



**HAL**  
open science

# Couleur des jus de pomme et des cidres : analyse structurale et impact de plusieurs paramètres physico-chimiques

Erell Le Deun

► **To cite this version:**

Erell Le Deun. Couleur des jus de pomme et des cidres : analyse structurale et impact de plusieurs paramètres physico-chimiques. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B047 . tel-01758930

**HAL Id: tel-01758930**

**<https://theses.hal.science/tel-01758930>**

Submitted on 5 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie Agro Santé**

présentée par

**Erell Le Deun**

Préparée à l'unité de recherche 1268 INRA BIA  
Unité Biopolymères, Interactions, Assemblages  
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Couleur des jus de  
pomme et des cidres:  
analyse structurale et  
impact de plusieurs  
paramètres physico-  
chimiques.**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 21 décembre 2016**

devant le jury composé de :

**Maria Teresa ESCRIBANO-BAILON**

Professeur – Université de Salamanque  
*Rapporteur*

**Mohammed BOUJTITA**

Maître de Conférences – Université de Nantes  
*Rapporteur*

**Lionel MUNIGLIA**

Maître de Conférences – Université de Lorraine  
*Examineur*

**Alain BOUCHEREAU**

Professeur – Université de Rennes 1  
*Examineur*

**Sylvain GUYOT**

Directeur de Recherches – INRA  
*Directeur de thèse*

**Marie-Laurence ABASQ**

Maître de Conférences – Université de Rennes 1  
*Co-directrice de thèse*

## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre du projet interrégional CICHROM, soutenu par le Pôle Agronomique Ouest et les régions Bretagne et Pays de Loire.

Cette thèse a été effectuée dans l'Unité Biopolymères, Interactions et Assemblages de l'INRA de Nantes, au sein de l'équipe Polyphénols, Réactivités, Procédés délocalisée sur le site du Rheu. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe Produits Naturels, Synthèse et Chimie Médicinale au sein de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes.

En premier lieu, je souhaiterais adresser mes plus sincères remerciements à M. Sylvain Guyot, directeur de cette thèse, pour m'avoir offert l'opportunité de venir travailler sur un sujet aussi intéressant (...la couleur, c'est FUN !) qui m'a fait découvrir un grand nombre de disciplines et tout un tas de techniques expérimentales. Merci pour ta disponibilité, tu as toujours su prendre du temps pour tenter de m'expliquer les bases de la réactivité chimique des polyphénols en solution (entre autres) alors que je débarquais dans le monde de la chimie alimentaire. Enfin, un grand merci pour ta patience, ta compréhension et tes encouragements permanents durant les périodes de doute, qui ont été fréquentes au cours de ces quatre années.

Je remercie vivement Mme Marie-Laurence Abasq, co-directrice de ce travail, pour avoir su m'initier aux rudiments de l'électrochimie. (Ah, les problèmes de connections ... !) Merci pour tes conseils avisés en sciences ... et pas que. Tu m'auras souvent rappelé que chaque jour était l'occasion d'amorcer un changement et que l'on doit accepter d'avancer « comme on peut » -et pas toujours « comme on le voudrait » ! Ta gentillesse, ta compréhension et ton soutien sans faille dans les moments difficiles ont vraiment été d'une aide précieuse pour continuer à avancer.

Je souhaite vous assurer tous deux de ma profonde reconnaissance pour les innombrables coups de main « en situations d'urgence ». Au-delà des aspects scientifiques, je suis contente d'avoir pu croiser votre route, c'était une véritable chance de vous avoir comme encadrants, vous avez su m'offrir des conditions de travail optimales pour démarrer dans la recherche.

Je remercie vivement Mme Maria Teresa Escribano-Bailon, professeur à l'Université de Salamanque, en Espagne ; et M. Mohammed Boujtita, maître de conférences à l'Université de Nantes, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant de l'examiner en tant que rapporteurs.

Je remercie sincèrement M. Alain Bouchereau, professeur à l'Université de Rennes 1 et M. Lionel Muniglia, maître de conférences à l'Université de Lorraine, pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier chaleureusement M. Patrick Trouillas pour m'avoir accueillie dans son équipe à Limoges : merci pour les échanges scientifiques toujours ultra enrichissants, tu as un talent certain pour donner aux profanes l'impression qu'ils comprennent quelque chose à l'atomistique ! Merci pour les encouragements et les re-boostages de dernière minute ! Un grand merci à Michal pour m'avoir co-encadrée sur ce stage de modélisation. Tu as tout tenté pour essayer de me « faire voir les molécules

dans l'espace »... en vain ! Merci pour ta gentillesse et pour m'avoir fait découvrir la « gastronomie tchèque » avec Petra. Merci à Gabin, Florent et Tahani également.

Mes remerciements s'adressent également à M. Olivier Dangles, M. Thomas Croguennec et M. Philippe Courcoux qui ont contribué à ce travail par leur implication dans les comités de thèse.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Sandrine Pottier et Arnaud Bondon de la plateforme PRISM, pour les analyses de RMN et l'interprétation des spectres. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Enfin, je remercie TOUS les membres de l'UMT Novacidre, de l'équipe PNSCM et tous ceux qui ont fait un passage (forcément) joyeux au Rheu, qu'ils soient chercheurs aguerris, CDD ou stagiaires. Vous avez tous contribué à maintenir une atmosphère incroyablement agréable au quotidien dans le laboratoire, ces quatre années ont été un réel bonheur en votre compagnie et je pèse mes mots. Vous mériteriez tous un petit mot personnalisé mais il me faudrait alors écrire un chapitre entier de remerciements ! Une pensée tout de même pour Jean-Michel Le Quéré, les pires attaques ne peuvent venir que du 29-S mais les plus grands soutiens aussi, assurément... Merci pour tout le temps passé à répondre à mes « petites questions », pour ta gentillesse et tes conseils avisés, le tout ponctué d'humour, toujours, vraiment merci ! Une pensée particulière pour Noémie Caël qui, au détour d'un stage de Master 2, est venue découvrir le monde coloré des jus de pomme et des cidres. Je me souviens avec plaisir (?) de nos heures de galère passées devant les machines, désespérant de ne pas purifier « le » 575... l'échantillon maudit (n'est-ce pas Hélène ?). Désespoir ponctué de nombreux fous rires – nerveux, bien souvent...

