considéré, traditionnellement, comme indispensable au transport des sucres entre la source et le puits, lieu déchargement du phloème. Cependant, à partir des expérimentations utilisant la technique dite de "graines vides", WOLSWINKEL (1990) suggère qu'une forte concentration en solutés osmotiquement actifs dans l'apoplaste de la zone "puits", conduit à un faible potentiel de pression de turgescence à l'extrémité "puits" du phloème, et stimule, ainsi, le transport phloémien vers les graines en développement. De fait, on peut stimuler le transport du saccharose ou des acides aminés, dans les "graines vides" de légumes (WOLSWINKEL et AMMERLAAN, 1984, 1986, 1988, dans WOLSWINKEL, 1990) ou les pédicelles de graines de maïs (PORTER *et al*, 1987), par traitement avec une solution concentrée (400mM en mannitol) , représentant un fort osmoticum dans l'apoplaste de la zone "puits" (ELLIS et SPANSWICK, 1987 et ELLIS *et al*, 1989). Inversement une solution peu concentrée, réduit le transport. Ce mécanisme pourrait fonctionner chez les fruits, durant la phase la plus active d'accumulation de sucres dans le raisin, l'apoplaste serait "baigné" par une solution de forte concentration en sucres (LANG et THORPE, 1986). D'autre part, l'accumulation des sucres dans divers tissus qui possèdent cette capacité de stockage, semble liée à la perte de l'activité de l'invertase acide soluble (vacuolaire et non pariétale). La diminution de son activité serait nécessaire, d'une façon générale, aux tissus stockant le saccharose; au contraire, sa présence remet le saccharose stocké à disposition du métabolisme sous forme d'hexoses, en particulier pour la glycolyse et donc la synthèse du citrate et du malate (betterave, GIAQUINTA, 1979; melon et concombre, SCHAFFER *et al*, 1987; canne à sucre, HATCH *et al* 1963; et enfin, citrus, KATO, 1978, et carotte, RICARDO, 1970, cités par SCHAFFER). Ce dernier auteur suggère que l'invertase (neutre) et la sucrose-synthase (cytosoliques) peuvent être impliquées dans l'hydrolyse du saccharose pour permettre son transport à travers le tonoplaste et son accumulation dans la vacuole, mais aussi son utilisation pour le métabolisme de la cellule. Ces activités augmentent chez le melon, lorsque diminue celle de l'invertase acide soluble. L'invertase acide pariétale (insoluble) garde également une activité relativement élevée. SCHAFFER suggère que la sucrose-synthase pourrait faire aussi partie d'un système de transfert du saccharose à travers le tonoplaste, sous forme UDP-hexoses, conjointement avec un système de cotransport saccharose/H^+.

Par ailleurs, les fortes concentrations de saccharose mais aussi d'acides organiques et d'ions K^+ dans les vacuoles, peuvent être déterminantes dans le processus d'accumulation des sucres et sa régulation. La pression osmotique (en valeur absolue) doit augmenter très vite au cours de la maturation et les cellules déjà complètement distendues ne peuvent plus compenser en augmentant leur volume et celui de la vacuole. Selon KINRAIDE et WYSE (1986), une forte turgescence inhibe l'extrusion des protons (chez la betterave) en diminuant la différence de potentiel transmembranaire (en valeur absolue) au niveau du plasmalemme. Cette inhibition est réversible puisque

l'acidification artificielle du cytoplasme peut réactiver cette extrusion des protons dans des tissus fortement turgescents. Secondairement, le transport du saccharose est réduit dans les mêmes tissus en forte turgescence (WYSE *et al*, 1986). La turgescence pourrait donc être un régulateur de l'accumulation des sucres.

L'accumulation des anions citrate et malate dans la vacuole peut correspondre à la nécessité du maintien de l'équilibre ionique. La cellule doit compenser l'effet des pompes qui expulsent les protons de la vacuole (ATPases tonoplastiques) et y font entrer du K^+ (ouvertures de canaux ioniques), lors des processus de transport transmembranaire, entre autre pour accumuler le saccharose (HO, 1988).

Les évolutions des sucres et des acides qui ont été observées, peuvent être expliquées par les mécanismes ci-dessus, cependant, leur existence chez l'ananas, reste à prouver. Leur étude et celle des facteurs qui les régulent, peut être déterminantes puisque les sucres et l'acidité sont les principaux critères de qualité gustative (KADER *et al*, 1978; CROCHON *et al*, 1981).

I-1-1-3 Acide ascorbique et thiols

La teneur en acide ascorbique du fruit mûr est peu élevée (≈100mg.100ml^{-1} de jus) et assez variable. Elle ne présente pas de variation nette au début du développement où elle est double de celle des fruits mûrs. Elle chute à partir de 125 jours et jusqu'en fin de maturation. Au niveau de l'épiderme, la concentration est beaucoup plus forte (fig.42B, expression des teneurs par rapport à la phase aqueuse de la pulpe ou de l'épiderme) mais suit exactement la même évolution que celle de la pulpe.

La teneur en thiols réduits est maximale vers 125-130 jours (≈0,25mM), ensuite la diminution est progressive jusqu'à maturation complète. La figure 42C compare les évolutions de ces 2 réducteurs, mais sur des séries de fruits différentes de celles utilisées précédemment. Les teneurs de l'acide ascorbique et des thiols évoluent de façon identique. La chute des teneurs en thiols et en acide ascorbique débute en même temps, vers 125-130 jours après TIF. L'essentiel du glutathion reste sous forme réduite durant toute la maturation du fruit (tableau 13). Au contraire, la forme réduite de l'acide ascorbique ne représente que 35 à 40% du total présent dans la cellule.

Tableau 13: Estimation du rapport forme réduite/total, de l'acide ascorbique et des thiols (de la phase aqueuse).

Rapports exprimés en %	AA/ (AA+DHA)	GSH/(GSH+GSSG)
Fruits verts (135jours)	42% ±5	105% ±4
Fruits de 154 jours	41% ±3	82% ±6
Fruits mûrs (160 jours)*	35% ±6	90% ±14
Fruits mûrs (165 jours)*	41% ±4	85% ±5

* Fruits issus de parcelles différentes
AA= acide ascorbique, DHA= déhydroascorbique (/DPNH)
GSH= Thiols réduits (/DTNB), GSSG= Glutathion oxydé

Discussion:

Classiquement, la mesure du taux d'acide ascorbique dans le jus d'ananas rend compte de son pouvoir antioxydant (réducteur) et particulièrement de sa résistance au BI (TEISSON, 1977). Etant donné leurs fonctions peu différentes de ce point de vue, la mesure de la teneur en thiols réduits, dont le glutathion, pourrait être aussi d'une grande utilité. Entre autre fonction, le glutathion est utilisé par la cellule pour régénérer l'acide ascorbique au fur et à mesure de son oxydation, par exemple par les phénols (fig.43, d'après CHRESTIN, 1984). Il a également une fonction directe dans l'élimination de formes toxiques de l'oxygène et du H_2O_2 produits lors des processus oxydatifs normaux de la cellule (LESHEM *et al*, 1986; RENNENBERG, 1982 et 1987). Le fonctionnement de beaucoup d'enzymes dépend, en grande partie, de l'état d'oxydation des groupes -SH de leur chaîne peptidique, qui peut être contrôlé par les thiols réduits (COTGREAVE *et al*, 1989). Le glutathion sert aussi de transporteur des groupement SH depuis les zones d'absorption (racines mais aussi feuilles dans le cas de l'ananas, puisque l'essentiel de la fumure est apporté par pulvérisation foliaire), pour la synthèse des protéines (RENNENBERG, 1982).

La chute des teneurs en thiols et acide ascorbique au cours de la maturation peut être le résultat d'une utilisation accrue contre les processus d'oxydation ou pour la fourniture de soufre réduit dans la synthèse protéique (glutathion), mais aussi d'une diminution de leur synthèse. Par ailleurs, le volume des cellules augmente considérablement durant cette période, il peut en résulter un effet de dilution, puisque nos résultats sont exprimés en % de la phase aqueuse.

Malgré l'augmentation probable des processus oxydatifs avec la maturation, le glutathion reste essentiellement sous forme réduite. La réduction de la molécule par la glutathion réductase est, en effet, rapide et pratiquement irréversible (MEISTER et ANDERSON, 1983).

Fig.43: CHAINE D'OXYDOREDUCTION POSSIBLE

(D'après CHRESTIN, 1984)

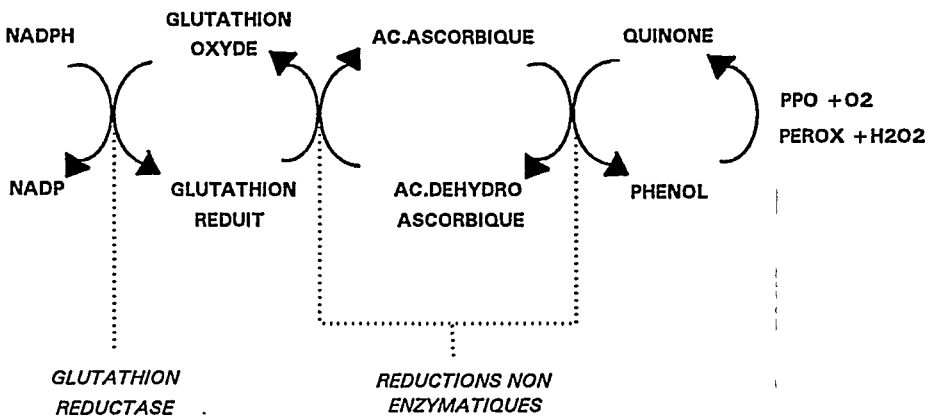
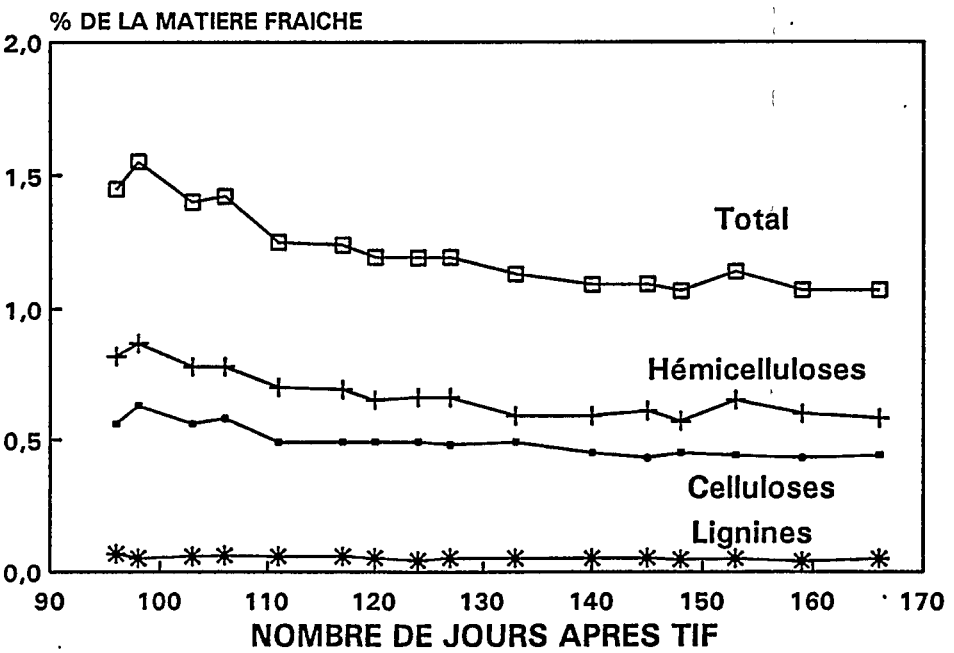


Fig.44: COMPOSITION EN FIBRES



Les dosages sont effectués par pesée des résidus après extraction par des solvants de force croissante (voir compositions page 37) selon la méthode dite de VAN SOEST)

I-1-1-4 Les fibres

"Les fibres" constituent la partie dégradable (70%) du résidu de pulpe insoluble dans l'alcool. Elles comprennent les parois cellulaires des cellules parenchymateuses et les très nombreux vaisseaux qui donnent cette texture très fibreuse à la chair du fruit. La méthode de dosage utilisée permet de distinguer différentes composantes de ces fibres: les celluloses, les hémicelluloses et les lignines et un résidu minéral (fig.44).

La teneur globale diminue jusque vers 130 jours, puis elle se stabilise à 1,1% (par rapport à la matière fraîche). Il en est de même pour les hémicelluloses et les celluloses qui se stabilisent à 0,70 et 0,45%, alors que les lignines sont en quantité très faible (≈0,05%).

Il intéressant de noter ici que la teneur globale cellulose + hémicellulose (en % par rapport à la matière fraîche) se stabilise à partir de 130 jours après TIF. Or le poids du fuit continue d'augmenter jusqu'en fin de maturation. Il y a donc incorporation de matériaux nouveaux dans les parois qui nécessite des équipements enzymatiques fonctionnels dont nous étudierons certains aspects par la suite.

I-1-1-5 Composés phénoliques de l'ananas

Basée sur les travaux de DIEUDONNE (1977), (voir présentation du fruit dans la deuxième partie, page 19), l'étude présentée ici est essentiellement qualitative. Cet auteur a souligné que l'évolution des composés phénoliques de la pulpe au cours de la maturation est qualitative et non quantitative. Ceci a pu être vérifié, et seule une identification sommaire des familles représentées dans l'ananas, a été réalisée.

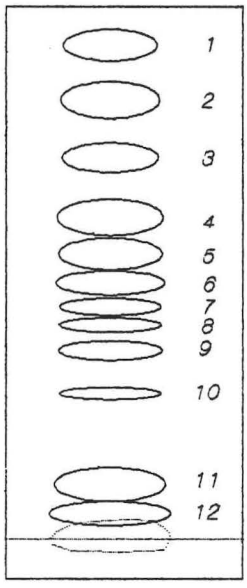
I-1-1-5-1 Identification des phénols de la pulpe

On appelle, ici, phénols de la pulpe, les composés phénoliques extractibles par le solvant (éthanol 80%) et non hydrolysés. La séparation des phénols présents dans les extraits est effectuée par CCM gel de silice (fig.45A) et par HPLC.

Sur la CCM, l'absence de spots colorés en jaune sous la lumière visible, indique qu'a priori les extraits ne contiennent pas de composés de type flavonol. Les spots sont repérés sous lumière UV avec ou sans vapeur d'ammoniac et un traitement à la vanilline-HCl, montre également l'absence probable de composés de type hydroxyflavane. L'analyse des chromatogrammes HPLC (voir en annexe 1, fig. A à E), confirme ces premières observations: l'absence de composés dont les spectres correspondent aux hydroxyflavanes (maximum d'absorption à 280nm) et aux flavonols (maximum d'absorption à 350nm).

Fig.45A SEPARATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA PULPE

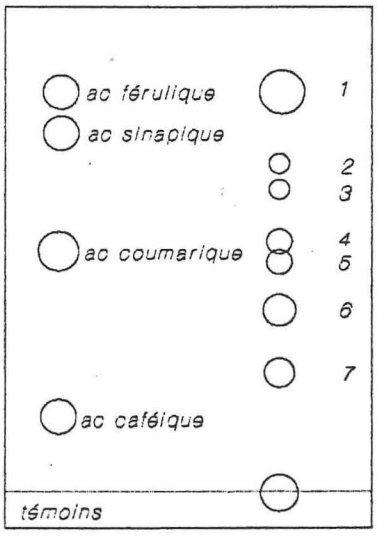
SILICE F60
SOLVANT: Acétate d'éthyle
Acide acétique
Eau (66-14-20)



	Rf	Révélation UV	Révélation UV + NH3
1	0.97	jaune vert	vert brillant
2	0.87	"	"
3	0.78	"	"
4	0.68	incolore	bleu
5	0.61	"	jaune vert
6	0.54	jaune pâle	jaune
7	0.49	incolore	bleu clair
8	0.46	"	"
9	0.41	"	"
10	0.32	bleu	bleu foncé
11	0.11	incolore n'apparaît qu'en absorption	
12	0.04	jaune	

SEPARATION DES PHENOLS ASSOCIES AUX PAROIS

SILICE F60
SOLVANT: Benzène
Acide acétique
Eau (24-28-9)



	Rf	REVELATION UV	REVELATION UV + NH3
1	0.74	bleu	bleu vert
2	0.64	bleu clair	incolore
3	0.6	bleu clair	bleu clair
4	0.54	incolore	bleu violet
5	0.50	"	bleu violet
6	0.41	incolore	bleu violet
7	0.29	bleu	bleu vert brillant

Après avoir été élués dans l'éthanol, le spectre UV des différents spots obtenus par CCM, a été réalisé (fig.45B). Les spectres des composés séparés par CCM montrent, par contre, la présence de dérivés hydroxycinnamiques dont les maxima d'absorption se situent vers 310-330nm (fig.45B, spectres n°10, 5 et 6 et éventuellement 7, mélangés à d'autres composés). Les composés correspondant aux spectres 3 et 4 sont en quantité trop faible pour pouvoir faire une détermination précise du maximum d'absorption. Les autres composés (spectres 1, 2, 8, 9 et 11) sont de nature indéterminée, leurs spectres présentent des maximum entre 265 et 280nm, mais aucun ne se rapproche d'un spectre caractéristique d'hydroxyflavanes comme celui de la catéchine (spectre C). Sur les chromatogrammes HPLC, divers pics correspondent à des composés de type hydroxycinnamique repérables par leur spectres (annexe 1, fig.E): pics n°4, 5, 8, 12 et 15 à 25. Parmi ceux-ci, le pic n°16, le principal quantitativement, correspond à un composé phénolique dont les caractéristiques du spectre sont similaires à celle d'un dérivé p-coumarique.

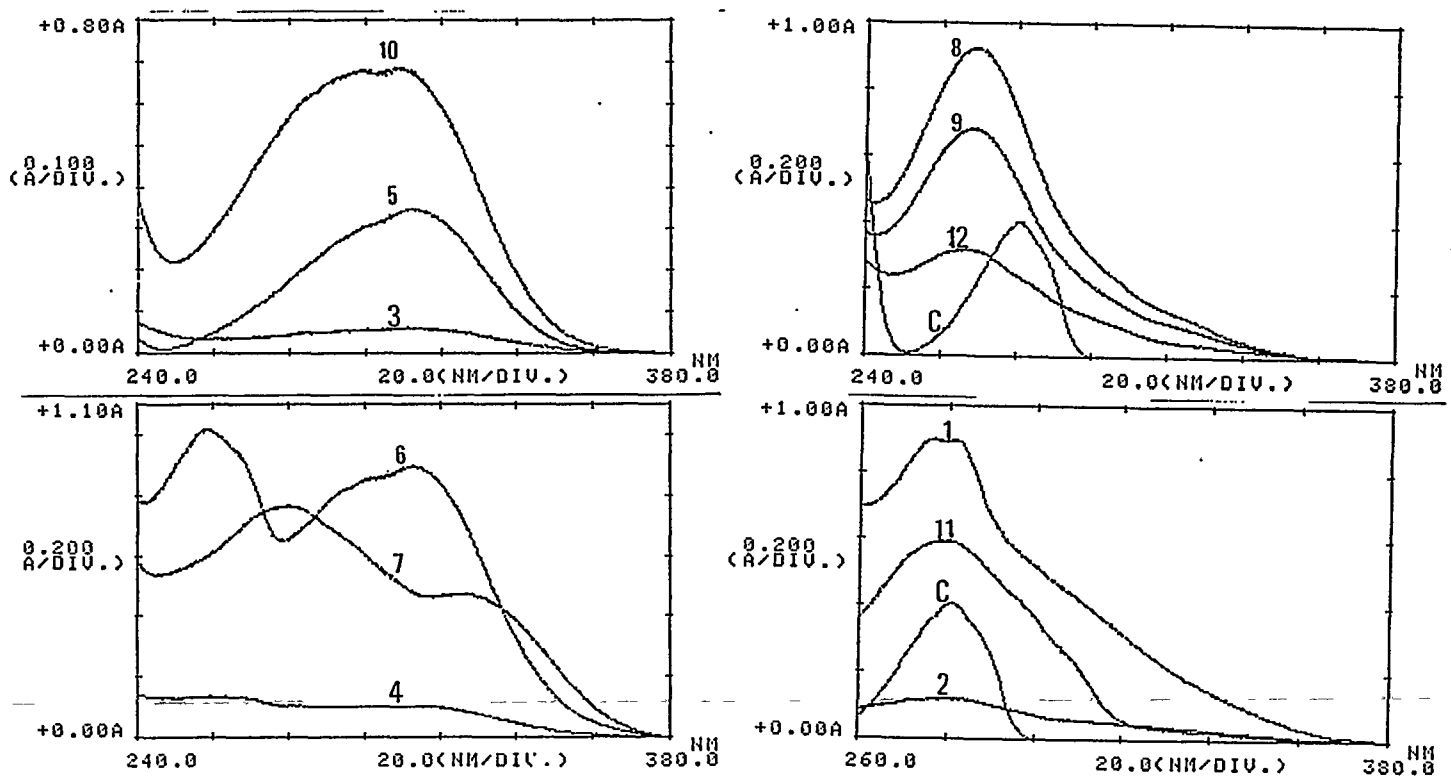
I-1-1-5-2 Identification des composés phénoliques associés aux parois

Les composés phénoliques associés aux parois sont ceux obtenus après hydrolyse alcaline du résidu d'extraction à l'alcool. La séparation est effectuée sur CCM (gel de silice) et également par HPLC.

Sur la CCM, la comparaison des Rf des spots et de ceux des témoins, ainsi que les caractéristiques de fluorescence sous UV (fig.45A), indiquent la présence d'acide férulique comme constituant essentiel (Rf=0,74) des phénols des parois. Le second phénol, important quantitativement, serait de l'acide p-coumarique (Rf=0,54). On notera que le spot correspondant (n°4 et 5) est séparé en 2, cette observation a été souvent faite aussi avec les acides p-coumariques du commerce utilisés comme référence. On note l'absence d'acide caféique cependant les spots 6 et 7, respectivement présentent des caractéristiques de fluorescence similaire à celle des acides p-coumarique et caféique, bien que leur Rf soit sensiblement différents de ceux des témoins. Sur les chromatogrammes obtenus en HPLC, on note que l'essentiel des composés séparés ont des maximum d'absorption qui se situent vers 320nm (fig.G à J, annexe 1) et des spectres correspondant à ceux de dérivés hydroxycinnamiques (fig.H, annexe 1). Seuls les pics mineurs n° 1 à 3 et 17 et 18, correspondent à des composés absorbant vers 280nm. Les 3 pics principaux 4, 5 et 21 correspondent à des composés phénoliques dont les caractéristiques UV sont similaires à celles des acides p-coumarique (n°4) et férulique (5 et 21). Le spectre du composé du pic n°14 est très semblable à celui de l'acide sinapique. Les autres pics correspondent à des composés dont les caractéristiques sont plus ou moins proches des acides phénols simples hydrocinnamiques, mais une détermination plus précise n'a pas été possible car

Fig.45B: Composés phénoliques de la pulpe d'ananas

Analyses spectrophotométriques des spots obtenus par CCM (Gel de silice F60, solvant AAE, monodimensionnel)



Après séparation par CCM (fig.45A), les spots sont découpés puis élués dans du méthanol (12h à 4°C). Les spectres sont réalisés entre 240 et 340nm pour déterminer le maximum d'absorption: 280nm pour les flavanes, 320nm pour les dérivés hydroxycinnamiques et 350nm pour les flavonols.

Le chiffre au dessus de chaque spectre correspond au numéro du spot sur la fig.45A.
Le spectre marqué d'un C est celui de la catéchine pure, à titre de témoin.

on n'a pu disposer des temps de rétention de témoins adéquats avec le gradient utilisé pour cette séparation en HPLC.

I-1-1-5-3 Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation

Evolution qualitative

L'évolution de la composition en phénols de la pulpe est essentiellement qualitative, aussi bien en ce qui concerne les composés extractibles par l'éthanol que ceux associés aux parois et libérés après hydrolyse alcaline.

La figure 45C présente la superposition des chromatogrammes à 280nm (HPLC) des composés solubles et de ceux associés aux parois à 2 stades de maturité très différents: fruit vert de 100jours et fruit très mûr "translucide" (= fruit atteint de surmaturité, voir chapitre II). Tous les pics repérés sur le chromatogramme du fruit "jaune", donc surmûr, sont repérables également sur les chromatogrammes des fruits plus verts (fig.A à E, en annexe 1).

La composition en phénols associés aux parois est identique dans les fruits mûrs (160jours) et surmûrs translucides ("jaunes"). Dans les chromatogrammes des fruits verts, se trouvent des pics supplémentaires avec de longs temps de rétention (>23min, fig.G, annexe 1) et dont le plus important quantitativement (pic n°21) présente des caractéristiques UV de l'acide férulique. Ces pics, et particulièrement le n°21, disparaissent des chromatogrammes des fruits plus mûrs.

Evolution quantitative dans la pulpe

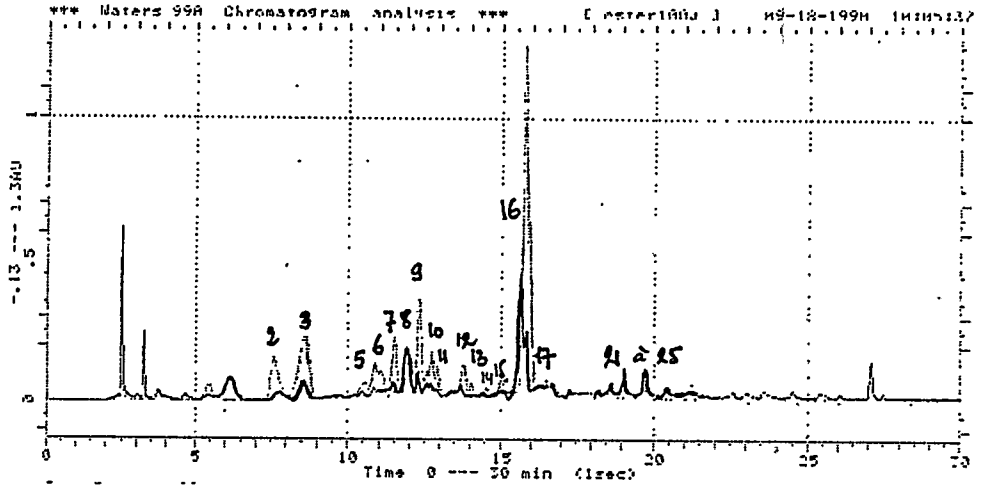
L'analyse chimique globale phénols totaux/orthodiphénols a été faite sur la pulpe aux différents stades de maturité (tableau 14).

Les teneurs en phénols de la pulpe des fruits mûrs sont comparables à celles trouvées par TEISSON (1977) et DIEUDONNE (1977). Elles augmentent très rapidement pendant la maturation, mais celles des O-diphénols est multipliée par 10 alors que la teneur globale ne l'est que par 3. Par ailleurs, DIEUDONNE a montré qu'un seul O-diphénol, un ester quinique de l'acide caféique, complexe (di cafféyl.1,4 quinique). Ces observations suggèrent une importante variation du rapport Mono-phénols/Ortho-diphénols entre 116 jours et 143 jours. Cependant eu égard à la réactivité différente des phénols au réactif de Folin, on ne peut conclure avec précision sur cette variation. La diminution de ce rapport au moment où la croissance du fruit s'accélère a été observée sur d'autres fruits (MACHEIX *et al*, 1990). Rappelons que son évolution pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la maturation des fruits, par la régulation de l'activité AIA oxydase (voir page 134).

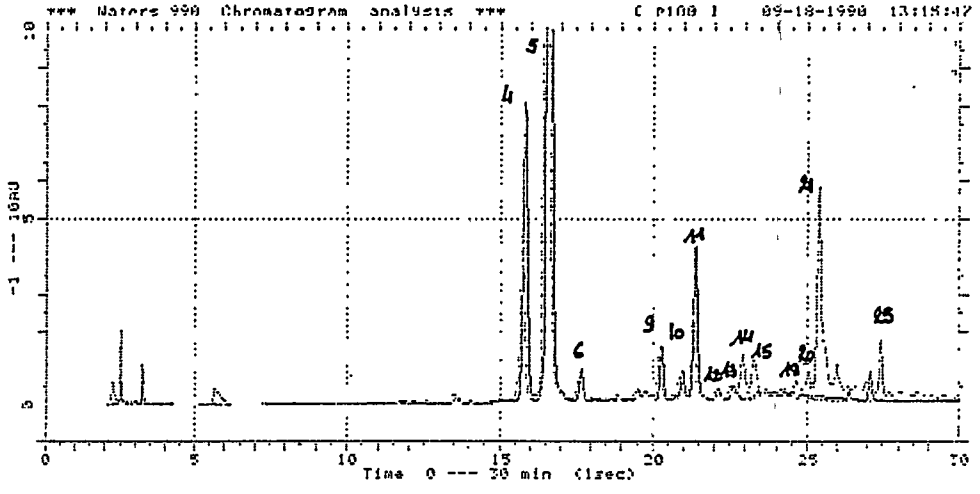
Fig.45C: COMPARAISON DE 2 STADES DE MATURITE

Superposition des chromatogrammes à 280nm

1) composés phénoliques solubles



2) composés phénoliques des parois



Comparaison de 2 stades de maturité:

1) composés solubles: On a superposé les chromatogrammes des composés phénoliques de la pulpe de fruits "jaune" (trait clair) et de fruits très verts de 100 jours (trait sombre), en ne modifiant que les échelles de DO. On note qu'il y a correspondance parfaite entre les 2 chromatogrammes, montrant bien l'absence de différence qualitative entre les 2 types de fruits.

2) composés associés aux parois: On a réalisé la même opération à partir des composés phénoliques associés aux parois.: trait clair= fruit de 100 jours; trait foncé= fruit "jaune". On note la correspondance parfaite entre les 2 chromatogrammes pour tous les pics correspondant à des temps de rétention inférieurs à 22,5minutes (pic n°13). Au delà, il apparaît des pics importants (dérivés hydroxycinnamiques, voir fig.H) dans les fruits verts;

Tableau 14: Evolutions des teneurs en composés phénoliques de la pulpe

Phénols en mg.100g^{-1} frais	116jours	143jours	157jours	164jours
O diphénols (en mg ac Chlorogénique)	0,2	1,1	1,9	2,3
Phénols totaux (en mg ac.p-coumarique)	26,4	43,4	67,0	84,3

Evolution quantitative dans les parois

Les parois contiennent des quantités importantes de composés phénoliques accessibles par simple hydrolyse alcaline.

Le tableau 15 regroupe les teneurs en composés phénoliques correspondant aux divers spots de CCM de la fig.45A (élution des spots dans l'alcool 80%), ainsi que les teneurs en phénols totaux directement mesurées sur les extraits alcooliques de pulpe. On confirme que l'essentiel des composés phénoliques associés aux parois est constitué par l'acide férulique. Les teneurs en acides férulique et p-coumarique varient faiblement au cours de l'évolution du fruit; elles augmentent lorsque les fruits évoluent du stade très vert au stade début de maturation. Ensuite, en fin de maturation, elles ont tendance à diminuer.

Tableau 15: Phénols totaux des parois (obtenus par hydrolyse alcaline, NaOH 2N, 2heures, récupération et élution des spots obtenus par CCM, fig.45A)

jours après TIF	116	143	157	164
(mg.g^{-1} sec de paroi)				
Phénols totaux mesurés directement sur l'extrait	24,8	33,5	30,0	24,8
Férulique (Rf=0,74)	22,2	31,2	29,5	23,0
p-Coumarique "1" (Rf=0,54)	4,0	5,0	4,4	4,6
p-Coumarique "2" (Rf=0,50)	0,6	0,7	0,7	0,6
Non identifié (Rf=0,41) (mais dérivé probable de l'acide p-coumarique)	0,6	0,7	0,5	0,5
Somme	27,4	37,6	35,1	28,7

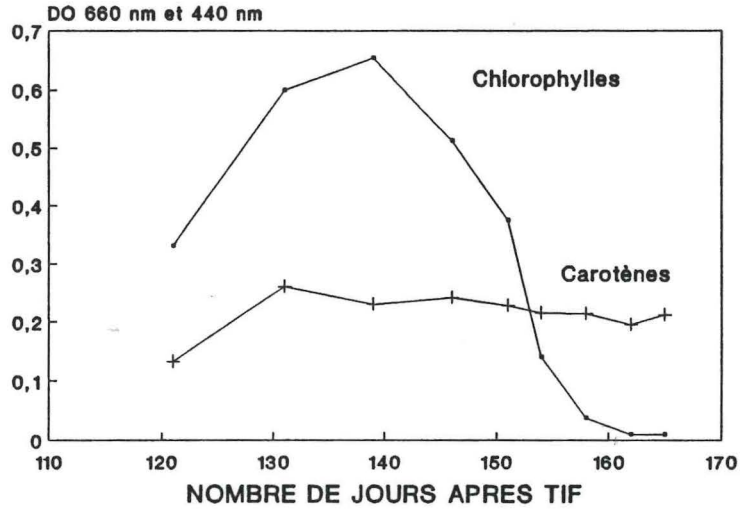
Les spots 2, 3 et 7 n'ont pas été comptabilisés en raison de la faible concentration en phénol.

Discussion sommaire:

DULL (1971) suggère qu'un système de polyphénols associés aux parois peut jouer un rôle dans la texture de l'ananas. L'un des phénols était présumé être l'acide férulique, ce qui a été confirmé par DIEUDONNE (1977) et qui est également confirmé ici. On sait que celui-ci permet de rigidifier les parois par l'intermédiaire de ponts diféruliques entre polysaccharides ou entre les protéines de structure des parois (CASSAB et VARNER, 1988; FRY, 1979). L'évolution de la teneur n'est pas très significative, cependant l'augmentation jusqu'en fin de croissance et au début de la maturation va dans le sens d'une rigidification des parois alors que les cellules arrêtent leur croissance. Ensuite, la diminution de la teneur dans les fruits très mûr est peut être liée à la dégradation des parois et au ramollissement du fruit.

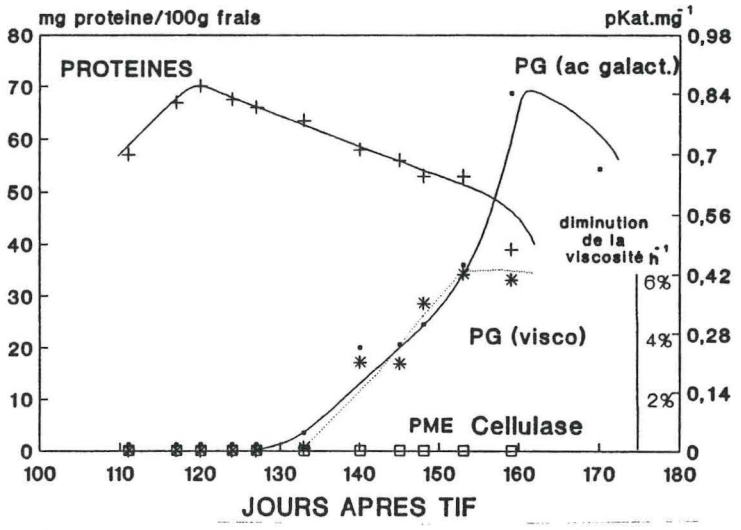
En résumé, la composition en phénols de l'ananas se caractérise par la présence de dérivés hydroxycinnamiques, présentant des absorptions maximales vers 310nm et l'absence de flavonols, dont le maximum d'absorption se situe vers 350nm ainsi que d'hydroxyflavanes (maximum d'absorption à 280nm). L'évolution depuis le stade très vert au stade très mûr, est uniquement quantitative, en ce sens qu'il n'apparaît pas de composés nouveaux. La proportion d'O-diphénol, qui est forte pour les fruits très verts, chute juste avant le début de la maturation. Ces substances sont pour la plupart glycosylées (DIEUDONNE, 1977). C'est une forme qui aurait un rôle détoxifiant mais aussi nécessaire pour les solubiliser et les transporter lorsque ces formes glycosylées sont précurseurs dans les synthèses (lignine par exemple), (MACHEIX *et al*, 1990). Les composés phénoliques sont aussi associés aux parois, qui contiennent une quantité importante d'acide férulique, maximale au début de la maturation. Elle diminue légèrement ensuite pendant la maturation lorsque les parois commencent à se dégrader, il faut noter, cependant, que ces variations sont faibles.

Fig.46: EVOLUTION PIGMENTS DE LA PEAU



Chlorophylles: estimées par mesure de la DO à 660nm de la phase éthérée obtenue après 13 extractions par un mélange méthanol/éther (V/V; 500ml totaux).
Carotènes: estimés par mesure de la DO à 440nm de l'extrait précédent après traitement par KOH 5% dans l'éthanol (20ml pour 50ml d'extrait éthéré).

Fig.47: POLYGALACTURONASE ET PROTEINE



Protéines: dosées par la méthode de Bradford (1978) sur extrait dialysé.
PG: 1) Hydrolyse de l'acide polygalacturonique 0,1% dans du tp citrate 0,05M, pH=4,6; puis dosage de l'acide galacturonique libéré par le réactif au DNS. 2) estimation par mesure de la diminution de la viscosité d'une solution d'ac polygalacturonique 5% (même tampon).
PME = pectine méthylestérase

I-1-1-6 Chlorophylles et carotènes de l'épiderme

La coloration naturelle de l'épiderme du fruit, qui évolue de bas en haut, est un des critères principaux pour déterminer la date de récolte dans une parcelle. Si la dégradation des chlorophylles est artificiellement accélérée par l'application d'éthéphon, c'est le début de coloration naturelle des fruits de la parcelle qui détermine la date du traitement. Ce stade, dit fruit "tournant", se situe dans la parcelle expérimentale 145jours après TIF.

L'évolution des pigments de l'épiderme est tout à fait classique (fig.46): les chlorophylles disparaissent, alors que la teneur en carotènes ne varie pas ou peu. La coloration résulte donc du démasquage des carotènes.

La coloration de l'épiderme débute bien après les premières modifications biochimiques de la pulpe, 145 jours après TIF contre 125-130 jours. On sait que cette coloration dépend fortement des conditions du milieu, la relation entre la coloration externe du fruit et la maturité de la pulpe, dans les conditions de culture ivoirienne, sera discutée dans le Chapitre sur la coloration artificielle (page 186).

I-1-2 Protéines et activités enzymatiques

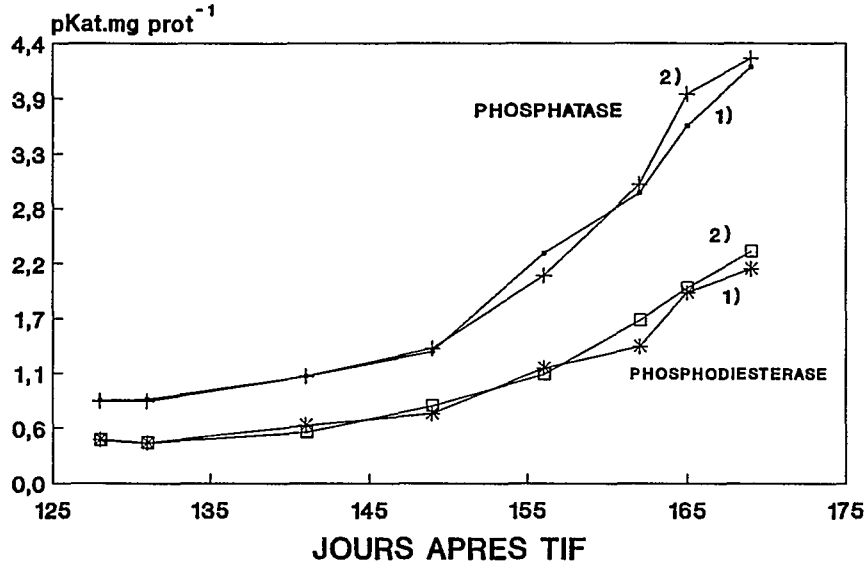
La teneur en protéines diminue régulièrement jusqu'à maturation (fig.47) alors que les diverses activités spécifiques des enzymes mesurées augmentent.

I-1-2-1 Polygalacturonases et hydrolases acides

Les polygalacturonases responsables de la disparition des pectines (HOBSON, 1964; BARTLEY, 1978) peuvent déjà être détectées à partir de 135jours (et même 115 jours pour certaines séries de fruits, voir tableau TEST NEWMAN et KEULS, pages 179 et 181) et leur activité augmente jusqu'à maturation (fig.47). Puis, elle se stabilise ou même diminue ensuite en fin de maturation (au delà de 160 jours) après être passée par un maximum (voir également Chapitre II, page 176). Les activités pectine-méthylestérase et cellulase qui participent souvent au ramollissement des fruits (HOBSON, 1963, 1968 et 1981; KNEE, 1978), n'ont pas été détectées ici, confirmant ainsi les observations de DULL (1971).

Par contre, nous avons mesuré les activités des **phosphatases acides, des diestérases** et de plusieurs glycosidases non encore étudiées sur l'ananas. Ces dernières peuvent être impliquées dans le ramollissement de la pulpe des fruits (HOBSON, 1981), mais aussi dans la synthèse et la dégradation des parois aux divers stades de développement des fruits ou dans les parois d'autres organes (YAMAKI et MATSUDA, 1977; CASSAB et VARNER, 1988; BARTLEY,

Fig.48a: PHOSPHATASE-PHOSPHODIESTERASE



fruits issus de 2 séries de plants:
1) plants recevant la fumure azotée normale (4g d'N par pied)
2) plants recevant double fumure azotée

Phosphatase: tp succinate 0,2M pH=5,5
α-mannosidase: tp citrate 0,2M pH=5,5
α-galactosidase: idem
N-acétyle glucosaminidase: idem
β-galactosidase: tp citrate 0,2M pH=3,9

Fig.48b: aMANNOSIDASE - N ACETYL GLUCOSAMINIDASE

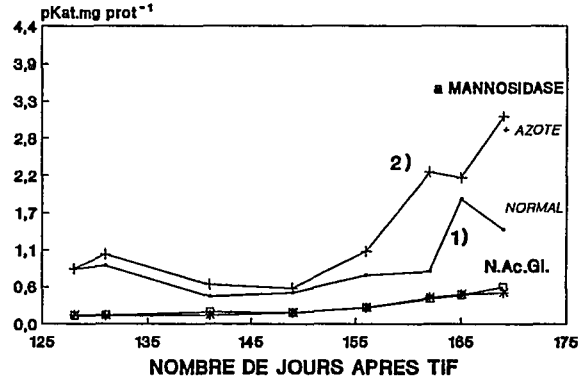
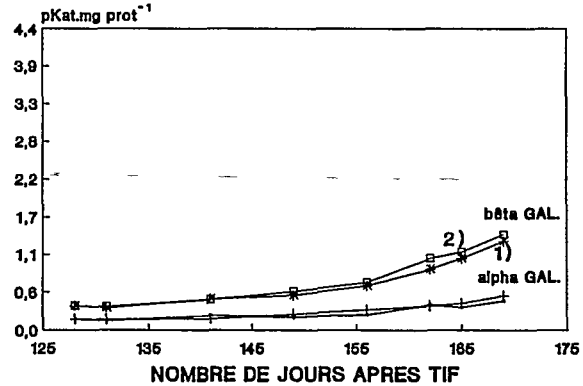


Fig.48c: alpha et bêta GALACTOSIDASE
(avec ou sans supplément d'Azote)



1977; WALLNER et WALKER, 1975; CHANDA *et al*, 1986): **α et ß-galactosidase, α-mannosidase, N-acétylglucosaminidase**.

La plupart de ces activités enzymatiques augmentent progressivement jusqu'à un stade avancé de maturation mais sont déjà présentes dans les fruits très verts (fig.48ABC).

Les phosphatases ont les activités de loin les plus fortes (de 4,2 à 5,5 pKat.mg^{-1} protéines) aux stades mûrs (fig.48A). Elles sont mesurées rappelons-le avec des dérivés p-nitrophényls. L'α mannosidase et la ß galactosidase sont également très actives (de 1,7 à 2,2 pKat.mg^{-1} protéine pour la première et de 0,8 à 1 pKat.mg^{-1} protéine pour la seconde). Les activités α galactosidase et N-acétylglucosaminidase sont faibles et augmentent peu.

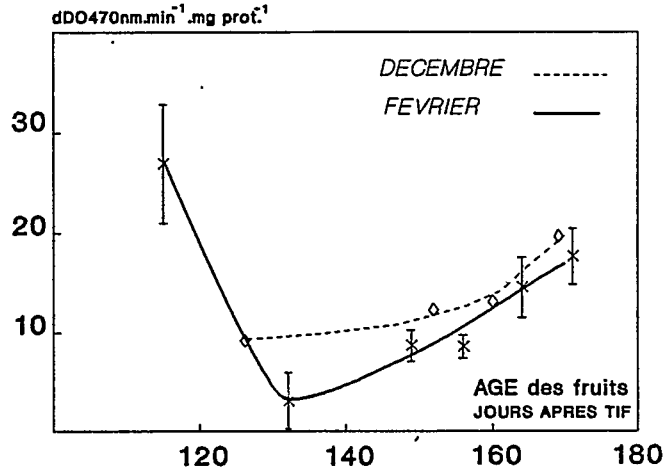
L'α mannosidase se distingue pourtant des autres enzymes avec une activité plus forte au début du développement de l'inflorescence. Elle diminue jusque vers 150-155jours alors que la phase finale de la maturation est déjà largement amorcée, pour augmenter rapidement ensuite.

Par ailleurs, des plants qui ont reçu un supplément de fertilisation en azote (facteur de grossissement du fruit, mais aussi facteur de fragilisation, voir page 211), ont une activité α mannosidase plus forte et qui augmente plus vite, alors que celles des autres hydrolases ne sont pas modifiées.

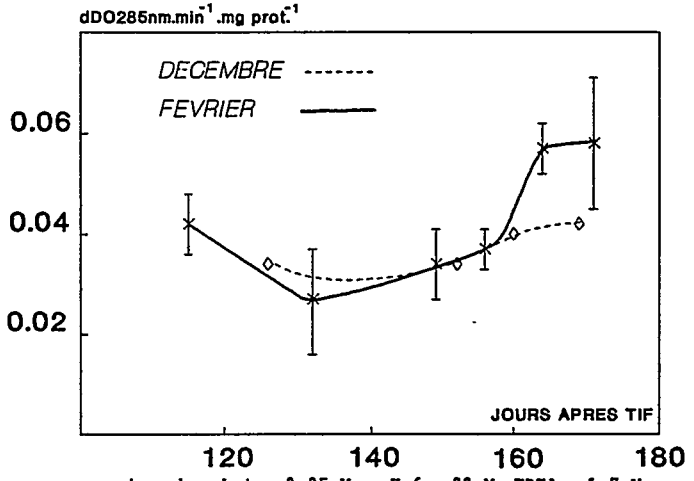
Discussion:

L'équipement enzymatique susceptible d'expliquer le ramollissement du fruit pendant la maturation, à savoir les activités polygalacturonases et glycosidases, est diversifié. Les PG interviendraient pendant une période assez courte par rapport aux glycosidases (135-160 jours après TIF). La diminution de l'activité des PG, vers 160 jours, peut s'expliquer par le fait que leur substrat, les pectines, a déjà pratiquement disparu. En effet, la lamelle moyenne des parois, l'essentiel des pectines, n'est plus visible à 160 jours sur les photos des structures pariétales prises au microscope électronique (voir planche 2, pages 149 et 150). Seules les activités des glycosidases peuvent poursuivre le ramollissement du fruit. Cependant, leur rôle dans la dégradation des polysaccharides pariétaux au cours de la maturation ou de la sénescence des organes végétaux, n'est pas clairement démontré. YAMAKI et MASUDA (1977), montrent que l'activité ß-galactosidase, chez la poire japonaise *Pyrus serotina* Rehder, augmente fortement jusqu'en fin de maturation et suggèrent qu'elle peut entraîner le blettissement du fruit. AHMED et LABAVITCH (1980) soulignent qu'il est difficile d'établir un lien entre l'augmentation des activités α-galactosidases et α-mannosidases observées chez la poire "Bartlett" et la modification des parois au cours de la maturation. De fait, l'analyse des parois cellulaires de la poire, ne montre pas la présence de mannanes ou de galactannes dont les résidus soient

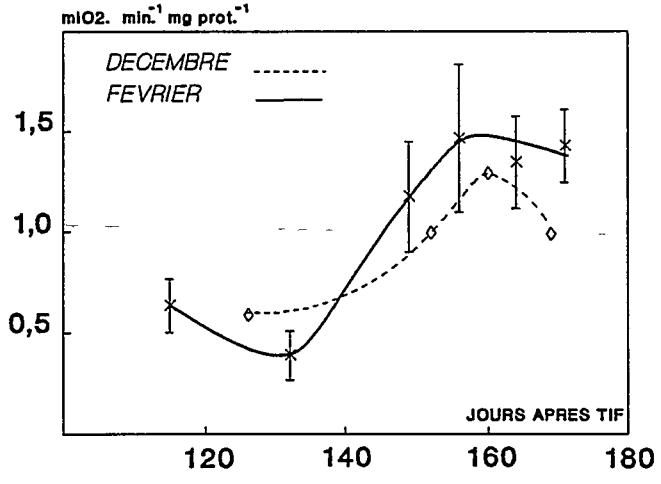
Fig.49: ACTIVITES (PER) OXYDATIVES



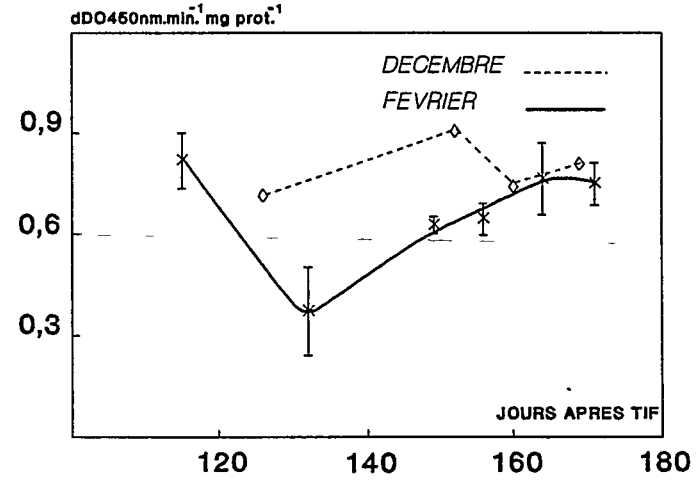
tp citrate 0,2M; pH=5; 29mM Gaïacol; 23mM H_2O_2



tp phosphate 0,05mM; pH=6; 22mM EDTA; 1,7mM H_2O_2; 0,37mM ac Ascorbique



tp phosphate 0,1mM; pH=7; 160mM H_2O_2



tp citrate 0,2M; pH=7; 0,4% DL DOPA

liés par des liaisons α, susceptibles d'être attaquées par ces enzymes. Chez la pomme, au cours de la maturation, BARTLEY (1977) observe une augmentation de l'activité ß-galactosidase et de manière concomitante une augmentation de la libération de galactose. Cependant, en faisant varier les conditions de stockage, il constate que cette libération de galactose peut précéder l'augmentation de l'activité enzymatique, et qu'en conséquence il ne s'agit pas d'une relation de cause à effet. Par ailleurs, WALLNER (1978) trouve que des préparations enzymatiques contenant des ß-galactosidases, sont incapables de dégrader des parois cellulaires de pomme. Par ailleurs, il serait intéressant de connaître la compartimentation réelle de ces activités. Leur localisation au niveau cellulaire peut être très différente suivant le matériel végétal, cytoplasmique, vacuolaire ou pariétale (BUTCHER *et al*, 1977; CASSAB et VARNER, 1988; BOLLER et KENDE, 1979; BOLLER, 1982). Leurs fonctions peuvent être différentes suivant leur localisation et celle-ci peut varier suivant le stade de développement.

L'α mannosidase est classiquement considérée comme un élément de défense contre les pathogènes, comme les autres hydrolases (BOLLER, 1987) en étant capable d'attaquer des structures spécifiques de leur paroi. Chez l'ananas le champignon *Penicillium funiculosum* ne commence à se développer à l'intérieur du fruit qu'à un stade déjà avancé de maturation, alors qu'il y est à l'état latent depuis la floraison (MOURICHON, 1982). Les risques d'attaque par le pathogène et l'augmentation d'activité de l'α mannosidase, coïncident dans le temps. On peut noter, par ailleurs, qu'on ne trouve pas de mannose libre dans le fruit mûr, alors qu'il y en a dans les hémicelluloses de l'ananas (CHAN et MOY, 1977). CASSAB et VARNER (1988) suggèrent que le rôle de l'α-mannosidase est plus lié au turn over des glycoprotéines (que sont d'ailleurs les hydrolases acides, GAUDREAULT et BEEVERS, 1983 et GAUDREAULT *et al* 1985). Cette observation est peut être à relier à l'augmentation de l'activité que nous avons constatée dans les plants plus riches en azote. Il existe, aussi, des glycoprotéines membranaires contenant du mannose et de l'N-acétylglucosamine, capables de fixer l'AIA avec une forte affinité et qui pourraient donc être des récepteurs membranaires de l'AIA (HESSE *et al*, 1989, cités par ROSSIGNOL, 1991). Les α-mannosidases qui sont des glycoprotéines, contiennent également, dans leur partie glycosidique, du mannose et de l'N-acétylglucosamine (cellules d'aleurone du blé, CONTI, 1987). Un rôle des α-mannosidases et N-acétylglucosaminidases (enzymes répandues chez les végétaux) dans le turn over de ces protéines, ne peut être exclu. L'N-acétylglucosaminidase, enzyme en principe exclusivement vacuolaire chez les végétaux, est un moyen de lutte contre les invasions fongiques ou bactériennes (BOLLER, 1982; CASSAB et VARNER, 1988), alors que chez les insectes, elle intervient dans la dégradation de la chitine (glucosamine polymérisée), substance absente chez les végétaux.

Une action très importante des glycosidases peut être de libérer

les composés volatils responsables de l'arôme de l'ananas. En effet, il est reconnu que certains des composés aromatiques sont stockés sous forme glycosylée chez les fruits (ENGEL et TRESSL, 1983; GUNATA *et al*, 1985) et en particulier chez l'ananas, le 2,5 diméthyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (WU, 1990). Les extraits méthanoliques de jus obtenus après passage sur colonne échangeuse d'ions Amberlite XAD-2 et élimination du méthanol, ne présentent l'odeur fruitée caractéristique de l'ananas qu'après hydrolyse, soit par des phosphatases acides soit par des ß-glucosidases (WU *et al*, 1991).

L'augmentation de l'activité phosphatase est un fait largement constaté par ailleurs chez la pomme, la poire ou la banane (SACHER, 1973). MATTOO cité par SACHER (1973) suggère qu'elle pourrait intervenir dans la synthèse des carotènes de la mangue en déphosphorylant les intermédiaires. Dans la pulpe de l'ananas la synthèse de carotène est forte et de plus elle commence relativement tôt au cours de la maturation (GORTNER *et al*, 1967). Cependant les intermédiaires de la synthèse des carotènes sont des isoprénoïdes diphosphorylés (isopenténylpyrophosphate à 10 atomes de carbone, farnésylpyrophosphate à 15 atomes de carbone et géranylgéranylpyrophosphate à 20 atomes de carbone). Les carotènes sont, eux-mêmes, des tétraterpènes (40 atomes de carbone). Les enzymes intervenant dans les processus de synthèse seraient donc des pyrophosphatases et non des phosphatases. Enfin, le rôle de ces dernières dans les interactions plante-pathogène a aussi été évoqué (BOLLER, 1987).

I-1-2-2 Activités peroxydasiques et oxydasiques

Les enzymes liés aux processus oxydatifs dans la cellule (en particulier le brunissement interne, TEISSON, 1979; VAN LELYVELD et DE BRUYN, 1977), ont été étudiées à partir d'extraits protéiques de fruits provenant d'autres parcelles mais récoltés soit à la même période, en décembre, soit en février. Les fruits récoltés au cours de ce dernier mois ont subi une sécheresse un peu plus longue que ceux récoltés en décembre.

Les peroxydases (avec pour substrat le gaïacol ou l'acide ascorbique) ont une activité qui augmente durant la phase de maturation, soit à partir de 125-130jours (fig.49). Cependant, dans les inflorescences très jeunes (115 jours après TIF, récolte de février) on a trouvé des activités spécifiques peroxydasiques une fois et demi plus élevées que dans les fruits mûrs (respectivement 26,9 contre 14,5 dDO470nm.mn^{-1}.mg^{-1} prot.). Les activités sont donc minimales vers 130 jours après TIF (3,1 dDO470nm.mn^{-1}.mg^{-1}).

Les catalases ont une activité qui ne diminue que faiblement entre 115 et 130 jours, puis elle est multipliée par 3 à maturation complète (fig.49). Tout à fait en fin de maturation, l'activité des catalases diminue

de nouveau, alors que celles des peroxydases (substrat gaïacol) continue d'augmenter.

Les polyphénoloxydases (avec pour substrat la DL DOPA, fig.49), qui chez l'ananas seraient en fait des peroxydases avec une activité polyphénoloxydase (TEISSON, 1977), et **les AIA oxydases** (fig.50A), qui sont également des peroxydases à activité AIA oxydasique (GOVE et HOYLE, 1975; GELINAS, 1973), présentent des évolutions similaires aux peroxydases, bien que la diminution soit plus marquée en fin de maturation, comme pour les catalases.

Discussion:

L'augmentation des activités peroxydasiques au cours de la maturation est un processus courant dans les fruits (banane, poire, tomate, mangue, SACHER, 1973). Leur rôle exact dans le développement du fruit est encore mal défini. La diversité des substrats qu'elles peuvent oxyder (phénols, amines aromatiques, primaires, secondaires ou tertiaires, hétérocycles comme l'AIA ou l'acide ascorbique, certains ions inorganiques..., DILLEY, 1971 et GASPAR, 1986) et le nombre d'isozymes qui constituent l'activité peroxydasique, rendent possible leur intervention dans divers processus métaboliques en fonction de leur localisation dans les tissus et du stade de développement du fruit. A partir des mesures faites sur les extraits protéiques "totaux" de pulpe d'ananas, il est difficile d'expliquer la signification de l'évolution de ces activités.

On peut noter, cependant, la coïncidence entre l'augmentation des teneurs en composés phénoliques jusqu'à la fin de la maturation et celle des activités peroxydases. Celles-ci, avec les polyphénoloxydases, conduisent à la formation de quinones et donc des mélanines et des tannins toxiques (brunissement physiologique ou dû à des pathogènes). Ce qui leur confère un rôle potentiel de défense vis-à-vis des pathogènes, mais aussi un rôle détoxifiant dans la cellule, contre l'H_2O_2, complémentaire à celui des catalases. Ce rôle détoxifiant est d'autant plus efficace que le milieu cellulaire contient suffisamment d'antioxydants pour retarder l'apparition des quinones toxiques en trop grande quantité. Enfin, classiquement, les processus oxydatifs qui s'accélèrent dans le fruit mûrissant, peuvent générer des ions superoxydes transformés par les SOD en H_2O_2.