Une mention spéciale pour Catherine J, Mélanie, Morgane et Léon pour le coup de main final, incroyablement sympa et tellement nécessaire... Les filles, je vous suis redevable à vie ! (sauf pour garder des chats, ne comptez pas sur moi...).

Enfin, une petite pensée pour Camille Jégou et Emeline Creis, les amoureux du goémon qui m'ont indirectement permis d'arriver jusqu'à cette thèse. Je garde de tellement bons souvenirs ... sincèrement ! Alors merci à vous aussi !

Les derniers mots seront pour mes proches, et notamment les amis. Je ne citerai pas tout le monde ici mais ils se reconnaîtront.

Idelette, merci, tu es assurément une bouée de sauvetage au milieu des bois, des chaussettes et des poons.

Une pensée pour Stephen – merci d'être toujours présent et capable de trouver comment me faire rire pour désamorcer des situations de « stress absolu » ...

Une pensée particulière pour Sani, Marie, Marta, Fred et Amé qui ont toujours été là.

Je pense enfin à ma famille et en particulier à mes parents qui m'ont toujours soutenue et supportée (dans tous les sens du terme) durant mes études. Ne vous en faites pas, on touche presque au but. Et MERCI n'est pas un mot assez fort...

## Liste des diffusions scientifiques

### Article scientifique à comité de lecture :

**Le Deun, E.**; Van der Werf, R.; Le Bail, G.; Le Quéré, J.-M.; Guyot, S., HPLC-DAD-MS Profiling of Polyphenols Responsible for the Yellow-Orange Color in Apple Juices of Different French Cider Apple3 Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2015, **63**, 7675-7684.

### Communications scientifiques dans des colloques et congrès nationaux ou internationaux :

#### Communications orales (auteur souligné= orateur)

**Le Deun, E.**; Courtel, P.; Sotin, H.; Faustin, M.; Cael, N.; Serrand, S.; Le Quéré, J. M.; Guyot, S.; Abasq, M. L. How pH and redox potential can modulate color expression of yellow-orange chromophores? An analytical and electrochemical study in the colorful world of apple juices. *XXVIIIth International Conference on Polyphenols, Vienna, Austria*, 2016; Book-of-Abstract.com: Vienna, Austria, 2016.

**Le Deun, E.**; Février, H.; Le Quéré, J.; Bauduin, R.; Guyot, S. Recent advances on the phenolic molecules and oxidative mechanisms involved in the color of classical and “rosé” cider apple juices. *2nd Euro-Mediterranean Symposium on Fruit & Vegetable Processing*, Avignon, France, 4-6 April, 2016.

**Le Deun, E.** Profilage et détermination structurale de molécules impliquées dans la coloration de jus de pommes et de cidres. *Journée Scientifique de l'axe Analyse Structurale et Métabolomique de Biogenouest*, IRS-UN Nantes, Nantes, 18 décembre, 2015.

#### Communications par affiche

**Le Deun, E.**; Van der Werf, R.; Le Bail, G.; Caël, N.; Le Quéré, J. M.; Guyot, S. Varietal diversity and characterization of the tannin and non-tannin compounds responsible for the color of cider apple juices. *XXVIIIth International Conference on Polyphenols (ICP 2014)*, Nagoya, Japan, 2-6 September, 2014.

Abasq, M. L.; Faustin, M.; **Le Deun, E.**; Courtel, P.; Guyot, S. Oxidation products of apple phenolic compounds issuing from enzymatic and electrochemical processes. Study by spectroelectrochemistry and LC - UV/Visible-Mass spectrometry. *Journées d'Electrochimie 2015*, Rome, Italy, 6-10 July, 2015.

Le Quéré, J. M.; Poupard, P.; **Le Deun, E.**; Guyot, S.; Bauduin, R. The color space of French ciders. *2nd Euro-Mediterranean Symposium on Fruit & Vegetable Processing*, Avignon, France, 4-6 April, 2016.

### Autres communications

**Le Deun, E.** Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et l'expression de la couleur en modèle jus de pomme et cidre. *Comité Scientifique et Industriel du Pôle Agronomique Ouest*, Conseil Régional des Pays de la Loire, Nantes, 19 mai, 2015 (communication orale).

**Le Deun, E.** Composés phénoliques responsables de la couleur des jus de pomme et des cidres: structures et stabilité. *Journée Jeunes Chercheurs INRA BIA*, Maison de l'Agriculture, Nantes, 11 juin, 2015 (communication orale).

Le cidre a la couleur des blonds soleils d'automne,  
Des ciels tièdes, striés de pâles rayons d'or :  
Leur agile chaleur dans sa mousse bouillonne,  
Et leur douceur fluide et cristalline y dort.

L'ivresse lourde de la bière  
Empâte les sens hébétés :  
Dans la chope à dessins sculptés  
C'est le spleen qui se désaltère.

L'ivresse fumeuse du vin  
Brûle les nerfs qu'elle détraque :  
Sa gaieté qu'on vante est opaque ;  
Son rire n'a rien de divin.

L'ivresse du cidre est légère :  
Elle chatouille le cerveau,  
C'est une flamme passagère,  
Un doux frisson toujours nouveau.

Le cidre a la couleur des blonds soleils d'automne,  
Des ciels tièdes, striés de pâles rayons d'or :  
Rien ne vaut au Normand que la soif aiguillonne  
Les brocs cerclés de cuivre où le bon cidre dort.