MEHLHORN et KUNERT (1986) montrent que la peroxydation des lipides, induite par le paraquat dans les cellules de feuilles de tabac, est bloquée par un prétraitement à l'acide caféique (précipitations des phénols); en outre, les plants prétraités ont des activités peroxydasiques, dépendantes de l'acide ascorbique, 2,5 fois plus fortes que celles des témoins. L'acide ascorbique, in vivo, est à la fois un antioxydant, un co-substrat des peroxydases (par exemple dans le système "peroxydase de Raifort et acide

Fig.50A: AIA OXYDASE

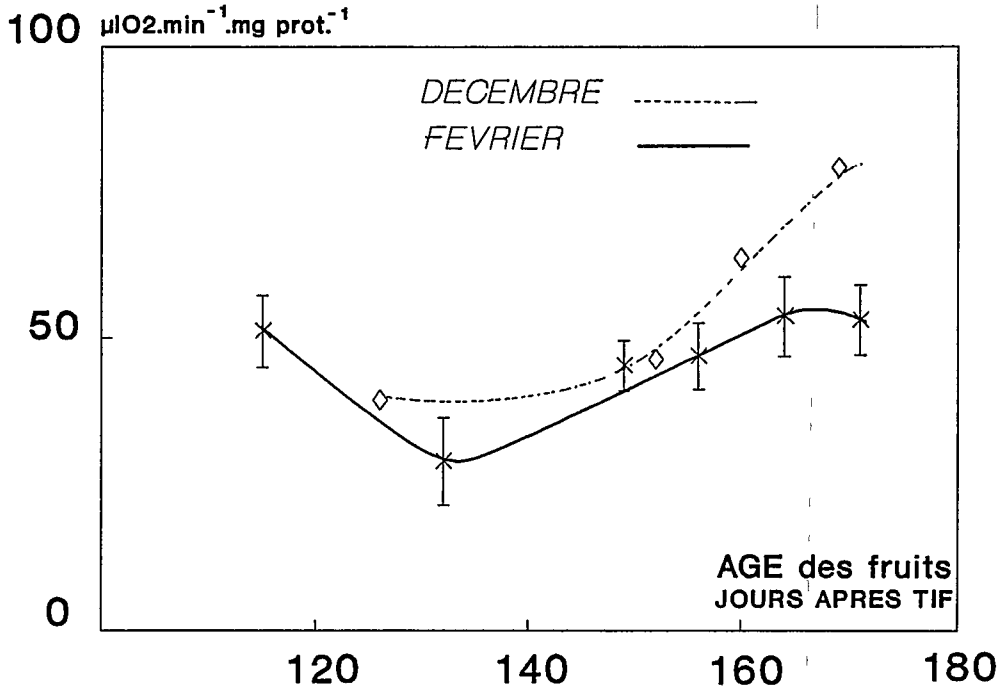
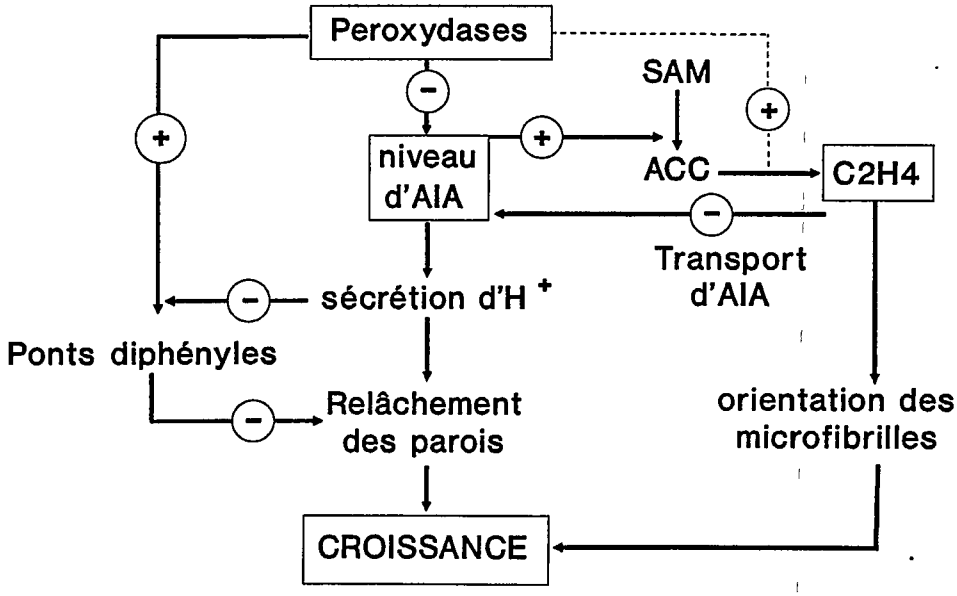


Fig.50B: REGULATION POSSIBLE DE LA CROISSANCE PAR LES PEROXYDASES (D'après GOLBERG, 1986)



caféique") et un substrat spécifique pour l'ascorbate peroxydase; l'auteur suggère que le système acide ascorbique, composés phénoliques et peroxydases, constitue un élément de défense contre les stress peroxydatifs artificiels ou naturels.

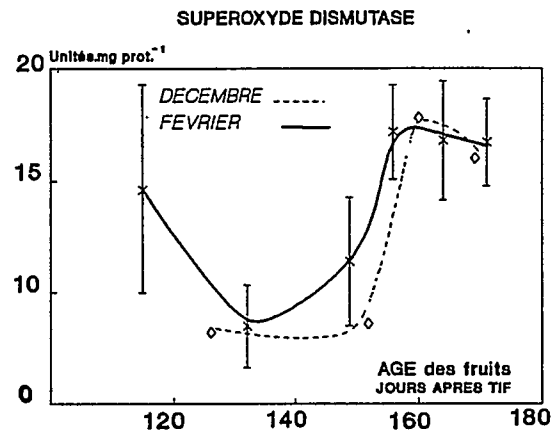
L'évolution des autres peroxydases (substrats autres que le gaïacol), n'est pas très différente de celle des peroxydases-(gaïacol). En fait, au cours de la maturation, on constate la dérépression de la production de nombreuses activités enzymatiques dont les différentes iso-peroxydases.

Au moment où la croissance des cellules est rapide (avant et au début de la maturation, ≈130jours après TIF) et donc nécessite une extensibilité maximale des parois, l'activité AIA oxydase est minimale (fig.50A). Ceci doit permettre une disponibilité plus importante en AIA, qui joue un rôle important dans le relâchement des parois nécessaire au grandissement cellulaire. GOLDBERG *et al* (1986) résument dans la fig.50B, l'intervention possible des peroxydases dans les processus de croissance. Les enzymes réguleraient le processus à trois niveaux, correspondant à une compartimentation de différentes isoperoxydases: 1) établissement des ponts diphényls entre polysaccharides (FRY, 1986), ou protéines de structure (LAMPORT, 1986), rigidifiant les parois, 2) régulation du niveau d'AIA et de l'acidification des parois, entraînant la rupture des liaisons faibles acido-labiles et le relâchement des parois, 3) rôle direct possible dans la transformation de l'ACC en éthylène (VIOQUE *et al*, 1981), lequel réduit le transport de l'AIA (BEYER et MORGAN, 1970) et augmente sa dégradation (SAGEE *et al*, 1990).

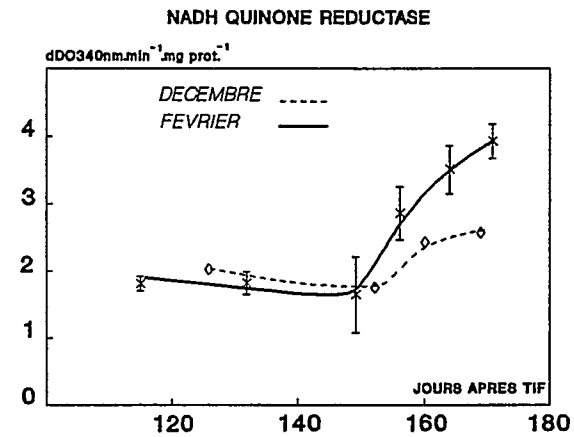
Par ailleurs, la synthèse apparemment active des composants des parois, pendant tout le développement du fruit (voir page 92), nécessite la présence des peroxydases. Elles interviennent directement dans la polymérisation des lignines et, comme déjà souligné précédemment, dans l'établissement des ponts diphényls entre polysaccharides ou protéines de structures, qui rigidifient les parois. La quantité d'acide férulique associé aux parois, est maximale en début de maturation (voir tableau 15). Et il a été montré que divers polysaccharides possédant des chaînes latérales d'acide férulique, se gélifient sous l'action des peroxydases, en présence de H_2O_2 (FRY, 1986). Cet auteur suggère donc qu'il existe une relation de cause à effet entre l'action des peroxydases et la rigidification des parois et par conséquent la croissance des cellules. De fait, le Ca^{++}, inhibiteur de la croissance des cellules, active la sécrétion de peroxydases dans les parois (GASPAR, 1983; STICHER, 1981) et inversement pour l'acide gibbérellique (FRY, 1980).

L'implication possible de l'AIA oxydase dans la sensibilisation des tissus à l'éthylène au cours de la maturation des fruits, mérite aussi une attention particulière (HARTMANN *et al*, 1987). L'augmentation de l'activité

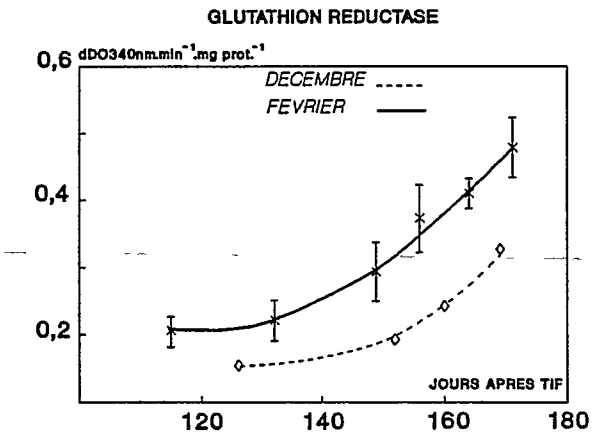
Fig.51: ACTIVITES ENZYMATIQUES DIVERSES



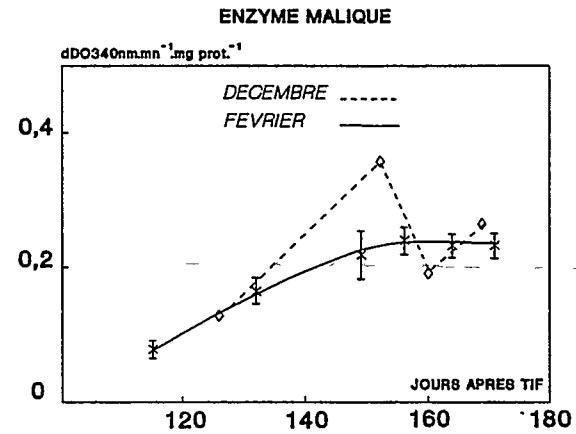
tp phosphate 0,1mM; pH=8,4; génération des ions superoxydes et détection par le système Xanthine/xanthine oxydase en présence de NBT



tp TRIS 50mM; pH=8; 0,4mM NADH; 150µM Ménadione



tp citrate 50mM; pH=7,5; 1mM EDTA; 2mM NADH; 0,25mM Glutathion oxydé



tp TRIS 0,1M; pH=7,5; 5mM MgSO4; 30mM Malate

pendant la maturation, va bien dans le sens d'une diminution de la teneur en AIA, nécessaire au processus. Cependant la régulation de l'activité par les composés phénoliques doit également être prise en compte.

Enfin, il est largement reconnu que les catalases ont une double fonction. La première, purement catalasique transformant l'H_2O_2 en H_2O et O_2, l'autre peroxydative entraînant l'oxydation d'un donneur d'hydrogène (alcools, phénols...), (DILLEY, 1971). Les similitudes de structures moléculaires et d'actions catalytiques ont d'ailleurs conduit à l'hypothèse d'une interconversion possible des molécules tétramériques des catalases en molécules monomériques des peroxydases (BRABER, 1980). CHRESTIN (1984) retient que quelque soit son activité, la catalase se comporte comme une enzyme protectrice puisqu'elle entraîne la consommation rapide de H_2O_2, ce qui dans un organe vieillissant comme le fruit mûrissant, doit être important. De ce point de vue, les catalases sont particulièrement intéressantes pour la cellule, car elle n'entraînent pas la formation de sous-produits toxiques de réaction, comme c'est le cas des peroxydases avec les quinones. Leur activité chute plus nettement que les autres peroxydases au début de la sénescence, ce qui est couramment observé dans les feuilles, où elles sont considérées comme meilleurs marqueurs du vieillissement (LAURIERE, 1983).

I-1-2-3 Autres activités enzymatiques

L'enzyme malique augmente progressivement depuis les stades très verts jusqu'au stade mûr, puis l'activité se stabilise pendant la fin de la maturation (fig.51). La signification de l'évolution de cette enzyme dont l'activité augmente au cours de la maturation ou de la sénescence de beaucoup de fruits (pomme, DILLEY, 1971; poire, HARTMANN, 1983; mangue, BAQUI *et al*, 1974) est mal connue. L'enzyme malique à NADP est une des composantes du système de décarboxylation du malate; elle produit du pouvoir réducteur sous forme de NADPH. Cet aspect de l'activité pourrait être important dans les fruits mûrissants; HARTMANN (1983) suggère que dans les fruits mûrissants, se produit une augmentation de l'importance de la glycolyse aux dépens de la voie des pentoses, et dans ce cas le malate et l'enzyme malique peuvent jouer un rôle de fourniture complémentaire de pouvoir réducteur. L'enzyme est fortement liée à la voie de respiration insensible au cyanure, non phosphorylante (LANCE, 1981), ce qui peut constituer un avantage pour des plantes ayant à métaboliser de grandes quantités de malate (comme l'ananas en raison du fonctionnement CAM) car le processus est indépendant de la charge énergétique.

La NADH quinone réductase (fig.51) réduit les quinones issues de l'oxydation des phénols (CHRESTIN, 1984; D'AUZAC *et al*, 1984), mais elle peut également produire des ions superoxydes toxiques lorsque la réduction est incomplète. Son activité n'augmente qu'après 150 jours lorsque le fruit est déjà proche du stade mûr et que la teneur en phénol est déjà élevée.

L'activité SOD qui piège les ions toxiques superoxydes issus notamment des réactions enzymatiques oxydatives, présente un minimum vers 130 jours (8 $U.mg^{-1}$ prot). Elle double ensuite à maturation complète mais le début de l'augmentation de l'activité pourrait être assez tardive (voir fig.51, décembre), et coïncider avec celle de la NADH quinone réductase. Globalement, cette activité évolue parallèlement à celles des différentes oxydases décrites précédemment.

La glutathion réductase augmente à partir de 130 jours et de façon continue jusqu'au stade très mûr. Cela peut correspondre à une nécessité accrue de régénération du glutathion et indirectement de l'acide ascorbique dont la teneur chute au même moment (la régénération se faisant par simple réaction chimique entre le glutathion et l'acide déhydroascorbique).

Discussion sommaire:

Ces quatre activités associées aux peroxydases, constituent un ensemble cohérent permettant à la cellule de lutter contre les dégradations provoquées par les formes toxiques de l'oxygène et l'H_2O_2 (CHRESTIN, 1984):

- élimination de H_2O_2 par les peroxydases et les catalases,
- réduction enzymatiques des quinones toxiques issues de l'action des peroxydases et polyphénoloxydases, par la NADH quinone réductase,
- réduction non enzymatique par les antioxydants (acide ascorbique et glutathion)
- régénération de l'acide ascorbique par le glutathion et régénération du glutathion par la glutathion réductase,
-fourniture de pouvoir réducteur accrue par l'enzyme malique pour le fonctionnement de la glutathion réductase
- piégeage des ions superoxydes par les SOD, permettant le fonctionnement "à moindre risque", d'enzyme comme la NADH quinone réductase.

I-1-3 Analyses de l'évolution des structures cellulaires par microscopie électronique

On peut essayer de relier certains des processus métaboliques du développement et de la maturation des fruits, à l'observation de l'évolution des structures cellulaires. Dans le cas de l'ananas, deux observations caractérisent l'évolution des structures cellulaires entre le fruit vert et le fruit mûr (voir planche 2 et pages 151-152).

- la raréfaction des organites comme les appareils de GOLGI et le réticulum endoplasmique granuleux.
- la disparition de la lamelle moyenne dans les fruits de 160 jours, mais aussi la désagrégation des parois, bien visible au niveau des méats intercellulaires.

Elles correspondent bien aux évolutions biochimiques décrites précédemment: processus de synthèse très actifs dans le fruit vert et augmentation de l'activité des hydrolases responsables de la dégradation des parois dans le fruit mûr, entraînant une modification de la texture. PESIS *et al* (1978) et BEN ARIE *et al* (1979) ont pu faire des observations similaires respectivement dans l'avocat, la pomme et la poire.

On peut noter que dans les fruits mûrs, le cytoplasme paraît plus granuleux, d'autant plus que le fruit est plus mûr, indiquant une certaine dégénérescence (planche 2, fig.d à g). Cependant, il semble que la compartimentation soit globalement maintenue, on peut même observer la formation de vésicules traduisant une fonctionnalité des membranes (pinocytose ou invagination du cytoplasme dans la vacuole).

L'observation de la structure interne des mitochondries (présence des crêtes de la membrane interne) est délicate. Les structures mitochondriales des fruits, qu'ils soient verts ou mûrs, sont similaires. Il semble que les mitochondries restent activent pendant toute la maturation des fruits (HARTMANN, 1983) ou la sénescence des feuilles (THOMAS, 1978), mais qu'avec l'âge, elles perdent leur pouvoir de régénération (ROMANI *et al*, 1968).

I-1-4 L'éthylène dans la pulpe

Analyse globale de la teneur

La teneur en éthylène de l'atmosphère interne du fruit est très faible lorsqu'il est vert (0,1-0,2µl.l^{-1}). A partir de 130 jours, elle augmente progressivement, pour atteindre 1,5µl.l^{-1} au stade mûr (fig.52). Ces valeurs sont similaires à celles rapportées par BURG et BURG (1962) de 0,16 à 0,4µl.l^{-1} et DULL *et al* (1967) de 0,08 à 1,16µl.l^{-1}, mesurée sur les ananas

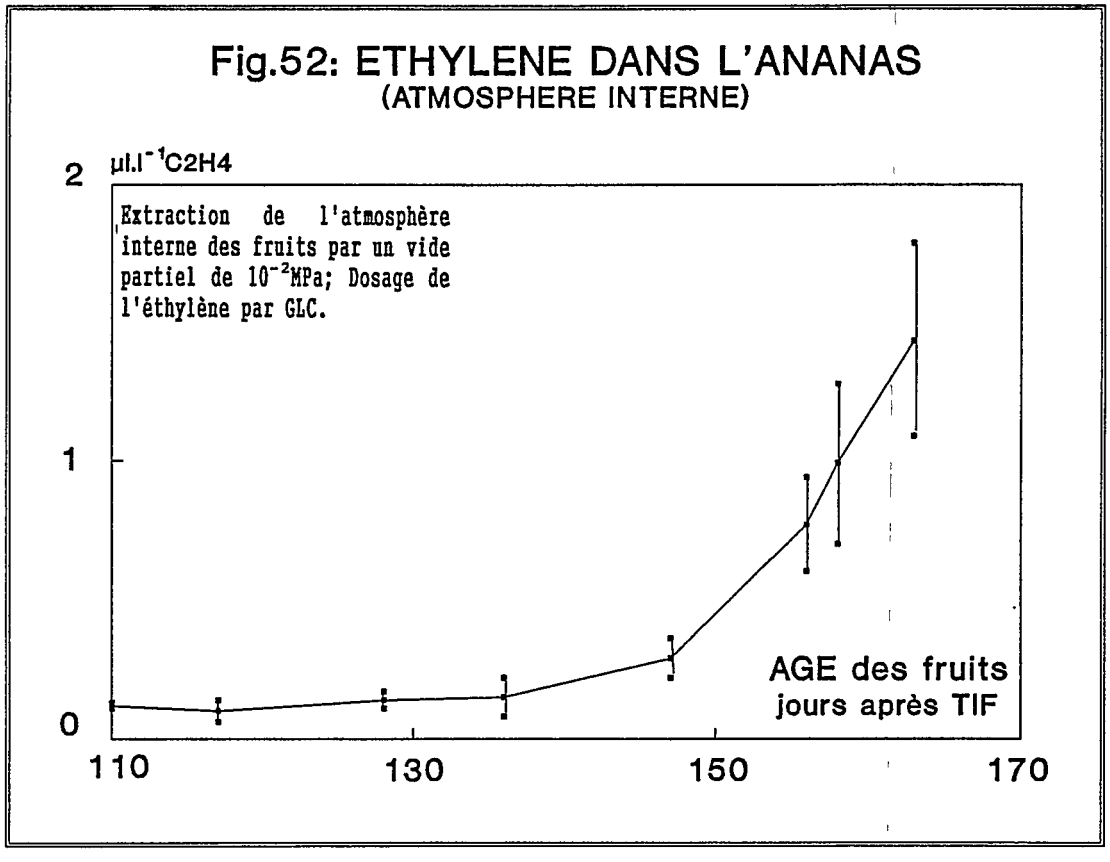


Fig.52: ETHYLENE DANS L'ANANAS
(ATMOSPHERE INTERNE)
µl.l⁻¹C2H4
2
1
0
Extraction de l'atmosphère interne des fruits par un vide partiel de 10⁻²MPa; Dosage de l'éthylène par GLC.
AGE des fruits
jours après TIF
110
130
150
170

des îles Hawaï.

Au delà de 163 jours, il est difficile d'analyser l'atmosphère interne car les quantités de gaz extractible diminuent. D'autre part, à ce stade, beaucoup de fruits présentent soit des développements de taches noires (*Penicillium funiculosum*), soit des pourritures dues au *Thielaviopsis paradoxa*, génératrices d'éthylène.

Analyses sectorielles

Une différenciation des zones du fruit (fig.4A) montre que l'évolution de la teneur en éthylène de la pulpe, est relativement synchrone horizontalement (fig.53). La partie haute du fruit est beaucoup moins riche, traduisant un retard de maturation d'environ 5 jours.

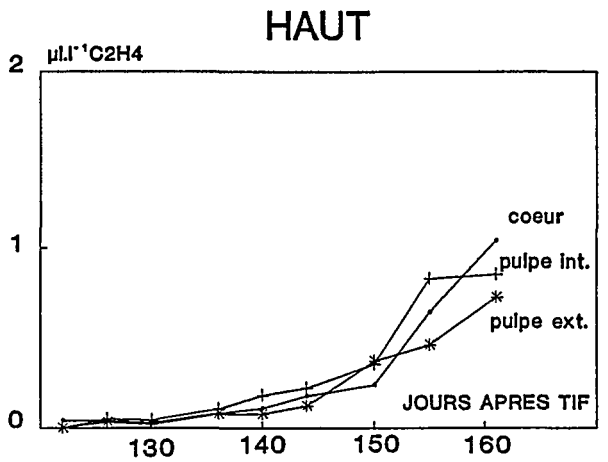
Dans les fruits sénescents (très mûrs, mais sans symptôme de dégradation importante), la teneur en éthylène de la partie la plus basse du fruit, se stabilise voire diminue parfois légèrement (voir tableau 25, dans "Sénescence"). Une telle évolution se rapproche de celles observées dans d'autres fruits non climactériques comme la cerise (HARTMANN *et al*, 1987). Il est impossible de montrer la stabilisation ou la diminution de la teneur en éthylène à ce stade, avec le gaz extrait sur le fruit entier, en raison de sa structure qui réunit des fruits individuels d'âges différents, donc de maturité différente.

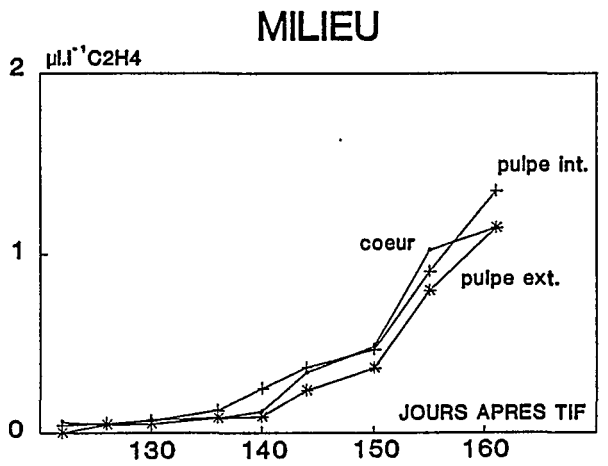
Dans la partie basale, la teneur en éthylène augmente dès 126 jours (fig.53); à 150 jours, les différences entre la base et la partie médiane du fruit s'estompent, tandis que la partie haute du fruit se distingue par des teneurs plus faibles. Globalement, dans le fruit mûr, la teneur en éthylène va en croissant de bas en haut.

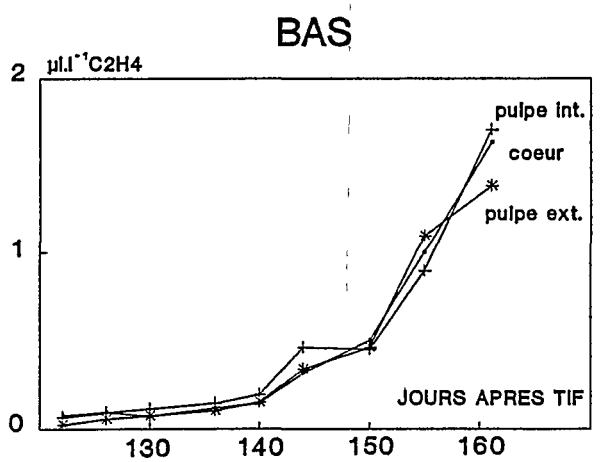
Discussion:

La teneur en éthylène de l'atmosphère interne de l'ananas est similaire à celles des autres fruits non climactériques (BIALE et YOUNG, 1981). Elle augmente faiblement avec la maturation du fruit (fig.52), en passant de 0,1-0,2 $\mu l.l^{-1}$ à 1,5$\mu l.l^{-1}$. A maturité complète, elle est du même ordre de grandeur que celles des fruits climactériques, au début de leur crise respiratoire. Finalement, avec sa teneur faible en éthylène pendant toute la maturation, l'ananas, comme les autres fruits non climactériques, se distingue des fruits climactériques qui ont des teneurs en éthylène très supérieures pendant la crise respiratoire (de 27$\mu l.l^{-1}$ dans la tomate à 500$\mu l.l^{-1}$ dans l'avocat, BIALE et YOUNG, 1981). Selon GRIERSON (1986), l'amplitude de la crise respiratoire est proportionnelle à la production d'éthylène chez les fruits climactériques, et les variations d'une espèce à l'autre sont importantes (Intensité respiratoire maximale lors de la crise:

Fig.53: EVOLUTIONS DES TENEURS EN C2H4 (dans les différentes zones du fruit)







Les fruits sont découpés selon la fig.4A; Chaque échantillon est composé de 10 fruits, dont les parties homologues sont réunies pour l'extraction du gaz par un vide partiel de 10^{-2}MPa sur solution de sulfate d'ammonium concentrée.

20ml d'O_2.kg^{-1}.h^{-1} chez la tomate, 155ml d'O_2.kg^{-1}.h^{-1} chez l'avocat). Dans le cas de l'ananas, la respiration augmente progressivement, comme la teneur en C_2H_4 (fig.52 et 53), pour atteindre 17ml d'O_2.kg^{-1}.h^{-1} au stade mûr (GORTNER *et al*, 1967 et DULL, 1971). GRIERSON (1986) rapporte que chez les fruits non climactériques, l'augmentation de la respiration provoquée par une stimulation à l'éthylène, est proportionnelle à la concentration utilisée. Cette observation a été effectivement faite dans le cas de l'ananas, DULL *et al* (1967). Des stimulations avec des concentrations croissantes d'éthylène (de 0,01 à 1000µl.l^{-1}), entraînent une augmentation de la respiration, le maximum étant atteint avec une concentration en éthylène de 100µl.l^{-1}. Cependant, l'effet du traitement ne déclenche pas le processus de maturation, si ce n'est une très légère accélération de la disparition des chlorophylles de l'épiderme et la respiration revient à sa vitesse initiale après l'arrêt de la stimulation par l'éthylène (c'est aussi le cas chez le citron, BIALE et YOUNG, 1981). Par contre, chez les fruits climactériques, une stimulation à l'éthylène déclenche la production autocatalytique; l'intensité de la respiration est proportionnelle à la production d'éthylène par le fruit (BIALE et YOUNG, 1981 sur la banane). Le mutant "rin" de la tomate n'a pas de production autocatalytique d'éthylène, ni de crise respiratoire, présentant en cela des caractéristiques de fruits non climactériques. D'après le même auteur, cette absence de production autocatalytique chez le mutant serait liée à l'impossibilité d'induire l'activité ACC synthase, soit naturellement au cours de la maturation, soit après stimulation par traitement à l'éthylène, alors que l'EFE est stimulée. Ce pourrait être le cas aussi, chez les fruits non climactériques. Dans le mutant rin comme dans les fruits normaux, l'ACC synthase et l'EFE sont cependant stimulées par une blessure, entraînant la production d'éthylène (YU, 1980). Il semblerait donc que le mutant rin et les fruits non climactériques aient la possibilité d'accroître leur production d'éthylène par induction de l'ACC synthase et de l'EFE en réponse à une blessure mais que seule l'EFE est induite par une stimulation à l'éthylène exogène.

I-1-5 Conclusion générale sur l'évolution biochimique et le métabolisme du fruit

La maturation de l'ananas est caractérisée par la durée assez longue du développement des processus conduisant du fruit vert au fruit mûr. Ils commencent vers 125-130 jours après TIF, s'accélèrent vers 140-145 jours (ce qui correspond au stade particulier signalé par GORTNER *et al*, 1967 et PINEAU, 1977) et se poursuivent jusqu'à 160 jours environ, avant que le fruit ne devienne sénescent.

Les principales caractéristiques chimiques sont l'accumulation de saccharose et d'acides organiques (citrate et malate). Mais l'équipement enzymatique du fruit évolue aussi, permettant le déroulement des différents

processus conduisant au fruit mûr:

- la modification de la texture de la pulpe par les polygalacturonases (disparition des pectines) et les hydrolases acides (dégradation possible des polysaccharides des parois);
- l'intervention probable des peroxydases dans les phénomène de plasticité des parois et dans la synthèse des éléments constitutifs (lignines à partir des composés phénoliques), lors de la croissance importante des cellules durant cette phase;
- le développement des arômes, vraisemblablement en partie sous le contrôle des mêmes hydrolases acides;
- la mise en place d'un équipement enzymatique protecteur de l'intégrité cellulaire, qui lui permet de poursuivre correctement son évolution durant cette longue phase de maturation. Il le protège d'une dégradation trop rapide des structures cellulaires par les phénomènes d'oxydations (phénols, quinones, formes toxiques de l'oxygène, H_2O_2), qui augmentent avec la maturation et la sénescence. Il le protège également, en assurant le renouvellement des antioxydants naturels du fruit (acide ascorbique et glutathion par la glutathion réductase);
- la mise en place d'un équipement enzymatique protecteur contre les agressions extérieures par des pathogènes, au moment le plus critique pour le fruit. De fait, l'augmentation des activités peroxydases et polyphénol-oxydases ainsi que celle des teneurs en phénols, pourraient permettre au fruit, en cas d'agression, de produire des substances toxiques susceptibles de freiner la progression du pathogènes. Des hydrolases acides, les α-mannosidases ou les N-acétylglucosaminidases, pourraient intervenir de façon complémentaire en s'attaquant directement aux structures pariétales des pathogènes.

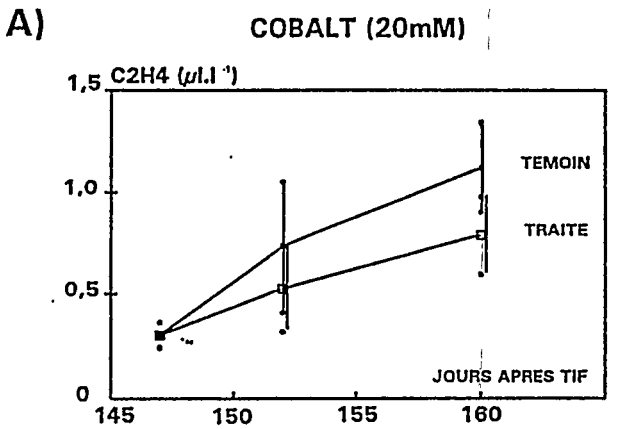
Comme pour d'autres fruits non climactériques, développement et maturation de l'ananas sont concomitants. Ils se caractérisent par:

- l'absence de signal facilement repérable du début du processus de maturation, tel l'augmentation brusque de la respiration (DULL *et al*, 1967) ou de la production d'éthylène,
- la difficulté de prévoir le début du processus final de la maturation pour déterminer le stade de récolte optimum.

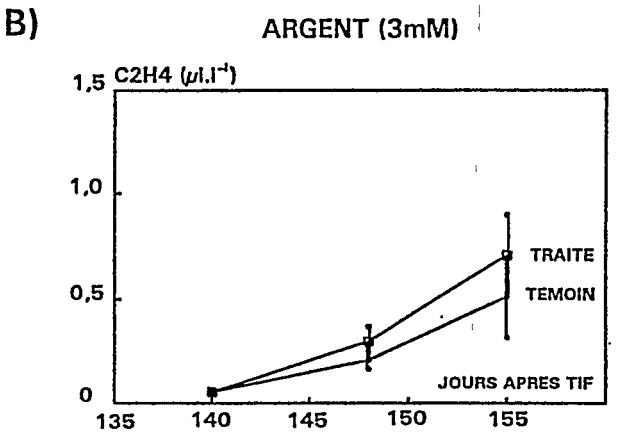
Cependant, la nature non climactérique du fruit n'est pas le seul facteur en cause, sa structure composite regroupant des fruits individuels de maturité différente, entraîne une hétérogénéité interne qui ne facilite pas la détermination d'un stade de maturité globale.

Fig.54: EFFET DU COBALT ET DE L'ARGENT SUR LA PRODUCTION D'ETHYLENE

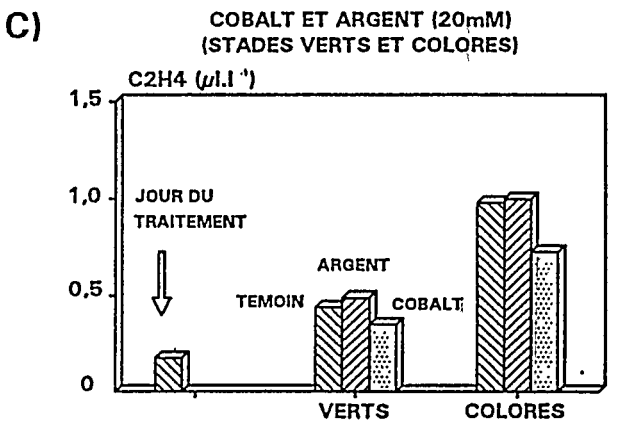
A) 10 fruits récoltés 5 et 13 jours après le traitement



B) 10 Fruits récoltés 7 et 15 jours après le traitement



C) 20 Fruits récoltés 12 jours après le traitement



Les fruits sont séparés en 2 lots suivant leur coloration externe
- fruits encore "verts"
- fruits déjà colorés

2,5ml des solutions sont injectées dans le pédoncule 10cm sous la base du fruit

I-2 CONTRÔLE DE LA MATURATION

I-2-1 Rôle de l'éthylène dans la pulpe

Il est possible d'injecter dans le pédoncule du fruit avant récolte, des substances qui sont alors redistribuées dans le plant et dans le fruit, par le flux de sève. Cependant, cette redistribution est probablement très hétérogène (voir la visualisation du processus obtenue par l'injection de colorant dans le pédoncule, planche 1, pages 149-150). Les effets du chlorure de cobalt et du thiosulfate d'argent, ainsi injectés, sur quelques caractéristiques biochimiques du fruit ont été observés pendant la maturation. Le cobalt est connu pour bloquer la biosynthèse de l'éthylène au niveau de l'EFE (ZEEV EVEN-CHEN *et al*, 1982; OI-LIM LAU et YANG, 1976; YU et YANG, 1979), tandis que l'argent inhibe les effets de l'éthylène (NICHOLS et KOFRANEK, 1982; HOBSON *et al*, 1984; BEYER, 1976). Le but des expérimentations est de rechercher l'existence d'un lien de causalité entre l'augmentation de la teneur en éthylène et l'évolution des caractéristiques biochimiques: AL, ESS et AA, critères les plus classiques de maturité, ainsi que deux activités enzymatiques qui augmentent pendant la maturation, polygalacturonase et peroxydase (voir pages 102 et 106).

Dans une première expérimentation, les fruits sont traités environ 15 jours avant la maturité complète, puis un premier prélèvement de 15 fruits est fait 6 jours après le traitement, le second 15 jours après.

Le traitement au cobalt diminue légèrement la teneur en éthylène des fruits ($0,79 \mu l.l^{-1} \pm 0,18$ dans les fruits traités contre $1,12 \mu l.l^{-1} \pm 0,22$ dans les témoins, 13 jours après l'injection), (fig.54A). Au contraire, les fruits traités à l'argent ont une teneur un peu supérieure ($0,71 \mu l.l^{-1} \pm 0,19$ contre $0,51 \mu l.l^{-1} \pm 0,19$, 15 jours après le traitement), (fig.54B). Les teneurs différentes dans les deux témoins s'expliquent par une maturité un peu plus avancée de la parcelle où a été appliqué le cobalt. La faible diminution de la teneur en éthylène observée dans le cas du traitement au cobalt, pourrait résulter de la mauvaise redistribution dans le plant, des produits injectés dans le pédoncule. Le cobalt, mal réparti dans le fruit, n'exercerait son action que dans certaines zones, alors que le gaz est extrait de l'ensemble de la pulpe.

Les effets des traitements sur les caractéristiques biochimiques de fruits sont faibles et non significatives. Après 15 jours, les fruits traités au cobalt ne montrent qu'une légère tendance à être plus acides et moins sucrés que les témoins, mais ont des activités PG et Perox un peu plus fortes. Dans les fruits traités à l'argent, aucune tendance n'apparaît (tableau 16).

Tableau 16: Caractéristiques biochimiques des fruits après traitement au cobalt et à l'argent (expérimentation 1)

Trait.	COBALT 20mM			ARGENT 3mM		
Jours après TIF	147jours	152jours	160jours	140jours	147jours	155jours
Témoins						
AL	15,1±0,5	9,2±0,6	6,8±1,0	11,3±1,3	10,6±0,9	9,2±0,8
ESS	15,2±1,6	15,2±2,0	16,9±1,0	12,9±1,3	16,5±0,7	17,6±0,7
AA	109±15	117±24	65±35	172±24	102±18	115±14
PG	1,00	1,48	1,62	0,64	1,05	1,44
PEROX	35,0	39,6	40,9	38,2	41,0	50,9
Traités						
AL		9,4±0,7	8,2±0,5		9,7±0,9	8,3±0,9
ESS		15,4±0,8	14,6±1,5		14,6±1,6	15,3±0,4
AA	jour du trait.	111±30	57±35	jour du trait.	105±10	108±12
PG		1,23	2,26		1,40	1,47
PEROX		47,5	63,3		44,7	54,0

AL: méq.100ml^{-1}, ESS: %, AA: mg.100ml^{-1}; PG: mg ac galacturonique.h^{-1}.mg prot^{-1}.
PEROX: dDO470.5mn^{-1}.mg^{-1} prot.; Les fruits sont traités par injection dans le pédoncule de 2,5ml de solution, avant le début de coloration naturelle, 10 à 15jours avant maturité (respectivement 147 et 140jours après TIF pour le traitement au cobalt et à l'argent); 15 fruits par prélèvement, extraction du gaz interne sur la moitié du fruit, extraction des protéines sur un échantillon de 50g de pulpe constitué par la réunion de prélèvements d'environ 3g de pulpe de chaque fruit, le reste de la pulpe est broyé et filtré pour les mesures d'AL et d'ESS.

Contrairement aux fruits traités au cobalt ou aux témoins, les fruits traités à l'argent, ont une coloration hétérogène. Sous forme de thiosulfate (STS), l'argent migre très facilement dans la plante (VEEN et VAN de GEIJN, 1978) et une bonne part a été transportée dans des zones localisées au niveau de l'épiderme; celles-ci ne se colorent pas lorsque le fruit mûrit. Le transport du STS paraît similaire à celui du colorant vital utilisé pour visualiser le processus, puisqu'on retrouve ce dernier dans quelques uns des vaisseaux, depuis le coeur jusqu'au niveau de l'épiderme où le produit diffuse dans les tissus de façon limitée (planche 2, fig.a).

Dans une seconde expérimentation, les fruits sont traités de la même façon que dans la première expérimentation mais l'ensemble des fruits est récolté à la même date, 12 jours après les traitements, au lieu de choisir 2 dates successives. Les fruits sont alors séparés en 2 lots, "verts" ou "colorés", respectivement les moins mûrs et les plus mûrs de chaque parcelle.

Les résultats sont tout à fait comparables à ceux de l'expérimentation précédente. Le cobalt diminue légèrement la teneur des fruits en éthylène alors que l'argent n'a pas d'effet (fig.54C). Les caractéristiques biochimiques diffèrent peu entre les témoins et les traités. Les fruits traités à l'argent ont des ESS un peu plus faibles que les autres (voir tableau 17).

La coloration des fruits de chaque traitement est similaire à celle de la première expérimentation: coloration homogène pour les fruits témoins et hétérogènes pour les fruits traités à l'argent. L'hétérogénéité due au traitement à l'argent est, cependant, beaucoup plus accentuée, probablement en raison de la concentration utilisée plus forte, 20mM au lieu de 3mM.

En résumé, sur l'ensemble des deux expérimentations, il n'apparaît pas de liaison claire de causalité entre la production d'éthylène de la pulpe et les autres caractéristiques biochimiques étudiées.

La technique utilisée pour les traitements ne permet pas une expression correcte de l'effet du cobalt, en particulier, sur la production d'éthylène par le fruit. Les variations observées sont trop faibles pour être suffisamment déterminantes.Cependant, les fruits traités au cobalt ont une teneur en éthylène, des acidités, des extraits secs un peu plus faibles que ceux des témoins, ce qui va dans le sens d'un ralentissement de la maturation, mais c'est l'inverse pour les activités enzymatiques. Quant au traitement à l'argent, il apparaît plutôt sans effet sur l'AL, l'ESS (sauf avec la solution

Tableau 17: Caractéristiques biochimiques des fruits après traitement au cobalt et à l'argent (expérimentation 2)

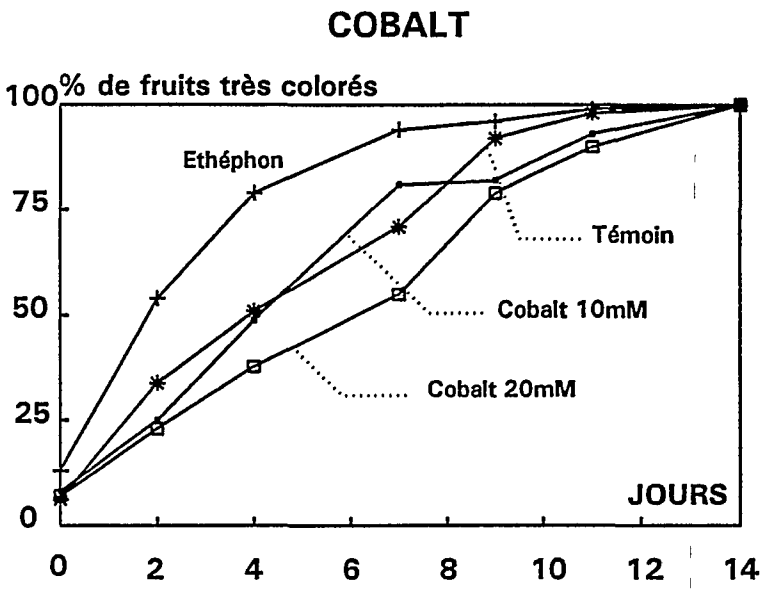
	Caractéristiques le jour du traitement	Fruits "verts"	Fruits "colorés"
Témoins			
AL	11,7±1,2	10,6±0,7	8,6±0,8
ESS	16,0±1,2	16,7±0,6	17,6±0,8
AA	149±9	115±13	78±37
PG	1,08	1,25	1,73
Perox	36,8	35,8	35,5
COBALT 20mM			
AL		10,3±1,1	10,4±2,3
ESS		15,3±1,2	16,0±1,0
AA	-	117±15	93±11
PG		1,35	1,79
Perox		43,7	42,1
ARGENT 20mM			
AL	AL: méq.100ml^{-1},	10,0±1,1	10,3±0,9
ESS	ESS: %,	13,6±1,5	14,6±1,2
AA	AA: mg.100ml^{-1}	116±7	86±17
PG	mg ac galacturonique.h^{-1}.mg^{-1} prot.	1,30	2,20
Perox	dDO470.5mn^{-1}.mg prot^{-1}.	46,9	45,4

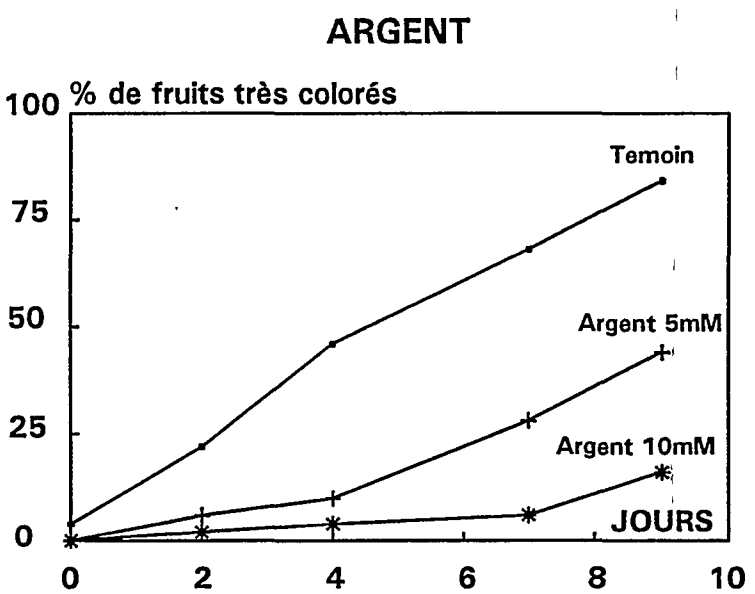
20 fruits sont récoltés 12 jours après injection de 2,5ml de chlorure de cobalt ou de thiosulfate d'argent 20mM, réalisée peu avant le stade fruit tournant, 135-140 jours après TIF. Les fruits sont séparés en 2 lots pour chaque traitement: fruits "verts" (chlorophylles peu dégradées) et fruits "colorés" (chlorophylles très dégradées). AL, ESS et AA sont mesurés sur le jus extrait après broyage de la pulpe, les extraits enzymatiques sont préparés à partir de 50g de pulpe consitués par la réunion de prélèvement de 2,5g de pulpe de chaque fruit (voir matériel et méthode).

à 20mM où il sont un peu plus faible) et l'éthylène, mais a tendance à augmenter les activités enzymatiques. Ces résultats ne reflètent pas un blocage de l'action de l'éthylène sur les processus de maturation, ce qui tendrait à montrer son indépendance vis-à-vis de l'éthylène comme dans d'autres fruits non climactériques. Une technique plus efficace de traitement de la pulpe par le cobalt ou l'argent, devrait pouvoir confirmer ces résultats.

L'épiderme du fruit semble particulièrement sensible à l'action de l'argent qui ralentit fortement la dégradation des chlorophylles (voir planche 2, pages 151-152). L'effet du cobalt et de l'argent sur la coloration de l'épiderme fait l'objet des expérimentations suivantes.

Fig.55: EFFET DE PULVERISATIONS DE COBALT ET D'ARGENT SUR LA COLORATION DES FRUITS





Les solutions (25ml) de chlorure de cobalt (10mM et 20mM) et de thiosulfate d'argent (5mM et 10mM) sont pulvérisées individuellement sur chaque fruit. La vitesse de coloration des fruits est déterminée en comptant le nombre de fruits dont l'épiderme est au moins au 3/4 coloré (notation visuelle standard IRFA 4 et 5 sur une échelle de 1 à 5).

I-2-2 Rôle de l'éthylène dans l'épiderme

La coloration jaune orangée du fruit résulte de la disparition des chlorophylles, révélant ainsi les carotènes déjà présents dans l'épiderme (voir page 102). Dans le langage courant, le terme "coloration du fruit" traduit la révélation de la pigmentation jaune orangée de l'épiderme et non la disparition des chlorophylles, même si, en fait, la teneur en carotènes ne varie pas. Sauf clairement explicité dans le texte, le terme a été utilisé dans ce sens traditionnel au cours de la description des expérimentations ci-après.

Compte tenu de l'effet spectaculaire de la solution de thiosulfate d'argent injecté dans le pédoncule du fruit sur la coloration de l'épiderme, des solutions de cobalt (10 et 20mM) et d'argent (5 et 10mM) ont été pulvérisées directement sur les fruits. Le retard de coloration des fruits, provoqué par les produits, est estimé par le pourcentage de fruits récoltés dans les parcelles expérimentales et dont les 3/4 de l'épiderme sont colorés en jaune orangé (fig.55). Un traitement supplémentaire, par une solution d'éthéphon ($1mg.l^{-1}$), a été ajouté à titre comparatif.

L'argent bloque très fortement la dégradation des chlorophylles de l'épiderme. Avec les solutions de 5 et 10mM, respectivement 40% et 10% des fruits sont colorés 10 jours après le début de coloration des témoins, alors que 80% de ces derniers sont déjà colorés. L'effet du cobalt est moins spectaculaire, mais il est net avec la solution de 20mM. L'application d'éthéphon a, au contraire et très normalement, accéléré la coloration des fruits.

La coloration naturelle de l'épiderme de l'ananas est par conséquent, sous la dépendance de la production endogène de l'éthylène.

L'utilisation de l'éthéphon ne fait qu'accélérer le processus naturel. L'épiderme du fruit présente, de ce point de vue, des caractéristiques d'organes végétatifs dont il dérive directement (sépales et bractées transformées, voir présentation du fruit, page 14). MATILE *et al* (1989) proposent une hypothèse sur le mécanisme de destruction des chlorophylles et le rôle de ce processus dans les organes vieillissants. L'action des chlorophyllases conduirait dans un premier temps à la production d'intermédiaires déphytylés mais conservant un noyau porphyrique intact et donc une coloration brune à verte. L'étape conduisant au changement de couleur typique des organes sénescents ou des fruits mûrissants, serait la destruction des porphyrines, qui pourrait avoir lieu dans la vacuole sous l'action de peroxydases. La destruction des porphyrines serait une nécessité pour la

cellule sénescente, afin de limiter la production de formes toxiques de l'O_2 par ces molécules, sous l'action de la lumière et la peroxydation des lipides membranaires (KNOX et DODGE, 1985; LESHEM, 1986). Cette protection est nécessaire, car le métabolisme associé au vieillissement, qui n'est pas que de nature catabolique, nécessite des cellules intactes et fonctionnelles. Dans les organes chlorophylliens un des principaux produits toxiques issu de l'interaction chlorophylle, lumière, oxygène est le singulet $^1O_2$, les carotènes servent d'ailleurs de "quenchers", agents protecteurs qui récupèrent l'énergie et permettent le retour à la forme O_2 (LESHEM *et al*, 1986).

I-2-3 Effets de régulateurs exogènes

Bien qu'on ne connaisse pas les mécanismes du contrôle du déclenchement de la maturation, l'équilibre entre les hormones serait un facteur primordial. Cependant, chez les fruits non climactériques (raisin, orange et fraise),l'ABA jouerait le rôle déterminant dans la maturation (GOLDSMITH *et al*, 1973; PECH et LATCHE, 1983). Les applications exogènes d'éthylène agiraient en stimulant la synthèse d'ABA. De fait, dans l'épiderme des citrus, autres fruits non climactériques, GOLDSMITH *et al* (1973) montrent une accumulation d'ABA lors de la sénescence naturelle ou stimulée par l'éthylène exogène. Il n'est cependant pas fait référence à l'éthylène endogène. Mais les auteurs suggèrent que, dans ce cas, l'ABA contrôle le processus de dégradation des chlorophylles, et que l'effet de l'éthylène exogène serait lié à la stimulation de la synthèse d'ABA. Mais pour d'autres organes (feuilles de citrus ou tomate), l'ABA exogène induit habituellement la production d'éthylène (RIOV *et al* 1990).

Divers régulateurs ont été injectés dans le pédoncule comme précédemment pour le cobalt et l'argent, et leur effet sur la maturation et la coloration, mesuré (20 fruits par parcelle). L'injection permet d'éviter les pertes par évaporation des solutions à la surface du fruit, en raison de leur température élevée (>40°C). On peut espérer également que la pulpe du fruit subira les effets des régulateurs au moins autant que l'épiderme, à la condition que ces molécules soient transportées aussi aisément que les ions Co^{++} ou Ag^{++}.

Cinq régulateurs aux propriétés différentes, ont été utilisé:

- **l'acide abscissique (ABA)**, à 10^{-4} et 10^{-5}M, souvent associé à l'éthylène dans les phénomènes de sénescence. De fait, dans les feuilles de citrus ou chez la tomate, l'ABA accroît la production d'éthylène (RIOV *et al*, 1990), et la rapidité de la réponse à la stimulation par l'ABA suggère une action directe au niveau la chaîne de biosynthèse de l'éthylène. L'effet de l'ABA d'après le même auteur, s'accompagne d'une synthèse accrue d'ACC.

- **le paclobutrazol (PP333 ou cultar)** à 50 et 500µg.l^{-1}; ce produit de la famille des triazoles est un inhibiteur de la synthèse de l'acide gibbérellique (CHARLET *et al*, 1987). En pulvérisation sur l'ananas, il supprime, de manière provisoire, la croissance en longueur des feuilles entraînant une nanification du plant; sur le fruit, il avance la maturation (SOLER, 1986).
- **les gibbérellines GA4/GA7** à 50 et 500µg.l^{-1}, au contraire des substances précédentes, retardent les phénomènes de sénescence (SACHER, 1973, SOLER, 1986).
- **l'acide 3 chlorophénoxy propionique (3CPA)** à 50 et 500µg.l^{-1}, substance à activité auxinique, en pulvérisation retarde la maturité du fruit, permettant un accroissement du poids du fruit. Il est parfois utilisé en plantation industrielle (SMITH, 1978; SOLER, 1985 et 1990).
- **le gallate de propyle** à 50 et 500µg.l^{-1}, qui est un "scavenger" ou piège à radicaux libres, à propriétés antisénescentes (APELBAUM *et al*, 1981) inhibant la transformation de l'ACC en éthylène. Son action à ce niveau résulterait du fait que la transformation ACC-éthylène fait intervenir des radicaux libres (LESHEM *et al*, 1986).

1- traitement par infiltration dans le pédoncule

Les effets des produits sur la maturation des fruits ont été appréciés en se basant sur la vitesse de coloration externe des fruits et sont résumés dans la figure 56.

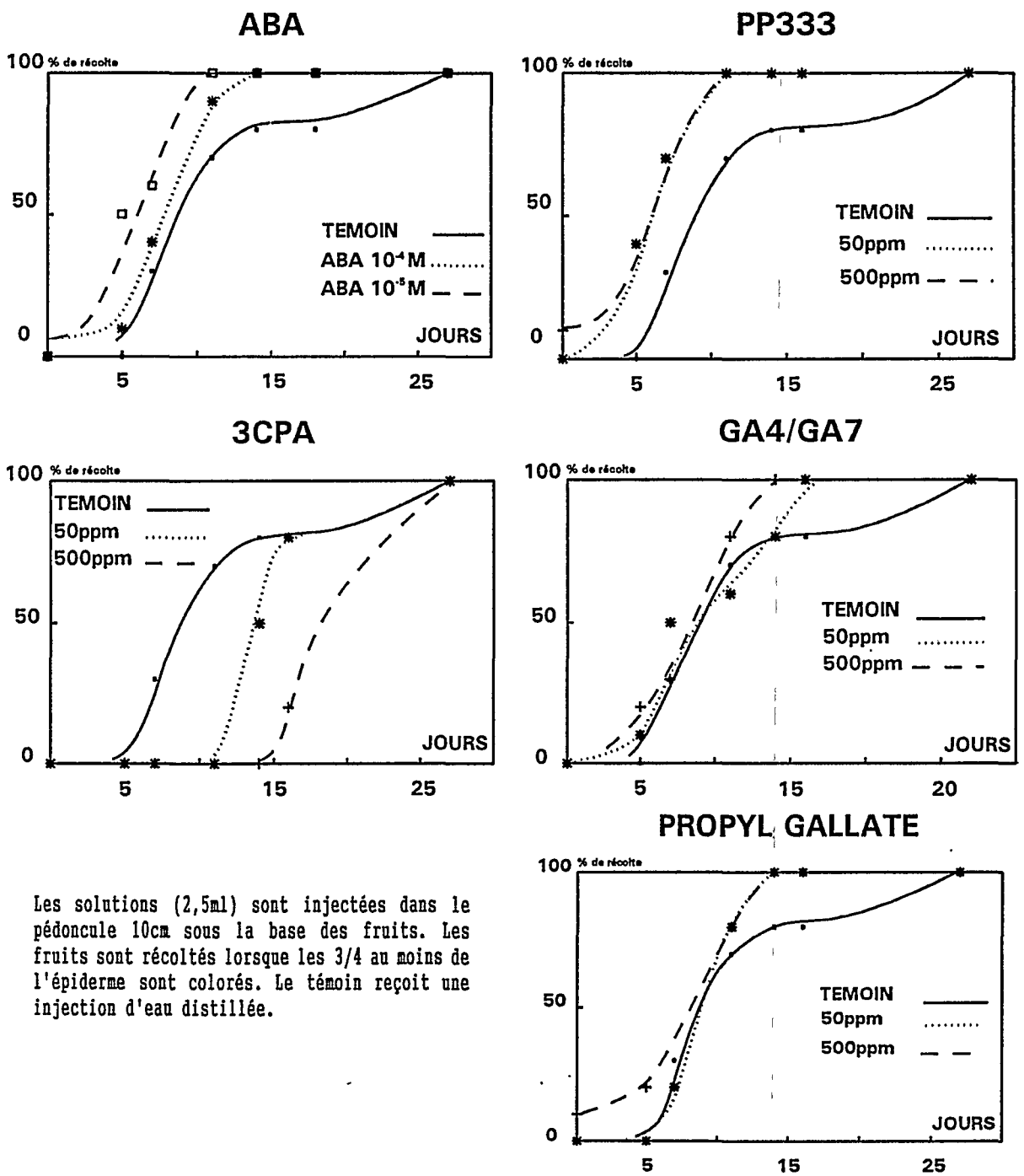
L'ABA avance la maturation des fruits d'environ 3 à 4 jours (50% des fruits récoltés) et la concentration la plus faible (10^{-5}M) est la plus active. L'ABA agit à des concentrations extrêmement faibles 10^{-4} à 10^{-7}M. Le PP333 avance aussi la maturation de 3 à 4 jours de façon identique pour les 2 concentrations.

Au contraire, le 3CPA retarde fortement la maturation mais comme lorsqu'on le pulvérise sur le fruit, son action semble plus forte sur l'épiderme que sur la pulpe (SOLER, 1990). Les fruits ne se colorant pas, ils ont été récoltés sans attendre la coloration complète de l'épiderme pour éviter une surmaturation interne et la perte totale des fruits. L'effet des gibbérellines est nul, alors que les pulvérisations à des stades jeunes entraînent habituellement un retard certain de la maturation (SOLER, 1986). Enfin le gallate de propyle n'a pas non plus d'effet net, la dose la plus forte aurait plutôt tendance à avancer la coloration des fruits (phytotoxicité?).

Normalement, la corrélation entre la coloration naturelle du fruit et la maturité de la chair est assez bonne. Quelques caractéristiques biochimiques des fruits à la récolte ont été analysées pour déterminer si l'effet d'avance ou de retard de maturation provoqué par les traitements est global ou non (tableau 18), mais les mesures des teneurs en éthylène des fruits après traitement n'ont pu être réalisées.

Fig.56: EFFET DES REGULATEURS EXOGENES SUR LA VITESSE DE MATURATION

(par injection dans le pédoncule du fruit)



Les solutions (2,5ml) sont injectées dans le pédoncule 10cm sous la base des fruits. Les fruits sont récoltés lorsque les 3/4 au moins de l'épiderme sont colorés. Le témoin reçoit une injection d'eau distillée.

Tableau 18: Caractéristiques chimiques de la pulpe des fruits après traitement par infiltration dans le pédoncule avec divers régulateurs de la maturation

	TEMOIN	ABA	PP333	3CPA	GA4/GA7	GALLATE de PROPYLE
Concent. fortes		10^{-4}M	500µg.l^{-1}	500µg.l^{-1}	500µg.l^{-1}	500µg.l^{-1}
AL	6,2	6,2	6,8	7,7	7,5	7,1
ESS	15,1	14,6	15,1	14,4	15,8	15,9
AA	74	78	76	79	90	92
THIOLS	0,130	0,097	0,107	0,143	0,102	0,108
CAROTENES	0,282	0,210	0,250	0,009	0,240	0,250
Concent. faibles		10^{-5}M	50µg.l^{-1}	50µg.l^{-1}	50µg.l^{-1}	50µg.l^{-1}
AL	méq.100ml^{-1}.	6,7	7,3	7,2	7,4	6,8
ESS	%	15,9	14,8	14,9	16,4	15,4
AA	mg.100ml^{-1}	110	83	87	84	85
THIOLS	mM	0,098	0,113	0,123	0,107	0,091
CAROTENES	DO410nm	0,270	0,255	0,176	0,223	0,263

2,5ml des solutions de régulateurs sont injectés dans le pédoncule de fruits peu avant le stade fruit tournant (entre 140-145jours après TIF); 20 fruits par parcelles; les fruits sont récoltés après coloration complète de l'épiderme; les analyses chimiques sont faites sur le jus obtenu après broyage de la pulpe et filtration. On compare ainsi l'effet de divers régulateurs sur l'évolution de quelques unes des caractéristiques chimiques des fruits pendant la phase ultime de maturation.