Maurice LEVAILLANT

*« D'ailleurs, ce liquide clair, transparent, limpide, de couleur ambrée ou rutilant comme l'or, et qui pétille dans le verre en se couvrant sur ses bords d'une légère couche de mousse, plaît à l'oeil et stimule déjà par son aspect, en même temps que ses variétés, suivant son âge et sa provenance, répondent à tous les caprices ; tantôt doux et sucré comme nos meilleurs vins de liqueur; tantôt amer et fort comme certains vins du Midi, ou bien légèrement acide et spumeux, frais et désaltérant comme nos petits vins de la Touraine. »*

Extrait de Propriétés médicales et hygiéniques du cidre – La maladie de la pierre en Basse-Normandie, par le Dr Denis-Dumont, 1881.

## Liste des abréviations

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>3-OH-PLZ</b>         | 3-hydroxy-phloridzine  |
| <b>3-OH-XPL</b>         | 3-hydroxy-xyloglucoside de phlorétine                          |
| <b>a*</b>               | Paramètre chromatique caractérisant l'axe rouge-vert (CIE Lab) |
| <b>ACQ</b>              | Acide caféoylquinique  |
| <b>AHC</b>              | Acides hydroxycinnamiques                                      |
| <b>B*</b>               | Paramètre chromatique caractérisant l'axe jaune-bleu (CIE Lab) |
| <b>C*</b>               | Chroma (CIE LCh)   |
| <b>CAT</b>              | (+)-catéchine  |
| <b>CCC</b>              | Chromatographie à Contre-Courant                               |
| <b>CIE</b>              | Commission Internationale de l'Eclairage                       |
| <b>CLHP</b>             | Chromatographie Liquide Haute Performance                      |
| <b>COSY</b>             | Correlation Spectroscopy                                       |
| <b>CPC</b>              | Chromatographie de Partage Centrifuge                          |
| <b>D-576-1</b>          | Dimère d'épicatéchine à 576 Da                                 |
| <b>D-576-2</b>          | Dimère d'épicatéchine à 576 Da                                 |
| <b>DBD</b>              | Détecteur à Barrette de Diodes                                 |
| <b>DDEC</b>             | Déhydrodiépicatéchine  |
| <b>DFT</b>              | Density Functional Theory                                      |
| <b>DFT-D</b>            | Dispersion-corrected DFT                                       |
| <b>DHC</b>              | Dihydrochalcones   |
| <b>DM</b>               | Variété <i>Dous Moen</i>                                       |
| <b>DMNO<sub>x</sub></b> | Jus de <i>Dous Moen</i> non oxydé                              |
| <b>DMO<sub>x</sub></b>  | Jus de <i>Dous Moen</i> oxydé                                  |
| <b>DP<sub>m</sub></b>   | Degré de Polymérisation moyen                                  |
| <b>DTEC</b>             | Déhydrotriépicatéchine   |
| <b>EC</b>               | (-)-épicatéchine   |
| <b>E<sub>pa</sub></b>   | Potentiel de pic d'oxydation                                   |
| <b>E<sub>pc</sub></b>   | Potentiel de pic de réduction                                  |
| <b>ES</b>               | Excited State  |
| <b>ESI</b>              | Electrospray Ionization  |
| <b>FA</b>               | Flavanols  |
| <b>FO</b>               | Flavonols  |
| <b>GU</b>               | Variété <i>Guillevic</i>                                       |
| <b>h</b>                | Angle de teinte (CIE LCh)                                      |
| <b>HMBC</b>             | Heteronuclear Multiple Bond Coherence                          |
| <b>HMQC</b>             | Heteronuclear Multiple Quantum Correlation                     |
| <b>HOMO</b>             | Highest Occupied Molecular Orbital                             |
| <b>HSQC</b>             | Heteronuclear Single Quantum Correlation                       |
| <b>I (λ)</b>            | Illuminant   |
| <b>IEF-PCM</b>          | Integral Equation Formalism - Polarizable Continuum Model      |
| <b>K<sub>p</sub></b>    | Coefficient de Partage   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <b>L*</b>            | Luminance   |
| <b>LUMO</b>          | Lowest Unoccupied Molecular Orbital   |
| <b>MF</b>            | Matière Fraîche   |
| <b>MM</b>            | Variété <i>Marie Ménéard</i>  |
| <b>MS</b>            | Matière Sèche   |
| <b>oQ</b>            | <i>ortho</i> -Quinone   |
| <b>PCAs</b>          | Procyanidines   |
| <b>PCQ</b>           | Acide <i>para</i> -coumaroylquinique  |
| <b>PJ</b>            | Variété <i>Petit Jaune</i>  |
| <b>PLT</b>           | Phlorétine  |
| <b>PLZ</b>           | Phloridzine   |
| <b>POPi</b>          | Produit d'Oxydation de la Phloridzine incolore  |
| <b>POPj</b>          | Produit d'Oxydation de la Phloridzine jaune   |
| <b>PPO</b>           | Polyphénol Oxydase  |
| <b>PXGOPj</b>        | Phloretin XyloGlucoside Oxidation Product « jaune »   |
| <b>RMN</b>           | Résonance Magnétique Nucléaire  |
| <b>SM</b>            | Spectrométrie de Masse  |
| <b>SM/SM</b>         | Spectrométrie de Masse en tandem  |
| <b>SMn</b>           | Spectrométrie de Masse multiple   |
| <b>T</b>             | Transmittance   |
| <b>T-862</b>         | Trimère d'épicatéchine à 862 Da   |
| <b>T-864</b>         | Trimère d'épicatéchine à 864 Da   |
| <b>TD-DFT</b>        | Time Dependent Density Functional Theory  |
| <b>TOCSY</b>         | Total Correlation Spectroscopy  |
| <b>T<sub>R</sub></b> | Temps de rétention  |
| <b>u.a.</b>          | Unités arbitraires  |
| <b>u.m.a.</b>        | Unité de masse atomique   |
| <b>UV</b>            | Rayonnement Ultraviolet   |
| <b>PXGOpi</b>        | Phloretin XyloGlucoside Oxidation Product « incolore »  |
| <b>XPL</b>           | Xyloglucoside de phlorétine   |
| <b>XPL-EC/Ox</b>     | Produit coloré issu du couplage oxydatif d'un xyloglucoside de phlorétine et d'une (-)-épicatéchine |
| <b>ΔE</b>            | Ecart de couleur  |