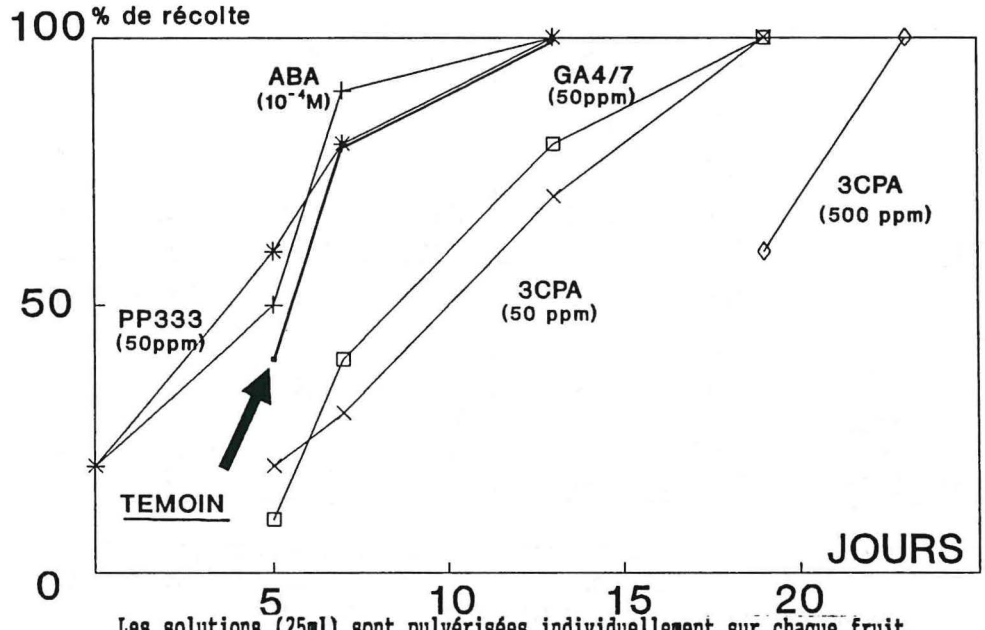
Les fruits sont récoltés après complète coloration (sauf pour le traitement 3CPA), donc très mûrs. Les acidités sont pratiquement au minimum de ce qu'il est possible d'obtenir sur des fruits sains, on observe peu de différences entre les fruits. Les fruits traités avec le 3CPA et GA4/GA7, qui ont retardé la maturation, sont légèrement plus acides que les autres (≈1,5 méq.100ml^{-1}). Les variations d'ESS et d'AA ne sont pas significatives. Les teneurs en thiols sont plus élevées dans les fruits traités au 3CPA et dans le témoin, tous les autres traitements ont tendance à les diminuer.

L'action retardante du 3CPA sur les thiols est particulièrement nette. Les teneurs en carotènes sont, en moyenne, plus faibles chez les fruits traités, mais le 3CPA a un effet assez spectaculaire: à 500µg.l^{-1}, il bloque leur synthèse et la diminue fortement à 50µg.l^{-1}. Globalement, les fruits des différents traitements ont des caractéristiques chimiques similaires bien que récoltés à des dates différentes. Autrement dit, le critère de maturité choisi, la coloration de l'épiderme, traduit assez bien la maturité réelle des fruits, sauf pour le 3CPA.

2- traitement par pulvérisation sur l'épiderme du fruit

A titre de comparaison, les mêmes solutions ont été pulvérisées sur l'épiderme des fruits, au même stade que précédemment. Les résultats obtenus sont similaires à ceux du test précédent (fig.57). Le 3CPA est le plus

Fig.57: EFFETS DE REGULATEURS EXOGENES PULVERISES SUR L'EPIDERME DE L'ANANAS



Les solutions (25ml) sont pulvérisées individuellement sur chaque fruit, lesquels sont récoltés lorsque les 3/4 de l'épiderme au moins sont colorés. Le témoin reçoit une pulvérisation d'eau distillée.

efficace pour retarder la coloration des fruits, 10 jours pour la plus forte dose. Les gibbérellines ont été plus efficaces en pulvérisation qu'en injection dans le pédoncule, elles retardent la coloration autant que le 3CPA à faible concentration 50µg.l^{-1}. Par contre, l'ABA et le PP333 n'ont pas eu d'effet très net, seuls quelques fruits ont commencé à se colorer avant ceux des fruits du témoin.

I-2-4 Conclusion sur le contrôle de la maturation

Selon les résultats précédents, l'ananas présente des caractéristiques biochimiques similaires à celles observées pour d'autres fruits non climactériques. Leurs évolutions conduisent au stade mûr et sont très progressives; elles débutent 125-130 jours après TIF. Le stade mûr se situant vers 160 jours, la transformation du fruit vert en fruit mûr dure environ 1 mois, à des températures souvent supérieures à 40°C.

La production d'éthylène augmente faiblement, en même temps qu'évoluent les autres processus de maturation. Les tentatives pour bloquer sa synthèse par le cobalt, dans la pulpe, n'ont pas été déterminantes pour 2 raisons principales: la première est la faiblesse des teneurs en éthylène de l'atmosphère des fruits, proches des limites de détection de notre équipement, la seconde est due à une répartition hétérogène des ions injectés, au niveau de la pulpe. Cependant, les résultats obtenus (fig.54) vont dans le sens d'un blocage de la synthèse d'éthylène par le cobalt dans la pulpe. Ce blocage, pour autant qu'il soit effectif, n'arrête pas les processus de maturation comme l'augmentation des activités polygalacturonases et peroxydases (tableau 16 et 17). L'argent injecté dans le pédoncule a migré facilement dans le fruit, bien que de façon tout à fait hétérogène, puisqu'il a des effets spectaculaires au niveau de l'épiderme en empêchant la dégradation des chlorophylles. Il convient, d'ailleurs, de séparer la dégradation des chlorophylles de l'épiderme, de la maturation de la pulpe. Le premier semble un processus typique d'organe chlorophyllien dépendant de l'éthylène (fig.55). En revanche, au niveau de la pulpe, aucun effet de l'argent sur les caractéristiques chimiques n'a été perceptible. L'éthylène ne jouerait pas, ici, le même rôle que pour les fruits climactériques, les processus de maturation de la pulpe de l'ananas ne dépendent pas de l'éthylène, ce qui est classique pour un fruit non climactérique.

Il est possible d'accélérer la maturation avec l'ABA (fig.56 et 57). Ce type d'observations a déjà été fait sur un autre fruit non climactérique, la cerise (HARTMANN, 1990; REID, 1985). L'ABA pourrait, ainsi, être l'hormone déterminante pour la maturation des fruits non climactériques. La biosynthèse de l'ABA dérive probablement de celle des carotènes (ZEEVAART et CREELMAN, 1988). Or, un régulateur hormonal comme le 3CPA, qui retarde la

maturation et la sénescence de l'épiderme mais aussi de la pulpe (tableau 18 et SOLER, 1990), semble aussi bloquer la synthèse des carotènes. Selon le site ou le mode d'action du 3CPA sur la chaîne de biosynthèse des carotènes, le retard de maturation qu'il provoque, pourrait être lié à un blocage de la synthèse d'ABA. On peut noter que d'autres substances similaires au 3CPA, sont capables de retarder la maturation du fruit (ANA, SMITH,1978; SNA, et 2,4,5-T, GORTNER, 1969).

Il est aussi possible d'avancer la maturation en bloquant la synthèse de l'acide gibbérellique ou au contraire de la retarder plus ou moins avec des gibbérellines (fig.56 et 57). Notons que chez la fraise, autre fruit non climactérique, la vitesse de la maturation est modulée par la concentration en AIA des akènes du fruit, alors que le blocage de la synthèse de l'éthylène n'affecte pas la maturation (GIVEN *et al*, 1988). Ces observations montrent bien l'importance de l'équilibre entre hormones dans le contrôle de la maturation des fruits non climactériques. Et les facteurs qui régulent cette balance hormonale sont importants, soit dans le déclenchement des processus de maturation, soit dans leur déroulement.

L'étape clé de la synthèse de l'éthylène est la transformation de de la SAM en ACC (YANG et HOFFMAN, 1984 et YANG, 1985). La dérépression de la synthèse de l'enzyme ACC-synthase peut être induite par divers stimuli dont l'AIA (YANG, 1984), alors que, paradoxalement, une application d'auxine sur un fruit retarde sa maturation. Le niveau d'AIA dans la cellule est contrôlé par l'activité AIA oxydase (partiellement au moins puisque les formes conjuquées interviennent aussi), elle-même est régulée par le rapport monophénol/ortho-diphénol. L'augmentation du rapport entraînant celle de l'activité enzymatique, induirait la synthèse d'éthylène nécessaire pour la maturation des fruits (accélération de la maturation, FLEURIET et MACHEIX, 1975; tomate "cerise", FLEURIET, 1982; poire, BILLOT, 1983) et la diminution de la teneur en AIA. Chez la tomate "cerise", au cours de la maturation normale, le rapport entre l'acide chlorogénique et les esters de l'acide quinique ou les dérivés glucosés des acides hydroxycinnamiques, pourrait jouer un rôle similaire (FLEURIET et MACHEIX, 1985). Les AIA-oxydases pourraient intervenir directement dans la transformation de l'ACC en éthylène (GASPAR *et al*, 1986; VIOQUE et VIOQUE, 1981, voir explication du mécanisme ci-après), ce qui peut expliquer l'apparente contradiction entre la diminution de la teneur en AIA et l'augmentation de la production d'éthylène. HARTMANN (1987) suggère que la diminution de la teneur en AIA est nécessaire pour que le tissu soit sensible à l'éthylène, ce qui est également supporté par l'observation classique que l'apport exogène d'AIA sur les fruits retarde leur maturation en dépit de l'augmentation de la production d'éthylène (SACHER, 1973).

Dans l'ananas, ce rapport chute entre le stade "fruit très vert" et le début de maturation, puis se stabilise. Mais la teneur en monophénol est très supérieure à celle des ortho-diphénols, contrairement à la poire (BILLOT,

1983). De plus cette teneur augmente fortement pendant toute la maturation (voir tableau 14), ce qui va dans le sens d'une activité enzymatique forte. Par ailleurs, l'AIA oxydase de l'ananas a un système de régulation particulier, elle requiert comme cofacteur de l'acide p-coumarique (la concentration optimale est de 3mM in vitro, mais l'effet positif sur l'activité enzymatique commence bien en dessous de cette concentration, fig.24) et elle est inhibée par l'acide férulique (GORTNER *et al*, 1967). Or, ces 2 composés phénoliques sont représentés essentiellement sous forme d'esters dont l'efficacité est probablement très différentes des formes libres. Seul l'acide p-coumarique serait présent dans la pulpe sous cette forme (DIEUDONNE, 1977) et donc susceptible d'augmenter l'activité de l'enzyme. Enfin, dans les fruits verts, le pic principal présent sur les chromatogrammes HPLC des composés phénoliques (voir en annexe 1), correspond à l'acide p-coumarique ou à un dérivé très proche. Par conséquent, un contrôle similaire à celui suggéré par FLEURIET et BILLOT n'est pas exclu pour l'ananas, par exemple dans la production d'éthylène nécessaire au lent processus de vieillissement et de sensibilisation des tissus au signal déclenchant la maturation.

Une interprétation de l'action de l'AIA et de l'AIA oxydase sur la synthèse de l'éthylène a été proposée par VIOQUE (1981). L'enzyme purifiée, extraite de l'olivier, est capable, en présence d'AIA et de ses cofacteurs (DCP et Mn++), de transformer l'ACC en éthylène. La réaction est activée par le pyridoxal phosphate qui est un cofacteur de l'ACC synthase. Le mécanisme impliquerait la liaison entre l'ACC et le pyridoxalphosphate sous forme de base de Schiff, jusqu'à la formation de l'éthylène. L'ouverture du cycle de l'ACC se faisant par un radical peroxyde formée par une oxydase. Ce qui expliquerait le rôle double oxydase-peroxydase du système AIA oxydase et l'effet stimulateur de la synthèse d'éthylène par l'AIA. De fait, le système enzymatique purifié produit des quantités croissantes d'éthylène avec l'augmentation de la concentration en AIA, jusque vers 0,4mM, avant de diminuer pour des concentrations plus fortes. Un mécanisme similaire avec intervention de radicaux libres est suggéré par BOUSQUET et THIMANN (1984) dans les feuilles, au cours de la peroxydation des lipides. D'autres travaux récents soulignent, également, l'intervention possible des peroxydases dans la production d'éthylène sous l'effet de stress: vitrification des tissus de vitroplants (KEVERS et GASPAR , 1985 et GASPAR, 1986); stress mécanique (BOYER *et al*, 1983); floraison chez l'épinard (CREVECOEUR *et al*, 1986). Enfin, BOUZAYEN *et al* (1991) ont montré que chez la tomate, le système enzymatique produisant l'éthylène (EFE) a pour cofacteur essentiel le fer.

I-3 LA VARIABILITÉ DES COMPOSANTES DE LA QUALITÉ

Les effets du milieu sur le plant, avant le développement du fruit ou sur le fruit en formation, sont déterminants pour la qualité du fruit. Ils peuvent agir sur le métabolisme du plant ou directement sur celui du fruit (PY, 1984; BARTHOLOMEW, 1986). Il s'ensuit une variabilité du fonctionnement du plant (plante + fruit) qui s'exprime dans les critères de qualité du fruit. Il est par conséquent primordial, pour arriver à comprendre comment s'élabore la qualité et éventuellement arriver à en tirer des conséquences pratiques, de ne pas s'arrêter à l'étude des modifications biochimiques au cours de la maturation. Il est nécessaire d'étudier cette variabilité et son origine. Le milieu agit principalement par les facteurs climatiques et nutritionnels.

Aucune expérimentation spécifique concernant les facteurs nutritionnels n'a été faite au cours de ce travail, mais les relations entre le climat et les principaux critères de la qualité gustative, l'ESS et l'AL (CROCHON *et al*, 1981), peuvent illustrer ce qui précède. De fait, l'effet saisonnier est assez marqué sur ces critères (voir pages 17 et 18). Leur évolution a été suivie au cours de l'année, sur un essai dit "Plantations mensuelles", dans lequel on observe l'impact du climat (toutes les autres conditions étant identiques) sur les caractéristiques de croissance des plants mis en terre chaque mois tout au long de l'année et l'effet sur les caractéristiques du fruit. L'AL a varié de 6 méq.$100ml^{-1}$, soit 35% du maximum. Dans le même temps, l'écart maximum d'ESS a été de 2%, soit 10% du maximum observé. L'acidité augmente quand le rayonnement et la température diminuent (saison des pluies) et inversement pour l'ESS.

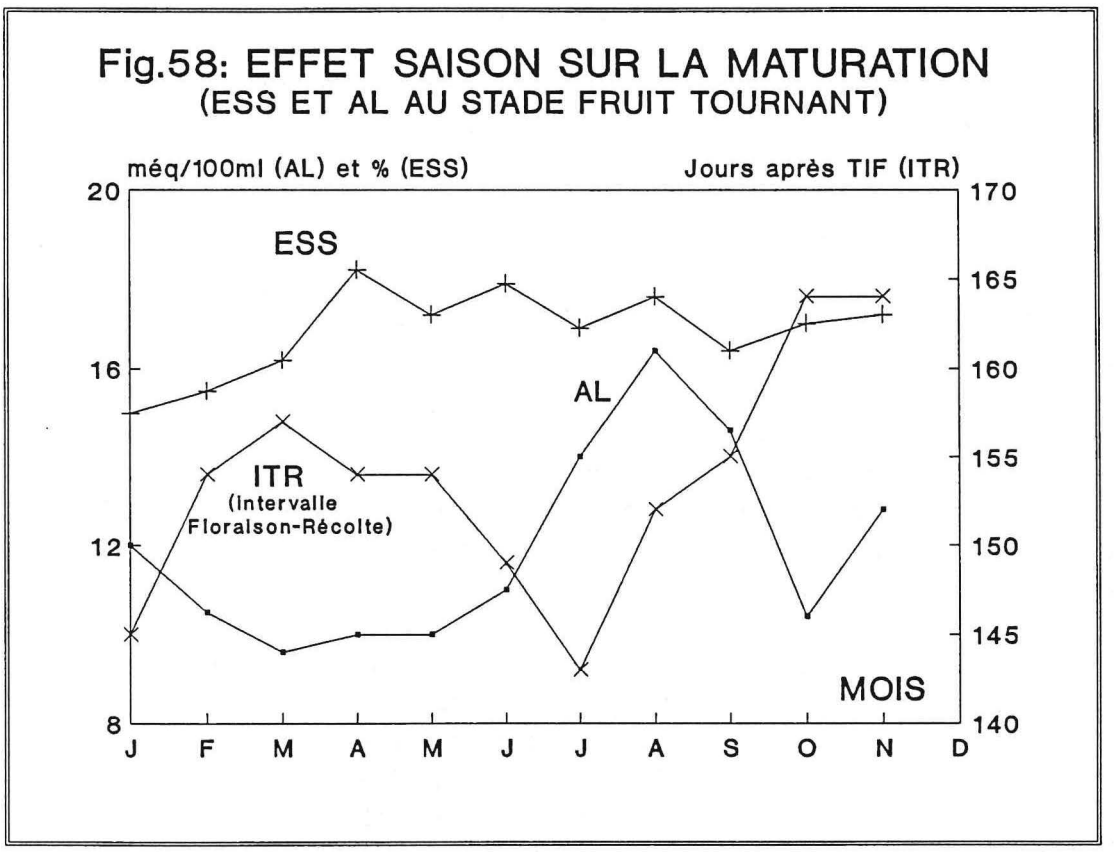
Cette relation acidité-température est vérifiée, par ailleurs, en fonction de la localisation de la culture (PY *et al*, 1984). Les cultures en altitude donnent des fruits plus acides. De même, un ombrage intensif des plants diminuant à la fois la température et le rayonnement, peut doubler l'acidité (TEISSON, 1979), tout en diminuant l'ESS et le poids du fruit. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer l'augmentation de l'acidité du fruit quand la température et le rayonnement diminuent. Une première est basée sur la différence d'optimum thermique entre les enzymes du métabolisme de l'acide malique (PEP carboxylase, malate deshydrogénase et enzyme malique). Pour des températures aux environs de 15°C, la synthèse de l'acide malique l'emporterait sur la disparition et inversement pour des températures supérieures à 35°C (BRANDON, 1967, chez les crassulacées; LAKSO et KLIEWER, 1975, chez le raisin). Une alternative est que l'orientation du métabolisme des sucres dans les organes de stockage, dépende de l'enzyme invertase acide soluble, (SHAFFER *et al*, 1987; voir page 88). Une régulation de l'activité de l'enzyme, de sa synthèse ou de sa dégradation par la température, pourrait contrôler l'accumulation des acides et du saccharose dans le fruit.

D'autre part, dans cette expérimentation, l'intervalle TIF-début de coloration (appelé aussi stade fruit "tournant"), varie de 143jours en juillet à 162jours en octobre. On a noté que l'ESS, à ce stade, a été particulièrement stable tout au cours de l'année, entre 17 et 18% (fig.58). Seuls les fruits récoltés au cours des 2 mois de pleine saison sèche ont des teneurs un peu plus faibles. L'acidité dans le même temps a subi une variation classique. Autrement dit, si la quantité globale de sucres varie peu au cours de l'année, la vitesse d'accumulation varie fortement (ce qui résulte de la comparaison de la variation forte de l'intervalle TIF-récolte et de la relative constance de l'ESS du jus des fruits sur la fig.58). Les maturations sont plus ou moins précoces et les variations saisonnières traduisent un fonctionnement du plant différent en fonction des conditions climatiques (équilibre entre assimilation carbonée de type C3 ou CAM) qui influe directement sur la qualité du fruit.

La relation apparente entre le début de coloration naturelle et la teneur en sucres est aussi intéressante à noter. Celui-ci peut constituer un simple indicateur de déclenchement de la phase finale de la maturation ou bien en être le ou l'un des facteurs déclenchants. L'ESS mesuré ici n'est pas la teneur maximale dans le fruit, mais elle doit correspondre à une teneur maximale pour la base du fruit, plus mûre. Une forte pression osmotique pourrait limiter l'accumulation des sucres, ce qui peut constituer une autorégulation du stockage par la vacuole (KINRAID et WYSE, 1986). Si ce mécanisme est valable dans le cas de l'ananas, il pourrait expliquer simplement l'effet saisonnier sur l'intervalle TIF-récolte.

La température et le rayonnement peuvent avoir également des effets plus drastiques que de simples variations saisonnières. Des conditions particulières combinant forts rayonnement, température et stress hydrique sont à l'origine de perturbations profondes du métabolisme du fruit qui se traduisent par d'autres variations des critères de qualité. La pulpe devient translucide et perd son acidité, alors que l'épiderme ne se colore plus. Enfin, dans les conditions naturelles, il est très difficile de faire la part des choses entre l'effet de la température, du rayonnement et de la disponibilité en eau. Les 3 éléments évoluent, en général, de façon concomitante au cours des variations climatiques. Par ailleurs, des facteurs nutritionnels peuvent avoir un rôle sensibilisant sur le phénomène qui sera étudié plus en détail dans le second chapitre.

Les facteurs nutritionnels sont aussi une source de variabilité qui peut être utilisée afin de mieux comprendre le fonctionnement du plant et par conséquent l'élaboration de la qualité. Le potassium, par exemple est un des éléments majeurs pour la qualité des fruits (PY *et al*, 1984). L'apport de K^+ entraîne un accroissement de la teneur en saccharose des feuilles (SIDERIS, 1945 cité par PY *et al*, 1984) et de celle des fruits (LACOEUILHE, 1978).



Les fruits sont récoltés au stade 'fruits tournants', qui correspond au début de la coloration naturelle. Les fruits ont été sélectionnés au stade floraison selon la date exacte de floraison et selon la dimension de l'inflorescence (hauteur et diamètre). Chaque point représente la moyenne des mesures effectuées sur le jus extrait de 10 fruits. L'intervalle ITR est le temps écoulé entre le jour de l'induction florale et le début de la coloration naturelle de l'épiderme.

Rappelons que cet ion a un rôle métabolique important (voir page 18): il intervient dans le transport du saccharose des feuilles vers le fruit, au niveau du phloème; il active les ATPases plasmalemmiques, créant une force motrice protonique énergisant les influx des solutés cellulaires (par exemple stockage du saccharose et acides organiques). L'acidité du fruit est également augmentée par le K^+ et de façon plus spectaculaire que l'ESS puisqu'un doublement de la fumure potassique, multiplie par 2 l'acidité. En fait, son accumulation implique une compensation de charge pour respecter l'électroneutralité (au moins partiellement), ce qui se fait par la synhèse d'acides organiques. D'autres critères de qualité du fruit dépendent de l'apport de potasse: amélioration du parfum, fermeté de la chair, coloration de l'épiderme (PY *et al*, 1984).

Des observations de même nature peuvent être faite avec les autres éléments de la fertilisation. Les facteurs qui contrôlent la nutrition du plant (modulation de la fumure, facteurs climatiques, parasitisme), contrôlent les mécanismes physiologiques dans le plant (photosynthèse, transport des assimilats...), et par conséquent l'élaboration de la qualité du fruit.

En résumé, pour comprendre comment s'élabore la qualité du fruit, il faut intégrer les effets des différents facteurs du milieu sur les composantes de cette qualité. Ces effets se traduisent par une variabilité qui reflètent les modifications du fonctionnement du plant qu'ils induisent. L'étude de cette variabilité est un des moyens de compréhension du fonctionnement de l'ananas dans son milieu et la source de solutions techniques pour contrôler la qualité des fruits.

I-4 CONCLUSION DU CHAPITRE I: MATURATION DE L'ANANAS

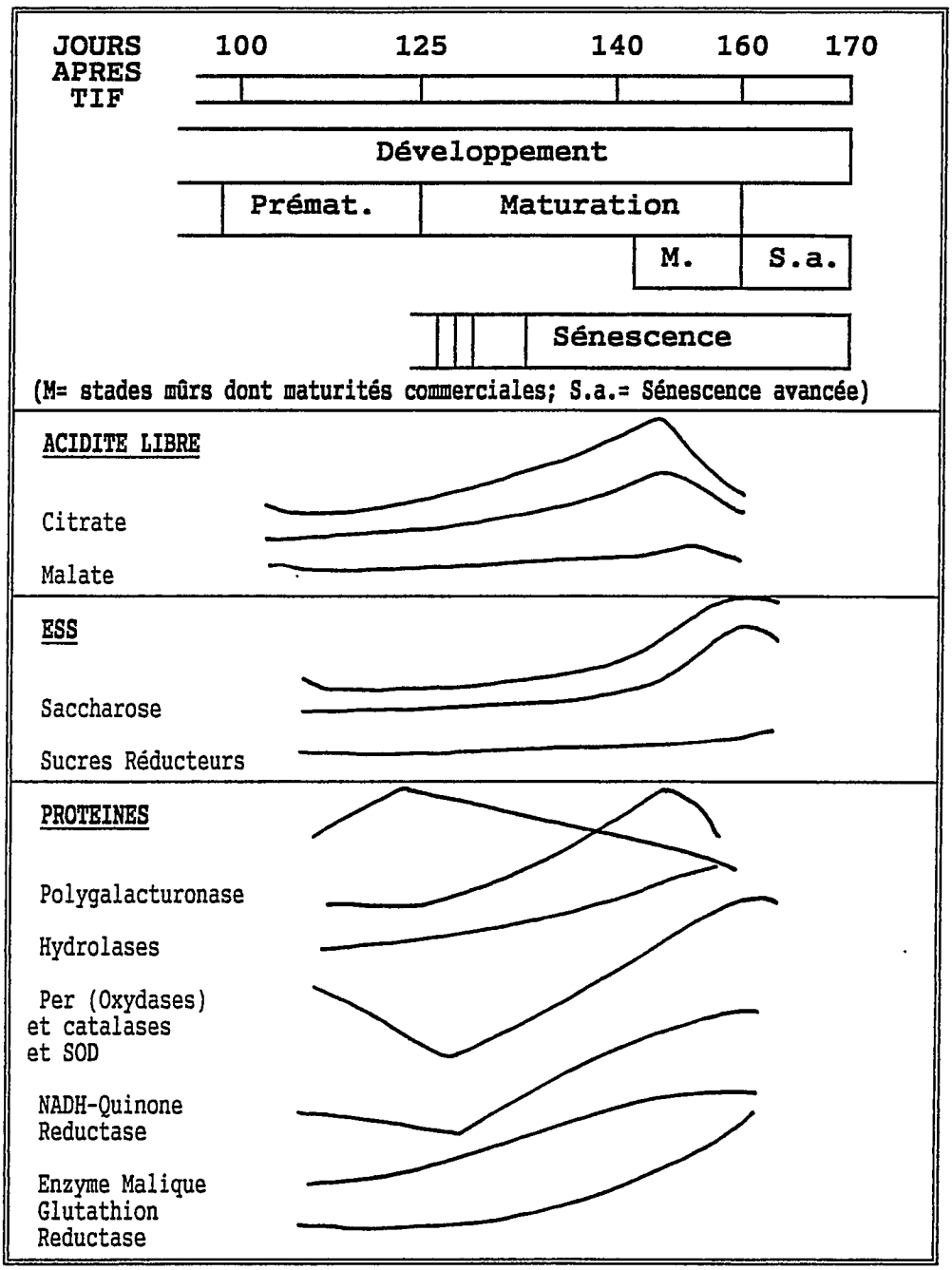
Une des principales caractéristiques de la maturation de l'ananas est la nature non climactérique du processus. Les évolutions biochimiques de la pulpe du fruit conduisant au stade mûr, sont, pour l'essentiel, similaires à ce qui est habituellement observé dans la plupart des fruits: coloration, parfum, accumulation de sucres et d'acides organiques, mise en place de systèmes enzymatiques divers et, en premier lieu , ceux responsables du ramollissement des fruits en détruisant les pectines et autres polysaccharides des parois.

En revanche, contrairement aux fruits climactériques, la maturation doit se dérouler avant la récolte puisque l'ananas n'accumule pas de réserves amylacées pouvant être transformées en sucres solubles par la suite. L'évolution du fruit est lente et progressive, les premiers signes se produisent vers 125 jours après TIF, soit plus d'un mois avant le stade mûr et alors que les températures des fruits dépassent fréquemment les 40°C.

La croissance du fruit et sa maturation sont intimement liés puisque l'accroissement pondéral se poursuit très tardivement, ce qui implique notamment un grandissement cellulaire, des processus synthétiques au niveau des parois et une intégrité des cellules, même dans le fruit mûr. Sur le plan pratique, cette liaison entre maturation et croissance est problématique: le producteur doit arriver à un équilibre entre le degré de maturité, la résistance du fruit (transport et conservation) et le rendement. A cela s'ajoute le fait que l'appréciation du degré de maturité du fruit n'est pas simple en raison de la structure du fruit, de sa nature non climactérique et de l'influence des facteurs du milieu sur les critères de qualité.

La maturation, sous contrôle génétique, résulte de la dérépression ou de l'activation de nombreux gènes, si on en juge par la diversité des activités enzymatiques qui augmentent, alors que la teneur globale en protéines diminue. Dans les fruits climactériques, l'éthylène pourrait être responsable de ce processus. Mais dans le cas de l'ananas, si la concentration en éthylène augmente, il semble qu'en dehors de la coloration de l'épiderme (disparition des chlorophylles), les autres processus (activités PG et PEROX dans la pulpe) soient indépendants de l'éthylène puisque l'Ag^{++} ne bloque pas leur augmentation. Un autre système de contrôle de la maturation doit exister chez l'ananas. Une autre hormone l'ABA ou bien l'équilibre entre les différentes hormones peut jouer ce rôle, puisqu'on peut par apport exogène avancer ou retarder la maturation. Les oligosaccharides libérés sous l'action des PG dont l'activité apparaît très tôt dans le processus de maturation, pourraient également avoir un rôle hormonal important (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985). L'augmentation de la teneur en éthylène pourrait être une réponse à leur action; de fait, il est possible d'induire chez la tomate (BALDWIN et PRESSEY, 1988) ou chez les citrus (BALDWIN et BIGGS, 1988), une production d'éthylène par traitement avec des PG exogènes.

SCHÉMA RÉCAPITULANT LES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE LA MATURATION DE L'ANANAS



La terminologie de base a été empruntée à GORTNER *et al* (1967) avec quelques modifications d'après WATADA *et al* (1984). La sénescence est le dernier stade du développement du fruit. Elle débute lorsqu'une certaine maturité physiologique est atteinte. La sénescence avancée suit le stade mûr. Celui-ci est la dernière phase de la maturation qui débute vers 125 jours après TIF (premiers changements biochimiques observables et conduisant vers le stade mûr). L'établissement de limites temporelles précises pour chacune des phases n'est pas possible (l'échelle n'a été donnée qu'à titre indicatif), d'autant plus que l'ananas est un fruit composite.

Chapitre II: Sénescence et "Jaune" de l'ananas

L'ananas fruit non climactérique, doit mûrir sur pied pour atteindre l'optimum de ses qualités gustatives. Si le fruit n'est pas récolté, il se produit rapidement des phénomènes de fermentation, avec une odeur caractéristique alcoolisée. Le fruit, fragilisé sous l'action des hydrolases responsables de son ramollissement, est envahi par des champignons et autres pathogènes.

Le processus de sénescence peut être accéléré sous l'action de facteurs climatiques et nutritionnels mal définis (HUET, 1953 et TEISSON, 1979). Dans ce cas particulier, le phénomène est appelé "jaune de l'ananas", il se traduit essentiellement par une translucidité plus ou moins développée de la pulpe, qui apparaît au centre des yeux et se propage au reste de la pulpe mais sans atteindre le coeur ni l'épiderme (voir planche 1, page 149) (HUET, 1953). Elle s'accompagne d'une dégradation incomplète ou nulle des chlorophylles de l'épiderme. Celui-ci est alors plus ou moins insensible au traitement de coloration artificielle par l'éthéphon. Il apparaît de préférence sur les gros fruits aux périodes chaudes (GREEN, 1963), mais on peut empêcher son apparition par un ombrage intense (TEISSON, 1979). En Guinée, HUET (1953) constate qu'il apparaît après la saison sèche au retour des pluies. L'azote ou la faiblesse du rapport K/N pourrait être un facteur sensibilisant (LACOEUILHE, 1978; PINON, 1980). Dans le fruit, le "jaune" augmente de bas en haut et se développe en même temps que la maturation avant récolte. Du fait de la translucidité de la pulpe, on dénomme les fruits atteints indistinctement fruits jaunes ou fruits translucides.

On se propose de comparer le "jaune" avec la sénescence normale.

En premier lieu, les caractéristiques générales physiques et chimiques des fruits atteints ont été déterminées. Puis, les facteurs biochimiques enzymatiques et non enzymatiques, pouvant intervenir dans le processus du vieillissement, ont été comparés dans les fruits normaux, moyennement atteints ou complètement atteints. Le traitement de coloration artificiel par l'éthéphon de l'épiderme des fruits étant inefficace sur les fruits "jaunes", quelques uns des aspects de ce traitement en relation avec son efficacité ont été étudiés: le devenir du produit, une fois appliqué sur le fruit; les effets de la température des fruits et du pH des solutions sur son efficacité; le lien avec la non dégradation des chlorophylles des fruits atteints de jaune.

Le climat et la nutrition jouent un rôle certain dans l'apparition du phénomène. On essaiera d'apporter quelques éléments complémentaires de ce qui est déjà connu, bien que la difficulté principale de l'étude réside dans l'impossibilité de reproduire artificiellement le phénomène.

Enfin la relation entre la qualité du fruit (aptitude à la conservation et qualité gustative) et le phénomène a été examinée.

II-1 CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DU PHÉNOMÈNE

II-1-1 Importance du phénomène

Le jaune de l'ananas peut entraîner des pertes considérables dans les plantations de Côte d'Ivoire, bien qu'apparaissant à de courtes périodes dans l'année car ces dernières correspondent à des exportations quantitativement importantes (octobre-novembre et mars-avril). Les fruits étant plus fragiles doivent être éliminés car ils supportent moins bien les conditions de transport et de conservation. A certaines époques de l'année, on a constaté jusqu'à 80% de pertes. Dans des situations plus classiques comme celle de la station de l'Anguédédou où a été réalisé ce travail, l'importance du phénomène est moindre. Les fruits éliminés pour cause de jaune peuvent malgré tout représenter 50% du total éliminé (malformation des fruits, mauvaise présentation, tâches noires, blessures...). La crainte du phénomène conduit les planteurs à récolter des fruits moins mûrs et de qualité médiocre.

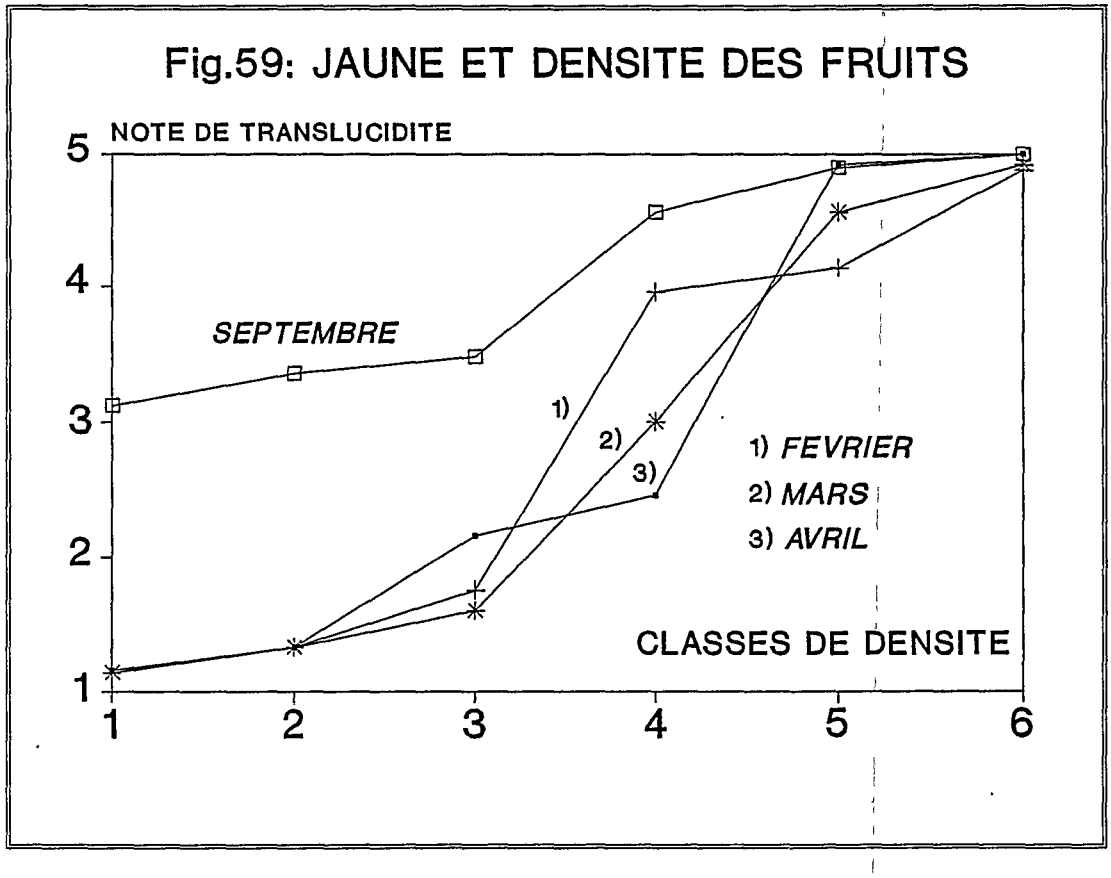
Dans le tableau 19, on a représenté le pourcentage mensuel de fruits jaunes par rapport au total des fruits de gros calibre, obtenus dans un essai dont les plantations se font mensuellement (moyennes de 1977 à 1984). On a calculé que pour un rendement moyen de 60 tonnes exportées/ha, le "jaune" représente une perte moyenne de 4 tonnes/ha.

Tableau 19: Rapport Fruits Jaunes/ total gros fruits (%) sur la station de l'Anguédédou, IRFA Côte d'Ivoire.

mois de récolte		mois de récolte	
Janvier	5,6%	Juillet	*
Février	12,3%	Août	*
Mars	11,1%	Septembre	25,9%
Avril	14,5%	Octobre	10,9%
Mai	18,0%	Novembre	12,7%
Juin	16,5%	Décembre	12,3%

Le pourcentage de jaune augmente après la saison sèche. Il est important à la période chaude et humide (Mai) et au retour des pluies en Septembre. En juillet et Août, petite saison sèche, le phénomène a été occasionnel suivant les années.

Ce tableau n'a qu'une valeur indicative, les conditions culturales de l'essai sont un peu différentes de celles des plantations industrielles qui ont le souci de produire de gros fruits donc plus sensibles au "jaune".



Notes de translucidité: 1=pas de translucidité; 3=fruit demi translucide; 5=fruit totalement translucide.
Classes de densité: Les classes de densité sont celles de solutions salines de 0 à 5%. Les fruits sont considérés comme appartenant à une classe, lorsqu'ils coulent légèrement dans la solution saline correspondante.

II-1-2 Densité des fruits

La densité de l'ananas dépend de l'air que renferme la pulpe, donc de sa porosité: une macroporosité résulte de la présence des 3 locules dans chaque oeil et elle peut être plus ou moins forte en fonction des conditions du milieu cultural; une microporosité due aux espaces intercellulaires et qui se remplit de jus dans les fruits "jaunes", donnant à la pulpe un aspect translucide. Les fruits "jaunes" ont une densité supérieure à celle des fruits normaux (d<1). Cette caractéristique permet d'éliminer au cours du conditionnement, par simple trempage dans l'eau, la majorité des fruits atteints.

La liaison entre la translucidité et la densité peut être démontrée en classant les fruits par classes de densité à partir de trempage en solutions salines de concentrations croissantes de 0, 1, 2, 3, 4, 5% en NaCl. La note de translucidité est attribuée par appréciation visuelle sur une section longitudinale du fruit: 1=trace ou pas de translucidité, 3= translucidité moyenne, 5=forte translucidité. Il apparaît clairement que l'intensité du jaune, autrement dit de la translucidité de la pulpe, augmente avec la densité du fruit (fig.59). Cependant les tests effectués à des époques différentes montrent que la liaison n'est pas stricte. En septembre, le "jaune" apparaît déjà dans les fruits de faible densité alors qu'en février, mars ou avril, il n'apparaît que dans les fruits de densité plus forte. La densité du fruit dépend beaucoup des conditions de croissance du plant et de développement du fruit. En utilisant un régulateur de croissance qui retarde la maturation, le 3CPA (voir page 131), on augmente artificiellement le poids du fruit et sa densité par un meilleur remplissage (diminution de la macroporosité, SOLER, 1985 et 1990). L'augmentation de poids du fruit est liée d'une part à une légère augmentation des dimensions des fruits (3 à 6mm en hauteur et 4 à 6mm en diamètre par rapport au témoin), et d'autre part à l'augmentation du remplissage (les cavités que forment les 3 locules de chaque oeil ont pratiquement disparues par suite de l'accroissement de la taille des cellules permis par le retard de récolte d'une semaine à 10 jours). Il en résulte un accroissement suffisant de la densité des fruits traités, pour qu'ils ne flottent plus dans l'eau comme c'est le cas pour les témoins. Durant le conditionnement, le calibrage des fruits (voir page 12) se fait en partie mécaniquement (trieuse automatique par poids) et en partie manuellement pour que la taille des fruits soit adaptée aux dimensions des cartons. On constate une augmentation du poids moyen des calibres des fruits récoltés qui traduit également la forte augmentation de la densité des fruits (tableau 20).

Tableau 20: Effet du 3CPA sur le poids des fruits à la récolte (d'après SOLER, 1990)

	TEMOIN date de récolte: 10/10		3CPA date de récolte: 21/10	
	poids moyen (g)	répartition (%)	poids moyen (g)	répartition (%)
Calibre A	1687	40,6	1858	60,9
Calibre B	1301	37,4	1314	29,3
Calibre C	971	22,0	1001	9,9
Rendement brut	61,036 t/ha		74,038 t/ha	

Les parcelles de plantation sont traitées avec des solutions à 50mg de matière active.l^{-1}, soit 1,5l de produit commercial à l'ha dans 2500l d'eau. Les fruits sont pesés individuellement et classés suivant le principe suivant: Calibre C= fruits de 0,9 à 1,1kg, calibre B= fruits de 1,1 à 1,5kg, calibre A= fruits de 1,5 à 2,3kg. Toutes les techniques classiques des plantations de Côte d'Ivoire sont appliquées (voir page 10).

II-1-3 Modifications ultrastructurales

Une des hypothèses avancées pour le jaune est qu'un fort afflux de sève associé à des températures élevées et une mauvaise régulation par évapotranspiration (en raison de la présence d'une cuticule cireuse sur l'épiderme du fruit), entraînerait une désorganisation des structures cellulaires voire un éclatement des cellules. Ce fort afflux de sève peut résulter d'une réhydratation brusque après une période sèche ou d'une irrigation irrégulière, 2 conditions favorisant l'apparition du phénomène. L'observation des cellules en microscopie optique et électronique a été réalisée pour détecter les signes d'une telle désorganisation.

microscopie optique

La comparaison de l'état des cellules a été faite sur 4 types de fruits:

- A: fruits non colorés mais proche de la maturation
- B: fruits non colorés mais à chair translucide
- C: fruits colorés et normaux intérieurement
- D: fruits colorés et à chair translucide

Les coupes réalisées dans les différentes zones du fruit ne permettent pas de déceler des différences entre les fruits. Tous sont mûrs ou proche de la maturité et les parois des cellules sont très fines mais ne présentent aucun signe de désorganisation (planche 1). La pulpe des fruits étant fixée et incluse dans la paraffine avant la coupe et la coloration, doit permettre d'observer globalement, en principe, les structures cellulaires. On peut noter sur les photos que seules les parois sont visibles et que les cellules paraissent "vides". En réalité, comme on pourra le constater par la suite, la vacuole représente la quasi totalité du volume de la cellule et le cytoplasme est rejeté et plaqué contre les parois, il n'est observable qu'en microscopie électronique.

microscopie électronique

La pulpe des fruits est fixée 5h au glutaraldéhyde 3% dans un tampon cacodylate (0,1M ph=6,8), puis post-fixée à l'osmium 2%. Après déshydratation, elle est incluse dans l'araldite et les coupes colorées à l'acétate d'uranyle. Quatre stades de maturité ont été utilisés pour la préparation des coupes:

	AL méq/100ml	ESS %	AA mg/100ml
fruit vert	11,4	15,6	89
fruit moyennement mûr	7,1	17,3	77
fruit très mûr	7,2	18,6	78
fruit jaune	5,9	17,7	79

Les structures cellulaires des fruits très mûrs ou sénescents se ressemblent beaucoup. Une des principales caractéristiques observables dans les 2 types de coupes, est la faible densité de la zone correspondant à la lamelle moyenne, les composés pectiques constituant le ciment intercellulaire ont disparu par rapport aux fruits moins mûrs (planche 2). Cela se traduit, d'ailleurs, au niveau de la préparation des coupes par un détachement des cellules, une par une, rendant très difficile la récupération sur les grilles d'observation.

On note également une désorganisation importante des fibrilles de celluloses dans les 2 types de coupes, visibles au niveau des espaces intercellulaires.

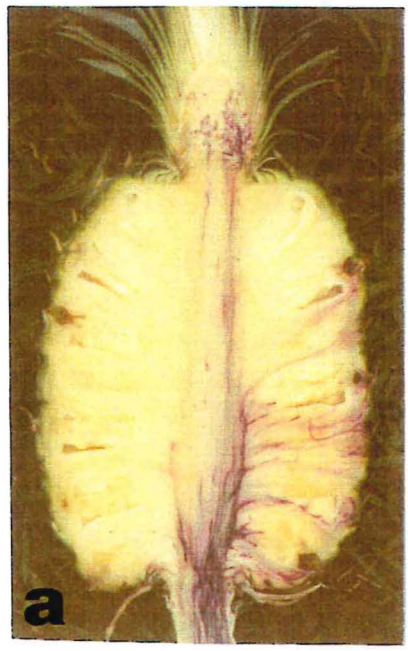
Le cytoplasme paraît se dégrader car il apparaît très granuleux et vésiculeux et le système membranaire est plus discontinu dans les fruits jaunes que dans les fruits très mûrs, ce qui doit se traduire par une fonction métabolique diminuée. Les plastes, très dégénérés, présentent souvent de fortes inclusions lipidiques surtout dans les fruits jaunes. Les ribosomes et parfois polysomes, sont moins fréquents dans les coupes de fruits translucides. On retrouve assez fréquemment dans les 2 types de fruits des structures dites "finger print" ou figures myéliniques, déjà présentes dans les fruits moyennement mûrs. Ces structures indiquent une différenciation des cellules très avancées, il s'agit d'enroulements membranaires à l'intérieur de vésicules où ils sont hydrolysés. Cependant, dans les 2 types de fruits des signes d'activités métaboliques, avec des invaginations de la membrane plasmique et formation de vésicules, sont visibles.

Les signes de dégradation des structures cellulaires apparaissent avec la sénescence, ils sont plus accentués dans les fruits translucides. On peut considérer que dans les fruits translucides les cellules sont beaucoup plus proches de la mort et de la désintégration que dans les fruits très mûrs normaux, car les signes de dégradation (granulosité du cytoplasme, fréquence de la discontinuité des membranes, désorganisation des parois) sont plus évidents et plus fréquents. Une partie des cellules conserve une certaine intégrité leur permettant d'assurer des fonctions métaboliques, ce qui suppose un certain respect de la compartimentation.

PLANCHE 1 :

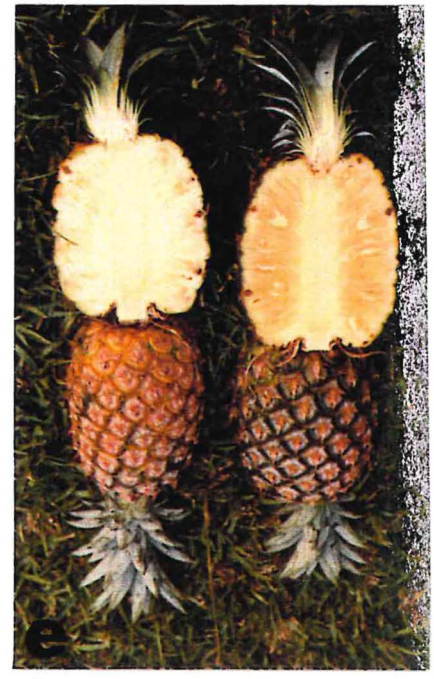
a) et b)

Méthode d'injection de régulateurs chimiques dans les fruits et visualisation de la répartition à l'intérieur du fruit.



c

d

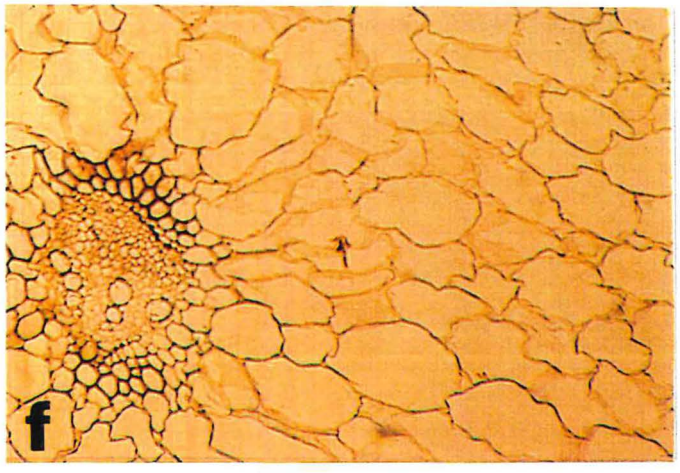


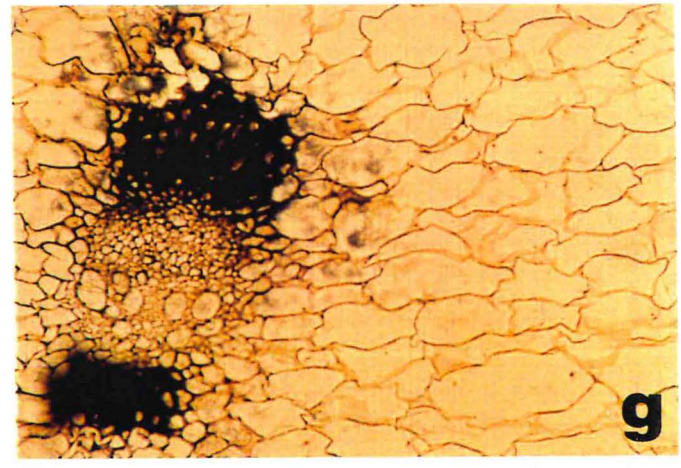
e

c) Fruit normal

d) Fruit "jaune"

e) Comparaison fruits normal et "jaune" traités à l'éthéphon





f) et g) Respectivement parenchyme de pulpe de fruit normal et de fruit "jaune".

LEGENDES PLANCHE 1 :

QUELQUES CARACTÉRISTIQUES DE L'ANANAS SAIN OU "JAUNE"

a) Un colorant (2,5ml de rouge neutre ou de bleu de méthylène) est injecté dans le pédoncule au moyen d'une pipette pasteur. La solution est entraînée dans le flux de sève en 3 ou 4 heures et le colorant réparti dans le fruit par le système vasculaire. On peut constater que la répartition est très hétérogène dans la pulpe mais il peut être, localement, transporté et diffusé jusque sous la peau.

b) Lorsqu'on utilise du thiosulfate d'argent au lieu d'un colorant, celui-ci ne peut être facilement visualisé dans la pulpe. Par contre, on peut constater, du fait son action inhibitrice sur les effets de l'éthylène et donc sur la dégradation des chlorophylles de l'épiderme, que sa répartition dans le fruit est également hétérogène et probablement similaire à celle du colorant. L'inhibition de la destruction des chlorophylles est plus ou moins localisée en plages hétérogènes.

c) et **d)** La section transversale d'un fruit normal montre une pulpe opaque et jaune pâle. La même section d'un fruit "jaune" montre que le centre des yeux devient translucide, le coeur et la zone épidermique étant épargnés. La coloration de la pulpe apparaissant plus jaune est à l'origine du nom de l'accident physiologique.

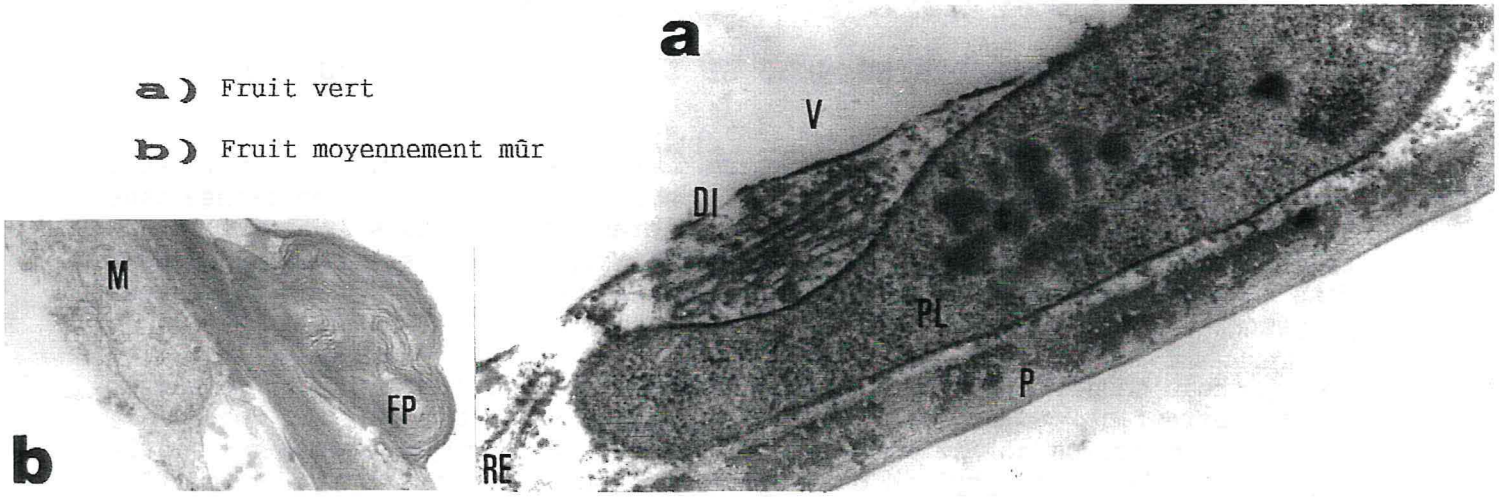
e) Comparaison de la coloration externe (épiderme) d'un fruit normal et d'un fruit "jaune" après traitement éthéphon pour détruire les chlorophylles. On peut constater que le fruit translucide est resté insensible au traitement.

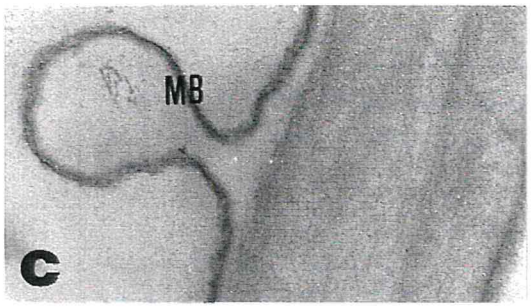
f) et **g)** L'observation en microscopie optique du parenchyme de fruit sain ou jaune ne montre pas de différence claire entre le 2 types de fruits. Les parois des cellules paraissent intactes et la taille des vacuoles qui occupent la quasi totalité du volume de la cellule, font apparaître ces dernières comme vides. On peut observer sur le côté gauche des photos un faisceau vasculaire libéro-ligneux. (grossissement x1300, inclusion en paraffine après fixation au glutaraldéhyde, coloration des coupes à l'hématoxyline après traitement à l'alun de fer, puis rouge de ruthénium). Les tâches noires de la photo **g)** correspondent à une accumulation de colorant.

PLANCHE 2 :

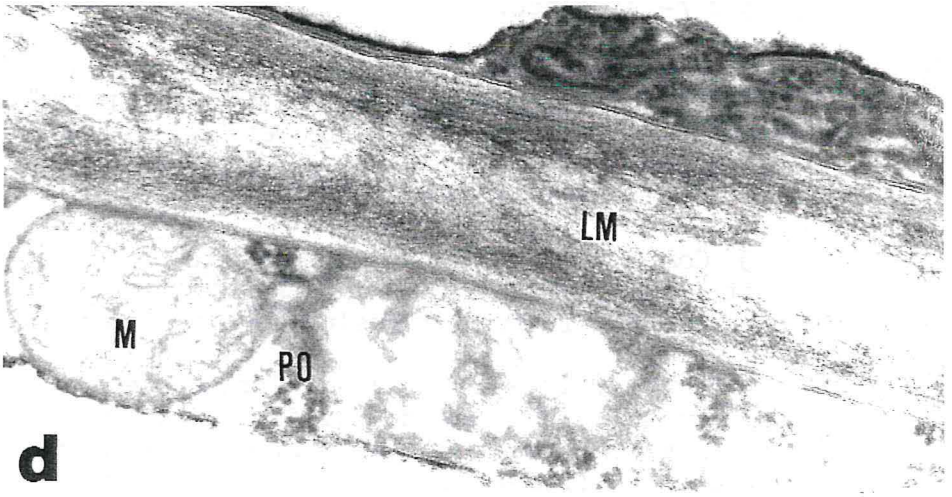
a) Fruit vert

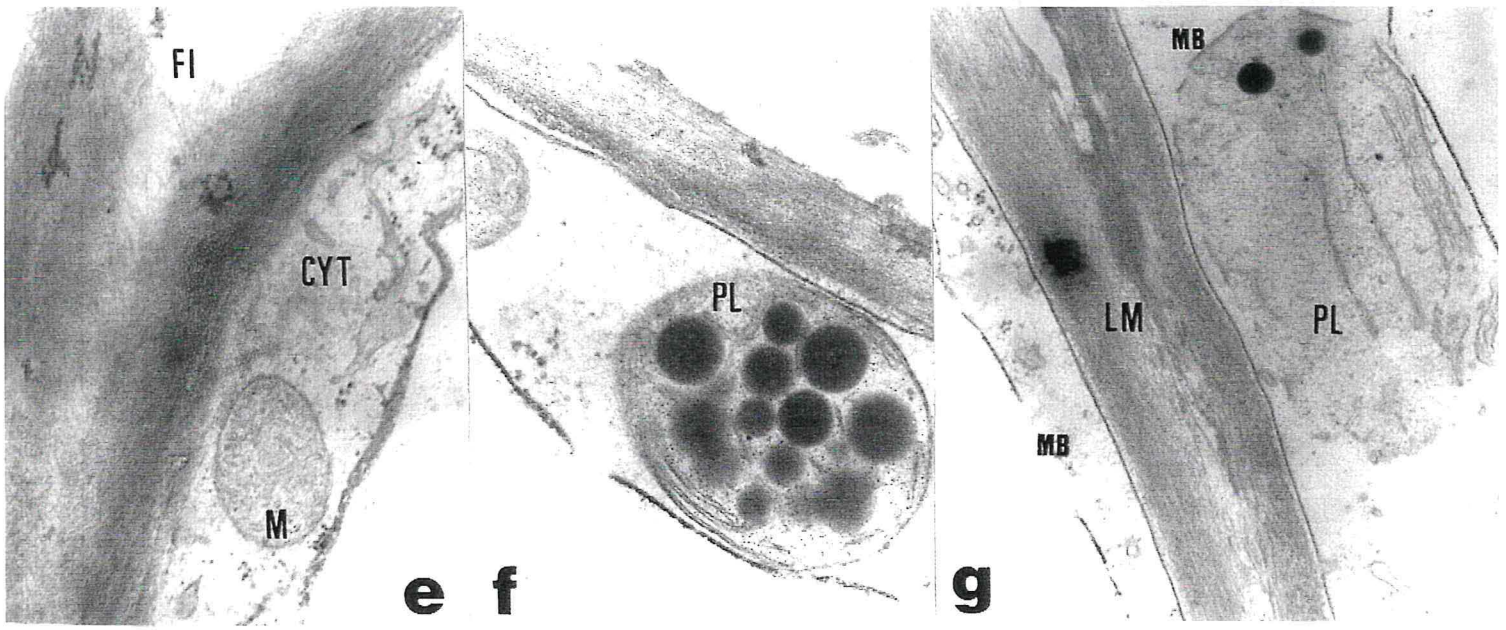
b) Fruit moyennement mûr





c) et d) Fruit très mûr





e) f) et g) Fruit "jaune"

LEGENDES PLANCHE 2 :

EVOLUTION STRUCTURALE DES CELLULES DE LA PULPE DE L'ANANAS AU COURS DE LA MATURATION ET DE LA SENESCENCE (NORMALE OU EN CAS DE "JAUNE")

a) Dans le fruit vert (mais proche de la maturation: juste avant le début de coloration naturelle), le cytoplasme présente des structures intactes et indiquant une capacité métabolique certaine. On peut constater la présence de Dictyosome (DI), d'un réticulum endoplasmique granuleux (RE), et de (pro)plaste en évolution (système lamellaire visible et présence de plastoglobuli, PL); vacuole (V) et paroi squelettique fine (P); (x54000).

b) Le fruit moyennement mûr (150 à 155 jours après TIF), présente encore des mitochondries dont les structures internes sont discernables (M) et fréquemment des structures lamellaires dites "finger print" (FP) ou figures myéliniques, correspondant à des zones d'enroulement de membranes en cours de lyse; ces zones sont plus ou moins typiques de cellules très différenciées ou en début de sénescence (X27000).

c) Dans les fruits très mûrs, on trouve encore fréquemment des invaginations de la membrane plasmisque (MB) dans la vacuole, signe d'activité métabolique; (x80000).

d) Dans ces mêmes fruits très mûrs, on note également la présence des mitochondries (M) dont les structures internes sont visibles, de polysomes (PO), signes d'activité métabolique et la disparition de la lamelle moyenne (LM) des parois qui se traduit par un éclaircissement de la zone correspondante sur les photos; (x80000).

e) Dans les fruits translucides, on constate souvent une désorganisation des fibrilles de cellulose (FI), visible surtout au niveau des méats intercellulaires, le cytoplasme (CYT) présente un aspect plus granuleux, signe de dégénérescence, mais les mitochondries sont toujours visibles et conservent un aspect sensiblement identique à celles des fruits mûrs; (x80000).

f) Ces mêmes fruits présentent des plastes dégénérés contenant de nombreux plastoglobuli (PL); (x40000).

g) Enfin, on retouve dans les fruits "jaunes" une lamelle moyenne très peu dense (LM), des sytèmes membranaires discontinus (MB) et des plastes complètement dégénérés (PL), signes de la dégénérescence globale de la cellule; (x40000).

Tableau 21: Comparaison de quelques caractéristiques des ananas normaux ou "jaunes"

	Translucidité moyenne	Taches noires	AL (méq.100ml^{-1})	ESS (%)
Fruits normaux	0	42%	13,40±0,83	16,46±0,60
maxi			15,30	18,40
mini			10,60	15,00
Fruits "jaunes"	3,1	10%	10,07±1,56	16,50±0,64
maxi			14,30	17,80
mini			7,30	15,40

Chaque lot comprend une quinzaine de fruits, classés en translucides ou non translucide par observation de la section transversale médiane. Le lot de fruits translucides comprend divers stades du phénomène, ce qui explique que la note de translucidité soit de 3,1 (sur une échelle de 1 à 5, respectivement, de 0 à 100% de translucidité). Les tâches noires sont des zones brunies sous l'action d'un champignon pathogène *Penicillium funiculosum.* Les analyses sont effectuées sur les jus obtenus par broyage et filtration individuellement pour chaque fruit.

Tableau 22: Comparaison des teneurs en différents acides organiques des pulpes des fruits normaux et translucides

Acides (mg.100g^{-1}frais)	Citrique	Malique	Succinique	Oxalique	Aconitique Cis	Aconitique trans
Fruits:						
NoOrmaux	650,7	205,0	54,5	4,0	0,41	0,52
Jaunes	301,1	130,0	17,5	3,9	0,33	0,46

Les analyses de ces fruits ont été réalisées par HPLC (M.MARCHAL, Montpellier). En Côte d'Ivoire, les pulpes de différents fruits de même qualité sont réunies pour former des échantillons de 100g, lesquels sont fixés à l'alcool bouillant pendant 45min. Les analyses sont faites après extraction totale par épuisements successifs à l'alcool bouillant).

II-1-4 Caractéristiques biochimiques générales

II-1-4-1 Acidité libre, Extrait sec soluble

Les différences entre fruits translucides et normaux sont extrêmement variables en fonction de l'âge des fruits; du degré de translucidité ou de la période durant laquelle les fruits ont été récoltés.

Le tableau 21 présente un exemple de ces différences entre deux lots, un translucide l'autre non, du même âge et issus de la même parcelle d'expérimentation.

On notera à titre indicatif, chez les fruits "jaunes", le faible pourcentage de fruits atteints par les brunissements dûs aux champignons *Penicillium funiculosum*. Ceci et le fait que, très souvent, on peut détecter une odeur d'alcool due à un début de fermentation, suggèrent que l'atmosphère au sein d'un fruit translucide serait très pauvre en oxygène par rapport à un fruit sain.

Les fruits translucides sont en général moins acides que les fruits normaux, ce qui écarte l'hypothèse d'une fermentation acide, alors que leur extrait sec est identique. L'augmentation du rapport ESS/AL fait que les fruits jaunes paraissent plus sucrés que les fruits normaux mais aussi plus fades lorsque le degré de translucidité est plus fort. La diminution de l'acidité concerne les 3 principaux acides détectés par HPLC (tableau 22), acides citrique, malique et succinique. La respiration du fruit consomme probablement ce qui reste du pool des acides organiques accumulés pendant le développement du fruit, mais dans le fruit translucide le processus est plus avancé.

L'acidité libre représente environ 70% de l'acidité totale laquelle diminue avec la surmaturation et plus encore avec la translucidité (tableau 23). Le rapport AL/AT baisse également. On peut supposer que les acides libres, plus accessibles à la respiration, sont consommés plus rapidement mais tout le pool d'acides organiques est utilisé dans le processus. De fait, la teneur en éthylène des fruits atteints est supérieure à celle des fruits normaux du même âge, ce qui doit probablement accélérer la respiration. Cependant une autre alternative peut être une diminution plus forte de la synthèse des acides dans les fruits jaunes, la teneur en acides dépendant en fait de l'équilibre entre la consommation par la respiration et la synthèse (ß-carboxylation).

Tableau 23: Rapports Acidité libre / Acidité totale

(méq.100ml^{-1})	Acidité Libre (AL)	Acidité Totale (AT)	AL en % du total
fruits normaux	11,6±1,2	17,4±1,5	66,6%
fruits surmûrs	7,7±0,7	13,4±1,2	57,5%
fruits jaunes	5,4±1,0	12,0±1,4	45,0%

AL: neutralisation directe du jus par NaOH N/10; AT neutralisation de 2ml de jus par NaOH N/50 après passage sur résine échangeuse d'ions (sous forme H^+).

II-1-4-2 Acide ascorbique et Thiols

Sur deux autres séries de fruits normaux et translucides, on a comparé les teneurs en acide ascorbique et thiols réduits et les rapports entre forme réduite et le total des formes réduites plus oxydées (tableau 24).

Tableau 24: Teneurs en Ac Ascorbique et Thiols du jus d'ananas et rapport des formes réduites sur le total réduit plus oxydé

	AL méq.100ml^{-1}	ESS (%)	AA (mM)	AA/ (AA+DHA)	Thiols (mM)	GSH/ GSH+GSSG
Série 1						
Normaux	9,7±1,1	16,0±0,7	5,2±0,9	0,35±0,06	0,11±0,01	0,90±0,14
Jaunes	7,3±0,6	16,1±0,6	4,5±0,6	0,31±0,05	0,12±0,02	0,92±0,07
Série 2						
Normaux	12,1±1,2	15,8±0,5	6,2±0,7	0,41±0,04	0,14±0,03	0,85±0,05
Jaunes	9,1±2,0	15,1±0,6	4,3±0,6	0,39±0,03	0,12±0,01	0,88±0,08

Chaque série comprend 2 lots de 20 fruits très mûrs avec ou sans translucidité; les mesures sont effectuées sur le jus de la partie médiane des fruits, ESS par réfractométrie, AL par neutralisation de 10ml de jus avec NaOH N/10, Thiols réduits par réactif au DTNB, Thiols oxydés, idem après réduction par la glutathion réductase, AA par DCIP, DHA par le réactif à la DNPH.

Dans les 2 séries, les fruits jaunes ont une plus faible acidité pour un ESS identique. L'acide ascorbique suit la même évolution que les autres principaux acides. Au contraire, les teneurs en thiols sont identiques dans les 2 types de fruits.

La proportion des formes réduites par rapport au total forme réduite plus forme oxydée, est identique dans les deux types de fruits aussi bien pour les thiols que pour l'acide ascorbique. Pour ce dernier, cela signifie une diminution de l'ensemble des 2 formes et un arrêt précoce de sa

synthèse dans les fruits translucides. Mais, dans le fruit translucide, sa régénération sous forme réduite par le glutathion se poursuit, ce dernier est lui-même maintenu à l'état réduit par la glutathion réductase. Les cellules sont encore capables de produire suffisamment de pouvoir réducteur sous forme de NADPH réduit pour assurer le fonctionnement de l'enzyme.

II-1-4-3 Composés phénoliques

Une analyse qualitative par HPLC des composés phénoliques de la pulpe et de ceux associés plus spécifiquement aux parois dans les fruits très mûrs ou translucides a été réalisée (voir annexe 1, fig. C,D et I,J).

On peut identifier sur les chromatogrammes des extraits de pulpe les mêmes pics pour les 2 types de fruits. Seuls 2 composés mineurs non déterminés, avec des temps de rétention longs (>25min), avec un maximum d'absorption vers 280nm disparaissent dans les fruits translucides. Par contre, les hauteurs relatives des pics varient beaucoup, il semble qu'il y ait une interconversion des différents composés en 2 formes principales, l'une absorbant vers 280nm (pic n°9) et de nature indéterminée, l'autre à 310-320nm (pic n°16), dont les caractéristiques UV sont proches de celles de l'acide p-coumarique (voir fig.E, en annexe 1 et page 92). Il peut s'agir d'une hydrolyse des diverses formes existant dans la cellule, en acide p-coumarique ou un dérivé très proche.

Il n'y a pas de différence qualitative de composition au niveau des parois, entre les différents fruits, les chromatogrammes pour des fruits de 165jours normaux ou "jaunes" sont pratiquement identiques (fig. I et J en annexe 1). La plupart des dérivés présents sont du type hydroxycinnamique avec des maxima d'absorption vers 320nm. Les pics majeurs correspondent à des composés dont les caractéristiques UV sont proches des acide férulique (pics n°5 et 21) et p-coumarique (pic n°4, voir page 94).

II-1-4-4 Ethylène

La répartition de l'éthylène dans le fruit très mûr est similaire à celle des fruits normaux, présentée dans le chapitre I "Maturation". Cependant la zone basse, la plus atteinte, a une teneur plus faible que la zone médiane (tableau 25).

Tableau 25: Teneurs en éthylène des différentes zones du fruit très mûr.

Teneurs en éthylène ($\mu l.l^{-1}$)	coeur	pulpe centrale	pulpe externe
haut	0,87	1,20	0,96
milieu	1,16	1,42	1,21
bas	0,64	1,09	1,23

Les mesures ont été effectuées sur 15 fruits très mûrs; après avoir réuni les parties homologues de chaque fruit, le gaz est extrait.

La teneur en éthylène de fruits moyennement translucides récoltés 150 jours après TIF est de 1,5ppm, identique à celle des fruits normaux récoltés dans la même parcelle 13 jours plus tard (163jours). Des fruits complètement translucides récoltés à 157 jours ont une teneur nettement plus faible, entre 0,8 et 1,0ppm. Il faut noter cependant que le volume de gaz extrait des fruits, diminue de moitié entre fruits normaux et fruits moyennement translucides (250ml contre 125ml) et l'extraction devient très délicate avec les fruits complètement translucides. C'est la conséquence de la disparition de l'air des espaces intercellulaires. Le niveau des teneurs en éthylène des fruits translucides peut traduire une précocité anormale de la sénescence, le maximum de production étant atteint plus tôt que dans les fruits normaux. Une autre alternative serait une production d'éthylène accrue dans un fruit encore "jeune" en réponse à un stress, lui-même cause première du phénomène. La synthèse d'éthylène chez les végétaux est souvent associée aux stress (YANG, 1981 et 1984). La production diminue ensuite dans les fruits très translucides, quand le fruit perd ses capacités de survie.

II-1-4-5 Modification de la perméabilité membranaire

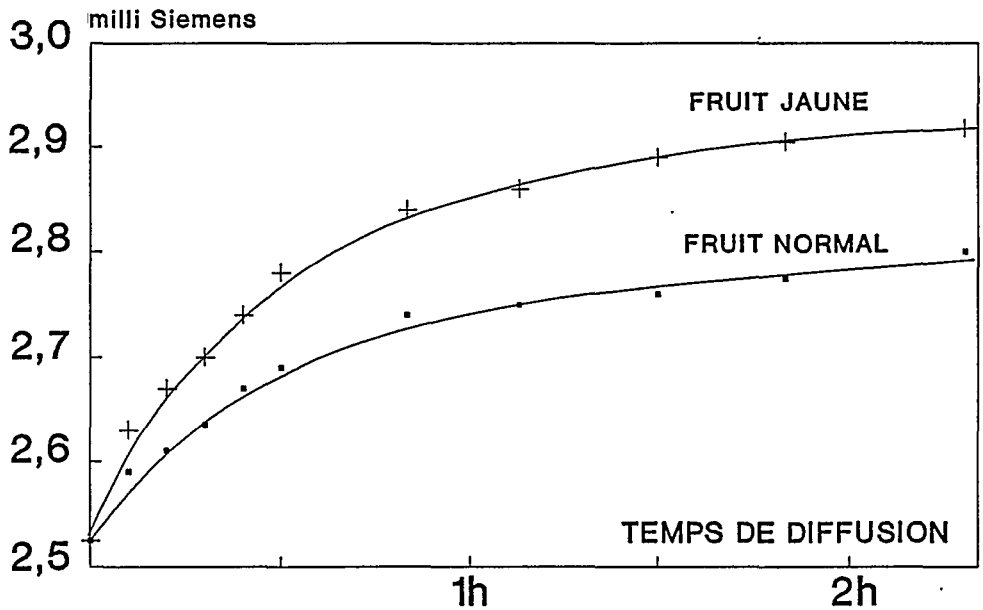
La translucidité de la pulpe est due à l'envahissement des espaces intercellulaires par le "jus". Etant donné que les structures cellulaires semblent ne pas être détruites en cas de jaune, le "jus", dans la zone apoplastique, provient soit du flux de sève soit des cellules elles-même, s'il se produit une importante modification de perméabilité membranaire. On peut tenter de mettre en évidence une telle modification, en mesurant l'efflux de quelques éléments du contenu vacuolaire à partir de morceaux de pulpe "jaune" ou normale, dans des milieux liquides fortement hypotoniques (eau) ou faiblement hypotoniques (eau + saccharose ou mannitol).

Dans une première série d'expérimentations, ont été effectuées des mesures de conductance en continu, pouvant refléter l'efflux du contenu des cellules dans un milieu liquide. La figure 60 montre l'augmentation de la conductance du milieu (tampon acétate pH=4,5 osmolarité ramenée à 0.3M par du mannitol), dans lequel on met à incuber 5g de pulpe découpée en cubes d'environ 0,5cm de côté. **La conductance du milieu augmente plus vite avec la pulpe de fruit jaune que celle de fruit normal. L'efflux des solutés est donc plus important à partir des fruits à chair translucide.** Cela peut suggérer une perméabilité plus forte pour les fruits translucides. Cependant l'efflux ainsi mesuré ne signifie pas forcément qu'il y a modification des perméabilités membranaires. On ne peut écarter l'hypothèse de lésions des cellules par la découpe de la pulpe, plus importantes dans les fruits translucides qui sont plus fragiles. Par ailleurs, il faudrait mesurer ce que représente l'efflux par rapport à la totalité des solutés de la cellule pour pouvoir affirmer que la mesure prend en compte effectivement des solutés sortant de la vacuole et non uniquement ceux déjà présents dans l'apoplaste et qui pourrait avoir une autre origine que les vacuoles. Ce qui pourrait être le cas si l'envahissement des espaces intercellulaires résulte d'un afflux d'eau par la voie apoplastique à partir des vaisseaux.

Dans une seconde série d'expérimentations, a été suivi l'efflux dans le temps des 3 cations majeurs (K^+, Mg^{++}, Ca^{++}), des composés phénoliques et des hydrolases acides précédemment citées. On a supposé que ces dernières étaient essentiellement vacuolaires dans la mesure où elles le sont dans la feuille de l'ananas (BOLLER et KENDE, 1979).

L'efflux global des ions est différent dans 2 expérimentations qui ont été réalisées à 2 époques différentes: la première expérimentation (ajustement de l'osmolarité des solutions par le saccharose) a été réalisée avec des fruits récoltés en janvier au début de la saison sèche, la seconde (ajustement de l'osmolarité des solutions par le mannitol) avec des fruits récoltés en mars, après le retour des pluies. D'autre part, une légère modification a été introduite dans la seconde expérimentation: avant

Fig.60: DIFFUSION DES SOLUTES DU JUS
A PARTIR DE LA PULPE (CONDUCTANCE)



5g de pulpe sont mis à incuber dans 20ml de tampon acétate 0,1M, pH=4,5 et ramenés à 300mOsmoles par du mannitol. L'évolution de la conductance est mesurée avec un conductimètre standard (0-200mS; sonde K=1,0).

incubation, les pulpes sont lavées dans une solution de mannitol au lieu d'eau distillée pour éviter un éclatement des cellules des couches superficielles.

Les différences de comportements des fruits dans le même milieu hypotonique (eau), entre les 2 expérimentations, est difficilement explicable par les seules modifications de protocole (fig.61 et 62). Il faut probablement en rechercher l'explication au niveau de la fragilité de la pulpe qui peut varier beaucoup suivant les conditions du milieu et l'état de surmaturité.

Si les efflux totaux dans l'eau sont différents dans les 2 expérimentations, on peut considérer en revanche que les comportements relatifs entre les fruits normaux ou jaunes, dans les 2 milieux ne sont pas très différents (fig.61 et 62). L'efflux des 3 ions dans l'eau est pratiquement identique pour les 2 types de fruits. Dans un milieu hypotonique, une forte entrée d'eau dans les cellules entraînerait leur éclatement et un efflux maximum de solutés. Dans la première expérimentation, il est même presque total pour le potassium (90%) et important pour le magnésium (75%). On peut se demander si l'exclusion du potassium n'est pas accélérée par la présence de saccharose dans le milieu externe. Si ce dernier est absorbé par la cellule, le mécanisme d'absorption implique la sortie du potassium. L'antiport H^+/Saccharose (tonoplaste) entraîne une diminution de charge de la vacuole par rapport au cytosol et la différence de potentiel de membrane entre les 2 compartiments diminue. Il peut s'ensuivre un efflux de K^+ hors de la cellule.

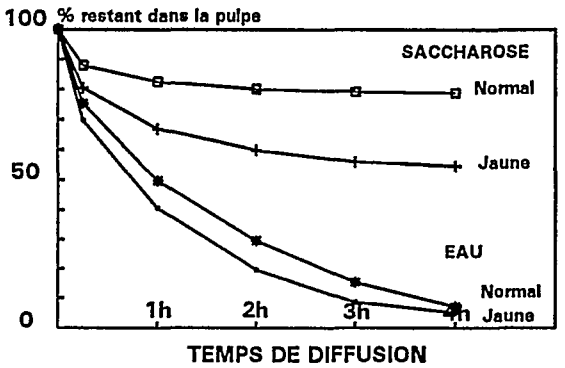
Dans les milieux faiblement hypotoniques (contenant du saccharose) les efflux de potassium et de magnésium sont plus forts à partir de la pulpe des fruits translucides. Cependant, si la différence est très nette dans la première expérimentation (milieu contenant du saccharose), elle l'est moins dans la seconde (milieu contenant du mannitol) où les efflux globaux sont plus faibles. Le calcium diffuse moins que les deux autres ions, surtout dans la première expérimentation, et son efflux est identique dans les 2 types de fruits. Le calcium intracellulaire est essentiellement réparti entre la vacuole et les parois. Son rôle dans la cellule, notamment au niveau du renforcement de la structure des parois en établissant des ponts calciques entre les molécules de pectines, peut expliquer qu'il soit partiellement moins mobile que les 2 autres ions.

Les composés phénoliques diffusent facilement à partir de la pulpe et les efflux sont tout à fait similaires à ceux du potassium (mesurés dans la première expérimentation uniquement, résultats non montrés).

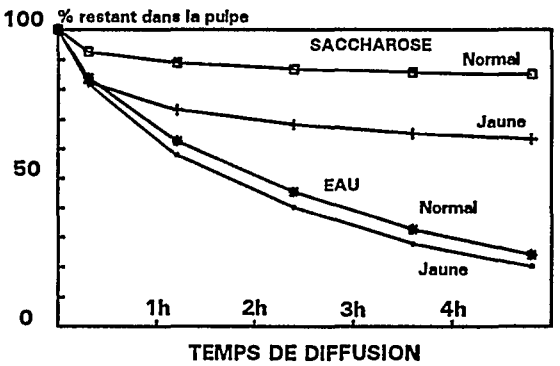
Les diffusions des hydrolases sont très faibles (tableau 26) puisque dans le meilleur des cas 10% de l'activité totale diffuse hors de la pulpe (milieu eau ou saccharosé). Les différences entre fruits ne sont pas

Fig.61: DIFFUSION DES IONS A PARTIR DE PULPE NORMALE OU TRANSLUCIDE (Milieu Eau ou Saccharosé)

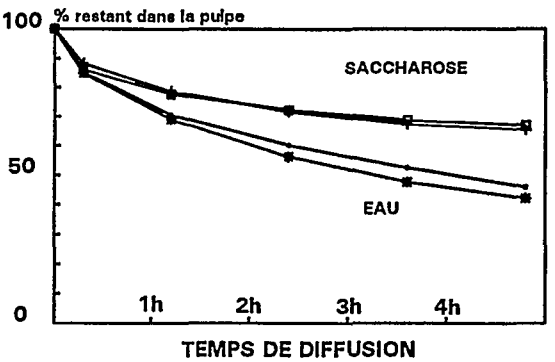
POTASSIUM



MAGNESIUM



CALCIUM



5g de pulpe incubés dans 20ml de solution (eau ou eau+saccharose avec une osmolarité voisine de celle du jus du fruit). Les solutions sont renouvelées aux temps de diffusion indiqués en abscisse. Les teneurs en K, Ca et Mg des solutions et de la pulpe restante sont mesurées par spectrophotométrie de flamme après calcination.

significatives. Ce résultat paraît contradictoire avec les précédents. De fait, si la perméabilité des membranes est fortement perturbée, les enzymes vacuolaires devraient également diffuser hors des cellules au moins en proportion plus importante. La très faible diffusion dans l'eau, alors que les cellules ont très probablement éclaté, peut être indicatrice de la difficulté pour ces molécules de franchir la barrière que constituent les parois (taille des molécules et charge).

Tableau 26: Pourcentage d'activités hydrolasiques restant dans la pulpe après 4 heures de diffusion.

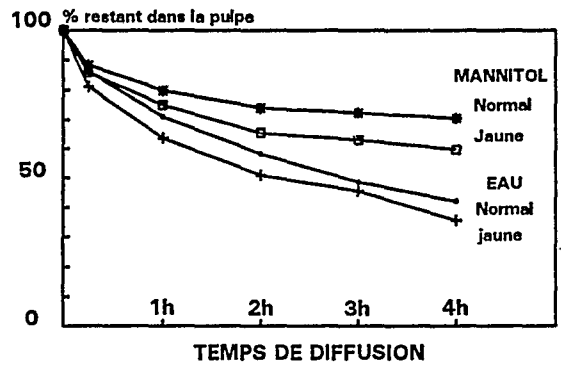
Activités enzymatiques	Fruit normal en Milieux hypotonique	isotonique (saccharose)	Fruit translucide en Milieux hypotonique	isotonique (saccharose)
Phosphatase	90,7	98,2	91,4	97,8
α-Mannosidase	98,3	99,8	99,1	99,7
α-Galactosidase	95,0	98,5	95,4	98,8
ß-Galactosidase	99,1	99,5	99,4	99,5
N-ac.Glucosaminidase	93,7	98,7	95,1	98,7

5g de pulpe découpée en cubes de 5mm incubés dans 20ml de solution (eau ou eau+saccharose); 3 répétitions sur fruits normaux et 2 fruits translucides; après 4h de diffusion, avec renouvellement des solutions à 15min puis toutes les heures, on mesure les activités enzymatiques ayant diffusé dans les solutions et celles restant dans la pulpe (voir matériel et méthodes); les résultats sont exprimés en activité restant dans la pulpe par rapport au total récupéré.

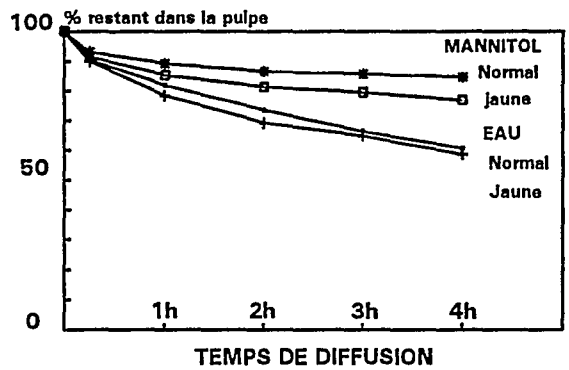
Fig.62: DIFFUSION DES IONS A PARTIR DE PULPE NORMALE OU TRANSLUCIDE

(Milieu Eau ou Mannitol)

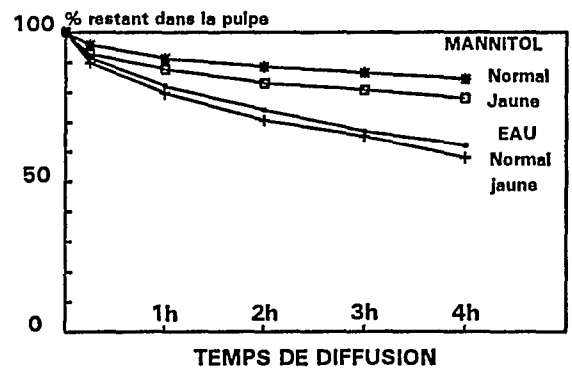
POTASSIUM



MAGNESIUM



CALCIUM



5g de pulpe incubés dans 20ml de solution (eau ou eau+mannitol avec une osmolarité voisine de celle du jus du fruit). Les solutions sont renouvelées aux temps de diffusion indiqués en abscisse. Les teneurs en K, Ca et Mg des solutions et de la pulpe restante sont mesurées par spectrophotométrie de flamme après calcination.

En résumé, les cellules des 2 types de fruits se comportent différemment vis-à-vis de la tonicité du milieu extérieur (milieu contrôlé avec du saccharose): faiblement hypotonique, l'efflux des petites molécules (composés phénoliques) ou des ions (au moins K^+ et Mg^{++}) est plus important pour les fruits "jaunes", ce qui suggère une moins bonne capacité de régulation des échanges cellule-milieu externe. Compte tenu du volume de la vacuole par rapport au cytosol et aux espaces intercellulaires, l'importance des efflux de ces composés, normalement vacuolaires, ne peut pas correspondre simplement à la diffusion de substances à partir des espaces intercellulaires, mais plutôt à un efflux des composés vacuolaires. La diffusion pourrait être liée à une augmentation de la perméabilité membranaire comme dans le cas des feuilles sénescentes (PENNAZIO *et al*, 1982) ou chez la pomme au cours de la maturation (FERGUSON et WATKINS, 1981). Cependant, la 2nde expérimentation (mannitol), ne confirme pas clairement cette hypothèse. La très faible diffusion des enzymes vacuolaires est troublante. Elle pourrait être due à une difficulté à franchir les parois squelettiques, car on l'observe même en milieu "Eau" où les cellules devraient éclater. Par ailleurs, le saccharose n'est pas neutre vis-à-vis de la membrane plasmique puisqu'il est accumulé dans la cellule pendant toute la vie du fruit. Sa présence dans le milieu extérieur pourrait modifier l'efflux des autres composés. En augmentant l'accumulation de saccharose dans les vacuoles, l'équilibre de charge peut être modifié et l'extrusion des ions vacuolaires s'accélérer (fig.61). Enfin, les différences d'efflux totaux entre les 2 expérimentations pourraient, également, refléter une variation de l'état de surmaturité et de fragilité de la pulpe liée à la période de récolte.

II-1-5 Caractéristiques enzymatiques: comparaison des fruits mûrs, sénescents et translucides.

La fin de la maturation de l'ananas se traduit par diverses évolutions enzymatiques (voir page 102). Les évolutions de ces activités au cours de la sénescence normale du fruit et dans le cas du "jaune" ont été comparées, pour avoir une approche biochimique de l'installation de la translucidité dans la pulpe du fruit.

Les analyses statistiques (analyses en composantes principales, ACP1 et 2; analyses factorielles discriminantes, AFD 1 et 2) portent sur des fruits de 149 jours après TIF ou plus. Les variables mesurées sont les activités enzymatiques caractérisées plus haut, auxquelles s'ajoutent ou non les analyses d'acidité libre, d'extrait sec soluble, d'acide ascorbique et des thiols (variables dites "chimiques" par la suite) et qui servent de contrôle de maturité.

Des fruits normaux sont récoltés à 4 stades de la fin de maturation (8 fruits par stade: 149, 156, 164 et 171 jours après TIF), ainsi que des fruits moyennement translucides (dénommés aussi demi translucides), à 156 jours, et translucides, à 164 jours. Sur les graphiques des ACP, les individus sont représentés par 4 chiffres, âges des fruits suivi du numéro de la répétition (fruits normaux), et par T/2 ou T, suivi du numéro de la répétition.

Abréviations utilisées pour désigner les variables dans le texte:
(pour des raisons techniques les abréviations utilisées pour les figures sont différentes de celles du texte, elles sont indiquées entre parenthèses)

chimiques:
- AL : acidité libre (ACL)
- THI: thiols (THI)
- ESS: extrait sec soluble (ESS)
- AA: acide ascorbique (ASC)

enzymatiques:
- αGAL: α-galactosidase (AGL)
- αMAN: α-mannosidase (AMN)
- NAG: N-acétylglucosaminidase(NAG)
- AIA: AIA oxydase (AIA)
- PPOX: polyphénoloxydase (POX)
- NQR: NADH quinone réductase (NQR)
- CAT: catalase (CAT)
- PG: polygalacturonase (PGA)
- ßGAL: ß-galactosidase (BGL)
- PHO: phosphatase (PHO)
- AA-PEROX: ascorbate peroxydase (AAX)
- PEROX: peroxydase (PER)
- MDH: enzyme malique (MDH)
- GSSG: glutathion réductase (GSG)
- SOD: superoxyde dismutase (SOD)

II-1-5-1 ACP1: toutes variables chimiques et enzymatiques

Les valeurs propres les plus intéressantes correspondent aux trois premiers axes mais celles des axes 4 à 6 sont encore supérieures à 1. Les pourcentages d'information apportée par les trois premiers axes sont de 27,6%, 17,1% et 11,9% soit 44,6% du total.

La représentation des individus sur le plan formé par les axes 1 et 2 montre que, suivant l'axe 1, les fruits sont classés par degré de maturation croissant (sens>0). Le long de l'axe 2 mais dans un seul des demi

plans délimités par l'axe 1, sont positionnés les fruits translucides (fig.63A); (voir qualité (QLT), corrélation (COR) et contribution (CTR) des représentations des variables ci-après (celles des individus sont présentées en annexe 2).

L'axe 1 (stade de maturité) est expliqué principalement par les variables NQR, PEROX et PPOX s'opposant à AL et THI (fig.63B). Elles ont des coefficients vecteurs propres ≥0.3 en valeurs absolues. Les fruits moins mûrs ont une plus forte acidité (on se situe dans la phase descendante de l'acidité), alors que leurs activités enzymatiques sont plus faibles et inversement pour les fruits très mûrs. Les activités AA-PEROX, AIA-OX viennent juste après avec des coefficients d'environ 0,25. On peut constater également que les variables αGAL et MDH ne participent pas du tout à la formation de l'axe 1, elles ont les coefficients les plus faibles (<0,07).

L'axe 2 (translucidité) est expliqué par cinq activités variant dans le même sens dont 3 hydrolases acides αGAL, ßGAL et NAG auxquelles s'ajoute la MDH (coefficients proches de 0,4) et la PG. Cependant la ßGAL et l'αGAL sont mieux représentées sur l'axe 2 que NAG et MDH. Ces dernières ont également un fort coefficient pour l'axe 3. Viennent ensuite les 3 autres hydrolases avec des coefficients d'environ 0,2. Le groupe αMAN, PHO est indépendant du groupe NAG, PG puisqu'ils ont sur le plan 1x2 des directions perpendiculaires (fig.63B). Les coefficients les plus faibles sont ceux des variables SOD, PEROX, PPOX et NQR (<0,1).

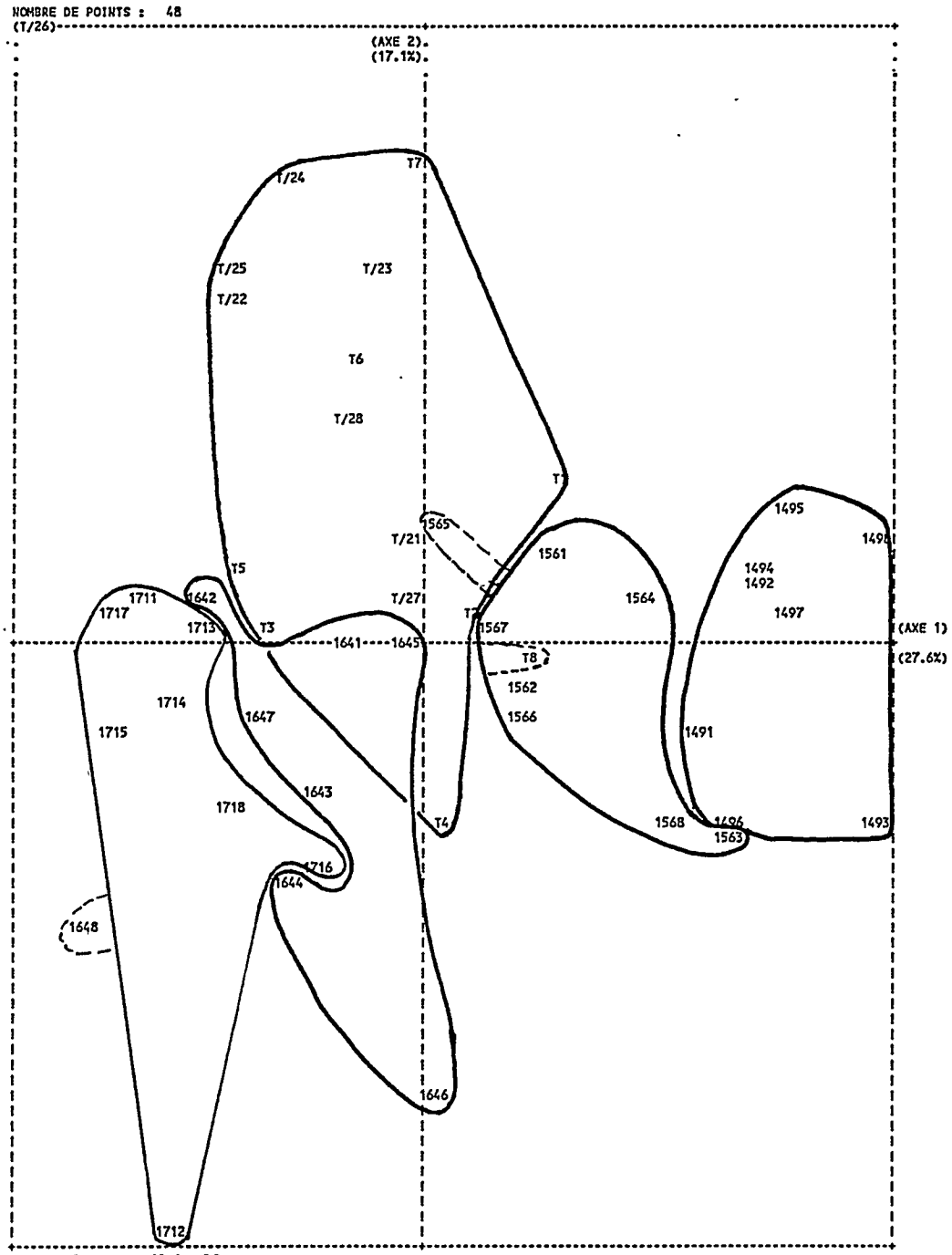
Un groupe de variables CAT, αMAN, AIA-OX, PHO et GSSG-R participe à la fois à la formation de l'axe 1 et de l'axe 2.

La différenciation des individus selon l'axe 3 implique beaucoup plus de variables (annexe 2, fig.A). Enfin, alors qu'il n'y a pas d'opposition nette entre variables enzymatiques sur le plan 1x2, il y en a une sur le plan 1x3 entre GSSG-R, MDH et PG, NAG (annexe 2, fig.B).

Les analyses chimiques classiques ont des corrélations faibles entre elles, inférieures à 0,4 en général sauf entre AL et THI (0,61) d'une part et AL et ASC (0,48) d'autre part (voir matrice des corrélation en annexe 2). Il faut signaler que ces corrélations deviennent fortes (>0,6) dès lors qu'on inclut dans l'analyse statistique, les mesures réalisées sur des fruits à des stades plus verts. D'autre part, AL est la seule variable chimique bien corrélée, mais négativement, avec des activités enzymatiques, GSSG-R et à un moindre degré NQR.

Les corrélations les plus fortes entre les variables enzymatiques sont positives et il n'y a aucune corrélation forte négative (voir matrice des corrélations en annexe 2). **Globalement, les activités peuvent être scindées en trois groupes principaux en fonction de leur répartition sur le cercle des corrélations (fig.63B).**

Fig.63A: Analyse en composantes principales ACP1
(représentation des individus sur les axes 1 et 2)



L'ACP1 prend en compte toutes les variables enzymatiques et chimiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.
Numérotation des individus, exemple: 1495= 149jours après TIF, répétition n°5; T1= fruit translucide, répétition n°1; T/21= fruit demi translucide (T/2), répétition n°1. Les individus appartenant à un même groupe de maturité sont entourés d'un même trait.

Le premier comprend PEROX, AA-PEROX, PPOX, NQR et avec des corrélations un peu plus faibles, AIA-OX. Il s'agit donc d'activités dues à des enzymes de type peroxydase (substrat gaïacol ou acide ascorbique) ou des enzymes similaires puisque l'activité AIA oxydase est due à une peroxydase (HARE, 1964) et qu'il semble que se soit également le cas pour les phénoloxydases de l'ananas (TEISSON, 1977). Aux quatre premières s'ajoute la NQR dont l'activité est liée aux précédentes.

Le second groupe comprend les activités PG et hydrolases acides (NAG, ßGAL, αGAL), hormis la PHO et l'αMAN (qui participent autant à la formation des 2 axes). L'αMAN n'est bien corrélée qu'avec la NAG. Les enzymes de ce groupe peuvent être impliquées dans le ramollissement des parois pendant la fin de maturation, ou dans la synthèse des parois puisqu'il y a augmentation du poids du fruit, de la taille des cellules et un taux constant de "fibres" jusqu'en fin de maturation.

Le troisième regroupe des activités ne présentant de corrélations intéressantes qu'avec une ou deux autres activités mais n'appartenant pas directement aux deux groupes précédants. La MDH est bien corrélée avec la ßGAL (0,60) et à un moindre degré avec αGAL (0,45) et GSSG-R (0,49). La CAT n'est moyennement corrélée qu'avec αGAL (0,45). La SOD n'est bien corrélée à aucune autre activité, la plus forte corrélation étant avec la NQR (0,43) dont un produit de réaction indirect, le H_2O_2, peut être utilisé par la SOD.

Tableau 27: ACP1- Qualité, corrélation et contribution des variables, axes 1 à 3.

	V	QLT	1#F	COR	CTR	2#F	COR	CTR	3#F	COR	CTR
1	PGA	744	340	116	22	449	202	62	-436	190	84
2	PHO	810	-400	160	31	309	95	29	98	10	4
3	AMN	758	-495	245	47	322	103	32	54	3	1
4	AGL	890	87	8	1	897	804	248	-156	24	11
5	BGL	896	-241	58	11	808	653	202	45	2	1
6	NAG	824	383	147	28	683	466	144	-451	203	90
7	PER	910	-801	642	123	-168	28	9	-394	155	69
8	AAX	817	-603	364	69	-311	97	30	-470	221	98
9	CAT	818	-263	69	13	363	132	41	-363	132	58
10	SOD	814	-349	122	23	-135	18	6	-273	74	33
11	AIA	708	-551	304	58	256	66	20	-264	70	31
12	POX	924	-695	483	92	58	3	1	-498	248	110
13	GSG	736	-555	308	59	217	47	14	610	372	165
14	NOR	878	-846	716	137	-113	13	4	- 29	1	0
15	MDH	830	-140	20	4	648	419	129	544	295	131
16	THI	732	676	457	87	- 12	0	0	-158	25	11
17	ACL	777	769	592	113	58	3	1	-410	168	74
18	ESS	854	-444	197	38	-186	35	11	-110	12	5
19	ASC	761	481	231	44	-233	54	17	-224	50	22
					1000			1000			1000

QLT = Qualité de la représentation globale

1#F = coordonnée sur l'axe 1
2#F = coordonnée sur l'axe 2
3#F = coordonnée sur l'axe 3

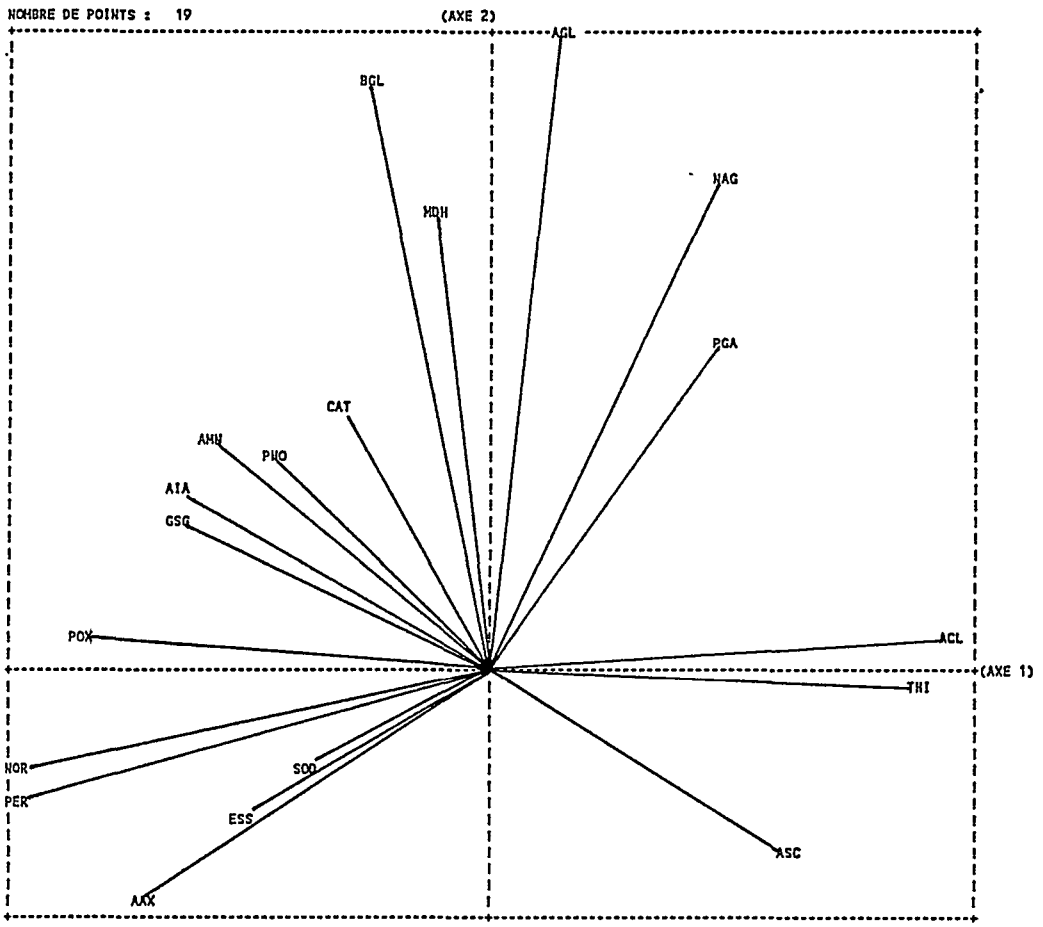
V = variables
COR = corrélation
CTR = contribution à l'axe

les COR sont multipliés par 1000

II-1-5-2 ACP2: variables enzymatiques seulement.

Cette seconde ACP est réalisée sur la même population que celle de l'ACP1. Elle a pour but de vérifier si l'on peut obtenir une définition

Fig.63B Analyse en composantes principales ACP1
(Représentation des variables sur les axes 1 et 2)



L'ACP1 prend en compte toutes les variables enzymatiques et chimiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.

AGL= α-galactosidase
PGA= polygalacturonase
PHO= phosphatase
PER= peroxydase
POX= polyphénoloxydase
NOR= NADH quinone réductase
MDH= enzyme malique
AAX= ascorbate peroxydase
ACL= acidité libre
ASC= acide ascorbique

BGL= β-galactosidase
AMN= α-mannosidase
CAT= catalase
AIA= AIA oxydase
SOD= superoxyde dismutase
GSG= glutathion réductase
ESS= extrait sec soluble
NAG= Nacétyleglucosaminidase
THI= thiols

aussi précise des axes maturité et translucidité avec les seules activités enzymatiques, les variables chimiques, AL, THI, ESS et AA étant mises en variables supplémentaires.

Les résultats obtenus ainsi sont effectivement très similaires à ceux de la première ACP (fig.64A). Les axes 1 et 2 représentent l'un le stade de maturité et l'autre la translucidité. Ils apportent respectivement 27% et 21,1% du total de l'information. La dispersion des individus sur le plan 1x2 est cependant un peu plus forte (voir la qualité des représentations des individus en annexe 2).

L'axe 1 (stade de maturité) est déterminé par les mêmes activités enzymatiques que dans l'ACP1, NQR, PEROX et PPOX (fig.64B). Les représentations de AA-PEROX et AIA oxydase sur les plans 1x2 et 1x3, restent proches de l'axe 1, ces activités participent donc également à sa détermination.

L'axe 2 (translucidité) est essentiellement déterminé par les hydrolases acides αGAL et ßGAL puis à un moindre degré NAG et MDH. Viennent ensuite les autres hydrolases. Les activités SOD, NQR et PPOX ont les coefficients les plus faibles.

Le même groupe de variables que dans la première analyse statistique, CAT, αMAN, AIA oxydase, PHO et GSSG-R participent à la fois à la formation de l'axe 1 et de l'axe 2.

On peut noter que l'axe 3 est déterminé essentiellement par la GSSG-R et à un moindre degré par la MDH (voir annexe page 254). On retrouve l'opposition très marquée sur le plan 1x3 entre GSSG-R, MDH et PG, NAG. Les activités PHO, αMAN et SOD et CAT sont très mal représentées à la fois sur les axes 1, 2 et 3.

Tableau 28: ACP2- Qualité, corrélation et contribution des variables, axes 1 à 3.

	V	QLT	1#F	COR	CTR	2#F	COR	CTR	3#F	COR	CTR
1	PGA	903	-272	74	18	488	238	75	-459	211	106
2	PHO	908	407	166	41	323	104	33	289	83	42
3	AMN	812	520	271	67	312	97	31	220	48	24
4	AGL	885	- 74	5	1	899	807	255	-179	32	16
5	BGL	906	228	52	13	789	622	196	56	3	2
6	NAG	842	-274	75	19	700	490	155	-490	240	121
7	PER	886	860	739	182	-186	35	11	-265	70	35
8	AAX	864	682	465	115	-326	106	34	-386	149	75
9	CAT	894	301	91	22	367	134	42	-310	96	48
10	SOD	970	401	161	40	-111	12	4	-173	30	15
11	AIA	757	630	396	98	263	69	22	-104	11	5
12	POX	933	802	644	159	47	2	1	-370	137	69
13	GSG	887	447	199	49	188	35	11	710	505	254
14	NOR	862	845	714	176	-106	11	4	176	31	16
15	MDH	858	57	3	1	634	402	127	586	343	172
					1000			1000			1000

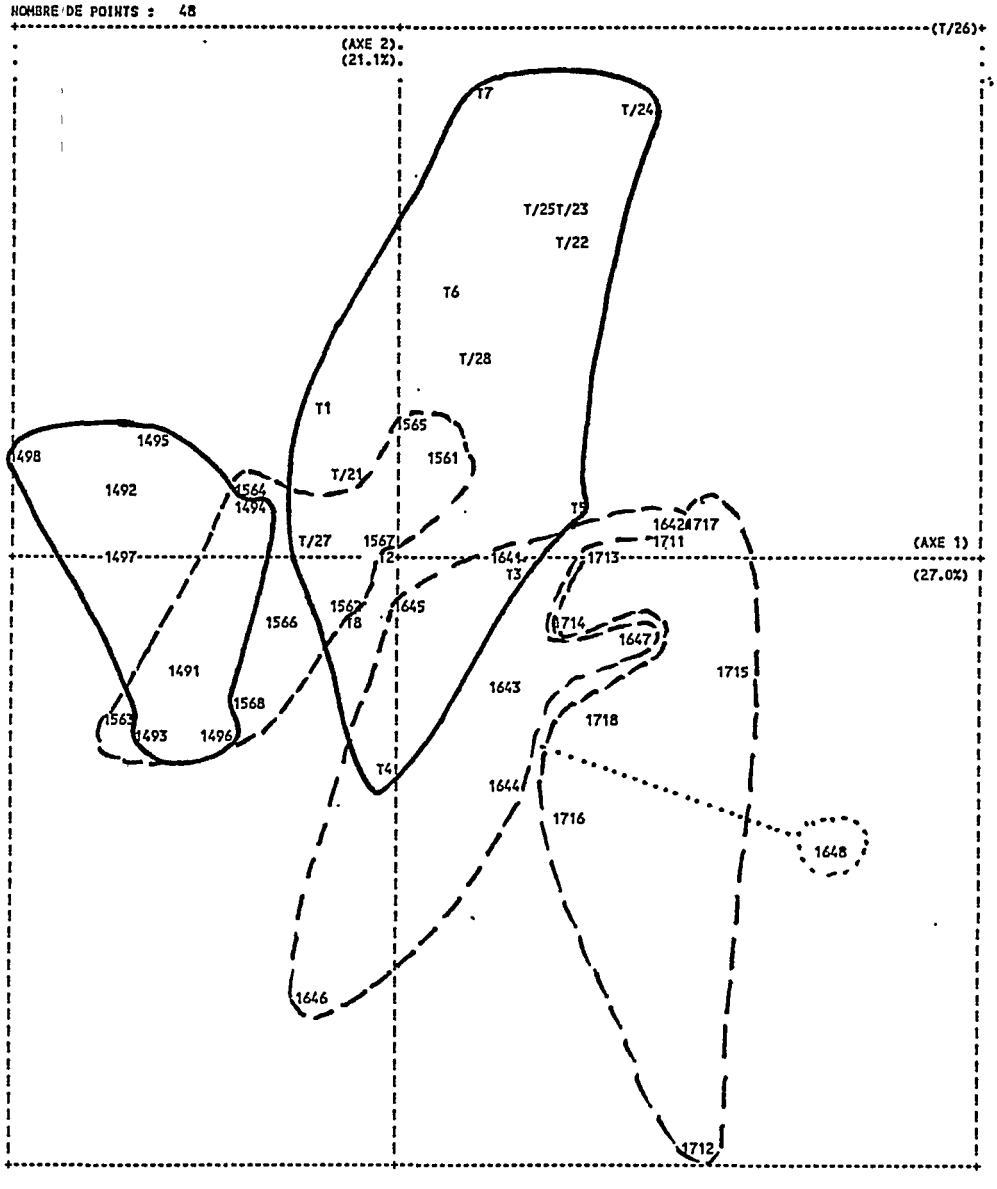
QLT = Qualité de la représentation globale

1#F = coordonnée sur l'axe 1
2#F = coordonnée sur l'axe 2
3#F = coordonnée sur l'axe 3

V = variables
COR = corrélation
CTR = contribution à l'axe

les COR sont multipliés par 1000

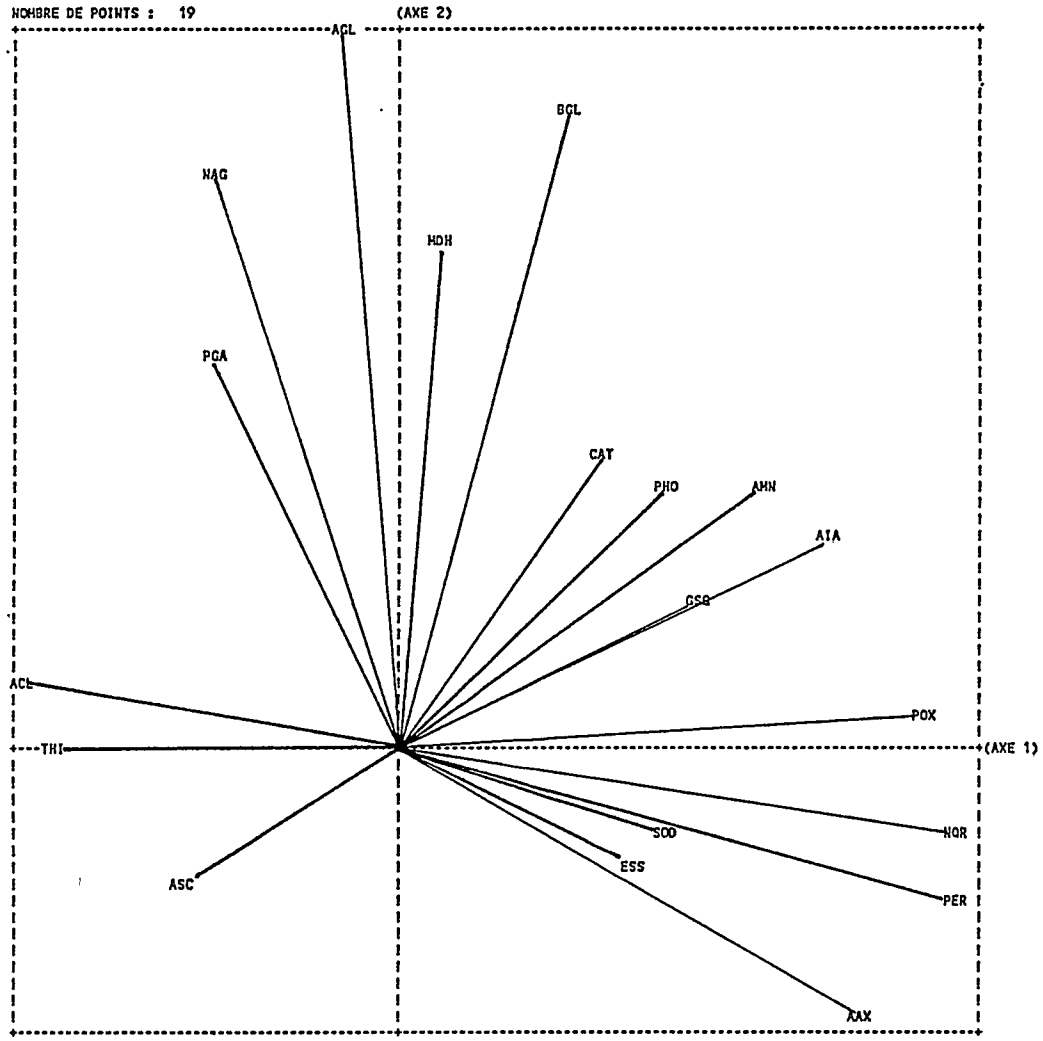
Fig.64A: Analyse en composantes principales ACP2
(représentation des individus sur les axes 1 et 2)



L'ACP2 prend en compte toutes les variables enzymatiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.
Numérotation des individus, exemple: 1495= 149jours après TIF, répétition n°5; T1= fruit translucide, répétition n°1; T/21= fruit demi translucide (T/2), répétition n°1. Les individus appartenant à un même groupe de maturité sont entourés d'un même trait.

En résumé, pendant la phase de fin de maturation, les fruits peuvent être classés suivant leur degré de sénescence en fonction de l'activité des peroxydases et d'une enzyme associée la NADH Quinone réductase. Et les fruits moyennement translucides se différencient des autres par l'activité des différentes hydrolases acides, ß galactosidase et α galactosidase et à un moindre degré N-acétylglucosaminidase, puis les α mannosidase et phosphatase et enfin l'enzyme malique. Dans les fruits totalement translucides, les activités diminuent et se retrouvent pratiquement au même niveau que celles des fruits normaux de même âge.

Fig.64B: Analyse en composantes principales ACP2
(Représentation des variables sur les axes 1 et 2)



L'ACP2 prend en compte toutes les variables enzymatiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.

AGL= α-galactosidase
PGA= polygalacturonase
PHO= phosphatase
PER= peroxydase
POX= polyphénoloxydase
NQR= NADH quinone réductase
MDH= enzyme malique
NAG= Nacétyleglucosaminidase

BGL= β-galactosidase
AMN= α-mannosidase
CAT= catalase
AIA= AIA oxydase
SOD= superoxyde dismutase
GSG= glutathion réductase
AAX= ascorbate peroxydase

et en variables supplémentaires
ACL= acidité libre
ASC= acide ascorbique

THI= thiols
ESS= extrait sec soluble

II-1-5-3 Analyses discriminantes

Avec l'analyse discriminante l'existence des groupes de maturité et de translucidité est posée a priori. On détermine, parmi les variables que nous avons mesurées, celles qui discriminent le mieux les groupes choisis.

Lorsqu'on intègre les stades verts (115 et 132 jours) dans l'analyse statistique, on les sépare des autres. Les quatre variables qui permettent cette discrimination sont les variables chimiques ESS, THI, AL et ASC par ordre décroissant d'efficacité. ESS, AL et ASC sont les analyses de routine qui sont faites dans la majorité des expérimentations sur ananas. Ces variables et surtout l'AL risquant d'avoir trop de poids par rapport aux autres, on ne les utilisera pas dans les AFD.

Dans les deux analyses discriminantes qui suivent, les groupes à discriminer sont les stades de maturité les plus avancés et les fruits translucides; les variables sont les activités enzymatiques.

II-1-5-3-1 AFD1: deux groupes: (stades de maturité) et (translucides)

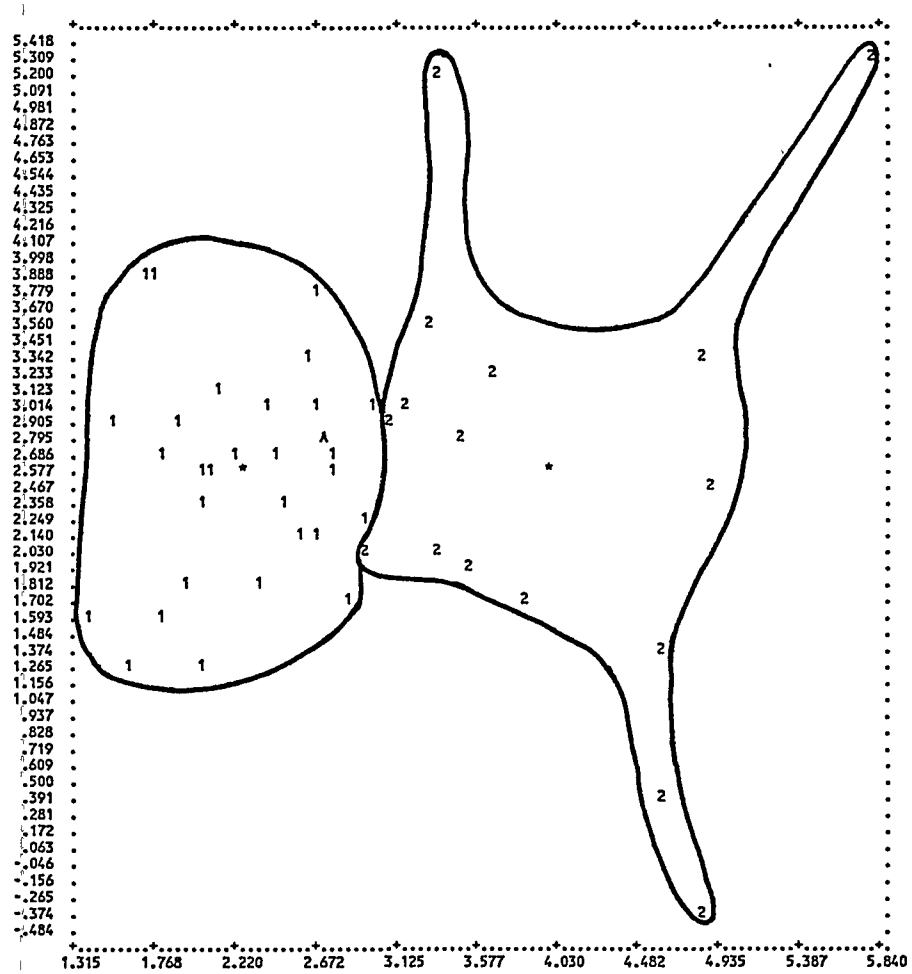
Dans cette première AFD on cherche à discriminer les fruits translucides des autres dans leur ensemble; le but est donc de trouver la ou les variables permettant de classer le plus distinctement possible, les individus en 2 groupes fruits normaux ou translucides, indépendamment de leur âge. La ßGAL permet de bien classer à elle seule 87,5% des individus, donc de différencier correctement fruits normaux et translucides.