## TABLE DES MATIERES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. AVANT-PROPOS</b>  | <b>11</b> |
| <b>I. 1. Un peu d'histoire ...</b>  | <b>11</b> |
| <b>I. 2. Pommes à Cidre, Polyphénols et Qualités sensorielles...</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>I. 3. La filière cidricole française...</b>  | <b>13</b> |
| <b>I. 4. Le projet CICHROM, un projet inter-régional sur la couleur des produits cidricoles</b>         | <b>14</b> |
| <br>  |           |
| <b>II. INTRODUCTION GENERALE</b>  | <b>16</b> |
| <br>  |           |
| <b>II. 1. Couleur des produits alimentaires</b>   | <b>16</b> |
| II. 1. 1. La couleur des aliments : un critère important pour les consommateurs ?                       | 16        |
| II. 1. 2. La vision en couleur (d'après J. Le Rohellec, 2011)   | 17        |
| II. 1. 3. Comment caractériser la couleur d'un aliment ?  | 20        |
| II. 1. 3. 1. Caractériser une couleur : les modèles de représentation.                                  | 20        |
| II. 1. 3. 2. Mesurer la couleur   | 25        |
| <br>  |           |
| <b>II. 2. Des métabolites végétaux sources ou précurseurs de couleur : les polyphénols</b>              | <b>27</b> |
| II. 2. 1. Les polyphénols : définition et nomenclature générale   | 27        |
| II. 2. 1. 1. Généralités  | 27        |
| II. 2. 1. 2. Les acides hydroxycinnamiques  | 28        |
| II. 2. 1. 3. Les flavonoïdes  | 28        |
| II. 2. 1. 4. Les flavan-3-ols   | 29        |
| II. 2. 1. 5. Les flavan-3-ols monomères ou catéchines   | 29        |
| II. 2. 1. 6. Les flavan-3-ols polymères : procyanidines ou tannins condensés                            | 30        |
| II. 2. 1. 7. Nature des unités constitutives et distinction entre unité terminale et unités d'extension | 31        |
| II. 2. 1. 8. Degré de polymérisation  | 32        |
| II. 2. 1. 9. Type et position des liaisons interflavaniques   | 32        |
| II. 2. 1. 10. Les principales procyanidines de la pomme   | 33        |
| II. 2. 1. 11. Les dihydrochalcones  | 34        |
| II. 2. 1. 12. Les anthocyanes   | 35        |
| II. 2. 1. 13. Les flavonols   | 36        |
| II. 2. 2. Généralités sur la réactivité et la physico-chimie des polyphénols                            | 37        |
| II. 2. 3. Rôles et propriétés des polyphénols de la pomme et de leurs produits d'oxydation              | 45        |
| <br>  |           |
| <b>II. 3. Contexte Scientifique</b>   | <b>46</b> |
| II. 3. 1. Positionnement des cidres Français sur le cercle des couleurs $L^*a^*b^*$                     | 46        |
| II. 3. 2. Problématique de l'étude  | 49        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>III. COMPOSES PHENOLIQUES JAUNES-ORANGES DES JUS DE POMME FRANÇAIS : PROFILAGE, ELEMENTS STRUCTURAUX ET APPREHENSION DES MECANISMES DE FORMATION</b>                 | <b>50</b> |
| <b>III. 1. Travaux antérieurs</b>   | <b>50</b> |
| III. 1. 1. La formation de chromophores phénoliques dans l'alimentation : une première étape d'oxydation par voie enzymatique suivie de réactions chimiques ultérieures | 50        |
| III. 1. 1. 1. Principaux substrats de la PPO  | 53        |
| III. 1. 1. 2. Vue d'ensemble des principaux pigments phénoliques néoformés par oxydation dans des boissons fermentées   | 54        |
| III. 1. 2. Molécules phénoliques colorées des jus de pomme  | 55        |
| <b>III. 2. Matériel et méthodes</b>   | <b>60</b> |
| III. 2. 1. Produits chimiques   | 60        |
| III. 2. 2. Matériel végétal   | 60        |
| III. 2. 3. Production de jus de pomme à cidre fortement et faiblement oxydés  | 60        |
| III. 2. 3. 1. Production d'une vingtaine de litres de jus à partir de quatre variétés de pommes à cidre (hydropresse)61   |           |
| III. 2. 3. 2. Production de 100 L de jus de <i>Dous Moen</i> fortement et faiblement oxydés (presse à paquets)  | 62        |
| III. 2. 3. 3. Production de moût oxydé  | 62        |
| III. 2. 3. 4. Production de moût non oxydé  | 62        |
| III. 2. 3. 5. Description de la couleur des jus au sein du système CIE $L^*a^*b^*/L^*C^*h$  | 64        |
| III. 2. 3. 6. Extraction en phase solide des polyphénols présents dans les jus de pomme   | 64        |
| III. 2. 3. 7. Extraction des polyphénols du jus de <i>Dous Moen</i> produit en grand volume   | 65        |
| III. 2. 4. Analyse des composés phénoliques colorés présents dans les jus de pomme  | 66        |
| III. 2. 4. 1. Profilage des polyphénols colorés par CLHP-DBD-SM   | 66        |
| III. 2. 4. 2. Collage à la gélatine de l'extrait phénolique oxydé du jus de <i>Dous Moen</i>  | 67        |
| III. 2. 4. 3. Analyse des polyphénols natifs par CLHP-DBD-SM  | 68        |
| III. 2. 4. 4. Détermination de la concentration totale en procyanidines et de leur degré moyen de polymérisation par analyse en CLHP après phloroglucinyse              | 69        |
| III. 2. 4. 5. Purification et analyse d'un nouveau composé coloré à partir de la fraction DMOX  | 70        |
| III. 2. 4. 6. Synthèse en solution modèle des deux colorants décrits précédemment   | 73        |
| III. 2. 4. 7. Incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine en présence d'un extrait de PPO de pomme  | 75        |
| <b>III. 3. Résultats &amp; Discussion</b>   | <b>77</b> |
| III. 3. 1. Diversité variétale de la couleur des jus de pomme   | 77        |
| III. 3. 2. Profilage des produits d'oxydation colorés présents dans les jus de pomme  | 79        |
| III. 3. 3. Mise en évidence de la présence de tannins colorés   | 82        |
| III. 3. 4. Quantification des polyphénols natifs présents dans les jus de pomme fortement et faiblement oxydés  | 83        |