Pourcentages d'individus bien classés dans les 2 groupes de fruits (normaux et translucides) en fonction du nombre de variables utilisées

ßGAL	+NAG	+NQR	+CAT	+GSSG-R
87,5%				
<---- 89,58%				
<---------- 91,67%				
<---------- 95,83%				
<---------- 95,83%				

La représentation graphique (fig.65) montre que la discrimination est très bien faite entre les fruits translucides et les fruits normaux, quel que soit leur stade de maturité. L'enzyme ßGAL est fortement liée à la translucidité et la NAG est la seconde variable discriminante, mais l'information supplémentaire qu'elle apporte est faible (+2,08%). Il manque

Fig.65: Analyse factorielle discriminante AFD1
2 groupes à discriminer: 1 = les stades de maturité
2 = translucidité



la moyenne de chaque groupe est indiquée par *
la lettre A indique la superposition de 2 individus

cependant dans le tableau, l'αGAL qui était un des meilleurs facteurs explicatifs de l'axe 2 de translucidité. Ceci signifie simplement que l'αGAL n'apporte pas d'information complémentaire à celle déjà apportée par ßGAL et non qu'elle est très inférieure. La NQR apparaît au troisième pas, elle était un des principaux facteurs explicatifs du stade de maturité. Cette activité paraissait relativement indépendante des précédentes activités puisqu'elles étaient placées perpendiculairement les unes aux autres sur les plans 1x2 des ACP. Il est donc normal qu'elle puisse donner une information complémentaire aux précédentes. On notera cependant qu'elle est négligeable, environ 2%. Il en est de même pour les suivantes.

II-1-5-3-2 AFD2: six groupes; 4 stades de maturité et 2 stades de translucidité

Dans cette seconde AFD les quatre stades de maturité et les deux stades de translucidité sont les groupes à discriminer.

La NQR permet de classer 50% des individus dans les groupes, et avec la ßGAL 64,6% des individus sont bien classés (fig.66). On retrouve donc les enzymes correspondant aux 2 premiers pas de l'AFD précédente, et expliquant respectivement, selon les ACP 1 et 2, l'une le stade de maturité (axe 1 des ACP) et l'autre la translucidité (axe 2 des ACP).

Pourcentages d'individus bien classés dans les 6 groupes de maturité et de translucidité en fonction du nombre de variables utilisés.

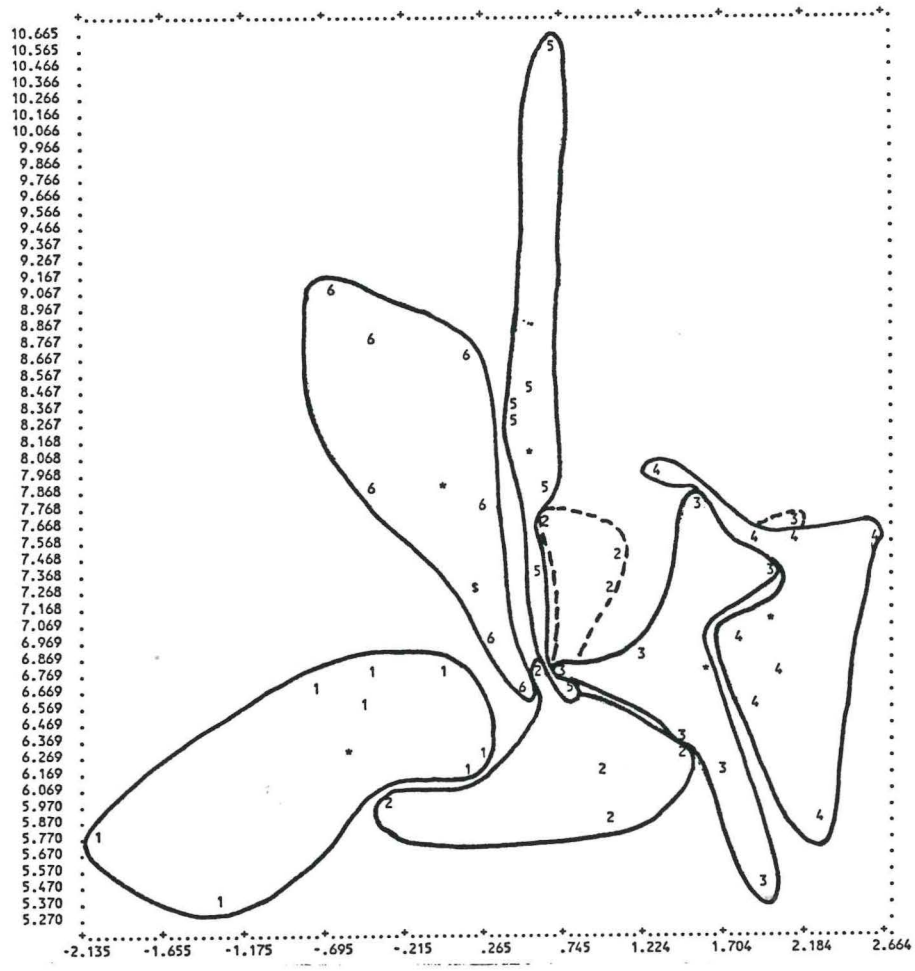
NQR	ßGAL	PGA	PER	PHO
50,0%				
<------64,6%				
<----------62,5%				
<----------70,8%				
<----------83,3%				

II-1-5-4 Analyse de variance et test de NEWMAN-KEULS

Les ACP et les AFD ont permis de déterminer les tendances globales des évolutions des variables enzymatiques et chimiques en fonction de la sénescence et de la translucidité. L'analyse de variance apporte des informations complémentaires sur la signification des variations intergroupes (stades de maturité et translucidité) pour les variables observées (voir tableau 29 TEST NEWMANN et KEULS, A, B, C et D).

Fig.66: Analyse factorielle dicriminante AFD2

6 groupes à discriminer:
1- stade 149 jours
2- stade 156 jours
3- stade 164 jours
4- stade 171 jours
5- demi translucide
6- translucide



la moyenne de chaque groupe est indiquée par *

Pour la NQR (tab.C), 3 ensembles de stades dont les moyennes sont significativement différentes, peuvent être distingués. Le premier comprend les deux stades les plus mûrs, le second les translucides et le stade de maturité intermédiaire et le troisième, le stade le moins mûr.

La PHO (tab.A) et la PEROX (tab.B) sont plus actives aux stades très mûrs et 1/2 translucides. Les autres enzymes, AIA-OX, PPOX (tab.C) et AA-PEROX (tab.B) n'ont pas des activités qui varient significativement selon ce test de NEWMAN-KEULS.

La MDH (tab.C) et la ßGAL (tab.A) sont significativement plus actives dans tous les fruits translucides, alors que la CAT (tab.B) et l'αGAL (tab.A) le sont seulement dans les fruits demi-translucides.

L'αMAN (tab.A) a une forte activité pendant toute la maturation du fruit et les différences ne sont pas significatives. On peut cependant définir des tendances. L'activité diminue jusqu'au début de la maturation puis, ensuite, croît de nouveau jusqu'en fin de sénescence normale. Les fruits demi translucides présentent une activité αMAN plus importante que les autres.

La PG (tab.A) est caractérisée par un accroissement de son activité des fruits verts aux fruits mûrs qui se poursuit jusque vers 156 jours après TIF. Ensuite avec la sénescence elle diminue. Les fruits demi translucides ont des activités normales pour des fruits de leur age alors qu'au contraire les fruits les plus translucides ont des activités proches de celles des fruits sénescents.

Enfin la GSSG-R (tab.C) est plus active aux stades les plus mûrs et translucides.

TEST DE NEWMAN ET KEULS: EVOLUTION DES VARIABLES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES DE LA PULPE D'ANANAS EN FONCTION DE L'AGE ET DU DEGRE D'ATTEINTE PAR LE "JAUNE".

A) VARIABLES ENZYMATIQUES	PG	PHO	αMAN	αGAL	βGAL
MOYENNES					
115 jours après TIF	0.31 (d)	6.78(d)	6.75(ab)	0.84(c)	2.88(c)
132	0.35 (d)	8.95(c)	5.48 (b)	1.42(b)	3.04(c)
149	0.58(ab)	14.13(b)	5.44 (b)	1.52(b)	4.03(b)
156	0.62 (a)	15.62(b)	5.87 (b)	1.44(b)	3.99(b)
164	0.48(bc)	15.68(b)	7.03(ab)	1.29(b)	3.92(b)
171	0.47(bc)	18.75(a)	7.75(ab)	1.27(b)	4.03(b)
1/2 translucide	0.68 (a)	19.38(a)	8.65 (a)	1.99(a)	4.92(a)
translucide	0.45 (c)	13.56(b)	6.17 (b)	1.65(b)	4.92(a)
MOY.GENERALE	0.49	14.10	6.64	1.43	3.96
CV	20%	14%	24%	19%	12%
F5%=2.18 F1%=2.98	14.6**	38.0**	4.14**	12.1**	21.2**

Abréviations des noms des enzymes et unités:
PG: Polygalacturonase, mg d'ac galacturonique.h^{-1}.mg^{-1} protéine.
PHO: Phosphatase, µmoles de p-nitrophénol.h-^{1}.mg^{-1} protéine.
αGAL: α-Galactosidase, idem.
βGAL: β-Galactosidase, idem.
αMAN: α-Mannosidase, idem.

SUITE

B) VARIABLES ENZYMATIQUES	NAG	PEROX	AA-PEROX	CAT	SOD
MOYENNES					
115 jours après TIF	1.93(ab)	26.94 (a)	0.042(ab)	634(c)	14.6(ab)
132	2.18 (a)	3.07 (e)	0.027 (b)	388(c)	8.5 (c)
149	2.24 (a)	8.64 (d)	0.034(ab)	1175(b)	11.4(bc)
156	2.14 (a)	8.52 (d)	0.037(ab)	1466(b)	17.2 (a)
164	1.91(ab)	14.50(bc)	0.057 (a)	1346(b)	16.8 (a)
171	1.78 (b)	17.63 (b)	0.058 (a)	1428(b)	16.7 (a)
1/2 translucide	2.26 (a)	14.50(bc)	0.049(ab)	2131(a)	14.1(ab)
translucide	1.97(ab)	11.00(cd)	0.049(ab)	1493(b)	15.4(ab)
MOY.GENERALE	2.05	13.10	0.044	1257	14.3
CV	11%	31%	39%	30%	25%
F5%=2.18 F1%=2.98	4.73**	24.9**	3.40**	16.6**	5.66**

Abréviations des noms des enzymes et unités:
NAG: N-acétylglucosaminidase, µmoles de p-nitrophénol.h^{-1}.mg^{-1} protéine.
PEROX: Peroxydase, dDO470nm.mn^{-1}.mg^{-1} protéine.
AA-PEROX: Ascorbate perpxydase, -dDO285nm.mn^{-1}.mg^{-1} protéine.
CAT: Catalase, µlO_2.mn^{-1}.mg^{-1} protéine.
SOD: Superoxyde dismutase, Unités.mg^{-1} protéine.

Les mesures ont été effectuées sur des extraits protéiques de pulpe d'ananas, à 0,2µg de protéine.μl^{-1}, selon les protocoles décrits dans Matériel et méthodes. Chaque mesure représente la moyenne de huit fruits, sélectionnés pour leur homogénéité. Dans les colonnes, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (seuil 5%). Les fruits ont été récoltés en janvier-février; leur âge est indiqué en nombre de jours après TIF (induction florale artificielle); les fruits demi translucides et translucides ont été récoltés, respectivement, à 156 et 164 jours après TIF; les fruits de ce test sont les mêmes que ceux des analyses ACP et AFD, les données correspondant aux fruits de 115 et 132jours n'ont pas été utilisées dans ces dernières analyses puisque la comparaison porte sur la fin de la maturation et la sénescence.

II-1-5-5 Conclusion des analyses statistiques

La fin de la maturation de l'ananas (stade mûr et sénescence) se traduit par la chute de l'acidité libre et un arrêt de l'accumulation des sucres. Elle s'accompagne d'une chute de la teneur en acide ascorbique et d'une légère diminution de celle des thiols réduits.

En fin de maturation normale, l'acidité diminue (tab.D, TEST NEWMAN et KEULS). Avec la translucidité, l'acidité diminue encore plus. Les fruits translucides, âgés de 160 jours, ont des acidités plus proches de celles des fruits normaux de 171 jours que de celles des fruits de 164 jours. De même, leur teneur en acide ascorbique est anormalement basse pour des fruits de 160 jours, alors que, par ailleurs, le rapport forme réduite sur forme oxydée ne semble pas varier (voir tableau 13). Soit la synthèse est stoppée, soit la cellule en utilise de trop grandes quantités pour pouvoir être remplacées par un métabolisme déjà défaillant, du fait même du stade de maturité avancé, mais aussi du phénomène de translucidité. La cellule perd ainsi une de ses armes importantes dans sa lutte contre certains processus d'oxydation (phénols) et la production de composés toxiques (formes toxiques de l'oxygène ou H_2O_2).

La teneur en thiols "réduits" diminue avec la sénescence du fruit mais de manière non significative (tab.D, TEST NEWMAN et KEULS). Elle se situe au même niveau pour des fruits demi translucides ou normaux du même âge. Le rôle des thiols et en particulier du glutathion, est important pour la régénération de l'acide ascorbique ou pour limiter l'oxydation des lipides membranaires, par exemple. Le fruit conserve, donc, un certain potentiel réducteur même en cas de translucidité.

Les activités enzymatiques qui caractérisent le mieux la sénescence, dans cette analyse statistique, sont d'une part la NADH quinone réductase et d'autre part les peroxydases (voir cercle des corrélations ACP1 et 2, axe 1).

L'augmentation de l'activité de la NADH quinone réductase (tab.C, TEST NEWMAN et KEULS) pourrait neutraliser l'activité des peroxydases et autres polyphénoloxydases qui produisent des quantités croissantes de quinones toxiques en les transformant en diphénols. En fin de maturation, ces activités augmentent de même que les quantités de substrats phénoliques susceptibles d'être utilisées. Cependant, le rôle de cette enzyme est ambigu puisque la réduction partielle des quinones peut produire des semi-quinones auto-oxydables qui génèrent des ions superoxydes toxiques (voir caractérisation de l'enzyme, page 65).

L'augmentation des activités peroxydasiques, au cours de la

TEST DE NEWMAN ET KEULS: EVOLUTION DES VARIABLES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES DE LA PULPE D'ANANAS EN FONCTION DE L'AGE ET DU DEGRE D'ATTEINTE PAR LE "JAUNE".

SUITE

C) VARIABLES ENZYMATIQUES	AIA-OX	PPOX	GSSG-R	NQR	MDH
MOYENNES					
115 jours après TIF	51.1 (a)	0.820 (a)	0.206 (d)	1.81 (d)	0.078(d)
132	29.1 (b)	0.371 (c)	0.221 (d)	1.82 (d)	0.163(c)
149	45.3 (a)	0.626 (b)	0.293(cd)	1.65 (d)	0.218(b)
156	46.9 (a)	0.644 (b)	0.373(bc)	2.86 (c)	0.239(b)
164	53.7 (a)	0.763(ab)	0.410(ab)	3.51(ab)	0.232(b)
171	53.1 (a)	0.750(ab)	0.478 (a)	3.92 (a)	0.232(b)
1/2 translucide	52.3 (a)	0.748(ab)	0.503 (a)	3.13(bc)	0.304(a)
translucide	50.2 (a)	0.717(ab)	0.487 (a)	2.63 (c)	0.302(a)
MOY.GENERALE	47.7	0.680	0.371	2.67	0.221
CV	16%	16%	22%	16%	22%
F5%=2.18 F1%=2.98	9.33**	13.2**	17.2**	32.8**	18.5**

Abréviations des noms des enzymes et unités:

AIA-OX: AIA oxydase, $-\mu lO_2.mn^{-1}.mg^{-1}$ protéine.
PPOX: Polyphénoloxydase, $dDO450nm.mn^{-1}.mg^{-1}$ protéine.
GSSG-R: Glutathion réductase, $-dDO340nm.mg^{-1}$ protéine.
NQR: NADH quinone réductase, $-dDO340nm.mg^{-1}$ protéine.
MDH: Enzyme malique, $dDO340nm.mg^{-1}$ protéine.

SUITE

D) VARIABLES CHIMIQUES	THI	AL	ESS	AA
MOY. TRAITEMENTS				
115 jours après TIF	0.172(c)	2.91 (d)	5.91 (d)	119.8(bc)
132	0.269(a)	7.70 (c)	9.69 (c)	156.5 (a)
149	0.195(b)	11.20 (a)	15.20 (b)	115.5(cd)
156	0.123(d)	9.66 (b)	16.46(ab)	131.9 (b)
164	0.109(d)	8.74(bc)	17.56 (a)	108.1(cd)
171	0.113(d)	7.65 (c)	17.10 (a)	102.6(cd)
1/2 translucide	0.118(d)	8.46(bc)	16.90 (a)	99.0 (d)
translucide	0.101(d)	8.93(bc)	15.30 (b)	104.9(cd)
MOY.GENERALE	0.150	8.16	14.27	117.3
CV	15%	13%	8.7%	11%
F5%=2.18 F1%=2.98	54.3**	39.3**	91.9**	16.0**

Abréviations des noms des variables chimiques et unités:
THI: Thiols, mM.
AL: Acidité libre, $méq.100ml^{-1}$ de jus.
ESS: Extrait sec soluble, %.
AA: Acide ascorbique, $mg.100ml^{-1}$ de jus.

maturation et de la sénescence des fruits (tab.B, TEST NEWMAN et KEULS), est un processus courant et rapporté depuis longtemps (banane, poire, tomate, mangue: SACHER, 1973), considéré comme un marqueur de sénescence. Mais le phénomène de translucidité n'entraîne pas d'augmentation particulière de ce type d'activités. Ces enzymes peuvent avoir des rôles multiples (voir page 106). Les enzymes interviendraient dans les oxydations des composés phénoliques toxiques qui s'accumulent au cours de la sénescence et joueraient aussi un rôle important dans l'élimination de H_2O_2. Globalement, en association avec les antioxydants classiques, acide ascorbique et glutathion, ces activités peuvent constituer un système de défense contre les stress peroxydatifs chez les végétaux supérieurs (MEHLHORN et KUNERT, 1986). Par ailleurs, la synthèse des constituants des parois qui semble se poursuivre jusqu'en fin de maturation et les peroxydases sont impliquées dans la synthèse des lignines (polymérisation des alcools coniférylique ou p-coumarylique: sous l'action des peroxydases les alcools donnent des mésomères à l'état de radicaux libres qui se condensent au hasard pour donner les polymères, GUIGNARD, 1985; HARKIN et OBST, 1973; MACHEIX *et al*, 1990). Dans les parois des cellules, ces enzymes catalysent aussi la formation des ponts diféruliques entre les chaînes de polysaccharides. On a vu précédemment (tableau 15) que la quantité d'acide férulique obtenue par hydrolyse des parois augmente de façon importante en fin de maturation. Ce processus de synthèse des parois, s'il est réel à ce stade, peut justifier aussi en partie ces activités.

L'augmentation des activités AIA oxydase, Ascorbate peroxydase et Polyphénoloxydase semble moins caractéristique de la fin de la maturation de l'ananas (tab.C et B, TESTNEWMAN et KEULS). On peut noter que l'activité AIA oxydase augmente un peu avant et au début de cette phase, alors que l'accroissement de la taille des cellules est important. On a déjà souligné son rôle dans la croissance des cellules (page 110). On lui attribue aussi un rôle possible dans la sensibilisation des tissus à l'éthylène au début de la maturation proprement dite (HARTMANN *et al*, 1987, MACHEIX *et al*, 1990), mais aussi un rôle direct dans la production d'éthylène (VIOQUE *et al*, 1981). Cependant, l'augmentation de la teneur en éthylène des fruits translucides est peut-être trop faible pour correspondre à une augmentation perceptible de l'activité enzymatique.

L'activité de la glutathion réductase augmente sensiblement pendant la fin de maturation (tab.C, TEST NEWMAN et KEULS). Elle est un peu plus élevée chez les fruits translucides (mais non significatif) dont la teneur en acide ascorbique chute tandis que celle en thiols diminue. Or, ces deux substances jouent un rôle capital dans le maintien de l'intégrité cellulaire, et doivent nécessairement être régénérées (fig.43).

L'activité de l'enzyme malique reste stable chez les fruits normaux, en fin de maturation. Elle augmente chez les fruits translucides et

pourrait comme le suggèrent HARTMANN *et al* (1977) et DROUET et HARTMANN (1977) être une source de NADPH, entre autre pour la glutathion réductase, au moment où la voie des pentoses peut être moins active. La plus forte activité de l'enzyme malique dans les fruits demi-translucides peut être partiellement responsable de la chute d'acidité, puisque le malate représente 20% du total des acides organiques.

La ß-galactosidase est stable chez les fruits normaux, en fin de maturation, mais elle augmente avec la translucidité. Elle pourrait être liée à la modification des caractéristiques des parois des cellules. Elle pourrait jouer comme chez la poire *Pyrus serotina* (YAMAKI et MATSUDA, 1977), la pomme (BARTLEY, 1974) ou la tomate (WALLNER et WALKER, 1975), un rôle dans la dégradation des parois elles-mêmes, et conduire à la fragilisation extrême des fruits "jaunes". Par ailleurs, la translucidité de la pulpe pourrait résulter de l'envahissement des espaces intercellulaires par le contenu des cellules, suite à une perturbation de la perméabilité membranaire (voir page 158). Si cette modification des membranes est réelle, les ß-galactosidases mais aussi des α-galactosidases pourraient y participer. L'α-galactosidase contribue très fortement à l'explication de la translucidité dans les ACP, mais son activité est la plus faible parmi les hydrolases. D'après DOUCE et JOYARD (1980) et CASSAB et VARNER (1988) ces enzymes sont capables de dégrader les galactolipides des membranes. Dans les tissus non photosynthétiques, les galactolipides sont moins abondants que les phospholipides (14% contre 84% chez la pomme par exemple), et sont constitués essentiellement par des digalactosyldiglycérides et des monogalactosyldiglycérides (les premiers sont plus abondants que les seconds), (DOUCE et JOYARD, 1980). D'après ces auteurs, la dégradation complète des galactolipides requiert l'hydrolyse de la liaison ester par une hydrolase spécifique (galactolipase) et de la liaison glycosidique des galactosylglycérols par les galactosidases (α et ß). La dégradation des galactolipides a été aussi démontrée au cours du processus de sénescence du pétale d'oeillet, en liaison avec l'augmentation de la production d'éthylène (ENGELMANN-SILVESTRE *et al*, 1989); Cependant la liaison n'a pas été faite avec les activités enzymatiques. NGUYEN et MAZLIAK (1990) rapporte que chez la tomate, la maturation normale de la tomate s'accompagne d'une chute de la teneur en phospholipides alors que celles des galactolipides est stable; au contraire, en cas de maladie physiologique induite par le froid, la teneur en galactolipides chute systématiquement. Cependant, la liaison avec les enzymes responsables de leur dégradation n'est pas faite, ici non plus.

L'activité de l'α-mannosidase, forte par rapport aux autres glycosidases, augmente légèrement pendant toute la fin de la maturation et plus particulièrement chez les fruits demi-translucides (tab.A, TEST NEWMAN et KEULS). Son rôle serait lié au turn over et à la synthèse des glycoprotéines (CASSAB et VARNER, 1988) que sont les hydrolases acides (GAUDREAULT et BEEVERS, 1983 et GAUDREAULT *et al*, 1985) et dont les activités

augmentent sensiblement en fin de maturation et surtout chez les fruits demi translucides. Mais un rôle direct dans la dégradation des parois n'est pas démontré. Le mannose comme le galactose sont présents dans les hydrolysats d'hémicelluloses de l'ananas (CHAN et MOY, 1977), mais ils n'ont pas été détectés sous forme libre parmi les sucres dans le jus (voir page 84). Comme l'N-acétylglucosaminidase qui contribue également à la translucidité sur le plan statistique, l'α-mannosidase s'attaquerait aux parois squelettiques des pathogènes. Une telle réponse des cellules aux facteurs déclenchant le jaune, qui ne sont pas des pathogènes, serait le résultat d'une activation des enzymes ou des gènes qui codent pour elles, même si elles n'ont pas de rôle spécifique dans le phénomène. L'éthylène, dont la teneur augmente, peut déréprimer les gènes de ces différentes activités. Ce peut être, également, le cas de l'activité phosphatase qui augmente dans les fruits très mûrs et plus encore dans les fruits demi-translucides (voir tableau 29 TEST NEWMAN et KEULS).

L'activité de la catalase est stable en fin de maturation dans les fruits normaux, alors qu'elle très forte dans les fruits demi translucides. Elle chute ensuite dans les fruits totalement translucides (tab.B, TEST NEWMAN et KEULS). Ceci explique pourquoi elle apparaît moins déterminante dans les analyses statistiques. L'activité est forte pendant toute la fin de maturation et joue certainement un rôle important dans la détoxification des cellules en éliminant le H_2O_2 et en limitant la génération d'ions $OH^{\cdot}$, extrêmement toxiques, par la réaction de HABER-WEISS à partir de H_2O_2 (LESHEM *et al*, 1986).

Enfin, il faut noter que le fruit, translucide ou pas, présente une activité superoxyde dismutase à un niveau constant pendant cette phase de la maturation.

En résumé, à un stade avancé, la translucidité de la pulpe d'ananas, est un processus physiologique présentant diverses caractéristiques de la sénescence mais sur des fruits encore "jeunes". La diminution de l'acidité libre et de la teneur en acide ascorbique s'accentue et, par ailleurs, la plupart des activités enzymatiques diminuent. L'évolution demi-translucidité vers translucidité totale, correspond à une dégénérescence accrue des tissus déjà constatée sur le plan physique (voir page 148).

A un stade moins avancé, le fruit "jaune" se distingue par ses caractéristiques enzymatiques et plus particulièrement celles conduisant probablement au symptôme le plus apparent: la translucidité de la pulpe. Les ß-galactosidases (et peut-être les α-galactosidases) pourraient être responsables de modifications de la perméabilité membranaire et donc de l'envahissement des espaces intercellulaires par le contenu cellulaire. Par ailleurs, ces hydrolases acides peuvent accentuer la fragilisation du fruit par dégradation des parois. L'α- mannosidase participerait au phénomène en jouant un rôle dans la régulation de la synthèse des hydrolases acides du fait de la nature glycoprotéique de ces dernières. Le rôle de l'N-acétylglucosaminidase chez les végétaux (autre que la défense contre des pathogènes) est mal connu, elle pourrait cependant être nécessaire dans la synthèse ou le turn over de protéines glycosylées par l'N-acétylglucosamine (par exemple une protéine à forte affinité pour l'AIA et pouvant être un récepteur de l'hormone, dans le coléoptile de maïs, voir page 105).

Il est à noter que seules les polygalacturonases avaient un rôle reconnu dans le ramollissement de l'ananas. De ces analyses, il ressort que d'autres hydrolases pourraient exercer un rôle non négligeable dans le processus, comme dans d'autres fruits.

La catalase et son rôle détoxifiant vis-à-vis du H_2O_2, se distingue par une activité particulièrement forte dans les fruits demi-translucides, on peut noter que dans les organes chlorophylliens, elle est considérée comme un meilleur marqueur de la sénescence (elle diminue) que les peroxydases (LAURIERE, 1983). La glutathion réductase contrôle la régénération du glutathion et de l'acide ascorbique. L'enzyme malique produit du pouvoir réducteur nécessaire en quantité plus importante. Globalement, le système permettant de lutter contre les effets toxiques des oxydations (production d'ions superoxydes et de H_2O_2 ou de peroxydes lipidiques) semble renforcé dans les fruits demi translucides, et peut être compris comme une réaction de la plante pour éviter d'aller vers la translucidité et la sénescence.

Enfin l'augmentation de l'activité des enzymes peut aussi être comprise comme une réaction des cellules, non spécifique, à une perturbation qui va conduire à la dégénérescence des tissus.

II-2 COLORATION ARTIFICIELLE DE L'ÉPIDERME

La coloration de l'épiderme (disparition des chlorophylles) est sous la dépendance de la production endogène d'éthylène (voir page 127) et le traitement par l'éthéphon accélère le processus naturel. La translucidité de la pulpe est presque toujours associée à une mauvaise coloration de l'épiderme, qu'elle soit artificielle ou naturelle. La production industrielle d'ananas en Côte d'Ivoire est très dépendante du traitement de coloration artificielle. Lorsqu'il devient inefficace, le premier réflexe des producteurs est de mettre en cause le produit. Afin de mieux comprendre comment l'éthéphon est métabolisé dans l'épiderme du fruit, l'absorption et sa cinétique de transformation en éthylène y ont été mesurées. Puis, a été déterminé l'impact des facteurs physiques, la température des fruits au moment du traitement et le pH des solutions pulvérisées, sur le processus d'absorption et l'efficacité du traitement.

II-2-1 Libération de l'éthylène à partir de l'éthéphon in vitro

On connaît les effets de la température et du pH des solutions d'éthéphon sur la cinétique de libération de l'éthylène (voir fig.7, dans "Matériel et méthode"). Ces 2 facteurs physiques accélèrent fortement le dégagement de l'éthylène, surtout à partir de 35-40°C, (énergie d'activation=130KJ/mole), et de pH=5 (BIDDLE *et al*, 1976; KLEIN *et al*, 1979; BEAUDRY et KAYS, 1987). On montrera, par la suite, l'importance de ces données pour l'efficacité du traitement.

Il a été également vérifié que les produits incriminés dans l'échec du traitement avaient bien des teneurs en éthéphon correctes, 480g/l de matière active (fig.67, exemple du CALLEL) et qu'ils étaient d'ailleurs tout aussi efficaces pour colorer les fruits que les autres formulations du commerce. L'échec du traitement était en fait lié à la période d'utilisation, propice à l'apparition du "jaune".

Fig.67: DEGAGEMENT DE C2H4 PAR 2 FORMULATIONS D'ETHEPHON

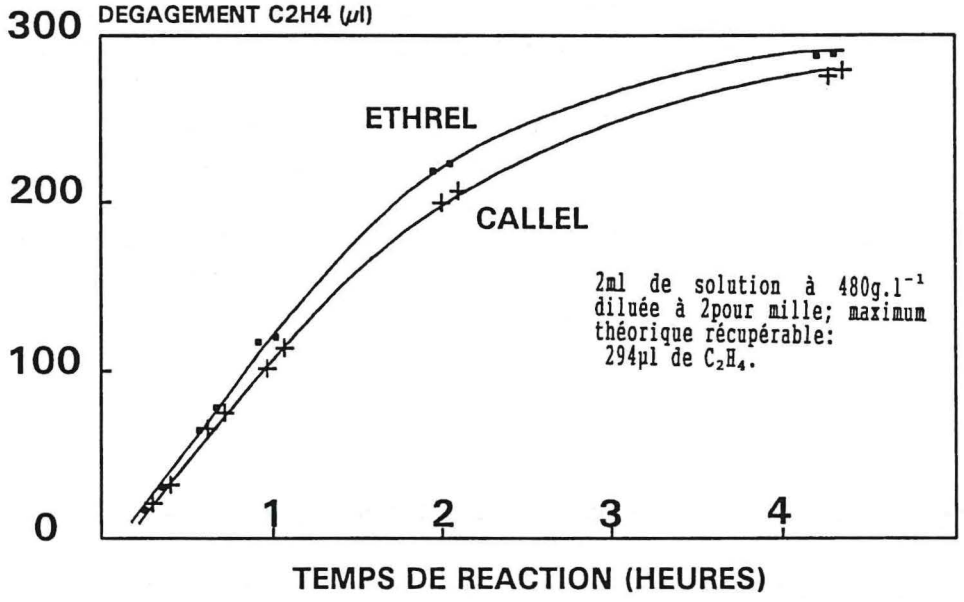
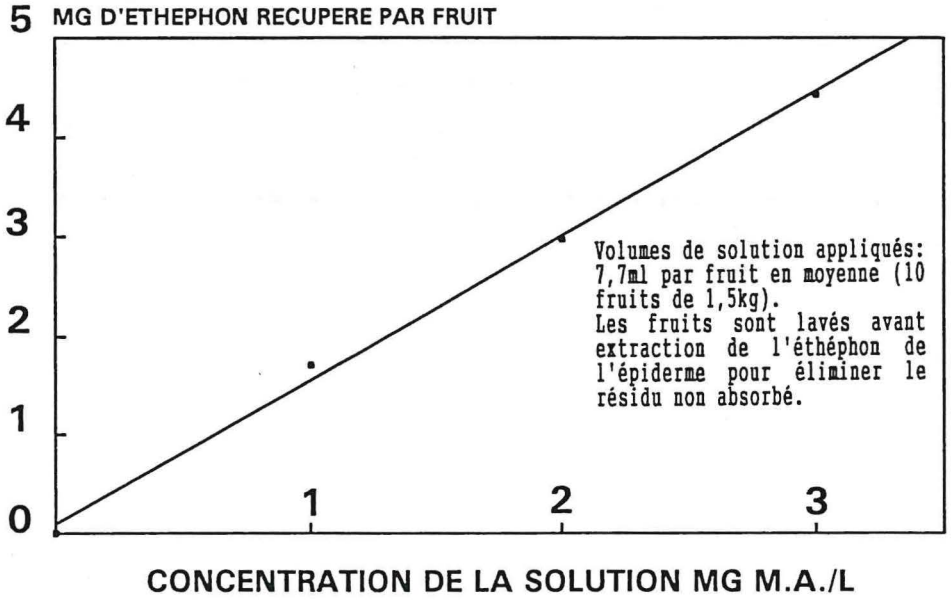


Fig.68: ABSORPTION DE L'ETHEPHON PAR L'EPIDERME (Après 24h)



II-2-2 Libération de l'éthylène in vivo

II-2-2-1 Absorption de l'éthéphon par l'épiderme du fruit

Les traitements éthéphon, destinés à colorer les fruits, se font habituellement sur la base de 3 à 6 litres de produit commercial (à 480g de m.a..l^{-1}) dans 1500 litres d'eau, pour 60 000 plants.ha^{-1}, soit des solutions de 1 à 2g de m.a..l^{-1}. La quantité théorique appliquée est de 25 à 50mg d'éthéphon par fruit.

Trois séries de 10 fruits ont été traitées avec des solutions de 1, 2 et 3 g de m.a..l^{-1} ; après élimination du produit résiduel en surface, l'éthéphon absorbé par l'épiderme du fruit est dosé par mesure de l'éthylène dégagé après alcalinisation des solutions (on considère comme épiderme toute la partie chlorophyllienne, mesurant quelques millimètres d'épaisseur, observable entre la cuticule et la pulpe, car aucune limite anatomique précise n'est discernable). Le volume total appliqué en mouillant toute la surface du fruit est en moyenne de 7,7ml. Ceci ramène la quantité réellement appliquée lors du traitement à 7,7mg, 15,4mg et 23.1mg d'éthéphon par fruit.

La quantité d'éthéphon absorbée est proportionnelle à la concentration de la solution pulvérisée sur le fruit (fig.68). Vingt-quatre heures après le traitement, on retrouve dans l'épiderme des fruits respectivement 1,7mg, 3,0mg et 4,4mg d'éthéphon non dégradé, soit 22,1%, 19,5% et 19,0% de la quantité appliquée.

Tableau 30: Bilan de l'évolution en 24 heures de l'éthéphon appliqué sur l'épiderme du fruit.

Valeurs en mg d'éthéphon	Témoin non traité	Traité lavé 3h après	Traité non lavé	Traité non lavé	Traité non lavé	Traité lavé 3h après
Ethéphon récupéré sous forme:	Température des enceintes					
	43°C	43°C	23°C	43°C	50°C	23°C *
C_2H_4 gazeux	0,040	1,03	0,85	2,92	3,03	ε
Résidu sec à la surface	-	5,40	3,33	3,75	4,68	5,20
Absorbé dans l'épiderme	0,014	0,29	1,80	0,82	0,65	1,12
TOTAL	0,054	6,72	5,98	7,49	8,36	6,32

Sur des fruits sans couronne de 1,5kg (4 répétitions), 6ml d'une solution d'éthéphon à 1mg de m.a..ml^{-1} ont été appliqués (volume déterminé par pesée simultanée à la pulvérisation, sur balance électronique). Les fruits sont placés dans des enceintes thermostatées (à 25, 43 et 50°C).

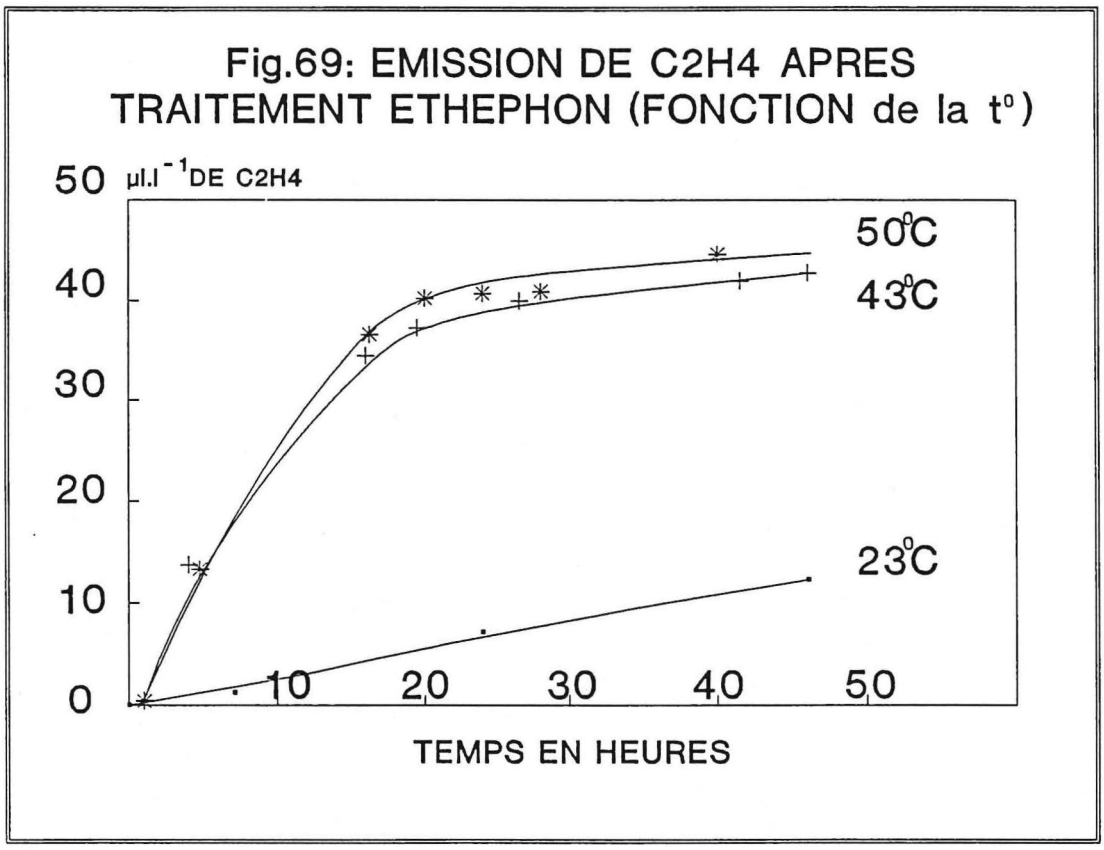
En laboratoire, sur fruits coupés, on retrouve 18% de l'éthéphon 3 heures après la pulvérisation (25°C, HR=60%), valeurs similaires à celles observées avec les fruits restés 24 heures sur pied. Cette observation pourrait laisser supposer que l'éthéphon absorbé est stabilisé. Cependant, en 24 heures, une bonne part de l'éthéphon absorbé est déjà dégradé (voir tableau 27) et une partie de l'éthéphon résiduel à la surface du fruit est réabsorbé après solubilisation par la forte condensation nocturne sur l'épiderme.

Signalons qu'après 3 heures, un traitement de coloration par l'éthéphon, est considéré comme efficace même s'il survient une pluie lessivant le produit résiduel en surface. Par conséquent, environ 20% de l'éthéphon appliqué sont suffisants pour assurer l'efficacité du traitement.

II-2-2-2 Evolution de l'éthéphon au contact du fruit en enceintes thermostatées

Pour déterminer le devenir de l'éthéphon appliqué sur l'épiderme du fruit, on a déterminé la répartition du produit, après 24h en enceintes thermostatées, entre l'atmosphère sous forme d'éthylène, la surface du fruit sous forme résiduelle, et l'intérieur de l'épiderme (tableau 27). Les bilans font apparaître un surplus d'éthéphon par rapport aux 6mg initialement déposés; il augmente avec la température (de 43 à 50°C), mais plus de 6mg d'éthéphon sont récupérés dans tous les traitements sauf à 23°C. Il est plus important lorsque l'éthéphon résiduel est laissé à la surface du fruit, pendant les 48 heures de l'expérimentation. Les fruits témoins ne produisent que des quantités négligeables d'éthylène par comparaison avec l'éthéphon appliqué; ces résultats suggèrent que l'application d'éthéphon entraîne un stimulation de la synthèse endogène d'éthylène par le fruit, dépendante de la température et de la durée de la stimulation par l'éthéphon. Il ne semble pas que la surproduction d'éthylène puisse être attribuée à un effet de stress dû au pH des solutions (pH=2,9), car des solutions de pH équivalent d'acide phosphorique n'induisent pas la dégradation des chlorophylles de l'épiderme.

A 43°C et 50°C, la teneur en éthylène de l'atmosphère des enceintes augmente rapidement pendant 24 heures, puis son accroissement devient très faible (fig.69). A 23°C le dégagement d'éthylène est très progressif et la teneur finale après 48 heures est d'environ le quart de celles obtenues à 43°C et 50°C. Compte tenu de la surproduction d'éthylène, à ces 2 températures, respectivement 24% et 11% de l'éthéphon appliqué se retrouvent sous forme d'éthylène gazeux, 63% et 78% restent sous forme de résidu à la surface des fruits et seulement 13% et 11% sont absorbés dans l'épiderme. A 23°C, le résidu de surface est très important (55%), une plus forte quantité de produit est absorbée dans l'épiderme (30%) et 13% sont transformés sous forme gazeuse. Dans les fruits préalablement lavés (43°C) la moitié des 10% d'éthéphon absorbés dans l'épiderme est transformée en éthylène pendant les 48 heures de l'expérimentation.



6mg d'éthéphon sont appliqués sur les fruits sans couronne, de 1,5kg, qui sont placés ensuite dans des enceintes closes, à différentes températures. La cinétique d'émission d'éthylène dans l'atmosphère des enceintes et issu de l'éthéphon est mesurée par dosage de l'éthylène (CPG), pendant 48 heures.

En résumé, après application d'éthéphon, le résidu en surface est très important et représente au moins la moitié de la quantité initiale. Avec des températures croissantes, l'eau des solutions s'évapore plus vite et le résidu augmente. Une température de cinquante degrés en surface du fruit n'est pas rare, surtout aux périodes chaudes (janvier à mai). Inversement, la quantité d'éthéphon absorbée par l'épiderme diminue, 10% à 43°C contre 20% à 23°C, et le produit est rapidement transformé en éthylène et relâché dans l'atmosphère. Le résidu continue d'être absorbé partiellement au cours de l'expérimentation puisqu'à 23°C, 19% de l'éthéphon sont absorbés dans l'épiderme au bout de 3 heures contre 30% après 48 heures. Enfin, il faut noter que le produit pénètre peu profondément dans le fruit, car il n'est pas retrouvé au delà de quelques millimètres sous la surface du fruit, au moins par la méthode d'analyse utilisée.

II-2-2-3 Essai de vérification de la stimulation de la synthèse d'éthylène par l'éthéphon

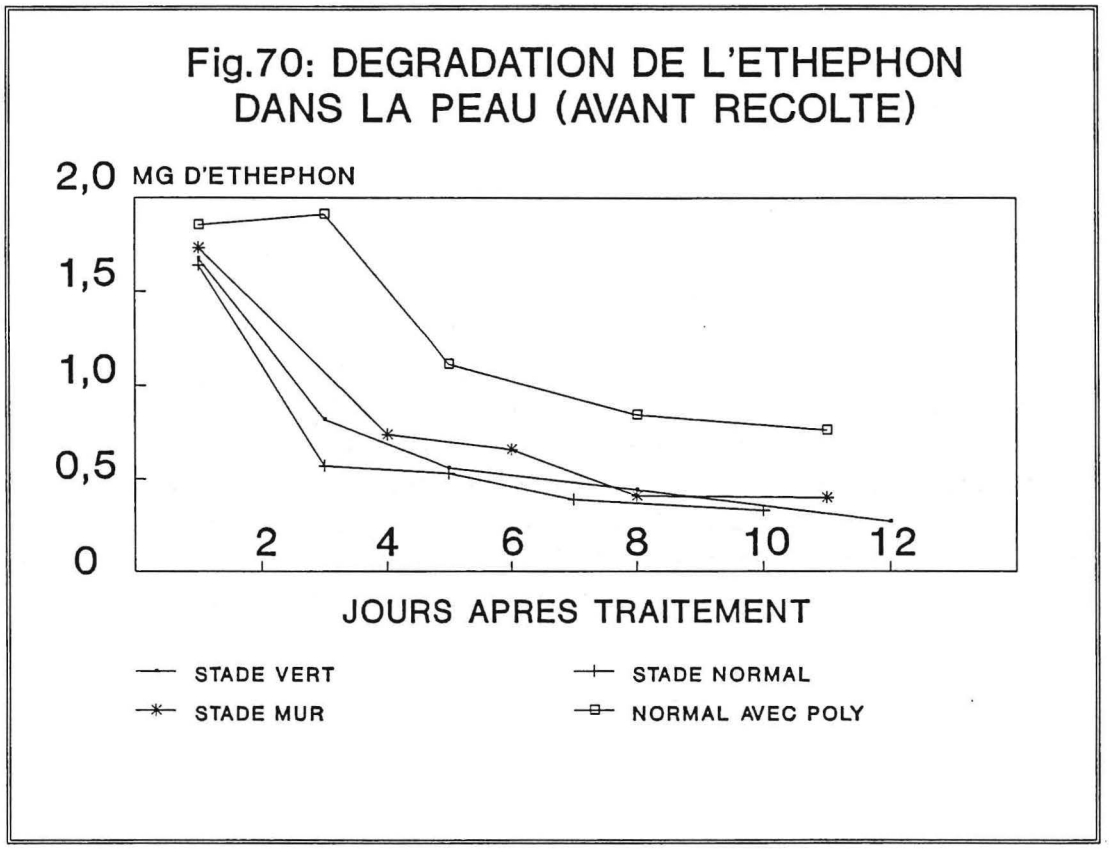
Les résultats du paragraphe précédent suggèrent que l'application d'éthéphon stimule la production endogène d'éthylène soit par l'épiderme, soit par la pulpe sous-jacente. L'induction de la synthèse d'éthylène par l'éthéphon a été mesurée sur des fragments excisés de 10g d'épiderme ou de pulpe. Ils sont traités avec une quantité d'éthéphon proportionnellement identique à celle utilisée pour le fruit entier. On a tenté de bloquer la production d'éthylène en infiltrant sous vide léger, des solutions de cobalt ou d'argent dans les tissus. Le bilan total de l'éthylène de l'atmosphère des petites enceintes de 250ml et de l'éthéphon restant dans les tissus, est fait après 24 heures à 43°C (tableau 31).

Tableau 31: Production d'éthylène par l'épiderme ou la pulpe excisés en présence des inhibiteurs: cobalt ou argent

Valeurs en µg d'éthéphon	Témoin	Témoin traité par inhibiteur	Traité par éthéphon	Traité par inhibiteur puis éthéphon
EPIDERME Cobalt 5mM Dépôt éthéphon	5,7	3,0	233,9 247,5	226,3 247,5
Argent 5mM Dépôt éthéphon	2,6	1,9	214,2 198,0	202,5 198,0
PULPE Cobalt 1mM Dépôt éthéphon	15,3	6,6	114,8 110,0	110,1 106,1
Argent 5mM Dépôt éthéphon	0,5	0,3	110,0 112,5	103,9 109,9

L'épiderme et la pulpe sous-jacente sont découpés en bandes de 1cm de large, environ 12cm de long et 0,4cm d'épaisseur. Après désinfection des tissus par NaOCl, les solutions de traitement ($CoCl_2$ 1mM et 5mM dans l'eau et témoins eau distillée, Thiosulfate d'Ag 5mM et témoins thiosulfate sans Ag) sont infiltrées sous vide léger, pendant 1minute. L'application d'éthéphon est faite à la micropipette pour le premier traitement puis par micropulvérisation pour les autres, le poids exact déposé étant mesuré à la balance électronique. Le matériel végétal est ensuite conservé 24 heures en flacons bouchés, à 43°C.

Les résultats ne confirment pas la stimulation de la synthèse endogène, ni dans l'épiderme, ni dans la pulpe sous-jacente, à la suite du traitement éthéphon. Les différences entre les traitements ne sont pas significatives et les quantités d'éthylène récupérées correspondent pratiquement à l'éthéphon déposé sur le tissu. On notera cependant que les 2 types d'infiltration (avec l'argent ou le cobalt) réduisent de moitié la production endogène d'éthylène des témoins, dont une part est sans doute due au stress de découpe et de mise sous vide partiel.



=8mg d'éthéphon sont appliqués par pulvérisation individuellement sur chaque fruit, avant la récolte, aux 3 stades de maturité indiqués sur la figure. Un 4ème traitement consiste à recouvrir les fruits avec un film polyéthylène après le traitement. Les fruits sont récoltés 5 par 5 tous les 2 jours pour suivre la cinétique de métabolisation de l'éthéphon à l'intérieur de l'épiderme. Le dosage de l'éthéphon se fait comme indiqué précédemment: après lavage des fruits, une aliquote de 50g de l'épiderme est broyée et homogénéisée dans 200ml d'HCl 0,05N. Après alcalinisation de 10ml du broyat, on mesure par GLC l'éthylène dégagé.

II-2-2-4 Evolution de l'éthéphon absorbé par l'épiderme du fruit avant récolte

La coloration du fruit après l'application du traitement nécessite une dizaine de jours, lorsqu'il n'y a pas de problème de fruits "jaunes". L'évolution de l'éthéphon (≈8mg de m.a./fruit) dans l'épiderme du fruit a été mesurée en conditions réelles, pour déterminer la part du produit effectivement susceptible d'influer sur la coloration du fruit.

Les fruits sont traités à 3 stades de maturation:
- immatures (140 jours après TIF),
- début de coloration naturelle (avec ou sans couverture polyéthylène),
- 1/3 de la surface colorée naturellement.

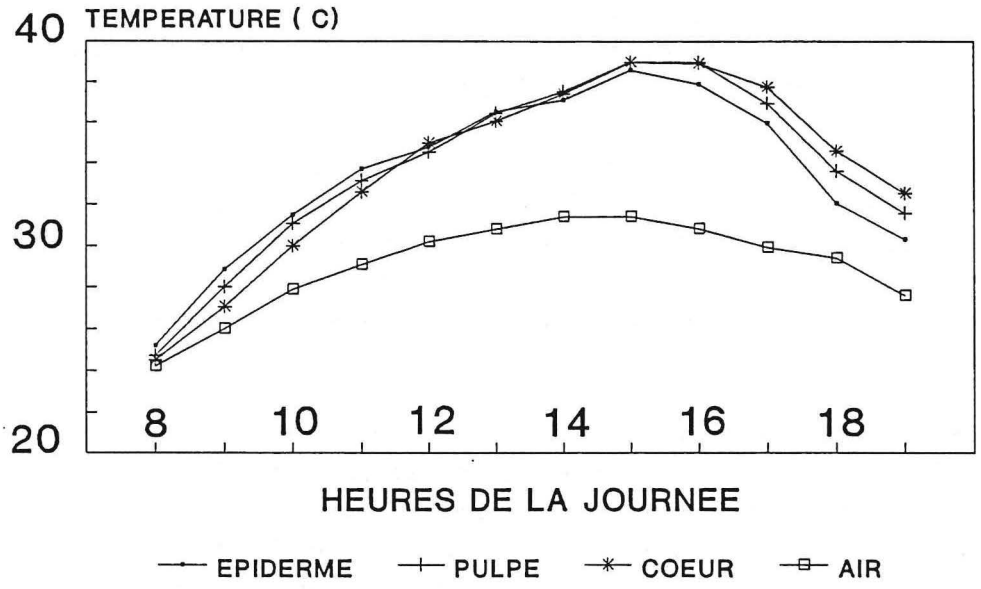
Le premier stade est abusivement utilisé par certains planteurs car les fruits se colorent mais comme ils sont immatures, ils résistent mieux aux chocs au cours du conditionnement et du transport. Le second stade est celui qui est recommandé pour l'application du produit. Au troisième stade, les fruits ont une maturité presque complète et ils sont utilisés pour les exportations par avion.

La quantité d'éthéphon absorbée est identique pour tous les fruits (1,68, 1,64, 1,73mg), ainsi que sa vitesse de dégradation (fig.70). Elles sont donc indépendantes de la coloration et du stade de maturité des fruits. La coloration complète des fruits ne s'est faite qu'avec les fruits mûrs (stades 2 et 3). La coloration artificielle est d'autant plus rapide et complète que les fruits sont plus mûrs (AUDINAY, 1970), ce qui suggère un réceptivité plus grande au traitement avec la maturité physiologique du fruit. Cette évolution de la réceptivité des fruits à l'éthylène est tout à fait courante. GRIERSON (1986) propose que les cellules développent une "compétence à mûrir", elle peut être le résultat d'un changement de sensibilité aux régulateurs de croissance ou de l'augmentation du nombre de récepteur (GUERN, 1987), ou bien les cellules immatures bien que percevant le signal hormonal, n'ont pas la "compétence" de déclencher le processus de maturation.

Vingt-quatre heures après le traitement, l'épiderme contient la même quantité d'éthéphon que celle signalée page 188 (environ 20% du total appliqué). Quarante huit heures après, la moitié a déjà disparu et la dégradation se poursuit lentement. Après 12 jours, il reste encore 5% d'éthéphon non dégradé.

Des fruits protégés par un film de polyéthylène ont absorbé plus d'éthéphon que les autres, du fait de la forte condensation qui reste sous le film. Celle-ci maintient en solution le produit, permettant ainsi une absorption plus forte, mais la vitesse de dégradation est similaire, il en est de même pour la coloration de l'épiderme.

FIG.71: EVOLUTION DE LA TEMPERATURE DES FRUITS AU COURS DE LA JOURNEE (MARS)



II-2-3 Influence des facteurs température et pH sur l'efficacité des traitements à l'éthéphon (tests agronomiques)

Le pH et la température ont une influence importante sur la libération d'éthylène à partir de l'éthéphon. On peut modifier le pH de la solution appliquée sur le fruit, mais ce facteur intervient aussi au niveau cellulaire, là où est effectivement dégradée la molécule. La température est celle du fruit au moment de l'application.

Dans un **premier test**, des solutions d'éthéphon destinées à colorer des fruits ont été appliquées après avoir modifié leur pH, en les tamponnant à pH=5, 6 ou 7, alors que le pH de la solution habituellement utilisée est de 2,7-2,9.

La coloration des fruits est notée visuellement selon une échelle de 1 à 5:

- 1: vert (=coloration verte de l'épiderme)
- 2: 1/4 jaune
- 3: 1/2 jaune
- 4: 3/4 jaune
- 5: 4/4 jaune

Les notes moyennes de coloration obtenues 10 jours après le traitement sont respectivement de 4,00, 3,15, 3,11 et 3,44 aux pH=2,7, pH=5,0, pH=6,0 et pH=7,0. On peut en déduire que l'augmentation du pH de la solution n'améliore pas l'absorption du produit et que l'éthylène gazeux dégagé à la surface du fruit est inefficace pour la coloration du fruit. La coloration des fruits sur pied, en les enfermant sous un film polyéthylène et en y injectant de l'éthylène, est très faible. Cette observation avait déjà été faite par DULL *et al* (1967), la dégradation des chlorophylles n'est que très faiblement accélérée par les concentrations habituellement efficaces sur d'autres fruits (de 0,1 à $1\mu l.l^{-1}$, BIALE et YOUNG, 1981). Ces résultats négatifs confirment que seul l'éthéphon absorbé agit, probablement après avoir été transformé en éthylène dans le tissu.

Dans le **second test**, le traitement est appliqué soit à des heures différentes de la journée, donc sur des fruits de températures différentes (fig.71) soit sur des fruits dont la température est artificiellement modifiée avec un ombrage intensif de courte durée (72 heures au moment de l'application des traitements). Le test a été conduit simultanément dans 3 zones distinctes d'exploitation. La première est située sur la station IRFA de l'Anguédédou (Basse côte), la seconde est sur une plantation en sols tourbeux où le jaune et les problèmes de coloration sont très fréquents (également en Basse côte). La troisième est une parcelle de plantation en région plus septentrionale (TIASSALE), où les températures peuvent être plus élevées, mais surtout qui a subi accidentellement un fort déséquilibre en azote (8g/pied au lieu de 4,5).

On a mesuré les températures des fruits (zone médiane perpendiculaire à la course du soleil) sur les 3 sites d'expérimentation où elles ont été pratiquement identiques. Elles ont varié en moyenne de 24°C à 7 heures du matin à 38°C vers 16 heures (moyenne de 5 jours comprenant la date du traitement, fig.71). On a pu noter des températures maximales de la pulpe, face au soleil, de 49°C!

Les différents modes d'abaissement des températures des fruits utilisés n'ont eu aucune incidence sur l'efficacité des traitements de coloration dans les deux premières zones. Tous les fruits étaient correctement colorés 10 jours après le traitement. Dans la troisième zone, où les plants ont subi un fort déséquilibre en azote, la coloration ne s'est pas développée et la majorité des fruits étaient translucides.

En résumé, augmenter le pH des solutions revient à diminuer la quantité d'éthéphon absorbable par l'épiderme car à la température des fruits (≈40°C), la dégradation de la molécule est rapide. D'autre part, l'éthylène gazeux extérieur au fruit est inefficace, seul l'éthéphon absorbé est efficace pour le traitement. La température, au moment du traitement, ne semble pas avoir d'effet majeur sur la coloration des fruits. Dans des conditions similaires de température, on a pu constater soit une bonne efficacité du traitement, soit une inefficacité totale pour les plants suralimentés en azote, donnant des fruits jaunes.

II-2-4 Conclusion

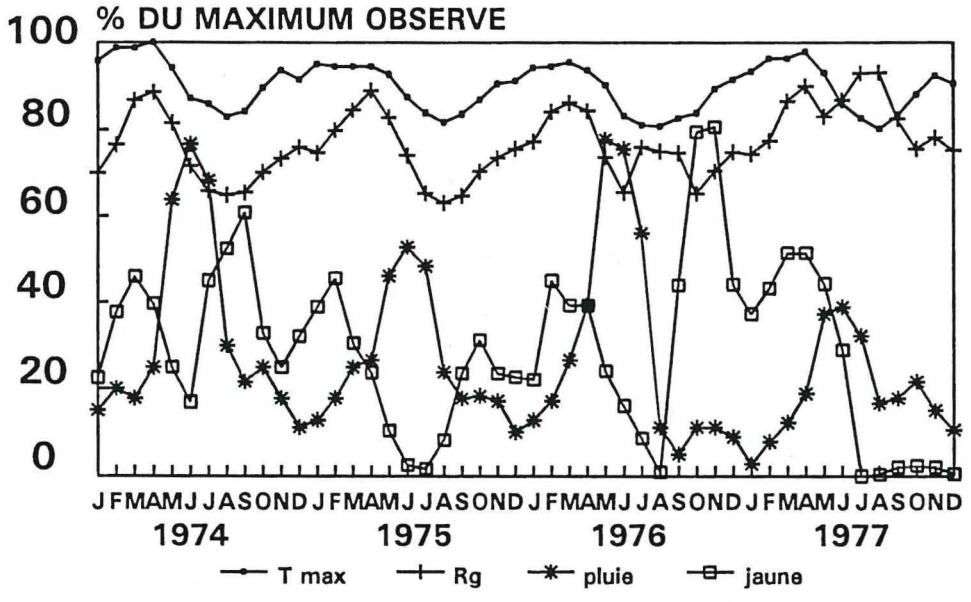
Après application du traitement destiné à colorer les fruits, la quantité d'éthéphon absorbée par l'épiderme varie en fonction des conditions de température et d'humidité. Plus il fait chaud et sec, moins l'éthéphon pénètre dans l'épiderme. Sur le plan pratique, on aura donc intérêt à éviter d'effectuer les traitements aux heures les plus chaudes de la journée où les fruits se comportent alors comme des accumulateurs de chaleur.

L'absorption est aussi fonction de la concentration de la solution utilisée, au moins dans la gamme habituellement utilisée en plantation. Mais seulement 20% de la matière active pénètre effectivement dans l'épiderme où il se produit une dégradation lente et incomplète, puisqu'il en reste encore 5% après une dizaine de jours, alors que les fruits sont déjà colorés. Cette dégradation est indépendante du stade physiologique de l'épiderme car il s'agit probablement d'un simple phénomène chimique. Mais, la réponse du fruit à l'éthylène exogène, sous forme d'éthéphon dépend de sa maturité physiologique. C'est un concept admis depuis longtemps aussi bien dans le cas de la coloration de l'ananas (AUDINAY, 1970) que dans la maturation des fruits en général (GRIERSON, 1986), mais aussi dans la plupart des réponses des plantes à l'action des hormones (TREVAWAS, 1982 et 1991). Cet auteur suggère que dans les tissus encore immatures, le développement des cellules, prises individuellement, est hétérogène et donc la réponse à un stimilus externe, l'éthylène par exemple, également. Le résultat observé à l'échelle du tissu, est une faible sensibilité au stimulus. Au contraire, le tissu mature, proche du but à atteindre du point de vue du développement (maturation du fruit par exemple), serait plus homogène car les cellules qui le composent auraient majoritairement atteint un stade mature identique. Il s'ensuit une sensibilité apparente au stimulus, plus importante.

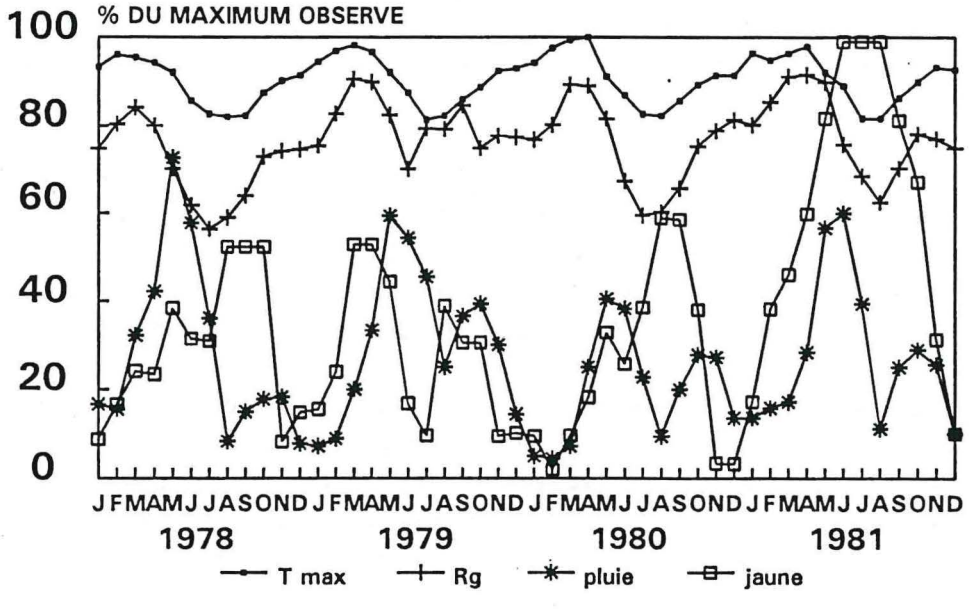
Seul le produit absorbé, puis lentement dégradé en éthylène dans l'épiderme, est actif; de fait, lorsque la transformation de l'éthéphon en éthylène est accéléré en élevant le pH des solutions, le traitement est moins efficace. D'autres produits que l'éthéphon, qui libèrent leur éthylène rapidement sont totalement inutilisables pour ce type de traitement (LURSSEN, 1982).

Il n'est pas possible d'expliquer l'inefficacité du traitement sur les fruits "jaunes" par un simple effet température durant la période d'application. Comme dans le cas des fruits immatures, il paraît logique de rechercher la réponse au problème dans la réceptivité du fruit au traitement. Par ailleurs, la température et d'autres facteurs climatiques pourraient modifier, à plus long terme, le métabolisme du plant.

Fig.72: LE JAUNE EN FONCTION DU CLIMAT
(MOYENNES MENSUELLES)



EVOLUTION DU JAUNE EN FONCTION DU CLIMAT
(MOYENNES MENSUELLES)



II-3 ORIGINES POSSIBLES DU PHÉNOMÈNE

II-3-1 Relation avec le climat

II-3-1-1 Rayonnement global, Température maximale et Pluviométrie

L'étude approfondie de l'effet du climat sur le "jaune" n'a pas été possible, principalement parce que la reproduction artificielle du phénomène est très aléatoire dans les conditions expérimentales de la station IRFA. Seules seront rapportées, ici, les grandes lignes des observations réalisées dans des situations proches de celles de la Côte d'Ivoire. On y ajoutera quelques éléments obtenus à partir des observations faites sur l'essai plantations mensuelles (voir page 136).

Les observations rapportées dans divers pays associent toutes plus moins directement translucidité et climat. Cependant, seules quelques situations sont tranchées, comme en Guinée (HUET, 1953) et plus rarement en Côte d'Ivoire (TEISSON, 1979) où le retour des pluies, après une forte période sèche, est souvent associé au jaune. En Côte d'Ivoire, où d'une façon générale les variations climatiques sont moins tranchées, il est difficile d'associer le jaune à une séquence climatique particulière, pendant la maturation du fruit. TEISSON (1979), dans une étude sur l'exploitation de l'Anguédédou, souligne que l'apparition du "jaune" dans les fruits semble être liée au passage du soleil au zénith, donc à un échauffement potentiel des fruits important. La température moyenne du fruit est de 10°C supérieure à celle de l'air et les faces exposées au soleil, peuvent atteindre les 50°C (voir page 199). Les limites supérieures des températures tolérables pour la vie, sont pratiquement atteintes. Des précipitations isolées à l'approche de la maturation peuvent accentuer le phénomène; mais l'effet est très irrégulier selon les parcelles d'exploitation, et on ne peut expliquer ainsi les variations à court terme de pourcentage de jaune.

Il est donc difficile de mettre en évidence un mécanisme climatique à court terme (jours précédant la récolte) qui soit le responsable majeur du phénomène.

Les variations climatiques et le pourcentage de jaune ont été examinés sur une échelle plus grande, afin de déterminer si le climat pouvait agir à plus long terme (les 5 mois que dure le développement du fruit). Pour cela ont été représentés, sur la figue 72, l'évolution mensuelle (de 1977 à 1981) des facteurs climatiques (température maximale, t°max, rayonnement globale, Rg, et précipitations, P) et les pourcentages de jaune. Pour limiter

l'effet des variations à court terme les courbes ont été lissées (chaque point est la moyenne de 3 points: le point considéré, le précédent et le suivant).

Les pourcentages maximaux de fruits "jaunes" ne sont pas systématiquement liés aux températures et rayonnement moyens les plus élevés. La tendance sur l'ensemble des 8 années serait un premier fort pourcentage de "jaune" au maximum de température et de rayonnement (mars, avril, mai) et un second en septembre, octobre alors que température et rayonnement augmentent, après un minimum de juillet, août. Comme l'a souligné TEISSON, le soleil passe au zénith durant ces périodes ce qui rend possible un fort échauffement des fruits sur un très court terme (journée). On note d'autre part que les pics de précipitation sont en général intercalés avec ceux du jaune. Les pics s'étalant sur 4 à 5 mois, cela suggère qu'une sensibilisation des plants pourrait résulter d'un stress hydrique global pendant la période de fructification. L'augmentation des pluies fait ensuite disparaître cette sensibilité et diminue le pourcentage de jaune.

L'expression du phénomène pourrait donc dépendre du climat de 2 façons différentes: il existerait, d'une part, une sensibilisation plus ou moins marquée, à long terme, consécutive à une faible disponibilité en eau pendant la formation du fruit et d'autre part, une induction par les conditions climatiques dans les jours qui précèdent la récolte. La sensibilisation pourrait traduire une modification du métabolisme du plant, suite à ces phénomènes climatiques.

II-3-1-2 Stress hydrique

Les facteurs climatiques semblent jouer un rôle déterminant dans le déclenchement du phénomène. Un stress hydrique important, associé à de fortes températures, puis une réalimentation excessive en eau, semble être une séquence climatique très favorable sinon nécessaire (HUET, 1953; TEISSON, 1979). Chez la pomme, la translucidité de la pulpe est induite par une séquence climatique similaire.

Le stress hydrique est connu pour induire des modifications importantes du métabolisme des plantes similaires à celles provoquées par d'autres stress, salinité ou froid (VIEIRA DA SILVA, 1978; HUBAC et VIEIRA DA SILVA, 1980; HAMZA, 1980; VEZINA et PAQUIN, 1982; CLIPSON *et al*, 1988). Il s'agit souvent d'accumulation de substances type proline, sucres solubles ou acides organiques. Cette augmentation des teneurs résulterait de la diminution des dégradations et d'une augmentation des synthèses des différentes substances (HUBAC et VIEIRA DA SILVA, 1980). Ce processus serait une modification adaptative en réponse à un stress extérieur, d'après le même auteur, HUBAC, qui rapporte les rôles possibles attribués à l'accumulation de

ces substances: La proline ou les sucres serviraient de régulateurs osmotiques en cas de sécheresse, en outre la proline pourrait exercer un effet protecteur sur les systèmes membranaires dans le chloroplaste; les sucres protègeraient les membranes en limitant l'impact du gel (abaissement du point de congélation), l'augmentation de la teneur en acide malique suggère une adaptation possible vers le métabolisme CAM. Par ailleurs l'augmentation de la teneur en ABA est une réponse fréquente à ces stress (NEILL et HORGAN, 1985; STEWART et VOETBERG, 1985; AUNG, 1979, ZEEVAART, 1980; BENGSTON *et al*, 1977, SIVAKUMARAN et HALL, 1979; HUBAC et LEPAGE DEGIVRY, 1981). La diminution de pression de turgescence serait un facteur clé déclenchant la biosynthèse de l'ABA, lequel induit 2 types de réponses, les unes très rapides (par exemple, la fermeture des stomates), et les autres, plus lentes, par l'intermédiaire de la synthèse protéique (ZEEVAART et CREELMAN, 1988). Ces fortes teneurs en ABA, si elles existent chez l'ananas pourraient être à l'origine des teneurs élevées en éthylène et de la sénescence prématurée de la pulpe des fruits. Certains auteurs avaient suggéré que l'ABA induisait l'augmentation de la teneur en éthylène (JACKSON et OSBORNE, 1972; LIEBERMAN *et al*, 1977), mais en fait l'ABA est capable d'induire une réponse très rapide et qui précède donc la sénescence proprement dite (RIOV *et al*, 1990). Mesurer directement les teneurs en ABA des plants et des fruits n'a pas été possible dans le cadre de ce travail, toutefois, on a tenté de vérifier si un fort stress hydrique provoquait chez l'ananas des modifications métaboliques importantes, similaires à celles induites chez d'autres plantes. En effet, l'ananas est particulièrement bien adapté à la sécheresse avec son métabolisme crassulacéen et la structure de ses feuilles, qui lui permettent de limiter ses pertes en eau et d'en stocker des quantités importantes.

Plusieurs indicateurs, utilisés par divers auteurs sur d'autres plantes pour caractériser l'effet de la sécheresse, ont été pris en compte dans le cadre d'une expérimentation préliminaire, uniquement destinée à vérifier l'intérêt d'approfondir les recherches dans cette voie. Le premier indicateur est <u>la matière sèche des feuilles</u>, mesure simple, mais qui reflète imparfaitement le potentiel de l'eau dans la plante. Le second est <u>la teneur en protéines des feuilles</u> qui diminue sous l'effet du stress (DHINSA, 1987). Le niveau de glutathion oxydé, un inhibiteur de la synthèse protéique, serait un facteur de contrôle important de l'évolution de la teneur en protéine sous l'effet d'un stress hydrique (DHINDSA, 1991). Le troisième indicateur est l'augmentation de <u>la teneur en proline libre</u> qui n'est pas systématique chez toutes les plantes, mais dont le rôle pourrait être lié à la régulation osmotique ou être une forme de stockage provisoire (STEWART et BOGGESS, 1978; TYMMS et GAFF, 1979; HUANG et CAVALIERI, 1979; TULLY *et al*, 1979; CABALLERO *et al*, 1988). Enfin, 3 activités enzymatiques qui font partie du système de détoxification de l'H_2O_2 dans les chloroplastes, ont été mesurées. Elles augmentent dans certaines plantes soumises à un important stress hydrique (SMIRNOFF et COLOMBE, 1988 chez le blé ou l'orge). Il s'agit de la

monodéhydroascorbate réductase, de l'ascorbate peroxydase et de la glutathion réductase.

Les résultats sont résumés dans le tableau 32. Le stress hydrique se traduit par une forte augmentation de la matière sèche dans les plants au stade végétatif, alors que les différences sont plus faibles entre les plants portant les fruits.

La teneur en protéines chute fortement dans les 2 types de plants, indiquant une réaction certaine des plants au stress. Il semble, par contre, ne pas y avoir d'accumulation de proline libre.

Les activités spécifiques des enzymes des plants portant des fruits, irrigués ou non, ne sont pas significativement différentes. Mais, au stade TIF, les plants stressés ont une activité ascorbate peroxydase qui est multipliée par 4. Les deux autres activités ne montrent qu'une légère tendance à augmenter, non significative.

Tableau 32: Indicateurs de stress hydrique dans les feuilles d'ananas

	Matière sèche (%)	Protéines ($mg.g^{-1}$ sec)	Déhydro ascorbate réductase	Glutathion réductase	Ascorbate peroxydase	Proline ($\mu g.g^{-1}$ sec)
Avant TIF						
irrigué	10,9±0,3	11,6±0,4	0,72±0,09	0,53±0,06	0,5±0,04	85,4
non irr.	18,7±0,5	7,7±0,5	0,73±0,12	0,59±0,08	1,6±0,06	82,3
Récolte						
irrigué	13,1±0,2	11,2±0,6	0,81±0,11	0,50±0,11	2,1±0,04	89,4
non irr.	16,4±0,6	7,5±0,7	0,91±0,14	0,46±0,13	2,1±0,07	74,3

Les résultats obtenus sur des plants en pot, sous ombrage, portant ou non un fruit et recevant ou non un arrosage régulier pendant 3 semaines, sont résumés dans le tableau 32. Les extraits protéiques ont été obtenus en mélangeant une portion identique de 10g des feuilles D de 8 plants (4 répétitions).

Rappelons que ces résultats ne sont qu'indicatifs, car il faudrait pouvoir mesurer ces indicateurs sur des plants en conditions réelles, qui peuvent être plus stressantes et notamment à cause du rayonnement. Cependant, ils montrent que malgré ses capacités d'adaptation à des conditions extrêmes de stress hydrique, l'ananas présente quelques réactions métaboliques similaires à celles des autres plantes (matière sèche des feuilles, diminution de la teneur en protéines, augmentation de l'activité AA perox avant TIF uniquement). Ils montrent également que les plants portant des fruits réagissent moins au stress hydrique, peut être en réutilisant partiellement l'eau du fruit. Cependant les feuilles utilisées dans les 2 types de plants sont, par nécessité, de maturité physiologique différente et les variations

sont peut être moins représentatives avec les feuilles plus âgées à la récolte. Il serait intéressant d'aller plus loin dans ce type d'analyses, puis de faire le lien avec les niveaux d'ABA et de son devenir dans la plante lors des réhydratations brusques.

II-3-2 Relation avec la nutrition

Les cas de translucidité ou de surmaturité de pulpe de fruit étudiés de manière approfondie sont rares:

1) La vitrescence de la pomme est un phénomène réversible après stockage (de longue durée) au contraire de l'ananas où l'état reste stationnaire (TISSEAU *et al*, 1982). Il se produit après une séquence climatique similaire à celle qui provoque le jaune de l'ananas, retour de pluie ou irrigation après une longue période sèche (BROWN, 1943). Le phénomène peut être réduit par des pulvérisations de calcium au champ, ce qui suggère une modification des membranes ou de la structure des parois, en partie contrôlée par l'ion Calcium. Le phénomène semble lié à des transferts, peut être trop importants, d'assimilats photosynthétiques vers le fruit (sorbitol) (WILLIAMS, BILLINGSLEY, 1973).

2) La pulpe jaune de la banane correspond à une maturation anormale et précoce de la pulpe par rapport au développement du fruit (MARTIN PREVEL, 1990). Ce phénomène est lié à des carences et déséquilibres minéraux, et associé à des facteurs écologiques divers. Il est intéressant de noter que l'anomalie peut être induite par un des facteurs lorsqu'il est très accentué, mais plus fréquemment par la synergie de plusieurs facteurs incapables de la déclencher individuellement. Selon l'auteur, les facteurs identifiés, susceptibles de jouer un rôle dans le phénomène, sont:

- carences prononcées en Magnésium ou Manganèse
- déséquilibres par excès du premier, entre:
  - Potassium et (Magnésium et/ou Azote)
  - Calcium et (Magnésium et/ou Manganèse et/ou Potassium)
  - Calcium et (Soufre et 1, 2 ou 3 des éléments précédents)
- sécheresse occasionnelle
- éclairement insuffisant
- destruction du feuillage

3) Un autre cas de translucidité, est la vitrification des tissus de vitroplants, considérée comme une réponse morphologique à des conditions légères de stress (excès d'eau, de minéraux ou de cytokinines), (GASPAR, 1986). L'auteur propose le mécanisme suivant: Le stress provoque une rapide production d'ACC et d'éthylène, ce dernier, par rétro-inhibition limiterait

sa propre production et celle des peroxydases acides et de la PAL; il en résulterait une lignification et une rigidification moindre des tissus vitreux; l'augmentation initiale de la production d'éthylène serait due à l'activation (et non la synthèse) directe par le stress, des activités peroxydases basiques, fonctionnant en tant qu'ACC oxydases; enfin, le calcium, dans ce processus, pourrait jouer un rôle central par son action sur la fixation des peroxydases aux membranes.

4) La vitrescence du melon est un phénomène qui paraît similaire à celle de l'ananas. Elle n'apparaît cependant pas aux périodes chaudes mais plutôt lorsque le sol est trop froid et l'évapotranspiration trop faible par rapport à la disponibilité en eau (MUSARD et YARD, 1990; MUSARD, 1989). Le calcium jouerait un rôle central; en phase de croissance, un rapport faible K^{+}/Ca^{++} (culture sur substrat hydrominéral) entraîne 100% de translucidité, alors qu'un rapport élevé réduit à 15% le nombre de fruits atteints. D'autre part une alimentation riche en calcium mais, en début de croissance, réduit notablement la proportion de fruits vitrescents. L'explication proposée est que le fruit est préférentiellement alimenté en eau par le xylème en début de croissance, permettant l'accumulation du calcium et donnant des fruits plus résistants au moment de la maturation. En fin de croissance, le relai est pris par le phloème où le calcium est moins mobile. La mobilité du calcium dans le xylème serait lié au flux de transpiration de la plante (pommier, HIMELRICK et McDUFFIE, 1983).

Ces phénomènes qui rappellent dans leur expression, la translucidité ou la surmaturité de l'ananas, sont liés plus ou moins directement à la nutrition minérale. On a tenté de déterminer si la translucidité de la pulpe de l'ananas pouvait également être liée à une carence ou à un déséquilibre minéral: la pulpe des fruits a été analysée, ainsi que les feuilles des plants qui les portent. Deux sortes de feuilles ont été utilisées. Les premières sont les feuilles les plus longues, à la récolte des fruits. Ces feuilles sont les dernières ayant eu une croissance normale au stade végétatif avant que n'intervienne le TIF. Cependant, la croissance des fruits remobilise une part importante des éléments minéraux des parties végétatives. L'image de l'équilibre minéral du plant porteur du fruit peut donc être faussée. Pour éviter ce problème, nous avons aussi analysé les feuilles D (FD) utilisées normalement pour le diagnostic foliaire (PY *et al*, 1984). On a récolté toutes les FD d'une parcelle expérimentale au stade TIF en repérant les plants un par un, puis à la récolte des fruits, on procède à la même opération avec les feuilles les plus longues. Les fruits translucides sont repérés a posteriori.

Diverses analyses ont été réalisées sur l'ananas, mais aucune n'a permis de lier la translucidité avec un déséquilibre minéral (tableaux 33 et 34).

Tableau 30 : Analyses minérales des fruits et des feuilles de l'ananas

	Calcium	Magnésium	Potassium	Azote	Phosphore	Sodium	Fer	Cuivre	Manganèse	Zinc	Bore
	(mg/100 g frais)						(µg/100 g frais)				
Analyse des fruits Cayenne (Basse Côte)											
Fruits normaux	9.7	14.1	208.6	73.6	-	-	290.5	79.2	121.9	80.0	75.6
Intervalle de confiance : 5 %	0.4	0.3	3.9	2.9			16.3	6.0	6.9	5.0	2.3
Fruits translucides	9.4	14.4	193.2	69.2	-	-	259.7	76.6	115.7	71.5	73.6
Intervalle de confiance : 5 %	0.4	0.4	6.1	2.5			11.4	5.0	9.7	3.1	2.1
Analyse des fruits Cayenne I10											
Fruits normaux	11.47	12.93	152.9	76.07	5.92	0.14	213.8	-	178.8	69.4	82.9
Intervalle de confiance : 5 %	2.75	0.98	26.7	8.48	1.78	0.04	25.7		61.8	7.8	8.6
Fruits moyennement translucides	10.58	12.82	148.7	75.43	5.20	0.13	210.2	-	184.1	64.5	78.6
	1.25	0.72	19.8	2.81	0.62	0.02	37.0		59.6	2.3	8.9
Fruits translucides	9.56	12.72	141.8	76.06	4.90	0.15	203.3	-	156.2	69.5	92.4
Intervalle de confiance : 5 %	2.15	0.32	14.1	3.51	0.42	0.05	14.1		51.7	4.5	3.9
Analyses foliaires des plants correspondants aux Cayenne I10			(g/100 g sec)						(µg/g sec)		
Fruits normaux	0.27	0.24	2.44	1.32	0.10	0.016	115.1	7.8	90.0	15.8	9.56
Intervalle de confiance : 5 %	0.04	0.03	0.47	0.10	0.01	0.002	21.1	1.4	21.6	5.5	2.4
Fruits moyennement translucides	0.27	0.24	2.32	1.36	0.09	0.015	115.4	6.4	90.4	14.3	7.9
	0.01	0.06	0.83	0.17	0.01	0.001	17.7	1.2	20.8	3.5	1.5
Fruits translucides	0.27	0.25	2.48	1.29	0.09	0.017	120.3	7.2	98.1	14.8	8.9
Intervalle de confiance : 5 %	0.04	0.05	0.76	0.18	0.01	0.002	33.8	2.3	20.7	6.0	1.7
Analyses foliaires des plants sur andain de déboisement											
Fruits normaux	0.67	0.24	2.96	1.03	0.15	-	88.5	-	70.0	21.5	-
Fruits tranlucides	0.70	0.26	3.03	1.06	0.15	-	104.5	-	70.5	15.0	-

Cayenne (Basse Côte) = cayenne lisse normal
Cayenne I10 = Clone sensible au jaune

Tableau n° 34 : Analyses minérales des fruits translucides ou non et des feuilles de leurs plants respectifs (Feuilles au TIF et à la récolte)

	N	P	K	Ca	Mg	B	Mn	Zn
Fruits		(mg/100 g frais)					(µg/100 g frais)	
Normaux	78.0	4.5	179.2	5.3	13.6	108,7	99.3	79.7
Ic 5 %	8.7	0.4	4.9	0.9	1.2	7.6	13.6	7.6
Moyennement Translucides	83.7	6.2	194.8	3.6	12.2	89.3	66.0	75.7
Ic 5 %	0.2	2.0	8.2	0.9	1.2	0.9	9.0	4.6
Translucides	73.9	7.5	207.6	4.3	11.9	74.8	79.5	86.8
Ic 5 %	12.6	0.4	9.0	0.8	0.1	5.2	11.6	4.4
	N	P	K	Ca	Mg	B	Mn	Zn
Feuilles D (au TIF)		(g/100 g sec)					(mg/100 g sec)	
Normaux	1.56	0.10	3.77	0.10	0.18	6.1	29.6	11.7
Ic 5 %	0.11	0.01	0.26	0.01	0.01	0.2	7.0	0.8
Moyennement Translucides	1.58	0.12	3.89	0.11	0.17	6.9	30.8	14.2
Ic 5%	0.11	0.01	0.14	0.01	0.01	0.7	1.9	1.6
Translucides	1.63	0.12	4.07	0.13	0.18	7.3	35.5	11.5
Ic 5 %	0.14	0.01	0.29	0.01	0.01	0.8	7.7	1.6
Feuille la plus longue (à la récolte)								
Normaux	1.35	0.10	3.42	0.19	0.19	6.1	52.0	11.9
Ic 5 %	0.08	0.00	0.19	0.02	0.01	1.0	9.7	1.1
Moyennement Translucides	1.34	0.12	3.57	0.24	0.20	6.9	59.9	13.3
Ic 5 %	0.06	0.02	0.20	0.03	0.02	1.2	9.9	1.1
Translucides	1.38	0.10	3.38	0.19	0.18	6.9	53.0	12.3
Ic 5 %	0.10	0.01	0.26	0.01	0.01	1.4	5.8	1.6

Il peut apparaître des différences pour tel ou tel élément, mais elles ne sont pas confirmées par les analyses des autres séries de fruits. Par ailleurs, il aurait été nécessaire de pouvoir analyser les différentes formes et leur concentration dans les différents compartiments cellulaires. Dans le cas du calcium, par exemple, la teneur totale dans le tissu n'a pas grande signification puisque l'essentiel est soit vacuolaire soit extérieur à la cellule, alors que la concentration dans le cytoplasme est très faible (<0,1µM), (KAUSS, 1987).

Le tableau 35 résume les tendances de variations pour les deux séries d'analyses les plus complètes qui comprennent des fruits très translucides, demi translucides ou normaux récoltés dans les mêmes parcelles le même jour. Une des 2 séries, I10, est constituée par un clone de cayenne sensible au jaune, l'autre est du cayenne normal.

Tableau 35: Variations de la composition minérale avec la translucidité

	Tendance à augmenter	Tendance à diminuer
FRUITS Cayenne normal I10	Phosphore, Potassium Bore	Calcium, Bore , Magnésium Phosphore, Potassium, Calcium
FEUILLES à la récolte Cayenne normal I10	(pas de tendance)	
Feuilles D Cayenne normal (pas de réf. I10)	Potassium, Bore(*), Mn * seule différence significative	

Ne sont représentés dans le tableau 35, que les ions qui dont les teneurs varient, même faiblement, entre fruits normaux et translucides. Les différences ne sont pas significatives sauf dans le cas du bore qui augmente dans les FD des plants des fruits translucides.

Globalement, peu d'éléments varient dans la pulpe des fruits et les tendances s'opposent pour le Potassium, le Phosphore et le Bore, d'une série à l'autre. Seul, le Calcium diminue très légèrement dans les fruits translucides de toutes les séries mais de façon non significative.

Dans les feuilles les plus longues à la récolte des fruits, aucune tendance n'est décelable. La redistribution des éléments dans le plant, lors de la croissance du fruit, masquerait de faibles variations si elles se

produisaient. Entre le TIF et la récolte, la composition en minéraux des feuilles évolue différemment suivant les éléments. Les teneurs en Azote et Potassium diminuent (probablement au profit du fruit), le Phosphore, le Magnésium, le Bore et le Zinc sont stables, le Calcium et le Manganèse augmentent.

Enfin dans les FD, seuls le Potassium, le Manganèse et surtout le Bore paraissent être plus élevés dans les plants donnant les fruits jaunes. Mais, cette observation n'a être pu confirmée par d'autres analyses.

Le tableau 33 (3ème partie), résume les résultats d'analyses foliaires à la récolte et correspondant à une situation particulière: l'andain de déboisement. Les plants installés sur des parcelles récemment déboisées bénéficient d'une alimentation particulièrement riche. Ils sont très développés et donnent des fruits gros et coniques typiques d'un excès d'azote. La composition minérale foliaire de plants ayant donné des fruits translucides a été comparée à celle de plants normaux. Il faut remarquer que le phénomène de translucidité a été aggravé par une irrigation 4 semaines avant la récolte, en période chaude. Par ailleurs, s'agissant d'un contrôle a posteriori, seules les feuilles à la récolte ont pu être analysées. On peut constater qu'aucune différence nette n'apparaît entre les plants.

L'ensemble de ces résultats ne met pas en évidence de relation claire entre le "jaune" et une carence particulière. La très légère diminution du calcium dans la pulpe des fruits jaunes pourrait éventuellement favoriser un problème de perméabilité membranaire ou de fragilité de paroi squelettique, comme chez la pomme. Cependant, en raison de la répartition du calcium dans les cellules (parois et vacuoles≈10mM et cytosol de 0,1 à 1µM, POOVAIAH, 1985), les mesures de calcium total permettent difficilement de rendre compte de l'impact de l'ion sur le phénomène du "jaune". Les faibles variations relatives des éléments pourraient avoir un impact sur le métabolisme du plant sans pour autant qu'il y ait de carence visible. Une trop forte alimentation (particulièrement en azote) peut être un facteur de sensibilisation déterminant comme l'avaient déjà noté LACOEUILHE (1978) et PINON (1980).

II-4 IMPACT DU JAUNE DE L'ANANAS SUR LA QUALITÉ

Les modifications qu'entraîne le jaune de l'ananas sur la qualité du fruit sont multiples. Il modifie la perception du goût que l'on a du fruit en augmentant le rapport ESS/Acidité. La coloration des fruits "jaunes" est en général moins attrayante que celle des fruits normaux. Ils sont plus fragiles et résistent, en principe, moins bien aux chocs que des fruits moins mûrs. Toutes ces raisons font que ces fruits sont éliminés dans les chaînes de conditionnement, après avoir été repérés par trempage dans l'eau.

Afin de déterminer l'impact du "jaune" sur la qualité des fruits exportés, une étude a été réalisée en collaboration avec Mme TISSEAU et Mr TEISSON de l'IRFA, sur le comportement post-récolte des fruits translucides au cours du transport. Celle-ci a permis de faire une évaluation de leur qualité gustative (TISSEAU *et al*, 1982). Les résultats sont présentés dans les tableaux 36 et 37.

Les fruits, atteints de jaune à des degrés divers, sont classés par la méthode non destructive de flottaison en solutions de NaCl (voir page 145). Trois catégories (expérimentation n°1) ou 5 catégories (expérimentation n°2) de degré d'atteinte de jaune croissant sont déterminées. Les fruits subissent ensuite les conditions normales de transport (9 jours à 8°C) et de commercialisation (longue durée : 12 jours ou courte durée : 3 jours, à température ambiante) avant d'être analysés et soumis à un test de dégustation.

Il ressort des résultats de cette expérimentation divers points marquants:

a) Tous les fruits ont une présentation correcte à la fin de l'expérimentation qui a duré 25 jours pour les traitements les plus longs. Par conséquent, avec un minimum de soins, les fruits "jaunes" seraient exportables dans leur grande majorité.

b) Le jaune, à condition de n'être pas trop développé à la récolte, n'évolue pas après la récolte pendant toute la phase de commercialisation. Il s'agit d'une observation importante pour la qualité du fruit car, même si on considère que le jaune est une forme de sénescence avancée, elle peut être bien contrôlée dans les conditions habituelles de commercialisation. Rappelons que chez la pomme le phénomène est réversible au cours d'une longue conservation au froid. Il n'est pas possible de le vérifier chez l'ananas car, ne supportant pas des températures inférieures à 7-8°C et étant déjà mûr à la récolte, sa durée de conservation est courte comparée à celle de la pomme qui peut durer plusieurs mois.

c) On sait que l'ananas est un des rares fruits dont l'acidité augmente au cours du transport au froid (TEISSON, 1977). Cette capacité de

Evolution des fruits "jaunes" au cours de la conservation

Tableau 36 : Expérimentation 1

Classement des fruits		Fruits non ou peu atteints		Fruits moyennement atteints		Fruits très atteints	
		Conservation		Conservation		Conservation	
		courte	longue	courte	longue	courte	longue
Note de jaune		1.2	1.1	2.0	1.8	3.7	4.4
ESS (%)	récolte	16.8	16.8	16.3	16.3	16.7	16.7
	post récolte	15.3	15.2	15.6	15.6	16.6	16.2
AL (méq/100 ml)	récolte	11.2	11.2	11.1	11.1	8.8	8.8
	post récolte	15.4	15.5	16.3	16.2	13.3	13.0
ESS/AL	récolte	1.5	1.5	1.5	1.5	1.9	1.9
	post récolte	1.0	1.0	0.9	0.9	1.2	1.2

Notations de translucidité
(note déterminée par appréciation visuelle)

1 = pas ou faible translucidité

3 = translucidité moyenne

5 = forte translucidité

synthèse d'acides organiques par la pulpe du fruit est conservée chez les fruits même très translucides (tableaux 36 et 37). Ceci indiquerait une relative intégrité des cellules des fruits jaunes, cependant il ne faut pas oublier que dans un fruit "jaune", seule une partie des tissus est atteinte par le phénomène (voir planche 1), la zone épidermique, la plus acide, n'est pas atteinte. Par ailleurs, alors que l'ESS n'évolue pratiquement pas, l'augmentation de l'acidité entraîne la diminution d'un rapport ESS/Acidité trop élevé à la récolte. La conséquence est que ces fruits, avec un rapport ESS/Acidité d'environ 1, ont eu la préférence des dégustateurs. Actuellement, sur les plantations, les fruits qui présenteront après transport les meilleurs qualités gustatives sont donc systématiquement éliminés. Avec les moyens modernes de transport (palettes et conteneurs notamment), il doit être possible d'exporter les fruits "jaunes", au moins lorsqu'ils sont faiblement ou moyennement atteints. La fragilité des fruits impose, cependant, un effort de qualité dans la manipulation et le conditionnement des fruits.

Evolution des fruits "jaunes" au cours de la conservation

Tableau 37 : Expérimentation 2

Classement des fruits		Fruits non ou peu atteints densité = 1		densité = 1,002		Fruits moyennement atteints densité = 1,005		densité = 1,012		Fruits très atteints densité = 1,019	
		conservation		conservation		conservation		conservation		conservation	
		courte	longue	courte	longue	courte	longue	courte	longue	courte	longue
Note de jaune	récolte	1	1			3.6	3.6	4.0	4.0	4.2	4.2
	post récolte	1	1.7	2.8	2.7	3.5	3.5	4.3	4.5	5	5
ESS (%)	récolte	15.4	15.4	16.2	16.2	17.1	17.1	17.3	17.3	17.2	17.2
	post récolte	13.2	14.4	14.4	14.6	14.3	15.6	15.0	14.5	14.8	15.7
AL (Méq/100 ml)	récolte	12.7	12.7	11.5	11.5	11.4	11.4	10.3	10.3	10.4	10.4
	post récolte	18.3	18.6	15.9	16.0	15.6	16.5	13.3	13.6	13.6	14.6
ESS/AL	récolte	1.21	1.21	1.40	1.40	1.50	1.51	1.68	1.68	1.65	1.65
	post récolte	0.72	0.87	0.92	0.91	1.51	0.94	1.13	1.07	1.09	1.07

II-5 CONCLUSION SUR LA SÉNESCENCE ET LA TRANSLUCIDITÉ

Induction du "jaune" de l'ananas:

L'induction du "jaune" est liée à des conditions climatiques particulières et stressantes (températures surtout) qui n'ont pu être exactement définies, sans doute parce qu'elles ne constituent pas le seul facteur en jeu. La sensibilité du plant doit être aussi une condition nécessaire à l'expression du phénomène. Un stress hydrique important semble pouvoir induire chez la plante une modification de son métabolisme (tableau 32), malgré ses caractéristiques de crassulacée. Les conditions climatiques particulières des périodes chaudes durant lesquelles se produit le "jaune", peuvent sensibiliser le plant au phénomène. Mais, cette sensibilisation, si elle existe, doit s'étendre sur une période plus ou moins longue avant la récolte du fruit. Par exemple, l'efficacité d'un traitement de coloration artificielle du fruit ne dépend pas de la température le jour du traitement (au moins dans la gamme de température des tests), les fruits translucides peuvent être insensibles à l'éthéphon appliqué. Le métabolisme de l'épiderme du fruit est donc modifié (diminution de la quantité ou de la qualité des récepteurs hormonaux?) bien avant le début de la maturation. On doit noter, cependant, que des températures supérieures à 40°C, sont susceptibles d'empêcher la dégradation des chlorophylles par diminution de la teneur en chlorophyllase chez les feuilles d'orge ou d'avoine (SABATER, 1978).

Quoiqu'il en soit, on peut considérer les variations biochimiques observées sur le fruit moyennement atteint, comme une réponse à un stress. Ces fruits se distinguent par une évolution de certaines activités enzymatiques quelque peu différente de celle des fruits normalement sénescents et par quelques unes de leurs caractéristiques physiques ou chimiques (éthylène, acidités, carotènes).

L'évolution du fruit translucide (augmentation de la translucidité et de la sénescence), résulte d'un équilibre entre des processus accélérant le phénomène et d'autres qui tendent à maintenir la survie des cellules:

Ethylène:

La synthèse accrue d'éthylène par rapport à des fruits normaux du même âge est une réponse classique d'un organe végétal à un stress (YANG et HOFFMANN, 1984). Mais les teneurs en éthylène des fruits translucides ne dépassent pas les teneurs maximales observables dans les fruits normaux, plus âgés; par conséquent, cette observation peut traduire simplement une **sénescence précoce**, chez l'ananas.

Glycosidases:

Simultanément, l'augmentation des activités de certaines hydrolases (α et ß-galactosidase) peut-être induite par l'éthylène. Celles-ci pourraient participer du phénomène de translucidité en intervenant dans la dégradation des galactolipides membranaires. Il peut, alors, en résulter une modification de perméabilité des membranes, permettant le passage d'une partie du contenu cellulaire dans les espaces intercellulaires. Cependant, les expérimentations de diffusion (voir page 158) n'ont pas clairement démontré l'origine de la solution envahissant ces méats (cellules des tissus du fruit ou afflux de sève) et donc la réalité du changement de perméabilité des membranes. Rappelons que la translucidité apparaît au centre des yeux, dans une zone vascularisée puisque proche des ovules, ce qui est un argument en faveur de l'afflux de sève. L'activité de l'α-mannosidase augmente aussi fortement avec le "jaune"; elle n'a pas de rôle clair dans le phénomène, si tant est qu'elle en ait un. Elle pourrait être nécessaire au turn over des autres glycoprotéines, dont les glycosidases. Son induction, sous l'action d'un stress d'origine externe, peut résulter de son rôle possible de défense contre les pathogènes.

Activités enzymatiques détoxifiantes:

D'autres processus enzymatiques plus marqués chez les fruits translucides constituent des éléments intervenant dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Il s'agit de l'augmentation d'activités enzymatiques plus ou moins directement liée à la détoxification des cellules. La catalase, qui augmente fortement, peut éliminer l'H_2O_2 toxique. L'augmentation de l'activité glutathion réductase permet de régénérer le glutathion et indirectement l'acide ascorbique, 2 antioxydants importants pour la cellule. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de l'enzyme malique, est susceptible de fournir du NADPH, entre autre pour le fonctionnement de la glutathion réductase.

Nutrition minérale:

Il n'a pas été possible de faire le lien entre le "jaune" et la nutrition minérale, comme pour d'autres phénomènes similaires en apparence: translucidité de la pomme ou du melon et teneur en calcium, pulpe jaune de la banane et teneurs en divers éléments (voir page 206). Les analyses biochimiques réalisées ne permettent pas non plus d'établir un lien entre le jaune et les processus de vitrification en culture de tissu, il eut fallu mesurer les activités des diverses isoperoxydases (déficience de lignification des parois entraînant une trop faible rigidification, liée à une diminution des activités peroxydases acides intervenant dans la synthèse des lignines et de la PAL fournissant les composés phénoliques de base).

Evolution vers la translucidité complète de la pulpe:

Lorsque le "jaune" s'accentue, les processus de dégradation l'emportent sur ceux de protection et conduisent à la dégénérescence des tissus. La capacité du fruit à maintenir son métabolisme en équilibre et à assurer sa survie diminue. Dans le fruit très atteint, diverses caractéristiques physiques et chimiques des cellules en dégénérescence, sont trouvées. Les structures cellulaires paraissent plus dégradées que dans le fruit sénescent normal, mais avec encore des signes d'activité métabolique (voir page 148). Les composantes biochimiques de la pulpe indiquent aussi un déclin certain du métabolisme des cellules. La forte diminution de la quantité d'acides organiques, traduit le déséquilibre entre les synthèses (qui diminuent probablement) et la consommation par la respiration. La chute de la teneur en acide ascorbique et, dans une moindre mesure, de celle des thiols, entraînent une capacité réduite des cellules à se protéger contre les phénomènes d'oxydation. Dans le fruit très atteint, la plupart des activités enzymatiques diminuent par rapport au fruit moyennement atteint, la synthèse protéique est donc fortement ralentie.

Evolution du fruit translucide après récolte:

Après la récolte, le processus ne s'aggrave pas et le fruit, à condition de ne pas être trop atteint, ne perd pas ses capacités de synthèse des acides organiques. Sa survie peut se prolonger pendant un temps assez long (voir page 212). Si les fruits jaunes ont une fragilité certaine, il est cependant tout à fait envisageable de les exporter, surtout avec les améliorations apportées ces dernières années au conditionnement et au transport. Par ailleurs, avec l'acidification qui se produit au cours de la conservation, leur rapport ESS/AL diminue aux environs de 1 et ils sont les plus appréciés des consommateurs. Il est donc possible de transformer les importantes pertes actuelles dues à l'élimination des fruits jaunes, en atout de qualité. Cependant, il conviendrait de maîtriser le phénomène pour éviter une trop forte translucidité de la pulpe. Les moyens actuels à la disposition des producteurs sont limités et un peu empiriques: ombrage des fruits pour limiter l'échauffement, récolte sélective des plus gros fruits avant que ne se développe trop le "jaune", utilisation de retardateur de maturation comme le 3CPA en combinaison avec le traitement à l'éthéphon classique, et réduction des autres facteurs sensibilisants: fumure trop forte, particulièrement en azote, irrigation irrégulière à l'approche de la récolte.

QUATRIEME PARTIE:
CONCLUSION

Conclusion

L'amélioration de la qualité de l'ananas nécessite de mieux comprendre comment elle s'élabore. L'évolution des composantes biochimiques (accumulation des sucres et acides organiques, ramollissement de la pulpe, coloration de l'épiderme, etc) résulte de mécanismes biochimiques au niveau cellulaire et de leur contrôle. Ce dernier s'exerce au moins à 2 niveaux: 1) au niveau moléculaire, avec l'action des hormones et la dérépression des gènes spécifiques de la maturation; 2) au niveau de la plante entière, avec les relations entre le fruit et le plant qui le porte et sur lesquelles agissent les facteurs du milieu. Ceux-ci ont d'autant plus d'importance qu'ils peuvent influer à long terme sur le métabolisme du plant et du fruit. Comprendre comment s'élabore la qualité nécessite donc d'intégrer les effets des divers facteurs du milieu (climat, nutrition, techniques culturales) sur les composantes de la qualité.

Maturation et équilibres hormonaux:

S'il est effectivement démontré que la maturation des fruits est sous contrôle génétique, les mécanismes et la régulation de ces processus sont mal connus, particulièrement chez les fruits non climactériques comme l'ananas. Celui-ci présente des similitudes de comportement avec d'autres fruits non climactériques comme la cerise (processus de maturation de la chair apparemment non lié à l'éthylène, réponse à l'ABA exogène). La vitesse de maturation du fruit est contrôlée par la balance hormonale puisque l'apport exogène de régulateurs, peut l'accélérer (ABA, paclobutrazol) ou la freiner (auxines et gibbérellines). Par ailleurs, l'épiderme du fruit se comporte vis-à-vis de l'éthylène exogène comme un organe chlorophyllien classique (disparition des chlorophylles dont la vitesse est également modulable par apport exogène de régulateurs de croissance: accélération par l'éthéphon et retard par le 3CPA ou les gibbérellines). La variabilité de la réponse d'un tissu végétal à l'éthylène (ou aux autres régulateurs), en fonction de sa maturité physiologique, traduit une différence de sensibilité aux hormones. TREWAWAS (1991) suggère que la réponse globale du tissu est fonction de la sensibilité individuelle des cellules et du nombre de cellules ayant la même sensibilité. Dans les tissus en croissance, l'hétérogénéité entre les cellules qui évoluent du stade jeune au stade mature, est forte et, en conséquence, le tissu est peu sensible. Avec le temps, un nombre de cellules de plus en plus grand atteint le stade mature et le tissu devient plus sensible. Avec un tel processus, il semble que l'existence d'un signal spécifique pour déclencher la maturation ne soit pas nécessaire, elle débutera lorsque les cellules auront majoritairement atteint un état de maturité physiologique requis.

Sénescence et maturation:

La maturation des fruits est considérée comme une étape de la sénescence (WATADA *et al*, 1984). ROMANI (1987) suggère que le fruit mûr maintient son homéostasie, mais avec de moins en moins de succès au cours du vieillissement. Jusque très tard dans la maturation, des systèmes de protection contre une dégradation trop rapide par les processus oxydatifs liés à la sénescence des cellules, existent dans le fruit, dont:

- les protecteurs enzymatiques (peroxydases, catalases, SOD, glutathion réductase, etc),
- les protecteurs non enzymatiques (acide ascorbique, thiols).

Déviation de la maturation:

Les processus de maturation et de sénescence peuvent dévier de la voie normale sous l'action d'un stress extérieur; la pulpe des fruits devient alors translucide et les chlorophylles de l'épiderme ne se dégradent pas, même après traitement par l'éthéphon. Le mécanisme physique conduisant à la translucidité paraît simple, la disparition de l'air dans les espaces intercellulaires rend le milieu plus uniforme, il devient translucide car la diffraction de la lumière y est moins forte. Parallèlement le fruit devient plus dense. Les espaces intercellulaires sont donc envahis par une solution, mais les observations réalisées (diffusion des solutés à partir de la pulpe) ne permettent pas de trancher véritablement en faveur d'une origine intracellulaire (efflux du contenu des propres cellules du tissu) ou d'une origine apoplastique (afflux de sève) de cette solution. Cette dernière hypothèse est appuyée par l'observation que le jaune commence au centre des yeux, dans une zone relativement plus vascularisée que le reste de la pulpe.

Activités enzymatiques impliquées dans le processus:

L'augmentation de certaines activités enzymatiques, α et ß-galactosidases, suggère une modification de la perméabilité des membranes par attaque des galactolipides membranaires et donc une origine intracellulaire de la solution qui envahit les espaces intercellulaires. La disparition des galactolipides est observée dans d'autres cas de sénescence anormale, par exemple induite par le froid chez la tomate .

D'autres activités enzymatiques augmentent, et en premier lieu, les α-mannosidases dont le rôle dans le métabolisme est mal connu, mais qui pourraient participer à la défense des cellules en cas d'agression extérieure (attaque des parois squelettiques des pathogènes). Les catalases augmentent également, elles sont souvent considérées comme de bons marqueurs de la

sénescence, mais ont aussi un rôle détoxifiant vis-à-vis de l'H_2O_2. Une alternative est que toutes ces activités sont peut-être induites par l'accroissement de la teneur en éthylène, en réponse au stress initial, sans présenter un rôle spécifique vis-à-vis du jaune.

L'absence de dégradation des chlorophylles de l'épiderme, peut résulter d'une diminution de la teneur en chlorophyllases liées à de hautes températures (≈50°C) relevées à la surface du fruit. Mais dans ce cas, il faudrait admettre une action à long terme (semaines ou mois) de ce facteur, car réduire les températures au moment des traitements ne modifie pas la réponse des fruits (page 198). Une alternative peut être une modification de la sensibilité de l'épiderme à l'éthylène (variation qualitative ou quantitative des récepteurs hormonaux). Une autre alternative est la présence de protecteurs des chlorophylles induite par les conditions climatiques aux périodes de jaunes (par exemple d'autres hormones antagonistes de l'éthylène).

Facteurs induisant le phénomène du "jaune" de l'ananas:

Parmi les facteurs qui déterminent l'apparition du "jaune", les facteurs climatiques semblent avoir une place prépondérante, devant d'autres facteurs comme la nutrition ou la génétique. Le "jaune" n'apparaît qu'aux périodes chaudes de l'année; le caractère aléatoire et la brièveté de son apparition dans le temps constituent la difficulté majeure pour la mise en place d'expérimentations sur le terrain et l'étude du phénomène. Il semblerait que l'induction du "jaune" soit contrôlée par différents facteurs, à des degrés divers, mais dont aucun n'est véritablement déterminant. Pour cette raison et bien qu'il semble évident que la nutrition a un rôle certain dans l'apparition du "jaune" puisque seuls les gros fruits sont atteints, il n'a pas été possible de mettre en évidence une liaison entre la translucidité de la pulpe et la composition minérale des plants ou des fruits. Le facteur nécessaire (mais non suffisant) d'apparition du "jaune" pourrait être la coïncidence d'un fort échauffement du fruit (notamment lors du passage du soleil au zénith) et de précipitations (TEISSON, 1979; HUET, 1953); l'observation de la répartition des précipitations et de l'apparition du "jaune" au cours de l'année, suggère une possible sensibilisation des plants s'étalant sur la période de fructification et liée à la disponibilité en eau pour les plants. L'induction accidentelle du "jaune" par une irrigation irrégulière en période chaude, est une observation qui appuie les suggestions précédentes.

Impact sur la qualité du fruit:

La nature non climactérique de l'ananas pose au producteur le problème de la détermination du stade de coupe. L'adéquation entre la maturité

(qualités organoleptiques optimales) et l'aptitude à la conservation (résistance et fermeté de la chair), doit être bonne pour que le fruit arrive en parfait état, au stade de la commercialisation. Il est clairement établi que la translucidité, si elle n'est pas trop développée, ne nuit pas aux qualités organoleptiques du fruit. Au contraire, les fruits translucides, grâce en partie à l'augmentation de l'acidité au cours du transport, sont les plus appréciés des consommateurs. De fait, ils ont le meilleur rapport sucres/acidité (selon les tests de qualité gustative, les fruits les plus appréciés ont un ESS/AL compris entre 1 et 1,5). L'augmentation de l'acidité provient probablement de l'utilisation d'une partie des sucres dont la teneur baisse légèrement au cours de la conservation. Il reste que les fruits sont plus fragiles que les autres et qu'il convient d'apporter un soin particulier au conditionnement et au transport. Plutôt que d'essayer d'éliminer le phénomène, il faut maîtriser son apparition et son développement dans les fruits pour tirer parti de l'amélioration des qualités gustatives liées au "jaune".

Orientations à donner aux recherches concernant le "jaune"

Pour aller au delà dans la compréhension du "jaune", la mise au point d'un système expérimental reproduisant le phénomène de manière moins aléatoire, serait nécessaire. La première possibilité serait d'**utiliser des parcelles irrigables**, en zone favorable à l'apparition du "jaune". Une alternative consiste à utiliser un modèle expérimental conduisant à des fruits translucides; par exemple, les **fruits obtenus en culture hydroponique** sont en général translucides. Cependant, une expression "macroscopique" identique (translucidité de la pulpe), ne signifie pas forcément identité des mécanismes.

Par ailleurs, il faut clarifier l'**origine du liquide extracellulaire** et plusieurs possibilités sont à explorer:

- l'**extraction sélective du liquide extracellulaire**, puis la comparaison de sa composition avec le "jus complet extrait de la pulpe". S'il s'agit d'un afflux de sève résultant d'une réhydratation brusque du plant, au retour des pluies, on peut s'attendre à obtenir une solution dont la composition se rapproche de celle de la sève, avec absence ou faibles concentrations des composés synthétisés et compartimentés dans les cellules (composés phénoliques par exemple).

- si la solution qui envahit les espaces intercellulaires provient des cellules, suite à une modification de perméabilité membranaire, il doit être possible de **caractériser ce changement au niveau de la composition des membranes**. Plus particulièrement, il faudrait d'une part mesurer les

variations des teneurs en lipides (dont les galactolipides) et d'autre part vérifier l'attaque effective de ces galactolipides par les α et ß-galactosidases des extraits protéiques du fruit. La disparition des galactolipides est associée à une maturation anormale induite par le froid chez la tomate (NGUYEN et MAZLIAK, 1990), alors que la sénescence en générale est plutôt associée à la dégradation des phospholipides (LESHEM *et al*, 1986). La composition des membranes peut donc être un indicateur de la nature du phénomène. D'autres activités enzymatiques liées à la sénescence des membranes peuvent être prises en compte (phospholipases et lipoxygénases). Quelques soient les activités mesurées, il est indispensable de tenir compte de la compartimentation cellulaire. Les extraits protéiques totaux permettant difficilement une interprétation du rôle éventuel de chacune des activités au niveau des membranes ou des parois.

La production d'éthylène est accrue dans les fruits "jaunes". Un modèle expérimental, comme la culture hydroponique, en réduisant le côté aléatoire de l'apparition du phénomène, permettrait d'étudier plus finement le **rôle de l'éthylène et son contrôle (ou non) des activités enzymatiques** qui augmentent au cours du processus. L'évolution et le **rôle des autres hormones endogènes**, en particulier l'**acide abscissique**, pourraient être étudiée (dosage (radio)immunologique), afin de chercher une liaison avec l'expression du phénomène.

L'étude détaillée des **facteurs, en particulier climatiques, qui induisent le phénomène**, est plus délicate toujours en raison du caractère aléatoire du phénomène et de la brièveté des époques de l'année où il apparaît. Une telle étude devrait se faire à la fois sur des clones sensibles et d'autres résistants, permettant peut être de mettre en exergue des caractéristiques biochimiques plus particulièrement associées au "jaune".

La non dégradation des chlorophylles de la peau, malgré l'application d'un générateur d'éthylène, mériterait aussi d'être étudiée de façon plus approfondie. Sur le plan pratique, c'est un point important pour les qualités de présentation du fruit. Un effet négatif de la température sur le traitement semble exclu à très court terme, mais une sensibilisation plus lente au phénomène est possible. Au moins 2 alternatives peuvent être explorées: 1) non induction des chlorophyllases par l'éthylène pouvant être liée à l'absence ou la dégradation des récepteurs, 2) présence d'autres hormones antagonistes servant de "protecteur" des chlorophylles.

La sénescence, dont la maturation fait partie, est la dernière phase du développement. Elle est l'expression séquentielle des gènes qui la contrôlent. La compréhension des phénomènes qui la régulent passent donc par l'étude du mode d'action des hormones pour la dérépression des gènes: identification des récepteurs et mécanismes de la dérépression (HARTMANN *et al*, 1987).

ANNEXE 1

Séparation par HPLC des composés phénoliques de la pulpe d'ananas:

- Esters solubles (dans les solvants d'extraction) non hydrolysés de la pulpe
- Acides phénols des parois après hydrolyse alcaline

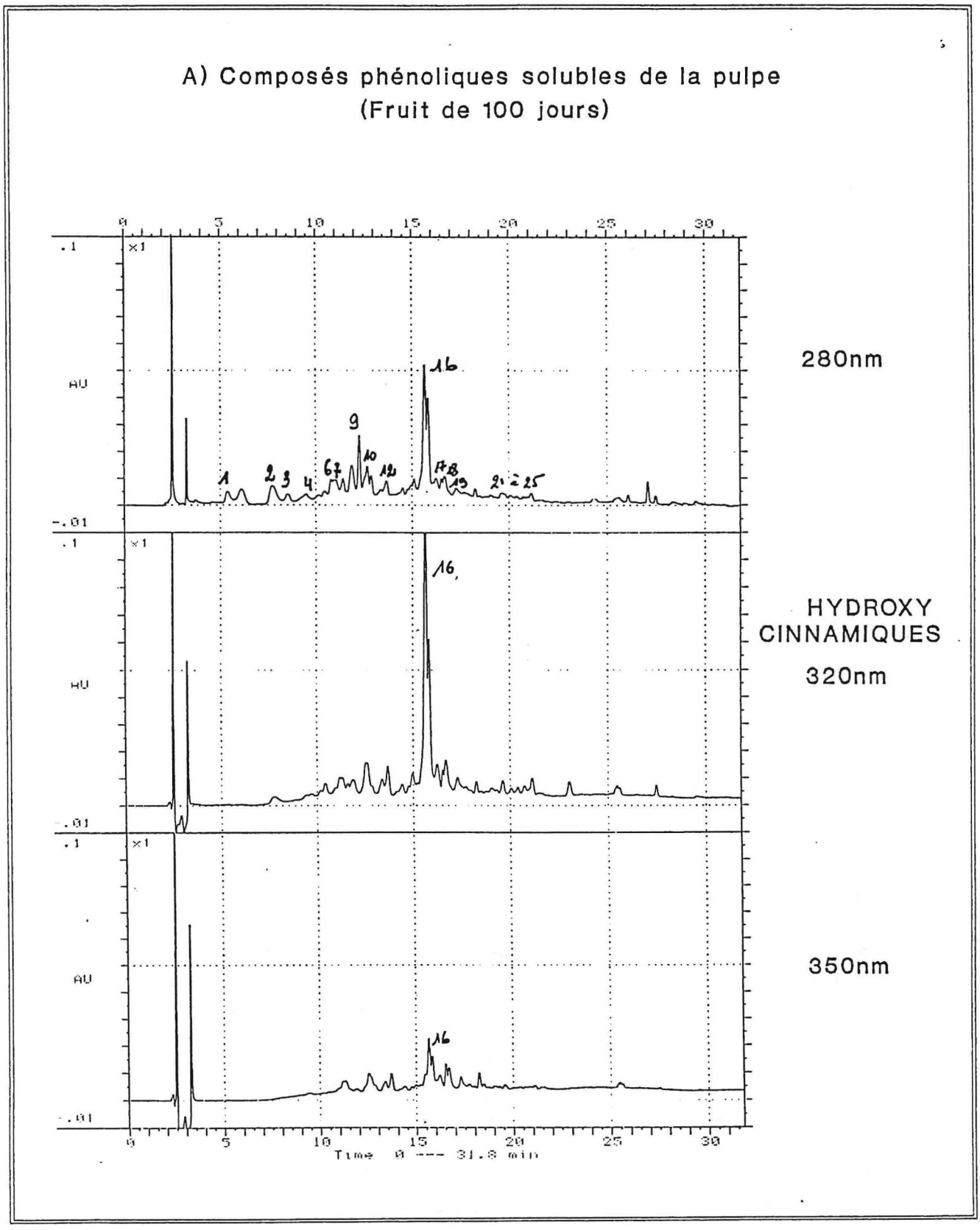
La séparation est réalisée sur colonne C18 par un gradient acétonitrile/eau acidulée, non linéaire (voir Matériel et méthode). La détection des phénols est réalisée simultanément à plusieurs longueurs d'onde, par une barette de diodes UV. Trois longueurs d'onde sont représentées sur les chromatogrammes:

- 280nm maximum d'absorption des hydroxyflavanes
- 320nm maximum d'absorption des dérivés hydroxycinnamiques
- 350nm maximum d'absorption des flavonols

Les fruits utilisés correspondent aux stades de maturité suivant:
- 100 jours après TIF
- 150 jours après TIF
- 165 jours après TIF
- "jaunes" de 165 jours

Les figures A à F-1) correspondent aux analyses des composés phénoliques solubles de la pulpe, les figures F-2) à J, aux composés phénoliques des parois obtenus après hydrolyse alcaline.

La détermination du groupe de phénols auquel appartient chaque pic peut être faite de 2 façons: la première consiste (fig.A,B,C,D et G,I,J) à examiner chacun des pics aux 3 longueurs d'onde 280nm, 320nm et 350nm pour déterminer où se situe le maximum d'absorption; la seconde (fig.E et H) consiste à examiner les spectres correspondant aux pics les plus significatifs et automatiquement déterminés par le programme d'analyse de l'appareillage utilisé pour faire les analyse HPLC (système WATERS 990). Les figures E et H montrent des analyses des chromatogrammes correspondant respectivement aux figures D (pulpe fruit "jaunes") et G (parois fruits de 100jours). Elles présentent les spectres entre 240 et 380nm des principaux pics séparés par la chromatographie. La numérotation des pics est faite à partir de ces figures et les pics sont repérés sur les différents chromatogrammes par les mêmes numéros. Il n'y a évidemment pas de lien entre la numérotation des pics des chromatogrammes obtenus à partir de la pulpe et des parois.



Fruits très verts de 100jours: Le pic principal correspond au pic n°16 des autres chromatogrammes, et identifié par son son spectre comme étant un dérivé de l'acide p-coumarique. On voit très bien ici le principe de détermination de l'appartenance à une famille de phénols. Le pic apparaît aux 3 longueurs d'onde mais le maximum d'absorption se situe vers 320nm; il s'agit donc d'un dérivé hydroxycinnamique. La plupart des pics repérés sur la fig.E (fruit 'jaune'), sont identifiables également sur ce chromatogramme.

La figure E confirme l'absence des flavonols des extraits de pulpe, car il n'apparaît que des spectres de dérivés hydroxycinnamiques ainsi que de composés absorbant entre 265 et 280nm et de nature indéterminée. La figure H montre que l'essentiel des phénols obtenus après hydrolyse alcaline des parois, sont des dérivés hydroxycinnamiques. Il ne reste que quelques traces d'autres composés.