|  |            |
|--|------------|
| III. 3. 5. Identification du PXGOPj, un nouveau produit jaune des jus de pomme résultant de l'oxydation du xyloglucoside de phlorétine.  | 89         |
| III. 3. 6. Caractérisation par spectrométrie de masse d'un nouvel hétérodimère coloré présent dans les jus de pomme et résultant d'un couplage entre le xyloglucoside de phlorétine et la (-)-épicatéchine | 92         |
| III. 3. 7. Synthèse en solution modèle des deux molécules colorées (1) (PXGOPj) et (6) (XPL-EC/Ox) trouvées dans les jus   | 97         |
| III. 3. 8. Synthèse enzymatique en milieu modèle de composés colorés issus de l'oxydation de la (-)-épicatéchine   | 104        |
| III. 3. 8. 1. Analyse en CLHP-DBD-SM du milieu d'incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine   | 105        |
| III. 3. 8. 2. Comparaison des spectres UV-visible des quatre composés d'intérêt  | 107        |
| III. 3. 8. 3. Purification des produits par CLHP à l'échelle semi-préparative  | 110        |
| III. 3. 8. 4. Analyse RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C des produits colorés issus de l'oxydation enzymatique de la (-)-épicatéchine en solution modèle  | 111        |
| <b>III. 4. Conclusion</b>  | <b>123</b> |

## **IV. IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU SUR L'EXPRESSION DE LA COULEUR DES CHROMOPHORES DES JUS DE POMME**

**124**

### **IV. 1. Impact du processus fermentaire sur l'expression de la couleur des jus**

**124**

### **IV. 2. Evaluation de l'effet du pH sur le POPj et la DTEC\_864 de type A, deux chromophores phénoliques choisis comme pigments modèle des jus de pomme**

**130**

IV. 2. 1. Introduction 130

IV. 2. 2. Matériel et méthodes 132

    IV. 2. 2. 1. Purification des deux chromophores modèles, le POPj et la DTEC de type A 132

    IV. 2. 2. 2. Acquisition des spectres UV-visibles en fonction du pH 134

    IV. 2. 2. 3. Détermination des valeurs de pKa du POPj 134

    IV. 2. 2. 4. Prédiction des spectres UV-visibles des formes neutres et chargées du POPj par TD-DFT, une méthode computationnelle de chimie quantique 137

IV. 2. 3. Résultats et discussions 138

    IV. 2. 3. 1. Evolution des paramètres colorimétriques du POPj et de la DTEC en fonction du pH 138

    IV. 2. 3. 2. Modification des spectres UV-visibles des deux composés en fonction du pH 140

    IV. 2. 3. 3. Exploration de l'effet du pH sur le POPj par TD-DFT 142

### **IV. 3. Evaluation de l'effet du potentiel rédox sur le POPj et la DTEC\_864 de type A, deux chromophores phénoliques choisis comme pigments modèles des jus de pomme**

**203**

IV. 3. 1. Eléments théoriques sur les méthodes électrochimiques à trois électrodes en régime de diffusion pure 203

    IV. 3. 1. 1. La voltammétrie cyclique 153

|              |  |            |
|--------------|--|------------|
| IV. 3. 1. 2. | La chronoampérométrie  | 156        |
| IV. 3. 1. 3. | La méthode couplée spectroélectrochimie UV-Visible                     | 209        |
| IV. 3. 2.    | Partie expérimentale   | 209        |
| IV. 3. 2. 1. | La voltammétrie cyclique   | 209        |
| IV. 3. 2. 2. | La spectroélectrochimie UV-Visible                                     | 158        |
| IV. 3. 3.    | Résultats et discussions   | 214        |
| IV. 3. 3. 1. | Etude des propriétés rédox du POPj et du POPi par voie électrochimique | 214        |
| IV. 3. 3. 2. | Etude des propriétés rédox de la DTEC_864 par voltammétrie cyclique    | 228        |
| <b>V.</b>    | <b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b>                                   | <b>230</b> |
|              | <b>LISTE DES FIGURES</b>   | <b>235</b> |
|              | <b>LISTE DES TABLEAUX</b>  | <b>242</b> |
|              | <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>                                     | <b>243</b> |
|              | <b>ANNEXE 1</b>  | <b>251</b> |

# I. AVANT-PROPOS

## I. 1. UN PEU D'HISTOIRE ...

Le cidre est une boisson gazeuse légère résultant de la fermentation de jus de pomme. Peu alcoolisée, elle est souvent associée à l'image de « la première boisson de fête ». Son origine n'est pas clairement établie. Elle est nécessairement liée à la culture des pommiers, or celle-ci remonte à des temps probablement très anciens. Dans l'Antiquité, les pommiers cultivés étaient déjà connus des civilisations égyptienne et gréco-romaine. Les Romains, qui attribuèrent à la nymphe des vergers le nom de Pomone, produisaient une boisson qu'ils appelaient « vin de pommes » ou « *sicera* » (terme qui dériverait indirectement de l'hébreu « *shekar* » désignant toute boisson alcoolique autre que le vin). Ces boissons étaient sans nul doute très différentes du produit que l'on connaît aujourd'hui. L'obtention d'un alcool de pommes est mentionnée dans *Histoire naturelle* de Pline l'Ancien, œuvre majeure publiée vers 77 après JC. L'auteur y décrivait déjà plusieurs manières de greffer les pommiers. En Gaule, le cidre est évoqué pour la première fois dans les écrits de Saint-Guénolé, religieux qui vécut en Bretagne, et plus précisément en Finistère, au V-VI<sup>ème</sup> siècles et fit bâtir l'abbaye de Landévennec. Le cidre tel qu'il le décrit correspond alors à une macération de pommes sauvages et de sève dans de l'eau claire. D'autres mentions sont faites dans différents écrits monastiques. Vers 800, Charlemagne exige la formation d'ouvriers brasseurs ou « siceratores » mais ce n'est probablement que vers le XII-XIII<sup>ème</sup> siècles qu'un cidre plus proche de celui consommé aujourd'hui connaît un réel essor en raison de l'apparition de pressoirs. Le cidre est véritablement devenu une boisson de consommation courante vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Suite aux conflits mondiaux, à l'arrachage de vergers, cette consommation connaît une diminution significative. Néanmoins, peu à peu, la profession travaille à obtenir des produits de qualité qui connaissent progressivement un regain d'attention auprès de la population française et même mondiale. (Gancel and Treignier, 2007)