En ce qui concerne les composés phénoliques de la pulpe, aucune différence qualitative n'apparait sur les chromatogrammes, la différenciation des pics selon leur appartenance à un groupe de phénols n'a été faite que sur les figures C (fruits de 165 jours) et D (fruit "jaune"): ont été marqués en noir les pics correspondant aux composés absorbant vers 280nm et de nature indéterminée; en blanc, ceux qui correspondent aux dérivés hydroxycinnamiques; aucun pic ne correspond aux flavonols, (voir la détermination des pics en légendes).

En ce qui concerne les composés phénoliques associés aux parois, aucune différence qualitative n'apparait pour les temps de rétention courts correspondant à des composés simples type acides phénols. Pour les temps de rétention longs (à partir de ≈25minutes), des pics supplémentaires apparaissent dans les fruits très verts (100 jours); ils correspondent à des molécules moins plolaires. Sur la fig.G, ont été colorés en noir les pics correspondant aux dérivés hydroxycinnamiques. Il n'y a en fait que quelques traces d'autres composés, (voir la détermination des pics en légende).

La figure F présente la superposition des chromatogrammes, à 280nm, des extraits de fruits jaunes et de 100 jours: 1) composés solubles de la pulpe, 2) acides phénols associés aux parois.

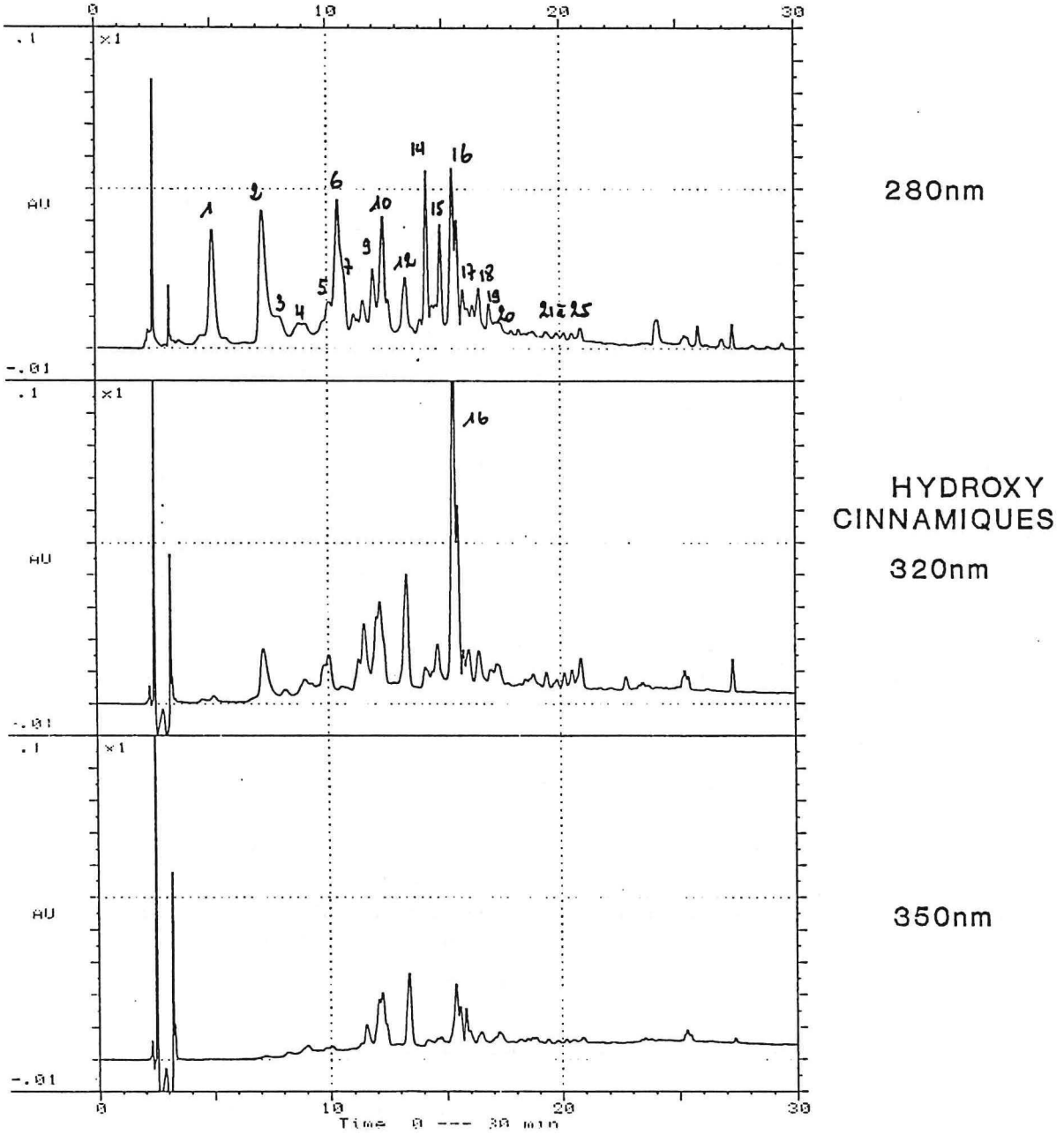
1) Composés phénoliques de la pulpe.

Le chromatogramme en gris clair correspond au fruit "jaune", celui en trait noir, au fruit de 100 jours. Les pics sont identifiés par les mêmes numéros que sur les chromatogrammes A à E. On constate qu'il y a superposition quasi totale des 2 chromatogrammes (avec 2 échelles différentes, puisque les concentrations sont très différentes dans les 2 types de fruits).

2) Composés phénoliques associés aux parois.

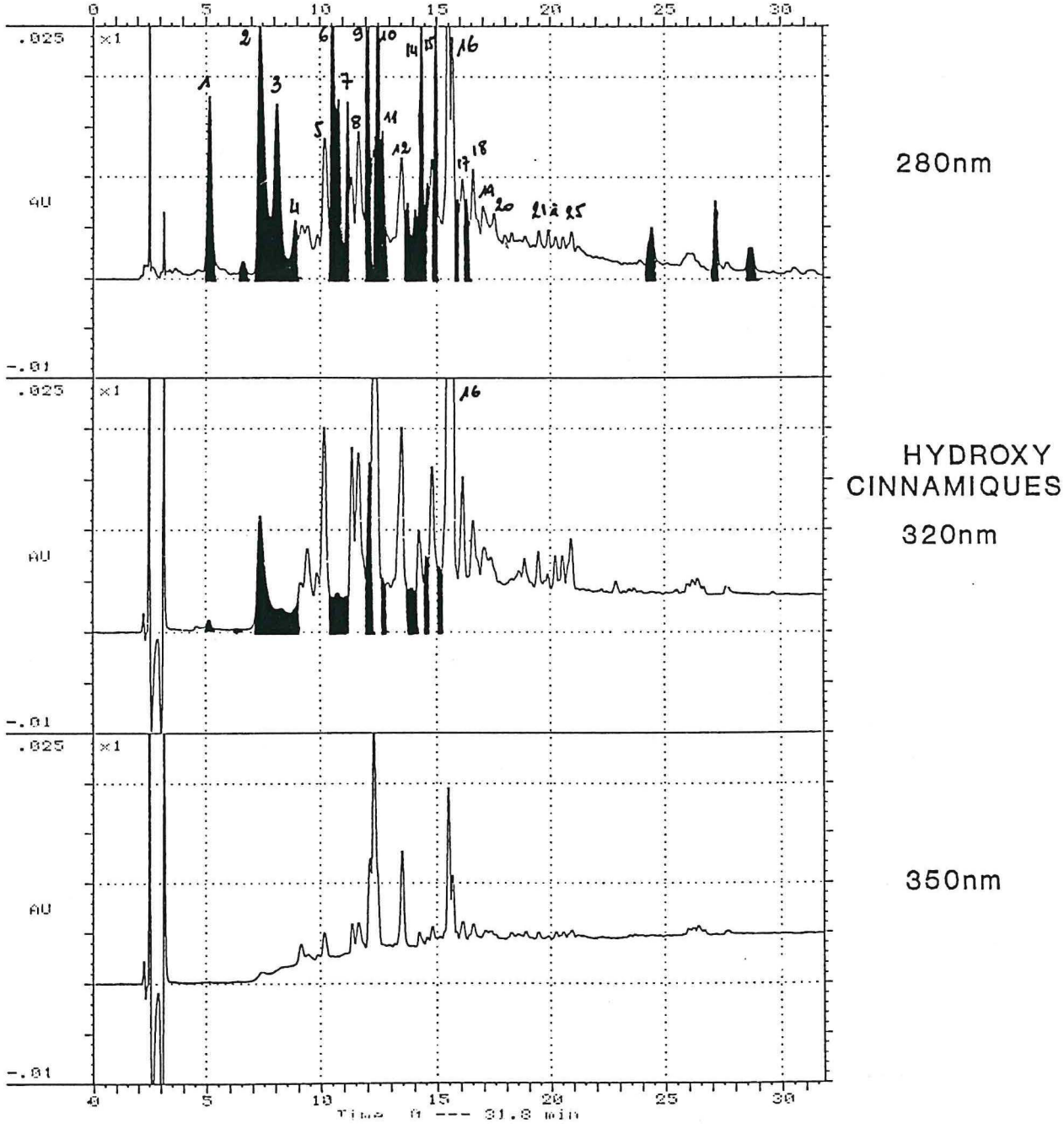
Le chromatogramme en clair correspond au fruit de 100jours, celui en trait plus foncé, au fruit jaune. Les chromatogrammes se différencient essentiellement par les pics correspondant aux longs temps de rétention (n° 14 à 25).

B) Composés phénoliques solubles de la pulpe d'ananas
(Fruits de 150 jours)



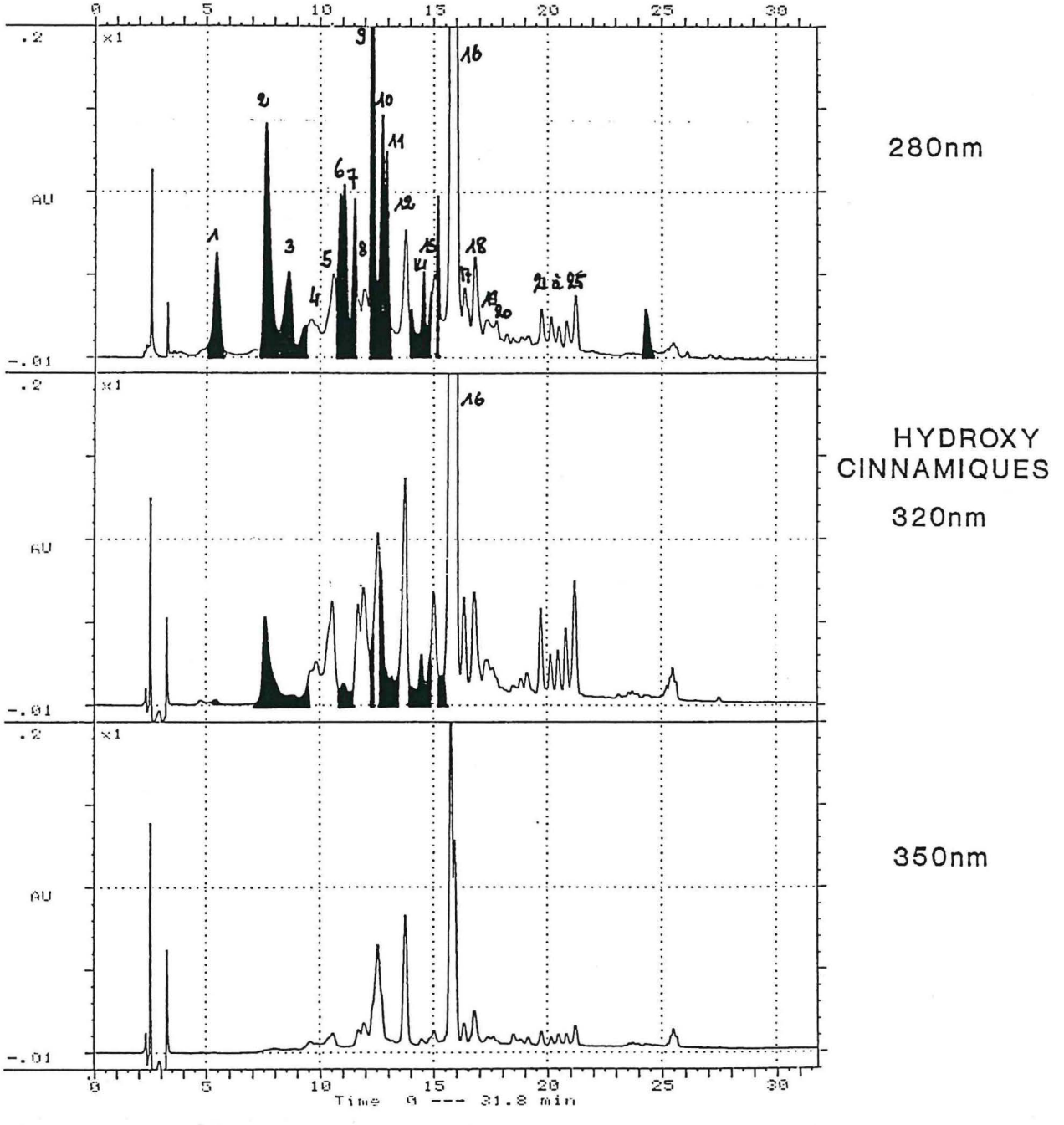
Fruits moyennement mûrs de 150 jours: Tous les pics de la fig.E sont identifiables également sur la fig.B; on constate que dans ces extraits 2 groupes sont représentés, les dérivés hydroxycinnamiques et des composés absorbant vers 280nm. Il n'y a pas de flavonol puisqu'aucun des pics n'est maximum à 350nm (par rapport aux 2 autres longueurs d'ondes). Entre le fruit très vert (fig.A) et le fruit de 150 jours (fig.B), on note une augmentation de l'ensemble des composés phénoliques par rapport à celui correspondant au pic n°16, (voir identification sur la fig.E).

C) Composés phénoliques solubles de la pulpe d'ananas
(Fruits de 165 jours)



Fruits très mûrs de 165 jours: Tous les pics de la fig.E sont identifiables également sur la fig.B; on constate que dans ces extraits 2 groupes sont représentés, les dérivés hydroxycinnamiques (pics en blanc) et des composés absorbant vers 280nm (pics en noirs). Il n'y a pas de flavonol puisqu'aucun des pics n'est maximum à 350nm (par rapport aux 2 autres longueurs d'ondes). On n'observe pas de différence qualitative majeure entre les compositions en phénols des ananas normaux aux différents stades de maturité (fig.A, B, C).

D) Composés phénoliques solubles de la pulpe d'ananas (Fruits "jaunes")

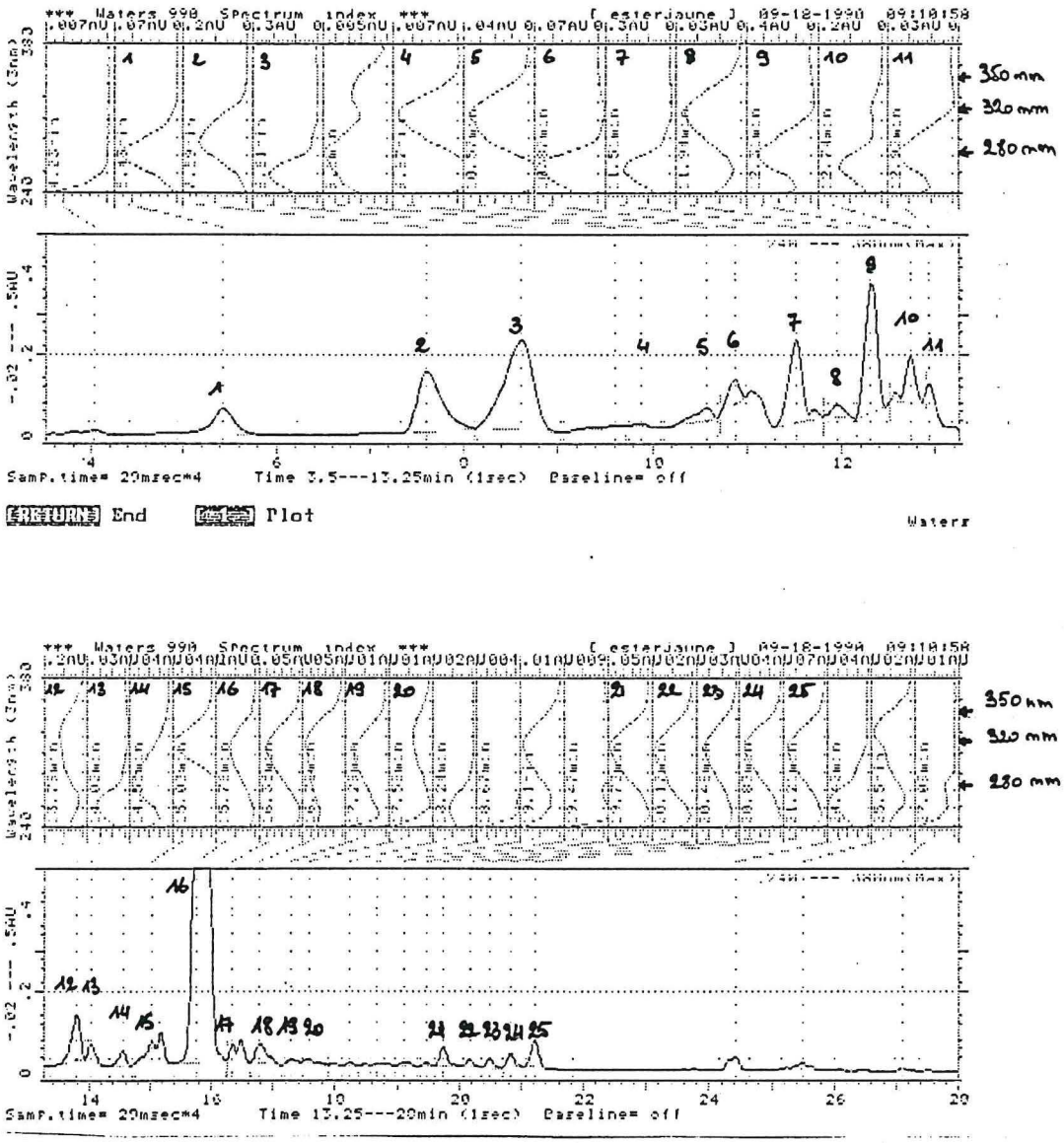


<u>Fruits "jaunes":</u> Tous les pics présents sur le chromatogramme des fruits "jaunes" ont été également repérés sur les chromatogrammes précédents; Il n'y a donc pas de différence qualitative entre fruits "jaunes" et normaux. Quantitativement, la concentration du dérivé hydroxycinnamique correspondant au pic n°16 est en nette augmentation par rapport aux autres composés. Parmi les composés absorbant vers 280nm, celui correspondant au pic n°9, en noir, augmente fortement (identification voir fig.E)

E) Composés phénoliques solubles de la pulpe d'ananas

Détermination du spectre des principaux pics

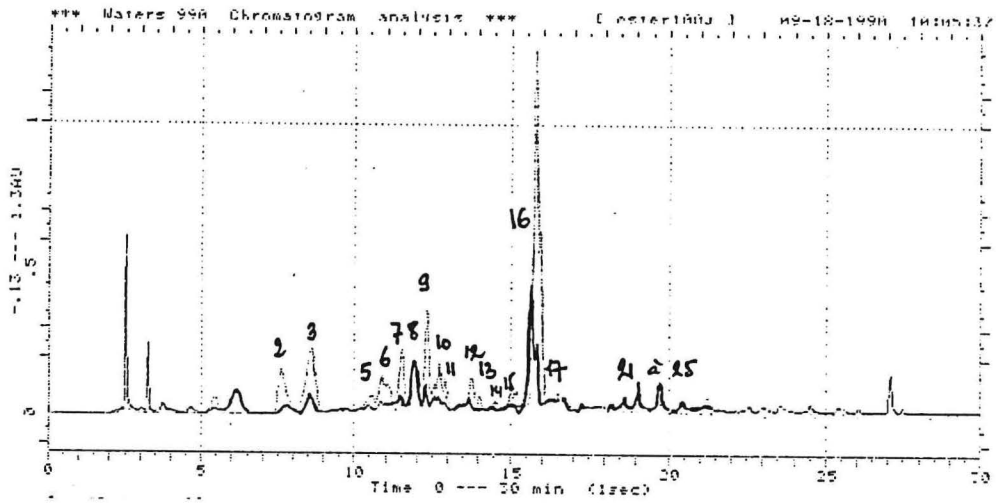
(Fruits "jaunes")



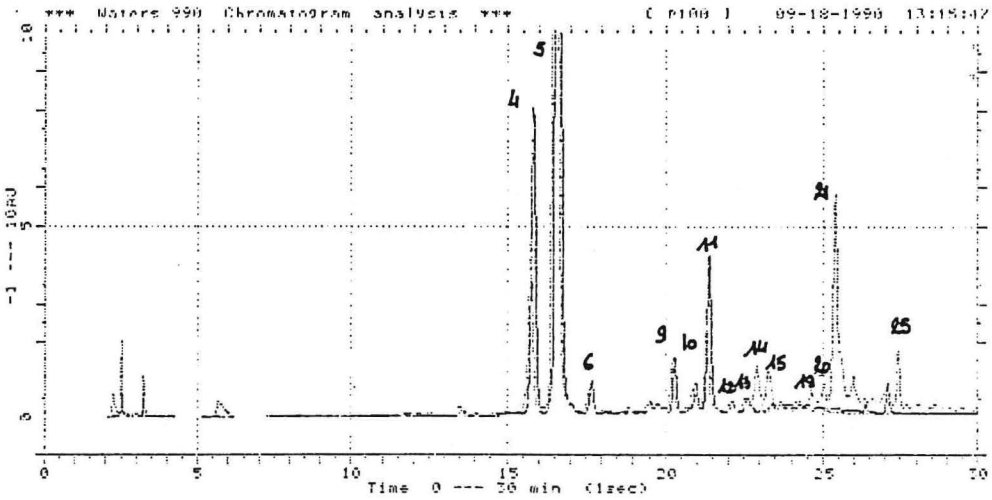
Fruits "jaunes": Cette figure reprend le chromatogramme de la fig.D transformé pour permettre une analyse spectrale individuelle de chaque pic. Les pics n° 4, 5, 8, 12, 15-25, sont des composés aux caractéristiques spectrales de dérivés hydroxycinnamiques. Les pics n°1-3, 6, 7, 9-11, 13 et 14, sont des composés de nature indéterminée ayant un maximum d'absorption entre 265 et 280nm.

F) Comparaison de 2 stades de maturité par Superposition des chromatogrammes à 280nm

1) composés phénoliques solubles



2) composés phénoliques des parois



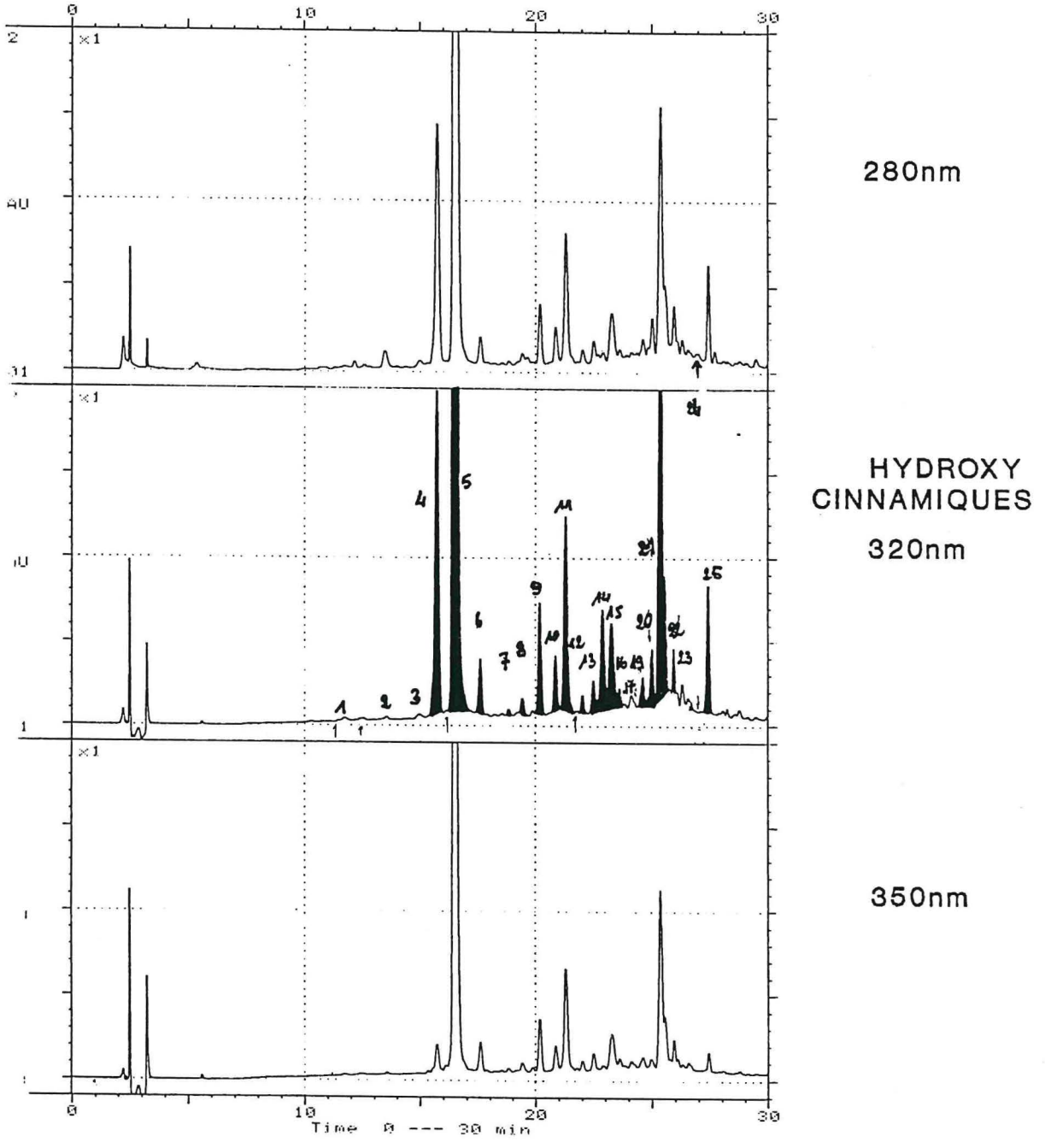
<u>Comparaison de 2 stades de maturité:</u>

<u>1) composés solubles:</u> On a superposé les chromatogrammes des composés phénoliques de la pulpe de fruits 'jaune' (trait clair) et de fruits très verts de 100 jours (trait sombre), en ne modifiant que les échelles de DO. On note qu'il y a correspondance parfaite entre les 2 chromatogrammes, montrant bien l'absence de différence qualitative entre les 2 types de fruits.

<u>2) composés associés aux parois:</u> On a réalisé la même opération à partir des composés phénoliques associés aux parois.: trait clair= fruit de 100 jours; trait foncé= fruit 'jaune'. On note la correspondance parfaite entre les 2 chromatogrammes pour tous les pics correspondant à des temps de rétention inférieurs à 22,5minutes (pic n°13). Au delà, il apparait des pics importants (dérivés hydroxycinnamiques, voir fig.H) dans les fruits verts;

G) Composés phénoliques des parois (par hydrolyse alcaline)

(Fruits de 100 jours)

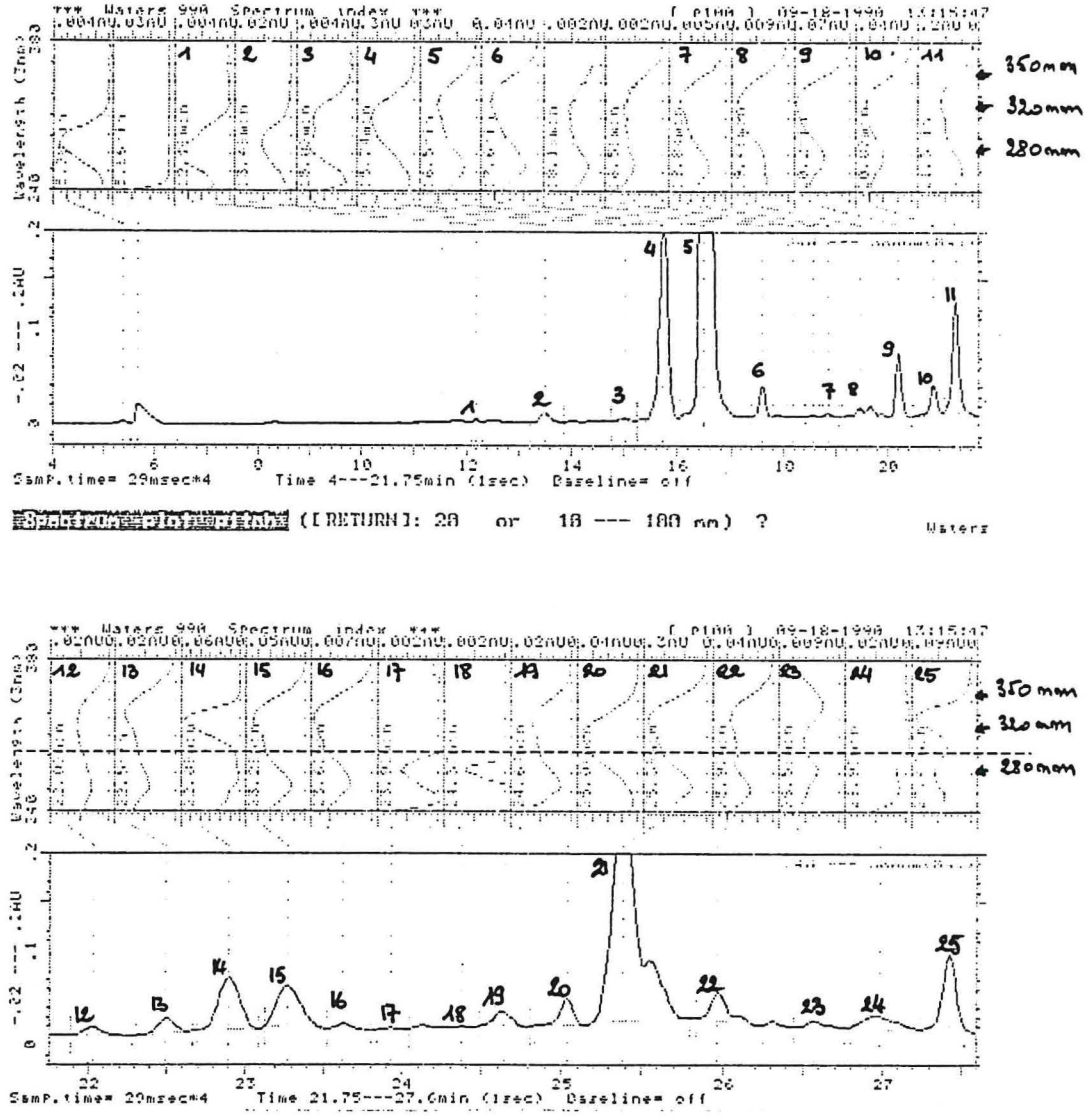


Fruits de 100jours: La comparaison des hauteurs des pics aux 3 longueurs d'onde et l'analyse spectrale (fig.H), montrent que l'essentiel des composés obtenus par hydrolyse sont des dérivés hydroxycinnamiques (en noir sur la figure).

H) Composés phénoliques des parois de pulpe d'ananas

Détermination du spectre des principaux pics

(Fruits de 100 jours)

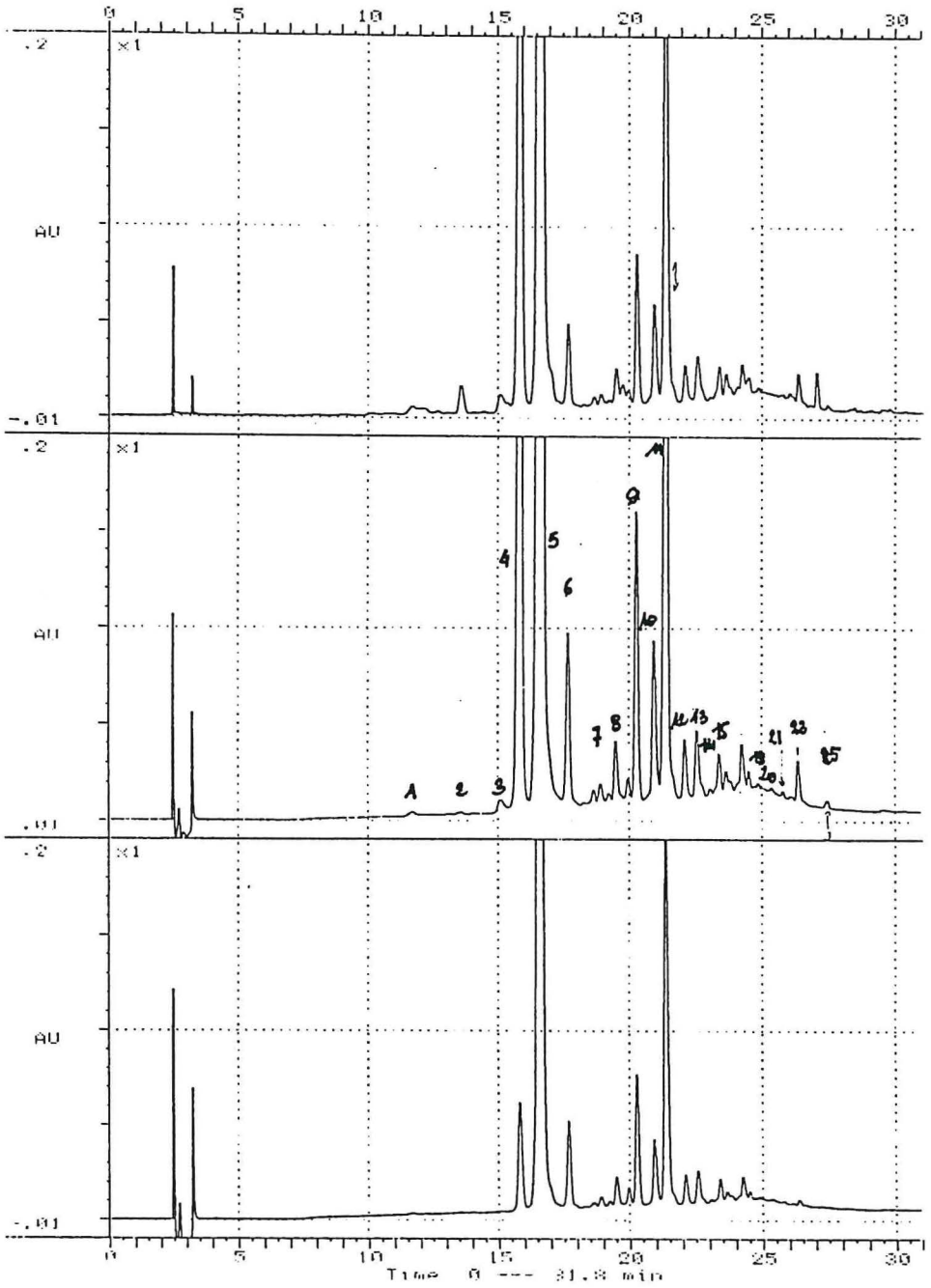


Fruits de 100jours: Cette figure reprend le chromatogramme précédent (fig.G) pour une analyse spectrale des composés phénoliques associés aux parois. Parmi les pics numérotés, seuls les pics n°1-3 et 17, 18 ont un maximum d'absorption vers 280nm. Les autres présentent des spectres de dérivés hydroxycinnamiques.

identification: les pics majeurs, n°4, 5 et 21 correspondent à des phénols dont les caractéristiques UV sont similaires à celles des ac p-coumarique (4), et férulique (5 et 21). Il en est de même pour les pics mineurs 20 (proche de l'ac p-coumarique) et 6 et 19 (proche de l'ac férulique). Le pic 14 correspond à un composé dont les caractéristiques sont proches de l'ac sinapique.

I) Composés phénoliques des parois (par hydrolyse alcaline)

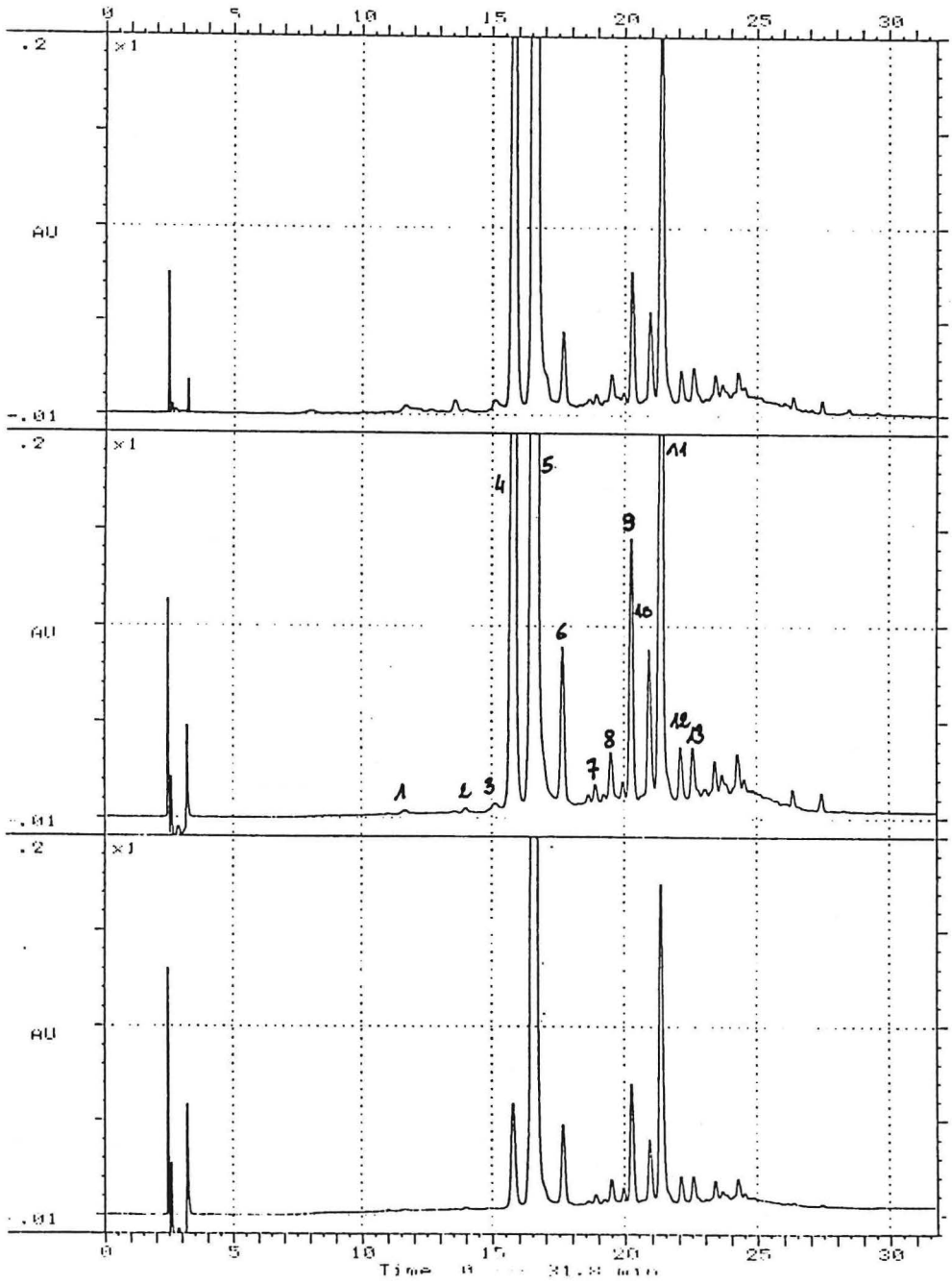
(Fruits de 160 jours)



Fruits de 160jours (fig.I) et "jaunes" (fig.J): On note sur les 2 chromatogrammes que l'essentiel des composés phénoliques associés aux parois sont des dérivés hydroxycinnamiques et qu'il n'y a pas de différence qualitative entre les 2 types de fruits. Il semble de même que les proportions relatives des différents composés phénoliques dans les 2 types de fruits soient similaires.

J) Composés phénoliques des parois (par hydrolyse alcaline)

(Fruits "jaunes")



ANNEXE 2

Figures complémentaires pour les analyses statistiques ACP1 et ACP2 et tableaux donnant la qualité, les corrélations et la contribution pour les 3 premiers axes pour chaques individus.

Rappelons que les 2 ACP, les 2 AFD portent sur la même population. Celle-ci comporte 48 individus étudiés selon 19 variables (15 enzymatiques et 4 chimiques) dans l'ACP1 et selon 15 variables enzymatiques dans l'ACP2 (les variables chimiques étant mises en variables supplémentaires).

Des fruits normaux sont récoltés à 4 stades de la fin de maturation (8 fruits par stade: 149, 156, 164 et 171 jours après TIF), ainsi que des fruits moyennement translucides (dénommés aussi demi translucides), à 156 jours, et translucides, à 164 jours. Sur les graphiques des ACP, les individus sont représentés par 4 chiffres, âges des fruits suivi du numéro de la répétition (fruits normaux), et par T/2 ou T, suivi du numéro de la répétition.

Abréviations utilisées pour désigner les variables dans les figures:

chimiques:
- ACL: acidité libre
- THI: thiols
- ESS: extrait sec soluble
- ASC: acide ascorbique

enzymatiques:
- AGL: α-galactosidase
- AMN: α-mannosidase
- NAG: N-acétylglucosaminidase
- AIA: AIA oxydase (AIA)
- POX: polyphénoloxydase
- NQR: NADH quinone réductase
- CAT: catalase
- PGA: polygalacturonase
- BGL: ß-galactosidase
- PHO: phosphatase
- AAX: ascorbate peroxydase
- PER: peroxydase
- MDH: enzyme malique
- GSG: glutathion réductase
- SOD: superoxyde dismutase

A la suite des abréviations, se trouvent les représentations graphiques complémentaires des analyses en composantes principales ACP1 et ACP2 (page 165): figurent respectivement pour les 2 ACP, un tableau récapitulatif de la qualité de la représentation sur les 3 premiers axes pour chaque individu (QLT= qualité; COR= corrélation; CTR= contribution à l'axe), la matrice des corrélations et le tableau des vecteurs et des valeurs propres (axes 1 à 3) et la représentation des individus et variables sur les axes 1 et 3.

A ANALYSE STATISTIQUE ACP1

MATRICE DES CORRELATIONS

	PGA	PHO	AMN	AGL	BGL	NAG	PER	AAX	CAT	SOD	AIA	POX	GSG	NQR	MDH	THI	ACL	ESS	ASC
PGA	1000																		
PHO	444	1000	.																
AMN	311	618	1000																
AGL	652	380	452	1000															
BGL	368	292	370	796	1000														
NAG	670	169	239	685	499	1000													
PER	10	341	453	68	188	-113	1000												
AAX	-92	21	154	-69	55	-205	761	1000											
CAT	423	398	450	631	455	395	358	239	1000										
SOD	105	95	240	93	50	-52	297	260	277	1000									
AIA	25	264	321	218	308	101	461	253	152	156	1000								
POX	203	272	395	337	490	166	796	713	379	360	557	1000							
GSG	-147	435	322	163	411	-245	220	121	159	18	197	223	1000						
NQR	-76	499	532	-63	102	-239	636	401	267	449	519	549	422	1000					
MDH	273	395	440	618	701	278	-61	-234	263	127	189	191	515	129	1000				
THI	100	-187	-241	-96	-289	236	-389	-344	-223	-340	-257	-398	-406	-553	-226	1000			
ACL	290	-238	-298	132	-123	427	-457	-231	10	-162	-292	-267	-585	-621	-226	612	1000		
ESS	-112	122	32	-161	-182	-315	280	261	99	92	123	73	81	369	-142	-445	-329	1000	
ASC	290	-37	-101	20	-155	198	-294	-148	-39	193	-97	-74	-316	-136	-65	191	471	-273	1000

coeff x1000

VECTEURS ET VALEURS PROPRES (AXES 1 à 3)

NUMERO	VAL PROPRE 1	VAL PROPRE 2	VAL PROPRE 3
	5.71472	3.90315	2.05782
OBJET 1	.11232	.36949	-.17406
OBJET 2	.26092	.10654	.11233
OBJET 3	.29732	.09882	.03757
OBJET 4	.21575	.38949	.04259
OBJET 5	.25921	.26424	.17249
OBJET 6	.05906	.42635	-.14114
OBJET 7	.30460	-.18531	-.27495
OBJET 8	.19922	-.21652	-.37775
OBJET 9	.24757	.18821	-.14699
OBJET 10	.16635	-.05072	-.24212
OBJET 11	.24060	-.04242	-.08534
OBJET 12	.32452	-.02652	-.29358
OBJET 13	.23077	-.08752	.43435
OBJET 14	.30832	-.22044	-.04345
OBJET 15	.20876	.22944	.38927
OBJET 16	-.25369	.18846	-.09785
OBJET 17	-.22776	.28633	-.29009
OBJET 18	.10125	-.24729	-.02435
OBJET 19	-.10333	.17260	-.27530

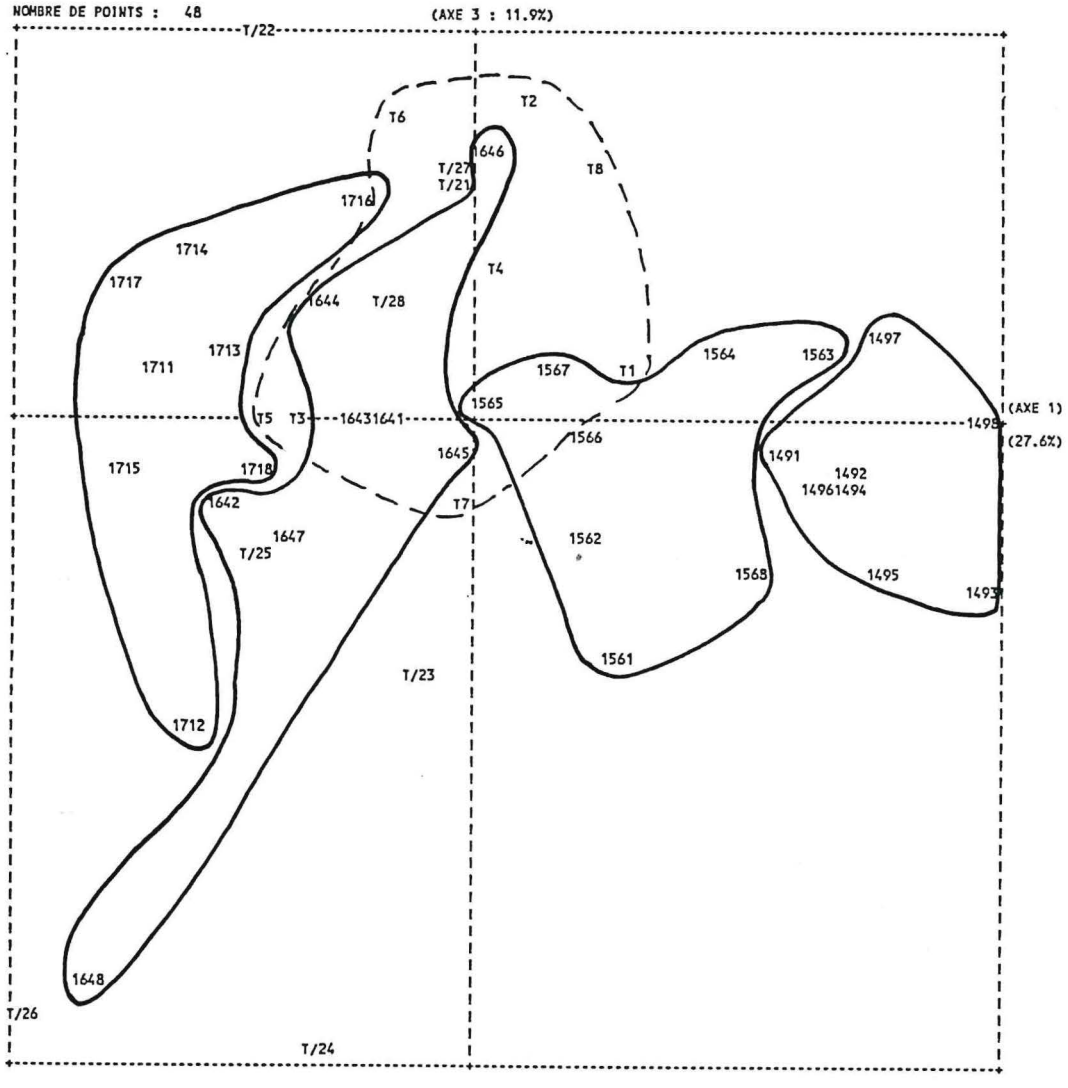
QLT = qualité de la représentation
1#F = coordonnée axe 1
2#F = coordonnée axe 2
3#F = coordonnée axe 3
CTR = contribution à l'axe
COR = corrélation

QUALITE DE LA REPRESENTATION DES INDIVIDUS (QUALITE, CORRELATION, CONTRIBUTION)

47 INDIVIDUS ACTIFS :

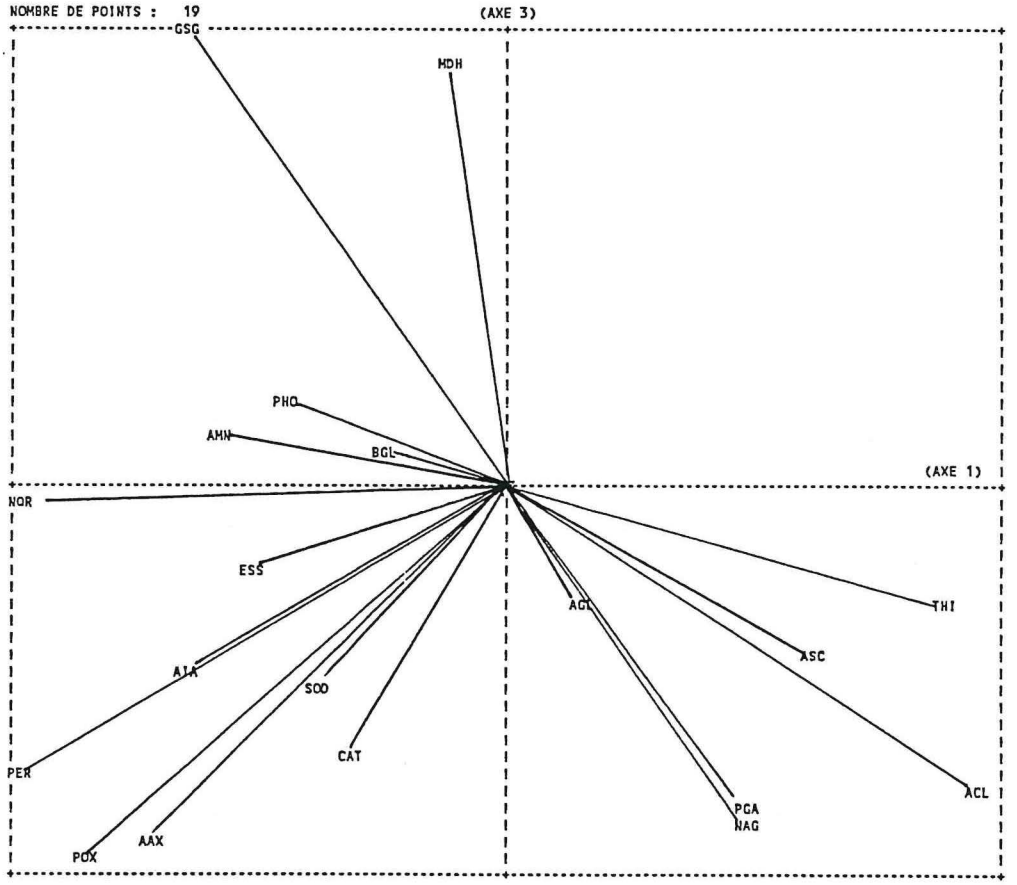
	I1	QLT	1#F	COR	CTR	2#F	COR	CTR	3#F	COR	CTR
1	1491	762	2701	385	30	-832	37	5	-266	4	1
2	1492	871	3339	511	45	416	8	1	-427	8	2
3	1493	832	4679	630	89	-1564	70	16	-1313	50	16
4	1494	917	3428	563	48	552	15	2	-573	16	3
5	1495	776	3849	621	60	1104	51	8	-1139	54	12
6	1496	856	3012	543	37	-1631	159	17	-463	13	2
7	1497	905	3801	718	59	233	3	0	665	22	4
8	1498	811	4827	763	95	799	21	4	-13	0	0
9	1561	748	1215	121	6	697	40	3	-1756	253	29
10	1562	708	1006	84	4	-391	13	1	-924	70	8
11	1563	846	3210	497	42	-1695	139	19	468	11	2
12	1564	626	2148	327	19	311	7	1	544	21	3
13	1565	403	69	1	0	1035	232	7	110	3	0
14	1566	798	1126	161	5	-725	67	3	-190	5	0
15	1567	745	610	33	2	57	0	0	326	9	1
16	1568	856	2675	395	29	-1639	148	18	-1183	77	13
17	1641	692	-891	110	3	-90	1	0	-31	0	0
18	1642	937	-2377	517	23	318	9	1	-676	42	4
19	1643	686	-1014	139	4	-1281	222	11	-47	0	0
20	1644	749	-1553	217	10	-2047	377	28	888	71	7
21	1645	457	-329	12	0	-104	1	0	-200	5	0
22	1646	896	-18	0	0	-3910	575	100	2059	160	40
23	1647	668	-1647	203	11	-735	40	4	-911	62	8
24	1648	882	-3502	243	50	-2539	128	42	-4180	346	165
25	1711	707	-2866	528	33	321	7	1	391	10	1
26	1712	933	-2726	154	30	-5086	538	170	-2369	117	53
27	1713	695	-2398	444	23	53	0	0	459	16	2
28	1714	908	-2685	516	29	-556	22	2	1272	116	15
29	1715	729	-3429	604	48	-860	38	5	-436	10	2
30	1716	893	-1172	65	6	-2006	191	26	1717	140	28
31	1717	871	-3338	587	45	243	3	0	976	50	9
32	1718	764	-2180	448	19	-1425	191	13	-411	16	2
33	T/21	768	-332	6	0	798	36	4	1809	184	31
34	T/22	825	-2208	154	20	2945	274	57	3003	285	85
35	T/23	927	-481	14	1	3142	605	65	-1874	215	33
36	T/24	919	-1367	42	8	3858	336	98	-4724	504	211
37	T/25	788	-2081	168	18	3133	380	64	-1001	39	9
38	T/27	709	-100	1	0	268	5	0	1879	246	33
39	T/28	673	-844	59	3	1864	289	23	906	68	8
40	T1	805	1352	214	7	1411	233	13	384	17	1
41	T2	544	415	9	1	250	3	0	2386	282	54
42	T3	903	-1928	151	15	13	0	0	33	0	0
43	T4	905	204	3	0	-1598	159	17	1170	85	13
44	T5	807	-2046	295	17	635	28	3	6	0	0
45	T6	925	-871	36	3	2440	284	39	2302	253	50
46	T7	715	-162	1	0	4047	602	108	-584	13	3
47	T8	729	880	56	3	-226	4	0	1936	270	35
					1000			1000			1000

B Analyse en composantes principales ACP1 (représentation des individus sur les axes 1 et 3)



L'ACP1 prend en compte toutes les variables enzymatiques et chimiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.
Numérotation des individus, exemple: 1495= 149jours après TIF, répétition n°5; T1= fruit translucide, répétition n°1; T/21= fruit demi translucide (T/2), répétition n°1. Les individus appartenant à un même groupe de maturité sont entourés d'un même trait.

C Analyse en composantes principales ACP1 (représentation des variables sur les axes 1 et 3)



L'ACP1 prend en compte toutes les variables enzymatiques et chimiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.