Figure 1 – « La dégustation du cidre nouveau procure l'occasion de se réunir pour une veillée en costumes traditionnels » (extrait de l'ouvrage *De la pomme au cidre*, reproduction d'une ancienne carte postale issue de la collection du Cartopole de Baud).

## I. 2. POMMES A CIDRE, POLYPHENOLS ET QUALITES SENSORIELLES...

Les qualités sensorielles des cidres français, incluant saveurs, couleurs et arômes, sont incontestablement liées à une matière première originale constituée d'une grande diversité de variétés de pommes dites « à cidre » pour lesquelles les polyphénols jouent un rôle essentiel. Déjà au XVI<sup>ème</sup> siècle Julien Le Paulmier, dans son ouvrage « *De vino et Pomaceo* », soulignait l'importance du choix de pommes de saveurs amères ou douces pour la qualité des cidres (Travers, 1896). L'amertume a ensuite été reliée à la présence de polyphénols et en particulier de tannins dans la matière première. Cependant, ce n'est qu'en 1959, qu'un véritable classement systématique des variétés de pommes à cidre (Tableau 1), fondé sur l'acidité et la teneur en polyphénols des moûts, a été établi en France (Tavernier and Jacquin, 1959).

Tableau 1 - Classification française des pommes à cidre (Tavernier et Jacquin, 1959)

| Catégorie   | Acidité (meq.L <sup>-1</sup> ) | Tannins (g.L <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------------------------|------------------------------|
| Douce       | A < 60                         | T < 2                        |
| Douce-amère | A < 60                         | 2 < T < 3                    |
| Amère       | A < 60                         | T > 3                        |
| Acidulée    | 60 < A < 90                    | T < 2                        |
| Aigre       | A > 90                         | T < 2                        |

Contrairement aux pommes de table, pour lesquelles la sélection variétale a souvent abouti à des fruits assez pauvres en composés phénoliques, la richesse en polyphénols dans les fruits à cidres se traduit généralement par l'expression d'une couleur intense au moment du râpage et du pressage. Cette couleur, qui s'inscrit classiquement dans une gamme variant du jaune pâle à l'orangé intense voire acajou, fait incontestablement partie des critères de qualité en contribuant à la diversité des cidres français. Cette diversité était déjà soulignée par Julien Le Paulmier, comme en atteste l'extrait suivant de la traduction française du « *Traité du vin et du sidre* » (édition originale en latin, 1589) :

« *CHAPITRE V. – La différence des sidres (I).* »

*Comme les vins, les cidres présentent des différences de couleur, de goût, de consistance et de force.*

*Le cidre, encore trouble, a la couleur de l'eau des rivières qui traversent des terrains ferrugineux et il est assez malsain.*

*Suivant les pommes dont il est fait, le cidre est rouge avec goût de sucre et de canelle, ou roux et tanné comme du vin muscadet, ou transparent et de couleur d'ambre, ou simplement jaune.*

*Les cidres du pays d'Auge sont épais et très nourrissants; ceux du Cotentin, ambrés et plus légers, se digèrent plus facilement.*

*« L'homme qui vit en oisiveté & repos doit entre ceux-ci choisir les plus foibles & délicats, qui ont moins de couleur, pourveu qu'ils n'ayent autre vice d'ailleurs: non seulement par ce qu'ils sont incontinent digérez & distribuez, comme serait quelque petit vin blanc. Mais aussi qu'ils nourrissent moins & humectent mieux. L'homme de peine doit choisir les plus puissans, qui sont plus hauts en couleur, par ce qu'ils nourrissent et fortifient davantage ».*

### I. 3. LA FILIERE CIDRICOLE FRANÇAISE...

Si la pomme est la troisième production fruitière au monde avec près de 80 millions de tonnes, dont 1,7 millions en France (données FAOstats, 2013), la production française de pommes à cidre est en revanche estimée à moins de 300 000 tonnes pour une production cidricole de l'ordre de 1,1 million d'hectolitres. Cela représente un marché traditionnellement diversifié générant un chiffre d'affaires d'environ 185 millions d'euros (données UNICID, 2014). Quinze pourcents de la production sont destinés à l'élaboration de jus de pomme et environ vingt pourcents correspondent à des produits dérivés tels que les eaux-de-vie de cidre (calvados ou eau-de-vie de Bretagne, dit « Lambig »), et les mistelles comme le pommeau, obtenu par assemblage de jus de pomme et d'eaux-de-vie de cidre. Cette production est fortement ancrée dans un territoire et associée à une culture régionale puisque l'essentiel des produits est réalisé en Bretagne et en Normandie. Parmi les autres pays européens producteurs de pommes à cidres, on citera l'Espagne (en particulier la région des Asturies, le Pays

Basque Espagnol et la Galice) et le sud du Royaume Uni. La consommation annuelle de cidre en France est d'environ un million d'hectolitres ce qui représente 5,4 litres par ménage (données UNICID, 2014). Cette consommation se caractérise par une certaine saisonnalité (Chandeleur, été) et reste encore souvent associée à la gastronomie (accompagnement des crêpes bretonnes salées ou sucrées). La segmentation du marché est encore largement positionnée sur les dénominations « cidres bruts », « cidres doux » voire cidres « demi-secs ». Cependant, depuis quelques années, l'offre se diversifie de plus en plus et l'on voit apparaître sur le marché des produits innovants comme les cidres rosés, les cidres blancs, les cidres aromatisés et les cidres de glace, qui sont de plus en plus plébiscités par les consommateurs.