AGL= α-galactosidase
PGA= polygalacturonase
PHO= phosphatase
PER= peroxydase
POX= polyphénoloxydase
NQR= NADH quinone réductase
MDH= enzyme malique
AAX= ascorbate peroxydase
ACL= acidité libre
ASC= acide ascorbique

BGL= β-galactosidase
AMN= α-mannosidase
CAT= catalase
AIA= AIA oxydase
SOD= superoxyde dismutase
GSG= glutathion réductase
ESS= extrait sec soluble
NAG= Nacétyleglucosaminidase
THI= thiols

D ANALYSE STATISTIQUE ACP2

MATRICE DES CORRELATIONS

	PGA	PHO	AMN	AGL	BGL	NAG	PER	AAX	CAT	SOD	AIA	POX	GSG	NQR	MDH
PGA	1000														
PHO	444	1000													
AMN	311	618	1000												
AGL	652	380	452	1000											
BGL	368	292	370	796	1000										
NAG	670	169	239	685	499	1000									
PER	10	341	453	68	188	-113	1000								
AAX	-92	21	154	-69	55	-205	761	1000							
CAT	423	398	450	631	455	395	358	239	1000						
SOD	105	95	240	93	50	-52	297	260	277	1000					
AIA	25	264	321	218	308	101	461	253	152	156	1000				
POX	203	272	395	337	490	166	796	713	379	360	557	1000			
GSG	-147	435	322	163	411	-245	220	121	159	18	197	223	1000		
NQR	-76	499	532	-63	102	-239	636	401	267	449	519	549	422	1000	
MDH	273	395	440	618	701	278	-61	-234	263	127	189	191	515	129	1000

coeff x1000

VECTEURS ET VALEURS PROPRES (AXES 1 à 3)

NUMERO	VAL PROPRE 1	VAL PROPRE 2	VAL PROPRE 3
	5.23203	3.16457	1.70158
OBJET 1	.20878	.31975	-.28002
OBJET 2	.28926	.03145	.23284
OBJET 3	.32481	-.00799	.12497
OBJET 4	.30788	.34702	-.08381
OBJET 5	.31438	.22054	.08589
OBJET 6	.17013	.39206	-.31921
OBJET 7	.27117	-.36108	-.18135
OBJET 8	.16081	-.38045	-.30027
OBJET 9	.29780	.09240	-.18622
OBJET 10	.15907	-.16433	-.13430
OBJET 11	.23753	-.16330	.00919
OBJET 12	.33064	-.22120	-.23043
OBJET 13	.19465	-.09329	.56794
OBJET 14	.25529	-.34740	.16686
OBJET 15	.24997	.24144	.39511

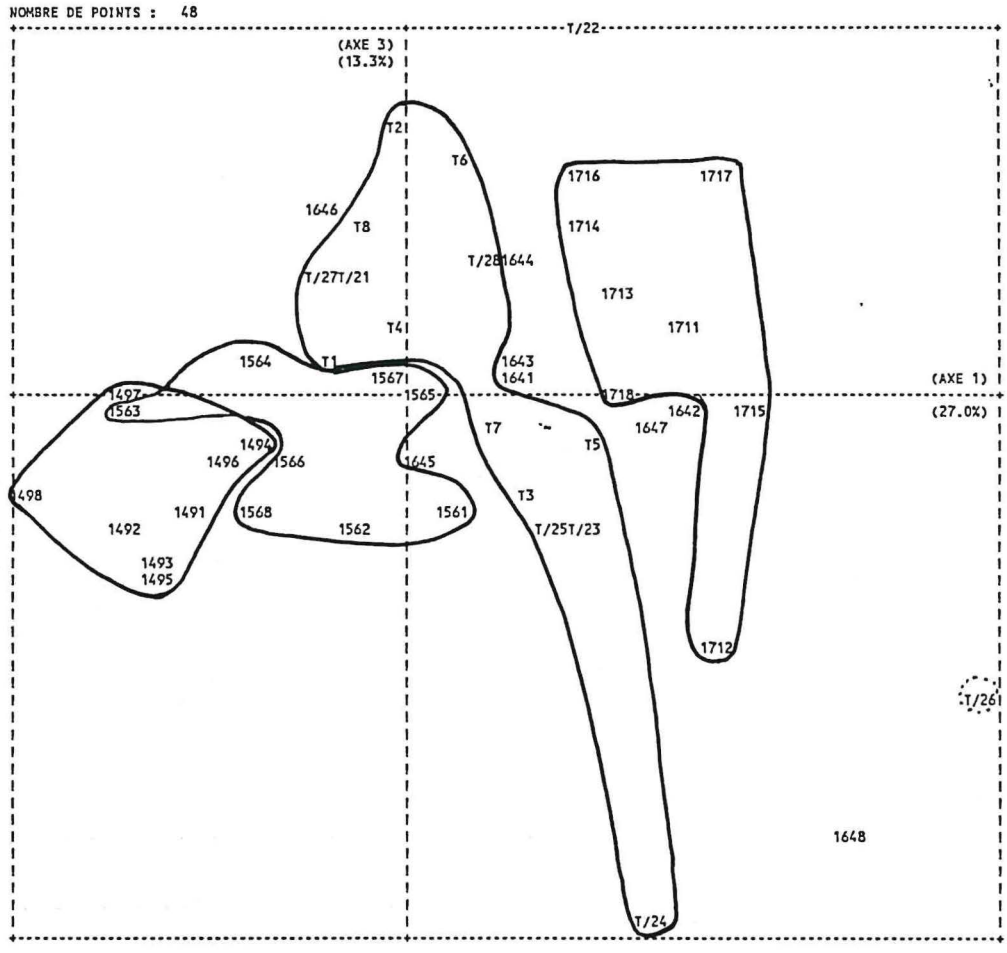
QLT = qualité de la représentation
1#F = coordonnée axe 1
2#F = coordonnée axe 2
3#F = coordonnée axe 3
CTR = contribution à l'axe
COR = corrélation

QUALITE DE LA REPRESENTATION DES INDIVIDUS (QUALITE, CORRELATION, CONTRIBUTION)

47 INDIVIDUS ACTIFS :

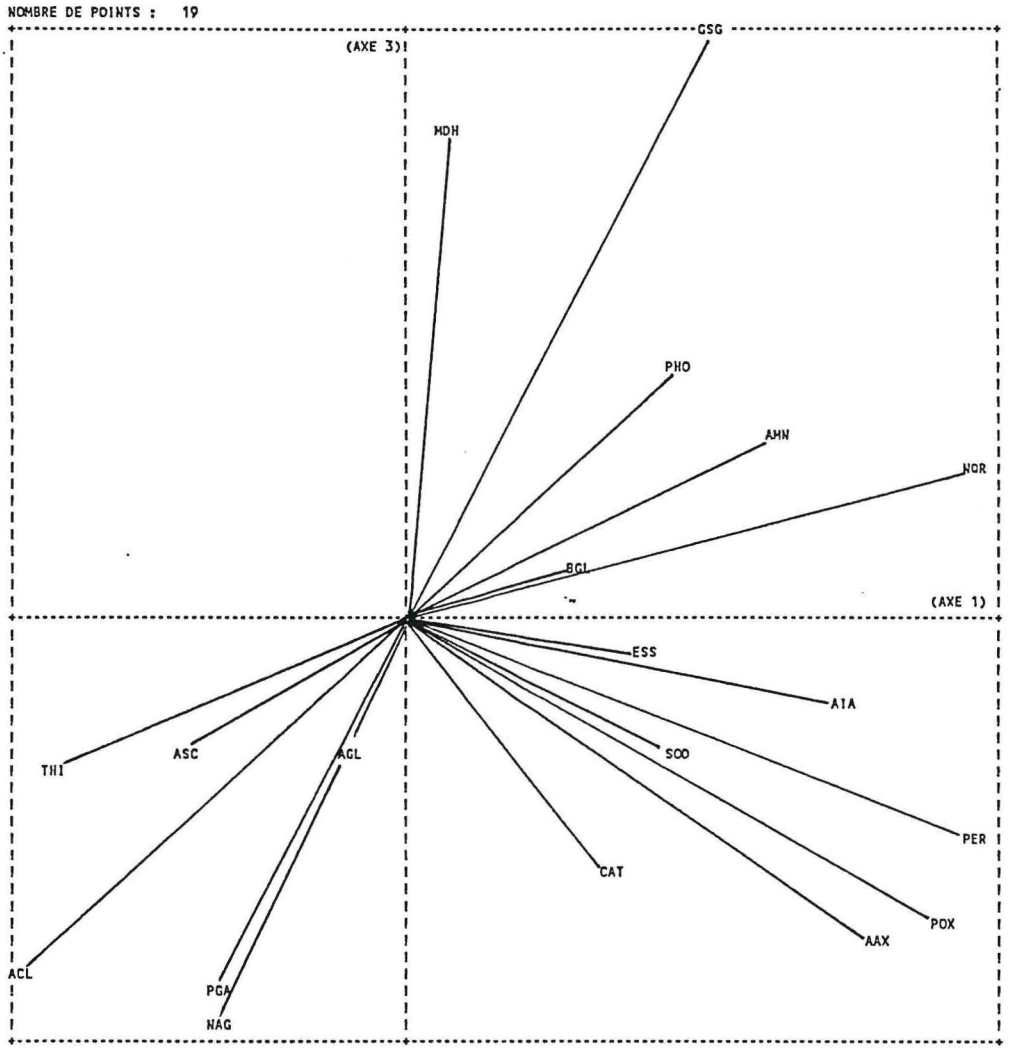
	I1	QLT	1#F	COR	CTR	2#F	COR	CTR	3#F	COR	CTR
1	1491	836	-2398	345	30	-1001	60	7	-872	46	8
2	1492	934	-3375	560	60	569	16	2	-1098	59	13
3	1493	852	-3005	520	47	-1574	143	17	-1307	98	18
4	1494	866	-1905	442	19	468	27	1	-409	20	2
5	1495	836	-2787	592	41	1019	79	7	-1375	144	20
6	1496	847	-2103	398	23	-1535	212	16	-503	23	3
7	1497	913	-3113	751	51	40	0	0	62	0	0
8	1498	834	-4448	733	104	841	26	5	-858	27	8
9	1561	650	32	0	0	961	171	6	-982	178	10
10	1562	896	-825	60	4	-319	9	1	-1137	114	14
11	1563	977	-3322	730	58	-1419	133	14	80	0	0
12	1564	928	-1974	477	20	554	38	2	345	15	1
13	1565	482	-241	16	0	1193	389	10	78	2	0
14	1566	833	-1485	339	12	-465	33	1	-505	39	3
15	1567	900	-651	40	2	142	2	0	180	3	0
16	1568	902	-1997	397	21	-1244	154	10	-989	97	10
17	1641	738	957	138	5	2	0	0	239	9	1
18	1642	968	2434	599	31	393	16	1	-108	1	0
19	1643	842	765	107	3	-1095	219	8	308	17	1
20	1644	915	1031	119	6	-1946	425	25	1181	156	15
21	1645	769	-138	15	0	-442	154	1	-505	202	3
22	1646	954	-1262	75	8	-3812	687	98	1673	132	30
23	1647	812	2133	359	24	-616	30	3	-272	6	1
24	1648	908	4164	351	91	-2555	132	44	-3719	280	148
25	1711	665	2516	501	33	209	3	0	636	32	4
26	1712	959	2803	170	41	-5089	561	174	-2068	93	46
27	1713	811	1997	348	21	21	0	0	919	74	9
28	1714	881	1603	317	13	-466	27	1	1492	275	24
29	1715	707	3179	598	53	-963	55	6	-140	1	0
30	1716	913	1441	145	11	-2245	352	34	1923	259	40
31	1717	887	3074	543	50	315	6	1	1932	215	40
32	1718	836	1960	436	20	-1328	200	12	95	1	0
33	T/21	709	-1006	79	5	727	41	4	1085	92	13
34	T/22	856	1459	75	11	2768	268	51	3273	375	115
35	T/23	949	1543	165	12	3119	673	65	-1104	84	13
36	T/24	975	2096	101	23	3964	361	106	-4337	432	201
37	T/25	841	1218	90	8	3107	589	65	-1076	71	12
38	T/27	683	-1079	147	6	173	4	0	1099	152	13
39	T/28	762	620	33	2	1816	284	22	1232	131	16
40	T1	794	-1027	176	6	1327	294	12	331	18	1
41	T2	891	-536	15	2	105	1	0	2368	299	60
42	T3	917	951	46	5	-140	1	0	-804	33	7
43	T4	952	-485	16	1	-1766	211	21	637	27	4
44	T5	969	1483	214	12	426	18	1	-437	19	2
45	T6	956	137	1	0	2315	275	36	2056	217	45
46	T7	876	470	9	1	4005	642	108	-163	1	0
47	T8	754	-903	120	4	-560	46	2	1544	350	25
					1000			1000			1000

E Analyses en composantes principales ACP2 (représentation des individus sur les axes 1 et 3)



L'ACP2 prend en compte toutes les variables enzymatiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.
Numérotation des individus, exemple: 1495= 149jours après TIF, répétition n°5; T1= fruit translucide, répétition n°1; T/21= fruit demi translucide (T/2), répétition n°1. Les individus appartenant à un même groupe de maturité sont entourés d'un même trait.

F Analyse en composantes principales ACP2 (représentation des variables sur les axes 1 et 3)



L'ACP2 prend en compte toutes les variables enzymatiques; 8 répétitions sont faites pour chaque stade de maturité.

AGL= α-galactosidase
PGA= polygalacturonase
PHO= phosphatase
PER= peroxydase
POX= polyphénoloxydase
NQR= NADH quinone réductase
MDH= enzyme malique
NAG= Nacétyleglucosaminidase

BGL= β-galactosidase
AMN= α-mannosidase
CAT= catalase
AIA= AIA oxydase
SOD= superoxyde dismutase
GSG= glutathion réductase
AAX= ascorbate peroxydase

et en variables supplémentaires
ACL= acidité libre
ASC= acide ascorbique

THI= thiols
ESS= extrait sec soluble

BIBLIOGRAPHIE

AHMED R.A., LABAVITCH J.M., 1980. Cell wall metabolism in ripening fruit. Plant Physiol., **65**, 1014-1016.

ALBERSHEIM P., DARVILL A., 1985. Les oligosaccharines. Pour la Science, **30**, 18-26.

APELBAUM A., WANG S.Y., BURGOON A.C., BAKER J.E., LIEBERMAN M., 1981. Inhibition of the conversion of the ACC to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transfer, uncouplers of oxidative phosphorylation and free radical scavengers. Plant Physiol., **67**, 74-79.

ASADA, K., 1984. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. Dans "Methods in enzymology", Ed. PACKER, L., A.P., New York, vol.105, 422-429.

AUBERT B., 1973a. Ecologie de l'ananas. Document interne, Réun.Ann.IRFA, (102), 57p.

AUBERT B., 1973b. Ecologie de l'ananas. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (155), 20p.

AUDINAY A., 1970. Essai de contrôle artificiel de la maturation de l'ananas par l'éthrel. Fruits, **25**, (10), 1-6.

AUNG L.H., 1979. Temperature regulation of growth and endogenous ABA-like content of *Tulipa gesneriana* L., Plant Physiol., **63**, 1111-1116.

BALDWIN E.A., BIGGS R.H., 1988. Cell wall lysing enzymes and products of cell wall digestion elicit ethylene in citrus. Physiol.Plant., **73**, 58-64.

BALDWIN E.A., PRESSEY R., 1988. Tomato polygalacturonase elicits ethylene production in tomato fruit. J.Amer.Soc.Hort.Sci., **113**, 1, 92-95.

BANKS N.H., 1983. Evaluation methods for determining internal gases in banana fruit. J.Exp.Bot., **34**, (144), 871-879.

BAQUI S.M., MATTOO A.K., MODI V.V., 1974. Mitochondrial enzymes in mango fruit during ripening. Phytochem., **13**, 2049-2055.

BARTHOLOMEW D.P., KADZIMIN S.B., 1977. Pineapple, in "Ecophysiology of tropical crops". ALVIM P.T., KOZLOWSKI T.T. Ed.Academic Press, New York, 113-156.

BARTHOLOMEW D.P., Paull R.E., 1986. Pineapple, in "Handbook of fruit set and development". Ed S.P. Monselise, CRC Press, Inc., Boca Raton, Flo., 371-388.

BARTLEY I.M., 1974. ß Galactosidase activity in ripening apples. Phytochem., (13), 2107-2111.

BARTLEY I.M., 1977. A further study of ß galactosidase activity in apples ripening in store. J.Exp.Bot., **28**, (105), 943-948.

BARTLEY I.M., 1978. Exo-polygalacturonase of apple. Phytochem., **17**, 213-216.

BEAUDRY R., KAYS S., 1987. Effects of environmental factors on the release kinetics of ethylene from 2-chloroethylphosphonic acid and 2-chloroethyl-methyl bis-phenylmethoxy silane. J.Amer.Soc.Hort.Sci., **112**, (2), 352-359.

BEN ARIE R., KISLEV N., FRENKEL C., 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of the ripening apple and pear fruit. Plant Physiol. **64**, 197-202.

BENGTSON C., FALK S.O., LARSSON S., 1977. The after effect of water stress on transpiration rate and changes in ABA content of young Wheat plants. Physiol.Plant., **41**, 149-154.

BEYER E.M., 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. **58**, 268-271.

BEYER E.M., MORGAN P.W., 1970a. Time sequence of the effect of ethylene on the uptake, distribution and metabolism of ^{14}C-IAA and 2-^{14}C and 1-^{14}C-NAA. Plant Physiol., **46**, 157-162.

BEYER E.M., MORGAN P.W., 1970b. A method for determining the concentration of ethylene in the gas phase of vegetative plant tissues. Plant Physiol., **46**, 352-354.

BIALE J.B., YOUNG R.E., 1981. Respiration and ripening in fruits. Dans "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables". Ed. FRIEND J., RHODES M.J.C., AP, New York, 1-39.

BIDDLE E., KERFOOT D., KHO Y., RUSSEL K., 1976. Kinetics studies of thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonique acid in aqueous solution. Plant Physiol., **58**, 700-702.

BILLOT J., Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation de la poire Passe-crassane. Physiol.Vég., **21**, (3), 527-535.

BISHOP P., PEARCE G., BRYANT J.E., RYAN C.A., 1984. Isolation and characterisation of the proteinase inhibitor inducing factor from tomato leaves: identity and activity of poly and oligogalacturonides fragments. J.Biol.Chem., **259**, 13172-13177.

BOLDUC R.J., CHERRY J.H. et BLAIR B.O., 1970. Increase in IAA oxydase activity of winter wheat by cold treatment and gibberellic acid. Plant Physiol. **45**, 461-464.

BOLLARD E.G., 1970. The physiology and nutrition of developing fruits. Dans "The biochemistry of fruits and their products". Ed.HULME A.C., AP New York, **1**, 387-425.

BOLLER T., 1982. Enzymatic equipment of plant vacuoles. Physiol.Vég., **20**, (2), 247-257.

BOLLER T., 1987. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In "Plant-microbes interactions", Ed KOSUGE T., NESTER E.W., New York, 385-414.

BOLLER T., KENDE H., 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. Plant Physiol., **63**, 1123-1132.

BOSE A.N., LODH S.B., DE S., 1962. Studies on the storage life of pineapple. Irst Intern.Congr.Fd.Sci.Technol. **2**, 117.

BOUFFIN J., 1990. L'ananas en Afrique du sud. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (1), 5p.

BOUZAYEN M., FELIX G., LATCHE A., PECH J.C., BOLLER T., 1991. Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. Planta, **184**, 244-247.

BOYER N., DESBIEZ O.M., HOFINGER M. GASPAR Th., 1983. Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: Ethylene production and sensitivity. Plant Physiol., **72**, 522-525.

BRABER J.M., 1980. Catalase and peroxidase in primary bean leaves during development and senescence. Z.Pflanzenphysiol., **97**, 135-144.

BRADFORD M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal.Biochem., **72**, 248-254.

BRADY J.C., 1987. Fruit ripening. Ann.Rev.Plant Physiol., **38**, 155-178.

BRANDON P.C., 1967. Temperature features of enzymes affecting crassulacean acid metabolism. Plant Physiol., **42**, 977-984.

BURG S.P., BURG E.A., 1962. Role of ethylene in fruit ripening. Plant Physiol., **37**, 179-189.

BUTCHER H.C., WAGNER G.J. AND SIEGELMAN H.W., 1977: Localisation of acid hydrolases in protoplasts. Plant Physiol., **59**, 1098-1103.

CABALLERO J.I., VERDUZCO C.V., GALAN J.M., JIMENEZ E.S., 1988. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: a tissue differentiation requirements. J.Exp.Bot., **39**, (204), 889-897.

CASSAB G.I., VARNER J.E., 1988. Cell wall proteins. Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol., **39**, 321-353.

CHAN H.T., CHANG T.K., CHENCHIN E, 1972. Non volatile acids of Passion fruit juice. J.Agr.Food Chem., **20**, (1), 110-112.

CHAN H.T., CHENCHIN E., VONNAHME P., 1973. Non volatile acids in pineapple juice. J.Agric.Food Chem., **21**, 208-211.

CHAN J.K.C., MOY J.H., 1977. Hemicellulose-B from commercial pineapple juice underflow. J.Food Sci., **42**, (6), 1451-1453.

CHANDA S.V., JOSHI A.K., KRISHNAN P.N., SINGH Y.D., 1986. Distribution of glycosidases and acid invertase activities in relation to elongation growth in Pearl millet internode. J.Exp.Bot., **37**, (182), 1406-1415.

CHARLET C., ROQUES J.F., ROUSSET P., 1987. Présentation des propriétés générales du paclobutrazol. Annales ANPP (association nationale de protection des plantes), 2ème colloque sur les substances de croissance et leur utilisation en agriculture, **1**, (3), 23-28.

CHEN C.V., LIAW Y.S., 1968. A study of the stomatal movement habitat in pineapple. J.Agr.Ass. China Taipei, Taixan. **64**, 23-29.

CHRESTIN H., 1984. Le compartiment vacuo-lysosomal les lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis*, son rôle dans le maintien de l'homeostasie et dans les processus de sénescence des cellules laticifères. Thèse de Doctorat d'état. Université de Montpellier II U.S.T.L., France.

CLIPSON N.J.W., LACHNO D.R., FLOWERS T.J., 1988. Salt tolerance in the Halophyte Suaeda maritima L.Dum.: ABA concentrations in response to constant and altered salinity. J.Exp.Bot., **39**, (207), 1381-1388.

COLLINS J.L., 1960. The pineapple. Ed.HILL l., London, 294p.

COMBRES C., 1979. Contribution à l'étude de l'action du climat sur les principales composantes du climat. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (60), 10p.

CONTI S., CARRATU G., GIANNATASO M., 1987. α-D-Mannosidase from the aleurone layers of resting wheat grains: sugar depleted forms. Phytochem., **26**, (11), 2909-2912.

COTE F.X., 1988. Photosynthèse et photorespiration d'une plante à métabolisme acide crassulacéen: Ananas comosus (L.) MERR, Etude des échanges gazeux. Thèse de l'université de TOULOUSE (SCIENCES).

COTGREAVE I.A., WEIS M., ATZORI L., MOLDEUS P., 1990. Glutathione and protein function. Dans "Glutathione: metabolism and physiological funcion". Ed. VINA J., CRC Press Inc. Boca Raton, Flo., 155-175.

CREVECOEUR M., PENEL C., GREPPIN H., GASPAR Th., 1986. Ethylene production in spinach leaves during floral induction. J.Exp.Bot., **37**, 181, 1218-1224.

CREWS C.E., VINES H.M., BLACK C.C., 1975. Post illumination burst of carbon dioxide in CAM plant. Plant Physiol., **55**, 652-657.

CROCHON M., TISSEAU R., TEISSON C., HUET R., 1981. Effet d'une application d'éthrel avant la récolte sur la qualité gustative de l'ananas de Côte d'ivoire. Fruits, **36**, (7-8), 409-415.

D'AUZAC J., SANIER C. et CHRESTIN H., 1985. Study of a NADH quinone reductase producing toxic oxygen from *Hevea* latex. Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur, **3**, 102-112.

DARWILL A.G., ALBERSHEIM P., 1984. Phytoalexins and their elicitors, a defense against microbial infection in plants. Ann.Rev.Plant Physiol., **35**, 243-275.

DAVIES D.D., 1977. Control of pH and glycolysis. Dans "Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants". Ed. SMITH H., A.P., 41-46.

DEKKER R.F.H., RICHARDS G.N., 1971. Determination of starch in plant material. J.Sci.Fd. Agric. **22**, 441-444.

DELAPORTE N., 1967. Mise au point d'une technique de dosage de l'acide ascorbique par destruction photochimique dans les végétaux congelés. Rev.Gén. du Froid, **5**, 587-597.

DELAPORTE N., MACHEIX J.J., 1968. Sur une méthode spectrophotométrique de dosage de l'acide ascorbique, de l'acide chlorogénique et des catéchines dans la pomme. Chimie Anal. **50**, (4), 187-198.

DHINDSA R.S., 1987. Drought stress induced inhibition of protein synthesis: mediation by oxidized glutathione. Plant Physiol., **83**, 45-47.

DHINDSA R.S., 1991. Drough stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury and protein synthesis in *Tortula ruralis*. Plant Physiol., **95**, 648-651.

DIEUDONNE G., 1977. Les dérivés hydroxycinnamiques de l'ananas comosus, var. Cayenne lisse, et leurs relations avec le brunissement interne. Thèse docteur ingénieur Paris VI.

DILLEY D.R., 1971. Enzymes, dans "The biochemistry of fruits and their products", Ed. Hulme A.C., AP, New York, vol.1, 179-204.

DOLL S., RODIER F., WILLENBRICK J., 1979. Accumulation of sucrose in vacuoles isolated from red beet tissue. Planta, **144**, 407-411.

DOUCE R., JOYARD J., 1980. Plant galactolipids: dans "The biochemistry of plants: Lipids, structure and functions". Ed. STUMPH P.K., CONN E.E., **4**, 321-357.

DROUET A., 1981. La maturation et la sénescence de la poire Passe-Crassane. Quelques aspect du métabolisme protéique. Thèse doct. d'état, Université d'Orléans.

DROUET A.G., HARTMANN J.R., 1977. Activity of pear fruit malic enzyme; its regulation by metabolites. Phytochem., **16**, 505-508.

DULL G.G., 1971. The pineapple: general., dans "The biochemistry of fruits and their products", Ed. Hulme A.C., AP, New York, **2**, 303-324.

DULL G.G., YOUNG R.E., BIALE J.B., 1967. Respiratory patterns in fruit of pineapple, *Ananas comosus*, detached at different stages of development. Physiol.Plant., **20**, 1059-1065.

DUNFORD, H.B., 1986: Catalytic mechanisms of plant peroxydases, with emphasis on reactions of compounds I and II. Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed. GREPPIN; H., PENEL, C., GASPAR, TH., Université de Genève, 15-23.

ELLIS E.C., TURGEON R., SPANSWICK R.M., 1989. Turgor sensitive phloem transport and unloading in seed coats of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol., **89**, suppl.,92.

ELLIS E.C., SPANSWICK R.M., 1987. Sugar efflux from attached seed coats of *Glycine max* (L.) Merr. J.Exp.Bot., **38**, 1470-1483.

ELLMANN G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch.Biochem., **82**, 70.

ENGEL K.H., TRESSL R., 1983. Formation of aroma components from nonvolatiles precursors in passion fruit. J.Agric.food Chem., **31**, 998-1002.

ENGELMAN-SILVESTRE I., BUREAU J.M., TREMOLIERES A., PAULIN A., 1989. Changes in membrane phospholipids and galactolipids during the senescence of cut carnations. Connection with ethylene rise. Plant Physiol.Biochem., **27**, (6), 931-937.

FERGUSON I.B., WATKINS C.B., 1981. Ion relations of apple fruit tissue during fruit development and ripening. I: Cations leakage. Aust.J. Plant Physiol., **8**, 155-164.

FLEISH H., 1988. Modeling pineapple plant growth and inflorescence development. Thesis of the university of Hawai.

FLEISH H., BARTHOLOMEW D.P., 1987. Development of a heat unit of pineapple Smooth cayenne fruit growth from fild data. Fruits, **42**, (12), 709-715.

FLEURIET A., 1982. Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance, de la maturation et de la réaction aux blessures de la tomate "cerise" (*Lycopersicum esculentum*). Thèse doct. d'état, Université de Montpellier, France.

FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1975. Relations entre la maturation accélérée de fruits blessés et leur teneur en composés phénoliques. Dans "Facteurs et régulation de la maturation des fruits", Ed. ULLRICH R., Colloques internationaux du CNRS, **67**, 267-273.

FLEURIET A., MACHEIX J.J., 1985. Tissue compartmentation of phenylpropanoïd metabolism in tomatoes during growth and maturation. Phytochem., **24**, (5), 929-932.

FRY S.C., 1979. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. Planta, **146**, 343-351.

FRY S.C., 1980. Gibberelin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. Phytochem., **19**, 735-740.

FRY S.C., 1986. Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxydases. Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed.GREPPIN H., PENEL C., GASPAR TH., Université de Genève, 169-184.

GAILLARD J.P., 1970. Recherche d'un équilibre K/N dans la production de l'ananas frais au Cameroun. Fruits, **25**, (1), 11-24.

GASPAR TH., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., 1983. Auxin control of calcium mediated peroxidase secretion and auxin independant sugarbeet cells. Phytochem., **22**, 2657-2660.

GASPAR TH, 1986. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxydase activities. Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed.GREPPIN H., PENEL C., GASPAR TH., Université de Genève.

GAUDREAULT P.R., BEEVERS L., 1983. Glycoprotein nature of glycosydases from leaves of *Pisum sativum L.* J.Exp.Bot., **34**, 1145-1154.

GAUDREAULT P.R., KILMARTIN M.A., BEEVERS L., 1985. The association of hydrolase activity with the microsomal fracion from pea cotyledons *Pisum sativum L.* J.Exp.Bot., **36**, (165), 590-601.

GEIGER D.R., FONDY B.R., 1980. Phloem loading and unloading: pathways and mechanisms. Dans "What's new in plant physiology: Transport in plants.I. Phloem transport". Ed. Zimmermann, Milburn, **1**, 256-286. Springer, Berlin.

GELINAS D.A., 1973. Proposed model for the peroxidase catalysed oxidation of indole-3-acetic acid in the presence of the inhibitor ferulic acid. Plant Physiol., **51**, 967-972.

GIAQUINTA R.T., 1979. Sucrose translocation and storage in the sugar beet. Plant Physiol., **63**, 828.

GIVEN N.K., VENIS M.A., GRIERSON D., 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non climacteric fruit. Planta, **174**, 402-406.

GOLDACRE P.L., GALSTON A.W. et WEINTRAUB R.L., 1953. The effect of substitute phenols on the activity of indoleacetic acid oxydase isozymes of peas. Arch.Biochem.Biophys., **43**, 358-373.

GOLDBERG R., IMBERTY A., LIBERMAN M., PRAT R., 1986. Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed.GREPPIN H., PENEL C., GASPAR TH., Université de Genève, 209-219.

GOLDSMITH E.E., GOREN R., EVEN-CHEN Z., BITTNER S., 1973. Increase in free and bound abscisic acid durig natural and ethylene induced senescence of citrus peel fruit. Plant Physiol., **51**, 879-882.

GORTNER A.W., 1962. A short trem effect of weather on malic acid in pineapple fruit. J.Fd.Sci., **28**, 191-192.

GORTNER W., 1969. Relation of chemical structure to plant growth regulator activity in the pineapple plant: retarding senescence of pineapple fruit with applications of 2,4,5 T and NAA. J.Food Sci., **34**, 577-580.

GORTNER A.W., KENT N.J., 1958. The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxidase. J.Biol.Chem., **233**, 731-735.

GORTNER W.A., SINGLETON V.L., 1965. Chemical and physical development of pineapple fruit. III- Nitrogenous and enzyme constituents. J.Fd.Sci., **30**, 24-29.

GORTNER W.A., DULL G.G., KRAUSS B.H., 1967. Fruit development, maturation, ripening and senescence: A biochemichal basis for horticultural terminology. Hortscience, **2**, (4), 141-144.

GOVE J.P., HOYLE M.C., 1975. The isozymic similarity of indole acetic oxidase to peroxidase in Birch and Horseradish. Plant Physiol., **56**, 684-687.

GREEN G.C., 1963. The pineapple plant. Dans The effect of weather and climate upon the keeping of fruit. Tech.World Meteo Org., Geneve, 53p.

GRIERSON D., 1986. Molecular biology of fruit ripening. Dans "Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology", **3**, 361-383.

GRIERSON D., SLATER A., PEIRS J., TUCKER G.A., 1985. The appearance of polygalacturonase in tomatoes: one of a series of changes in gene expression during development and ripening. Planta, **163**, 263-271.

GUERN J., 1987. Regulation from within: The hormone dilemna. Ann.Bot., **60**, suppl.4, 75-102.

GUIGNARD J.L., COSSON L., HENRY M., 1985. Phytochimie. Ed. MASSON, Paris, 224p.

GUINCHARD D., 1990. Commerce mondial frais et transformé de l'ananas. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (58), 6p.

GUNATA Y.Z., BAYONOVE R., BAUMES R.L., CORDONNIER R.E., 1985. The aroma of grapes: Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aromat components. J.Chromatogr., **331**, 83-90.

GUYOT A., PINON A, PY C., 1974. L'ananas en Côte d'ivoire. Fruits, **29**, (2), 85-117.

HAMNER K.C., NIGHTINGALE G.T., 1946. Ascorbic acid contents of pineapples as correlated with environmental factors andplant composition. Food Res., **11**, 535-546.

HAMZA M., 1980. Réponses des végétaux à la salinité. Physiol.Vég., **18**, (1), 69-81.

HANSEN E., 1970. Proteins. Dans "The biochemistry of fruits and their products".Ed. HULME A.C., AP, New York, **1**, 147-158.

HARE R.C., 1964; Indoleacetic acid oxydase. Bot.Rev., 129-165.

HARKIN J.M., OBST J.R., 1973. Lignification in trees: indication of exclusive peroxydase participation. Science, **180**, 296-302.

HARTMANN C., 1983. Quelques aspect de la sénescence du fruit. Physiol.Vég., **21**, (1), 137-150.

HARTMANN C., 1990. Are ethylene and abscisic acid involved in the control of the ripening of the cherry fruit? XXIII International Horticultural Congress. Communication n°2383. Firenze, Italy.

HARTMANN C., BOULAY M.P., DROUET A.G., 1977. Some properties of malic enzyme extracted from the cherry. Physiol.Vég., **15**, 569-576.

HARTMANN C., DROUET A., MORIN F., 1987. Ethylene and ripening of apple, pear and cherry fruit. Plant Physiol.Biochem., **25**, (4), 505-512.

HATCH M.D., SACHER J.A., GLASZIOU K.T., 1963. Sugar accumulation cycle in sugar cane I. Studies on enzymes of the cycle. Plant Physiol., **38**, 338.

HO L.C., 1988. Metabolism and compartimentation of imported sugars in sink organs in relations to sink strength. Ann.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39**, 355-378.

HIMELRICK D.G., McDUFFIE R.F., 1983. The calcium cycle: uptake and distribution in apple trees. HortScience, **18**, (2), 147-150.

HOBSON G.E., 1963. Pectinesterase in normal and abnormal tomato fruit. Biochem.J., **86**, 358-365.

HOBSON G.E., 1964. Polygalacturonase in normal and abnormal tomato fruit. Biochem.J., **92**, 324-332.

HOBSON G.E., 1968. Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. J.Food Sci. **33**, 588-592.

HOBSON G.E., 1981. Enzymes and texture changes during ripening. Dans "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables". Ed. FRIEND J., RHODES M.J.C., AP, 122-132.

HOBSON G.E., NICHOLS R., DAVIES J.N., ATKEY P.T., 1984. The inhibition of tomato fruit ripening by silver. J.Plant Physiol., **116**, 21-29.

HOSSAIN, M.A., ASASDA, K., 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterisation as a thiol enzyme. Plant and cell physiol., **25**, 85-92.

HUANG A.H.C., CAVALIERI A.J., 1979. Proline oxidase and water stress induced proline accumulation in spinach leaves. Plant Physiol., **63**, 531-535.

HUBAC C., VIEIRA DA SILVA J., 1980. Indicateurs métaboliques de contraintes mésologiques. Physiol.Vég., **18**, (1), 45-53.

HUBAC C., LEPAGE DEGIVRY M.T., 1981. Evolution de la teneur en ABA au cours de l'assèchement du Cotonnier sous différentes photopériodes. Physiol.Vég., **19**, (1), 87-97.

HUET R., 1953. Contribution à l'étude du jaune de l'ananas en Guinée. Fruits, **8**, (11), 544-546.

HUET R., 1958. La composition chimique de l'ananas. Fruits, **13**, (5), 183-197.

JACKSON M.B., OSBORNE D.J., 1972. ABA, IAA, and Ethylene in explant abscission. J.Exp.Bot., **23**, 849-862.

JOCELYN P.C., 1972. Biochemistry of the SH group. Academic Press, New York.

KADER A.A., MORRIS L.L., STEVENS M.A., ALBRIGHT-HOLTON M., 1978. Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some post harvest procedures. J.Am.Soc.Hortic.Sci., **103**, 6-13.

KATO T., KUBOTA S., 1978. Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation. Physiol. Plant., **42**, 67.

KAUSS H., 1987. Some aspects of calcium dependent regulation in plant metabolism. Ann.Rev.Plant Physiol., **38**, 47-72.

KERMASHA S., BARTHAKUR N.N., ALLI I., MOHAN N.K., 1987. Changes in chemical composition of the Kew cultivar of pineapple fruit during development. J.Sci. Food Agric., **39**, 317-324.

KERNS K.R., COLLINS J.L., HAROLD K., 1936. Development studies of the pineapple *Ananas comosus*. I- Origine and growth of leaves and inflorescence. New Phyt., **35**, 305-307.

KEVERS C., GASPAR Th., 1985. Vitrification of carnation in vitro: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC into ethylene. Plant Cell Tis.Org.Cult., **4**, 215-223.

KINRAIDE T.B., WYSE R.E., 1986. Electrical evidence for turgor inhibition of proton extrusion in sugar beet taproot. Plant Physiol., **82**, 1148-1150.

KLEIN I., LAVEE S., BENTAL Y., 1979. Effect water vapor pressure on the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonique acid. Plant Physiol., **63**, 474-477.

KNEE M., 1978. Metabolism of poly methylgalacturoniate in apple fruit cortical tissue during ripening. Phytochem., **17**, 1261-1264.

KNOX J.P., DODGE A.D., 1985. Singlet oxygen and plants. Phytochem., **24**, 889-896.

KRAUSS B.H., 1948. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus*. I. Introduction, organography, the stem and the lateral branch or axillary buds. Bot.Gaz., **110**, (2), 159-217.

KRAUSS B.H., 1949. Anatomy of the vegetative organs of the pineapple *Ananas comosus*. II. The leaf. Bot.Gaz., **110**, (2), 333-404.

LACOEUILHE, J.J., 1976. Contribution des feuilles vivantes pendant la période de fructification à la croissance et au développement du fruit. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (10), 6p.

LACOEUILHE J.J., 1978. La fumure N-K de l'ananas en Côte d'ivoire. Fruits, **33**, (5), 341-348.

LACOEUILHE J.J., 1982. De la biologie à la phytotechnie, Contributions aux problèmes de l'hétérogénéité. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (23), 5p.

LACOEUILHE J.J., GICQUIAUX Y., 1971. La nutrition en cations de l'ananas à la Martinique. Fruits, **26**, (5), 353-357.

LAKSO A.N., KLIEWER W.M., 1975. The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. Plant Physiol., **56**, 370-372.

LAMPORT D.T.A., 1986. Roles for peroxydases in cell wall genesis. Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed.GREPPIN H., PENEL C., GASPAR TH., Université de Genève, 199-207.

LANCE C., 1981. Cyanid insensitive respiration in fruit and vegetables. Dans "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables". Ed. FRIEND J., RHODES M.J.C., AP, 63-87.

LANG A., THORPE R.M., 1986,. Water potential, translocation and assimilate partitioning. J.Exp.Bot., **37**, 495-503.

LAU O.L., YANG S.F., 1976. Inhibition of ethylene production by cobaltous ion. Plant Physiol., **58**, 114-117.

LAURIERE C., 1983. Enzymes and leaf senescence. Physiol.Vég., **21**, (6), 1159-1177.

LEAL F.J., ANTONI M.G., 1980. Descripcion y clave de las variedades de pinas cultivadas en Venezuela. Rev.Fac.Agron.Alicante, **29**, 51-79.

LEE M., MACMILLAN J.D., 1968. Mode of action of pectin enzymes.I: Purification and certain properties of tomato. Biochem., **7**, 4005-4010.

LESHEM Y.Y., HALEVY A.H., FRENKEL C., 1986. Processes and control of plant senescence. "Developments in crop science". Elsevier, The Netherlands, **8**, p215.

LEWIS I., 1978. The application of growth hormones during fruit developmento increase pineapple fruit size. Crop Production, **7**, 115-123.

LIEBERMANN M., BAKER J.E., SLOGER M., 1977. Influences of plant hormones on ethylene production in apple, tomato and avocado slices during maturation and senescence. Plant Physiol., **60**, 214-217.

LODH S.B., SELVARAY Y., CHADHA K.L., MELANTA K.R., 1972. Biochemeical changes associated with growth and development of pineapple fruit varriety Kew. II, changes in carbohydrates and minerals constituents. Indian J.Hortic., **29**, 287-291.

LOISON-CABOT C., 1990. Caractérisation, origine et validité des groupes définis dans l'espèce *Ananas comosus.* Document.interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (23), 12p.

LURSSEN K., 1982. Manipulation of crop growth by ethylene and some implications of the mode of generation. Dans "Chemical manipulations of crops growth and development".Ed. McLAREN J.C., University of Notthingam School of Agriculture, p78.

MACHEIX J.J., FLEURIET A., BILLOT J., 1990. Fruits phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida, 378p.

MALDONADO M.C., STRASSER DE SAAD A.M., CALLIERI D.A., 1989: Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger sp.* Sciences des Aliments, **9**, 101-110.

MALEZIEUX E., 1986. Etude d'un peuplement végétal d'ananas, Analyse de l'hétérogénéité intrapeuplement. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (40), 16p.

MALEZIEUX E., 1990a. Répartition et évolution du déficit hydrique dans le sud-Est de la Côte d'Ivoire: Application à la culture de l'ananas. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (10), 8p.

MALEZIEUX E., 1990b. Analyse de la variabilité des rendements d'ananas en Basse Côte d'ivoire. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (13), 11p.

MAPSON L.W., SWAIN T., TOMALIN A.W., 1963. Influence of variety, cultural conditions and temperature of storage conditions on enzymatic browning of potato tubers. J.Sci.food Agric., **14**, 673-684.

MARCHAL J., 1990. Communication personnelle.

MARCHAL J., 1971. Les oligo éléments dans l'ananas. Fruits, **26**, (4), 263-277.

MARCILLAT G., 1974. Contribution à l'étude de la broméline de l'ananas. DEA, Montpellier, Univ.Sci.Techn.Languedoc.

MARTIN PREVEL P., 1990. Facteurs agroécologiques de l'anomalie dite "Pulpe jaune" de la banane. 9ème Colloques sur les recherches fruitières, INRA CTIFL, Avignon, décembre 1990, à paraître.

MARTIN PREVEL P., HUET R., HAENDLER L., DUGAIN F., 1961. Potassium, magnésium et calcium dans la nutrition de l'ananas en Guinée. Fruits, **16**, (12), 49-56, (3), 113-123, (4), 161-180, (7), 341-351, (11), 539-557.

MARTIN PREVEL P., HUET R., HAENDLER L., DUGAIN F., 1962. Potassium, magnésium et calcium dans la nutrition de l'ananas en Guinée. Fruits, **17**, (5), 211-227 et (6), 257-261.

MASUDA H., NARITA S., SUGAWARA S., 1990. α-Mannosidases from suspension-cultured sugar beet cells. Phytochem., **29**, 2, 393-397.

MATILE P., DÜGGELIN T., SCHELLENBERG M., RENTSCH D., BORTLIK K., PEISKER C., THOMAS H., 1989. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves. Plant Physiol.Biochem., **27**, (4), 595-604.

MAURYA K.R., 1988. Predicting maturity of pineapple, var. KEW. Indian Food Packer, **1**, 43-45.

MAYANS C.D., PLANELLS J.E., 1986. Dinámica del crecimiento y cambios bioquímicos del fruto de la piña *Ananas comosus* MERR. cv Española roja en Cuba. Act.Bot.Hungarica, **32**, 295-302.

McMURCHIE E.J., McGLASSON W.B., EAKS I.L., 1972. Treatment of fruit with propylene give information about biogenesis of ethylene, Nature, **237**, 235-236.

MEHLHORN H., KUNERT K.J., 1986. Ascorbic acid, phenolic compounds and plant peroxidases: A natural defense against peroxidative stress in higher plants? Dans "Molecular and physiological aspects of plant peroxydases". Ed.GREPPIN H., PENEL C., GASPAR TH., Université de Genève, 437-439.

MEISTER A., ANDERSON E.M., 1983. Glutathione. Ann.Rev.Biochem., **52**, 711-760.

MILL P.J., 1966: The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. Biochem.J., **99**, 557-561.

MILLER G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal.Chem., **31**, 426-428.

MORARD P., BOURRIER E., 1971. Dosage de quelques acides organiques végétaux par chromatographie en phase gazeuse. Chimie Analytique, **53**, (5), 315-322.

MOURICHON X., 1982. Contribution à l'étude des taches noires de l'ananas de Côte d'ivoire. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (14).

MUSARD M., 1989. La vitrescence du charentais. Fruits et Légumes, **63**, 38-40.

MUSARD M., YARD C., 1990. Melon à chair vitreuse: le point de la situation. PHM-Revue Horticole, (305), 57.

NEALES T.F., PATTERSON A.A., HARTNEY V.J., 1968. Physiological adaptation to drought in the carbon assimilation and water loss of xerophytes. Nature, **219**, 469-472.

NEELY R.S. AND BEEVERS L., 1980: Glycosidases from cotyledons of *Pisum sativum*. J.Exp.Bot., **31**, (120), 299-312.

NEILL S.J., HORGAN R., 1985. ABA production and water relations in wilty tomato mutants subjected to water deficiency. J.Exp.Bot., **36**, (169), 1222-1231.

NEVINS D.J., 1975. The in vitro stimulation of IAA induced modification of avena cell wall polysaccharides by an exo-glucanase. Plant and Cell Physiol., **16**, 495-504.

NGUYEN X.V., MAZLIAK P., 1990. Chilling injury induction is accompanied by galactolipid degradation in tomato pericarp. Plant Physiol.Biochem., **28**, (2), 283-291.

NICHOLS R., KOFRANEK A.M., 1982. Reversal of ethylene inhibition of tulip stem elongation by silver thiosulfate. Sci.Hortic., **17**, 71-79.

OI-LIM LAU, YANG S.F., 1976. Inhibition of ethylene production by cobaltous ion, Plant Physiol., **58**, 114-117.

OKIMOTO M.C., 1948. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. Bot.Gaz., **110**, (2), 217-231.

PECH J.C., LATCHE A., 1983. Aspects fondamentaux de la sénescence et de la maturation: conséquences pratiques. COLUMA, Colloques substances de croissance, 841-868.

PENNAZIO S., D'AGOSTINO G., SAPETTI C., 1982. Cation release from discs of tobacco leaves of different ages. Physiol.Vég., **20**, (4), 577-583.

PESIS E., FUCHS Y., ZANBERMAN G., 1978. Cellulase activity and fruit softening in avocado. Plant Physiol., **61**, 416-419.

PIECHULLA B., CHONOLES IMLAY K.R., GRUISSEM W., 1985. Plastid gene expression during fruit ripening in tomato. Plant Mol.Biol., **5**, 373-384.

PINEAU P., 1977. Quelques observations sur l'évolution de l'ananas à l'approche de la maturation. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (132), 8p.

PINON A., 1980. Communication personnelle.

POIGNANT A., 1971. La maturation contrôlée de l'ananas. II- L'éthrel et son action au cours des phases ascendante et descendante de la maturité. Fruits, **26**, (1), 23-25.

POOVAIAH B.W., 1985. Role of calcium and caldomodulin in plant growth and development. HortScience, **20**, (3), 347-351.

PORTER G.A., KNIEVEL D.P., SHANNON J.C., 1987. Assimilate unloading from maize (Zea mays L.) pedicel tissues.I. Evidence for regulation of unloading by cell turgor. Plant Physiol., **83**, 131-136.

PURVIS A.C., 1980. Sequence of chloroplast degreening in calamondin fruit as influenced by ethylene and $AgNO_3$. Plant Physiol., **66**, 624-627.

PURVIS A.C., BARMORE C.R., 1981. Involvement of ethylene in chlorophyll degradation in peel of citrus fruits. Plant Physiol., **68**, 854-856.

PY C., TISSEAU M.A., OURY B., AHMADA F., 1957. La culture de l'ananas en Guinée. Publ.IRFA, Ed.SETCO, 331p.

PY C., LOSSOIS, 1962. Prévision de récolte en culture d'ananas: étude de corrélations. Fruits, **17**, (2), 75-87.

PY C., TISSEAU M.A., 1965. L'ananas. Ed. MAISONNEUVE et LAROSE, Paris, 291p.

PY C., LACOEUILHE J.J., TEISSON C., 1984. L'ananas, sa culture, ses produits. Ed Maisonneuve et Larose, Paris, 562p.

RATTAPANONE N., SPEIRS J., GRIERSON D., 1978. Evidence for mRNA content related to tomato fruit ripening. Phytochem., **17**, 1485-1486.

REID M.S., PECH J.C., LATCHE A., 1985. Non intervention de l'éthylène endogène dans la maturation de la cerise, fruit non climcatérique. Fruits, **40**, (3), 197-203.

RENNENBERG H., 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. Phytochem., **21**, (12), 2771-2781.

RENNENBERG H., 1987. Aspects of glutathione function and metabolism in plant. Dans "Plant molecular biology". Ed. D. von WETTEIN et NAM-HAI CHUA, Plenum publishing corporation, 279-292.

RIBEREAU-GAYON P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod, Paris, 254p.

RIOV J., DAGAN E., GOREN R., YANG S.F., 1990. Characterisation of abscisic acid induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. Plant Physiol., **92**, 48-53.

ROE J.H., KUETHER C.A., 1943. J.Biol.Chem., **147**, 399-407.

ROMANI R.J., 1975. Mitochondrial functions and survival in relation to fruit ripening and the climacteric. Dans "Facteurs et régulation de la maturation des fruits", CNRS, Paris, 229-233.

ROMANI R.J., 1987. Senescence and homeostasis in postharvest research. Hortscience, **22**, (5), 865-868.

ROMANI, R.J., YU L.L., FISHER K., DEHGAN H., 1968. Cellular senescence, radiation damage to mitochondriea and the compensatory response in ripening pear fruits. Plant Physiol., **43**, 1089-1096.

ROSSIGNOL M., 1991. Le mode d'action des auxines: données biochimiques et moléculaires. ANPP(association nationale de protection des plantes) troisième colloque sur les substances de croissance et leurs utilisations dans les productions végétales. Paris, février 1991.

SABATER B., RODRIGUEZ M.T., Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barleyand oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. Physiol.Plant., **43**, 274-276.

SACHER, J.A., 1973. Senescence and postharvest physiology. Ann.Rev.Plant Physiol., **24**, 197-224.

SAGEE O., RIOV J., GOREN R., 1990. Ethylene enhanced catabolism of [^{14}C]-indole-3-acetic acid to indole-3-carboxylic acid in citrus leaf tissues. Plant Physiol., **91**, 54-60.

SASSON A., ERNER Y., MONSELISE S.P., 1976. Gas-liquid chromatography of organic acids in citrus tissues. J.Agric.Food Chem., **24**, (3), 652-654.

SCHAFFER A.A., ALONI B., FOGELMAN E., 1987. Sucrose metabolism and accumulation in developing fruit of *Cucumis*. Phytochem., **26**, 7, 1883-1887.

SIDERIS C.P., YOUNG H.Y., 1949. Growth and chemical composition of Ananas comosus in solution cultures with different Fe/Mn ratios. Plant Physiol., **23**, 456-440.

SINGLETON V.L., 1965. Chemical and physical development of the pineapple fruit. I- Weight per fruitlet and other physical attributes. J.Fd.Sci., **30**, (1), 98-104.

SIVAKUMARAN S., HALL M.A., 1979. Hormones in relation to stress recovery in *Populus robusta* cuttings. J.Exp.Bot., **30**, (114), 53-63.

SMIRNOFF N., COLOMBE S.V., 1988. Drought influences the activity of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system. J.Exp.Bot., **39**, (205), 1097-1108.

SMITH L.B., 1979. Ananas comosus L. MERR. Dans "Flora Neotropica", **14**, part 3, 2048-2064.

SMITH I.E., 1978. The application of growth hormones during fruit development to increase pineapple fruit size. Crop production, **7**, 115-123.

SOLER A., 1985a. Utilisation du fruitone 3CPA comme régulateur de croissance sur l'ananas Cayenne lisse en Côte d'ivoire. Fruits, **40**, (1), 31-37.

SOLER A., 1985b. Induction florale de l'ananas par voie solide: le clathrate d'éthylène. Fruits, **40**, (5), 321-325.

SOLER A., 1986. Synthèse floraison et maturation de l'ananas. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (12).

SOLER A., 1990. Avantages et limites d'utilisation du 3CPA (acide 2-3 chlorophénoxypropionique) en culture d'ananas en Côte d'Ivoire. Fruits, **45**, (4), 357-365.

STEWART C.R., BOGGESS S., 1978. Métabolism of 5-3H] proline by barley leaves and its use in measuring the effects of water stess on proline oxidation. Plant Physiol., **61**, 654-657.

STEWART C.R., VOETBERG G., 1985. Relationship between stress induced ABA and proline accumulations and ABA induced proline accumulation in excised barley leaves. Plant Physiol., **79**, 24-27.

STICHER L., PENEL C., GREPPIN H, 1981. Calcium requirement for the secretion of peroxydases by plant cell suspensions. J. Cell Sci., **48**, 345-353.

TEISSON C., 1973a. Essai d'ombrage du fruit. Etat nutritif et qualité du fruit. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (47), 4p et (141), 6p.

TEISSON C., 1973b. Développement et croissance de l'inflorescence d'*Ananas comosus* cv Cayenne lisse. Fruits, **28**, (6), 433-439.

TEISSON C., 1973c. Etat nutritif et qualité du fruit d'*Ananas comosus*. Document interne Réun.Ann.IRFA, (141), 8p.

TEISSON C., 1977: Le brunissement interne de l'ananas. Thèse, Université d'Abidjan CI.

TEISSON C., 1979a. Enquête à propos du jaune sur l'exploitation de l'Anguédédou. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (13), 9p.

TEISSON C., 1979b. Le brunissement interne de l'ananas. I et II. Fruits, **34**, (4), 245-261.

TEISSON C., 1979c. Essais 519 et 549: Effets d'un ombrage excessif sur la qualité du fruit. Document IRFA non publié.

THAIN J.F., DOHERTY H.M., BOWLES D.J., WILSON D.C., 1990. Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarization of tomato leaf cells. Plant Cell Environ. **13**, 569-574.

THIBAUD B., 1990. Synthèse de quelques paramètres météorologiques sur la station d'Anguédédou CI. Document interne IRFA, Réunion annuelle IRFA, n°33.

THOMAS H., STODDART J.L., 1980. Leaf senescence. Ann.Rev.Plant Physiol., **31**, 83-111.

TISSEAU M.A., 1963. Variations de l'acidité et de l'extrait sec des jus frais d'ananas de Côte d'ivoire au cours de la campagne 62-63. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (4), 4p.

TISSEAU M.A., 1971. Application de la potasse sur ananas après différenciation de l'inflorescence. Fruits, **26**, (12), 823-829.

TISSEAU R., SOLER A., TEISSON C., 1982. Surmaturation interne de l'ananas de Côte d'ivoire: Le "jaune". Incidence sur la qualité gustative des fruits commercialisé en France. Document interne IRFA, Réun.Ann.IRFA, (1), 8p.

TREWAVAS A.J., 1982a. The regulation of development and its relation to growth substances. What's New in Plant Physiol., **13**, 41-43.

TREWAWAS A.J., 1982b. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. Physiol. Plant. **55**, 60-72.

TREWAWAS A.J., 1991. How do plant growth substances work? II. Plant Cell Envir., **14**, 1-12.

TUCKER M.L., LATIES G.G., 1984. Interrelationship of gene expression, polysome prevalence and respiration during ripening of ethylene and/or Cyanide-treated avocado fruit. Plant Physiol., **74**, 307-315.

TULLY R.E., HANSON A.D., NELSEN C.E., 1979. Proline accumulation in water stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget. Plant Physiol., **63**, 518-523.

TYMMS M.J., GAFF D.F., 1979. Proline accumulation during water stress in resurrection plants. J.Exp.Bot., **30**, (114), 165-168.

ULRICH R., 1970. Organic acids. Dans "**The biochemistry of fruits and their products**". Ed.HULME A.C., AP New York, **1**, 387-425.

VAN LELYVELD L.J., DE BRUYN J.A., 1977. Polyphenols, ascorbic acid and related enzymes activities associated with black heart in Cayenne pineapple fruits. Agrochemophysica, **9**, (1), 1-5.

VEEN H., VAN de GEIJN S.C., 1978. Mobility and ionic form if silver as related to longevity of cut carnations. Planta, **140**, 93-96.

VEZINA L., PAQUIN R., 1982. Effet des basses températures sur la distribution de la proline libre dans les plantes de Luzerne *Medicago media* Pers.. Physiol.Vég., **20**, 101-109.

VIEIRA DA SILVA J., 1978. Aspects physiologiques de l'halophilie et de la résistance aux sels. Bull.Soc.Bot.Fr., Actualités botaniques., **3-4**, 275-284.

VINA J., 1990. Glutathione: Metabolism et physiological fonctions. Ed. VINA J.,Press Inc. Boca Raton, Florida, 11-20.

VIOQUE A., ALBI M.A., VIOQUE B., 1981. Role of IAA oxidase in the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Phytochem., **20**, (7), 1473-1475.

VUILLAUME C., 1986. Quelques données sur la culture de l'ananas en Australie. Document interne IRFA, Réun.Ann. IRFA, (48), 6p.

WALLNER S.J., 1978. Apple fruit ß-galactosidase and softening in storage. J.Am.Soc. Hort.Sci., **103**, 364-366.

WALLNER S.J., WALKER J.E., 1975. Glycosidases in cell wall degrading extracts of ripening tomato fruits. Plant Physiol., **55**, 94-98.

WARD T.M., WRIGHT M., ROBERTS J.A., SELF R., OSBORNE D.J., 1978. Analytical procedure for assy and identification of ethylene. Dans "Isolation of plant growth substances". Ed HILLMAN J.R., Society for experimentalbiology, Seminar series, **4**, 135-151, CU press, GB.

WASSMAN R.C., 1989, Effects of seasonal temperature variations on pineapple scheduling for canning in Queensland. Communication to Nelspruit.

WATADA A., HERNER R.C., KADER A.A., ROMANI R.J., STABY G.L., 1984. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. Hortscience, **19**, 20-21.

WILLIAMS M.W., BILLINGSLEY H.D., 1973. Water core development in apple fruits as related to sorbitol levels in the sap and to minimum temperatures. J.Amer.Soc.Hort.Sci., **98**, (2), 205-207.

WILSON D., BAILEY R.W., 1971. Factors affecting leaf strach levels in some temperate grasses. J.Sci. Fd Agric., **22**, 335-337.

WOLSWINKEL P., 1990. Recent progress in research on the role of turgor sensitive transport in seed development. Plant Physiol.Biochem., **28**, (3), 399-410.

WOLSWINKEL P., AMMERLAN A., 1984. Turgor sensitive sucrose and amino acid transport into developing seed of *Pisum sativum*. Effect of high sucrose or mannitol concentrations in experiments in empty ovules. Physiol.Plant, **61**, 172-182.

WOLSWINKEL P., AMMERLAN A., 1986. Turgor sensitive transportin developing seeds of legumes: The role of the stage of development and the use of excised vs attached seed coats. Plant Cell Environ., **9**, 133-140.

WOLSWINKEL P., AMMERLAN A., 1988. Effect of the osmotic environment of the seed coat on sucrose and amino acid transport into developing seeds of *Lunaria annua, Acer pseudoplatanus and Glycine max*. Plant Physiol., **74**, 262-269.

WU P., KUO M.C., ZHANG K.Q., HARTMAN T.G., ROSEN R.T., HO C.T., 1990. Analysis of glycosidically bound 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in pineapple. Perfum.Flavor., **15**, 1, 51-53.

WU P., KUO M.C., HARTMAN T.G., ROSEN R.T., HO C.T., 1991. Free and glycosidically bound aroma compounds in pineapple *Ananas comosus* l.Merr. J.Agric. Food Chem., **39**, 170-172.

WYSE R.E., ZAMSKI E., TOMOS A.D., 1986. Turgor regulation of sucrose transport in sugar beet taproot tissue. Plant Physiol., **81**, 478-481.

YAMAKI S., MATSUDA K., 1977. Changes in the activities of some cell-wall degrading enzymes during development and ripening of Japanese pear fruit Pyrus serotina Rehder var. culta Rehder. Plant Cell Physiol., (18), 81-93.

YAMASAKI H. et YAMASAKI I., 1973. The reaction between indoleacetic acid and horseradish peroxydase. Arch.Biochem.Biophys., **154**, 147-159.

YANG S.F., 1981. Biosynthese of ethylene and its régulation. Dans "Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. Ed. FRIENDS J., RHODES M.J.C., A.P., 89-104.

YANG S.F., 1985. Biosynthesis and action of ethylene. Hortscience, **20**, (1), 41-45.

YANG S.F., HOFFMAN N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann.Rev.Plant Physiol., **35**, 155-189.

YU Y., YANG S.F., 1979. Auxin induced ethylene production and its inhibition by AVG an cobalt ion. Plant Physiol., **64**, 1074-1077.

YU Y., YANG S.F., 1980. Biosynthesis of wound ethylene. Plant Physiol., **66**, 281-285.

ZEEVAART J.A., 1980. Changes in levels of ABA and its metabolites in excised leaf blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. Plant Physiol., **66**, 672-678.

ZEEVAART J.A.D., CREELMAN R.A., 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol., **39**, 439-473.

ZEEV EVEN-CHEN, MATTOO A.K., GOREN R., 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by AVG and by polyamines shunts label from 3,4 [^{14}C]Methionine into spermidine in aged orange peel disc. Plant Physiol., **69**, 385-388.

ZINSOU C., SOBESKY O., CLAIRON M., 1983. Composition minérale et glucidique du fruit de christophine ou de chayotte, Sechium edulis SW., au cours du grossissement du fruit. Agronomie, **3**, (6), 529-536.

RESUME

Les processus physiologiques de la maturation de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) MERR) ont fait l'objet de peu d'études approfondies en regard de l'importance économique du fruit. En Côte d'Ivoire, l'évolution des caractéristiques chimiques de la pulpe du fruit et de son épiderme sont similaires à celles observées dans d'autres conditions de culture. Diverses activités enzymatiques en relation soit avec la dégradation des parois cellulaires, soit avec les processus oxydatifs ayant lieu au cours de la maturation et de la sénescence, ont été mesurées. On n'a pu montrer de relation de cause à effet entre la teneur en éthylène de l'atmosphère interne du fruit et sa maturation, en raison de sa nature non climactérique. La dégradation des chlorophylles de l'épiderme est, en revanche, clairement dépendante de l'éthylène. On a comparé la sénescence normale du fruit avec le cas des fruits dits "jaunes", anomalie physiologique présentant des caractéristiques de sénescence accélérée et anormale de la pulpe par rapport à celle de l'épiderme. Le "jaune" se traduit par une translucidité de la chair et la non dégradation des chlorophylles de l'épiderme. Le phénomène est induit par des conditions climatiques particulières mais mal déterminées (sécheresse suivie de pluies et fortes températures), et il ne semble pas lié à une carence minérale. Les fruits "jaunes" présentent une faible acidité et une teneur plus élevée en éthylène. Les activités α et ß-galactosidases et catalasiques augmentent notablement sans que l'on ait pu, toutefois, les lier clairement à l'expression du phénomène (translucidité de la pulpe). Faiblement développé, le "jaune" améliore les qualités organoleptiques du fruit et ne diminue pas leur aptitude à la conservation. Cependant, l'exportation de ces fruits fragilisés demande quelques précautions lors du conditionnement et du transport.

The physiological processes of pineapple (*Ananas comosus* (L.) MERR) ripening were not so studied for a fruit of a such economical importance. In Ivory Coast, chemical evolutions of the pulp and the shell are similar with the observed evolutions in other countries. Several enzymatic activities related with cell walls degradation or oxidatives processes during maturation, ripening and senescence of the fruit, were studied. No causal relationship between ethylene in internal atmosphere of the fruit and ripening was found, due to its non climacteric character. On the contrary, the shell chlorophyll degradation is ethylene-dependent. The normal senescence and the physiological disease called "jaune" (greenripening) with characteristics of accelerated senescence, are compared. The fruit flesh becomes translucent and the shell chlorophyll are not degraded during ripening. Hydric stress followed by rain and high temperatures are inductive conditions, and the disease could not be related with mineral deficiencies. The fruit have a low acidity and a higher level of ethylene. α and ß-galactosidases, catalases activities increase, but this could not be clearly related with translucency process. Lightly developed, the desease increase organoleptic quality of the fruit and do not decrease the postharvest storage abilities. Nevertheless, these fruits more "fragile" need particular cares during processing.