#### I. 4. LE PROJET CICHROM, UN PROJET INTER-REGIONAL SUR LA COULEUR DES PRODUITS CIDRICOLES

Une enquête réalisée par l'interprofession (Institut Français des Productions Cidricoles, IFPC) a révélé que le visuel des produits cidricoles, et notamment leur couleur, était une problématique importante pour les transformateurs de pommes à cidre (enquête non publiée). En effet, la couleur est souvent le premier critère organoleptique apprécié par les consommateurs lors de la dégustation. Les produits cidricoles sont susceptibles de couvrir une large gamme de colorations. La sensibilisation des consommateurs à la typicité et la diversité de ces couleurs permettrait une éventuelle segmentation du marché sur ce critère, à l'image de celle qui existe depuis longtemps pour d'autres types de boissons fermentées (par exemple, vins ou bières). Depuis quelques années, on note clairement une volonté d'innovation de la part de la filière sur ces aspects « couleur », en particulier avec l'émergence de cidres rosés ou encore de certains cidres dont le cahier des charges mentionne des clauses spécifiques sur la couleur jaune pâle des produits (notamment les cidres Label Rouge « *Guillevic* »). Cependant, ce critère n'est pas parfaitement maîtrisé au cours des assemblages et les professionnels ne disposent pas de beaucoup de leviers pour orienter la couleur de leurs produits. En effet, l'utilisation de certains additifs permet certes d'augmenter ou de renforcer la coloration, mais cette option est actuellement peu souhaitable. Le cas contraire d'une recherche de coloration limitée reste problématique et les stratégies utilisées actuellement (ajout de sulfites, collages protéiques) peuvent avoir un impact considérable sur les autres propriétés sensorielles des produits.

C'est dans ce contexte que le projet interrégional CICHROM (Bretagne, Pays de la Loire) a vu le jour. L'objectif de ce projet est, à terme, de pouvoir proposer aux transformateurs des itinéraires techniques et des outils pour orienter et caractériser la couleur de leurs produits, ainsi que pour prédire la couleur obtenue suite à un assemblage et anticiper sa stabilité. Le projet CICHROM se décline en plusieurs tâches qui trouvent un équilibre entre développements technologiques, recherche plus fondamentale des mécanismes biochimiques et physico-chimiques de la couleur, analyses

sensorielles et sciences du consommateur pour l'évaluation des préférences et attentes des consommateurs vis-à-vis du critère couleur. Cela passe par une meilleure définition de « l'espace couleur » des cidres français, la mise en place d'outils pratiques permettant d'identifier, de codifier la couleur des produits cidricoles ou de diagnostiquer de façon anticipée le potentiel couleur d'un moût. Il s'agit aussi de développer des travaux de recherche en amont pour mieux connaître les mécanismes moléculaires gouvernant la formation, l'expression et la stabilité des composés colorés présents dans les jus de pomme. Le projet prévoit aussi une validation des résultats les plus pertinents par la mise en place d'essais à l'échelle pilote et si possible à l'échelle industrielle si certains partenaires s'avèrent motivés.

La couleur des jus de pomme et des cidres peut se transcrire en une question de recherche qui prend naissance dans l'oxydation des polyphénols par catalyse enzymatique au cours de la transformation des fruits. La question est complexe car de multiples facteurs y contribuent plus ou moins fortement. Parmi ceux-ci, on peut citer : la diversité des molécules phénoliques qui s'exprime dans la pluralité des variétés de pommes à cidre et qui peut orienter la synthèse des certains chromophores, l'activité oxydase et la disponibilité de l'oxygène qui peuvent s'avérer variables au cours des différentes étapes du procédé, le pH du moût ou du cidre par son impact sur l'expression de la couleur, ou bien le caractère plus ou moins réducteur du milieu avec des répercussions encore largement méconnues mais néanmoins avérées sur la couleur des produits finis.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le contexte du projet CICHROM. Il se positionne davantage sur les aspects de recherches les plus fondamentaux, à savoir :

- (i) **la caractérisation globale d'une fraction phénolique colorée dérivée d'un jus de pomme et l'élucidation de certaines structures impliquées dans la coloration.** Enrichir la connaissance sur ces éléments structuraux devrait permettre de poser des hypothèses quant aux mécanismes moléculaires participant à leur formation ;
- (ii) **l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur l'expression de la couleur jaune-orangée.** Il s'agira notamment d'évaluer l'impact de l'étape fermentaire sur la coloration globale d'un jus de pomme puis de fournir des éléments de compréhension en se focalisant sur l'étude en solution modèle de l'effet du pH et du potentiel rédox sur des molécules colorées sélectionnées comme « chromophores » modèles des produits cidricoles.

## II. INTRODUCTION GENERALE

### II. 1. COULEUR DES PRODUITS ALIMENTAIRES

#### II. 1. 1. LA COULEUR DES ALIMENTS : UN CRITERE IMPORTANT POUR LES CONSOMMATEURS ?

Un aliment se déguste d'abord par les yeux et les professionnels de la gastronomie ou de l'agroalimentaire l'ont bien compris ! Les grands chefs soignent le dressage de leurs plats pour susciter l'envie de déguster, l'industrie agroalimentaire tente sans cesse d'innover en développant de nouveaux procédés technologiques et de nouvelles formulations afin de rendre leurs produits plus attractifs. Néanmoins, la réussite commerciale d'un nouveau produit dépend du marché, et notamment du désir des consommateurs de le tester puis de l'accepter. L'étude de la perception de la nourriture, en termes de qualité et d'acceptabilité, s'avère complexe et s'appuie sur plusieurs champs disciplinaires, à savoir les sciences et technologies des aliments, la nutrition, la psychologie, la physiologie, le marketing. Les interactions entre les caractéristiques sensorielles des aliments et leur perception par l'homme font l'objet d'études de psychophysique. Dans leurs formes appliquées, ces travaux se basent principalement sur des analyses sensorielles. Naturellement, la perception des goûts, des odeurs, de la texture d'un aliment a été largement étudiée (Clydesdale, 1991, 1993) mais plusieurs auteurs se sont aussi intéressés à l'importance du visuel dans le choix d'un aliment. En effet, l'apparence d'un produit alimentaire dans un environnement donné génère la première impression marquant le consommateur. Cette apparence peut se décomposer en différents attributs tels que la forme, la taille, la couleur, l'opacité, la transparence ou encore la brillance du produit. En tant que primate, l'homme perçoit le plus souvent des stimuli visuels comme premiers signaux sensoriels liés à la nourriture (Lieberman, 2006). Ces stimuli peuvent même initier la phase de digestion en augmentant la motilité gastrique et la sécrétion de salive et d'acide gastrique, d'hormones gastro-intestinales et d'enzymes pancréatiques. Parmi les signaux visuels perçus, la couleur de l'aliment joue un rôle non négligeable. Au cours de l'évolution, la sélection naturelle a favorisé la vision en couleur. Outre l'avantage sélectif que cela a pu conférer aux individus chasseurs qui pouvaient ainsi mieux distinguer leurs proies, la couleur servirait d'indicateur de qualité et de palatabilité (HUTCHINGS, 1977). Elle fournirait des indices sur les conséquences potentielles de l'ingestion d'un aliment considéré, sur le plan organoleptique mais aussi en termes de « sécurité alimentaire », ce qui aurait pu jouer un rôle non négligeable pour la survie de l'espèce (Lieberman, 2006). Le changement de couleur d'un fruit, comme le rougissement de la tomate par exemple, peut renseigner sur sa maturité... et donner des informations sur d'autres caractéristiques organoleptiques telles qu'une saveur plus sucrée ou une texture plus souple. Lee et al., 2013 se sont intéressés aux préférences des consommateurs en termes de couleurs susceptibles de les mettre en appétit. L'étude s'est focalisée sur plusieurs aliments couvrant la gamme de colorations classiquement rencontrées dans l'alimentation (rouge, jaune, vert,

rose, blanc). Les consommateurs ont clairement tendance à préférer des couleurs assez saturées, parfois même plus vives que celles des aliments réellement considérés, mais toujours à l'opposé des couleurs finissant par apparaître au cours des processus de décomposition des aliments. Les auteurs suggèrent que les préférences de couleur pourraient être liées à la tendance des êtres humains à sélectionner la nourriture la plus fraîche possible, la plus saine, sans trace de contamination, ce qui peut être mis en lien avec une certaine préservation des micronutriments (par exemple, l'association de la couleur jaune-orange avec le carotène ou provitamine A). De la même façon, les changements de couleur peuvent être utilisés pour s'assurer de la bonne cuisson d'un aliment tel que la viande et comme un indicateur de présence ou d'absence de microorganismes potentiellement pathogènes.

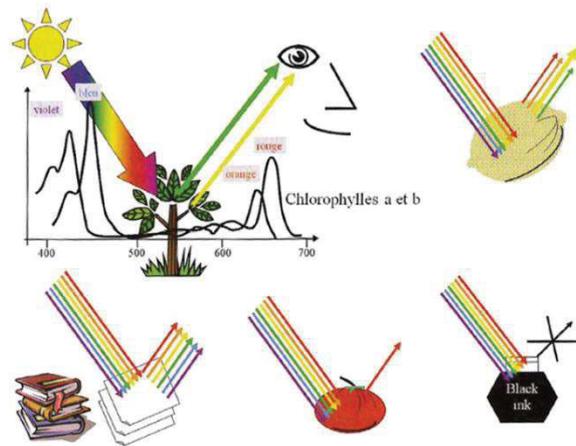
En résumé, les signaux visuels reçus sont utilisés par le consommateur pour un premier screening « à distance », avant tout examen rapproché de l'aliment pour accéder à d'autres informations sensorielles telles que l'odeur et la texture. L'appréciation de l'apparence intervient, en particulier, avant tout acte d'achat et/ou de dégustation. Il s'agit du premier paramètre dont l'acheteur potentiel dispose pour évaluer le produit. Le consommateur a tendance à associer à un produit alimentaire une couleur appropriée, attendue, située dans une gamme d'acceptabilité (HUTCHINGS, 1977). Cette gamme est susceptible de varier selon différents facteurs liés au consommateur lui-même (son âge, ses origines ethniques et culturelles, ses expériences) (Shankar et al., 2010) et liés aux conditions environnementales dans lesquelles se trouve l'aliment au moment de la perception et du jugement (conditions d'illumination, mode de présentation du produit et contraste ou non avec les couleurs des éléments proches, ...). Dans nos esprits, une apparence attractive est souvent associée à une saveur agréable. L'apparence agit dès lors comme un facteur d'anticipation susceptible de modifier les perceptions sensorielles subséquentes (Spence et al., 2010). C'est ce que l'on nomme l'effet halo (Imram, 1999). Avant la dégustation, le consommateur fait une expérience sensorielle visuelle. Celle-ci entre en interaction avec les expériences sensorielles d'autres natures qui surviennent après la consommation de l'aliment puis une réponse hédonique est associée à l'ensemble de ces expériences. Ce « vécu » est à l'origine d'un feedback déclenchant des processus d'apprentissage et de mémorisation.

## II. 1. 2. LA VISION EN COULEUR (D'APRES J. LE ROHELLEC, 2011)

Les rappels proposés ici sont présentés de manière plus approfondie dans les chapitres d'ouvrages rédigés par J. Le Rohellec (Le Rohellec, 2011), H. Zollinger (Zollinger, 2003) et Christie (Christie, 2001).

Chez l'humain, la vue est un sens majeur, une grande partie du cortex cérébral est d'ailleurs dédiée à la réponse aux stimuli visuels. La vision sert de filtre pour appréhender le monde physique qui nous entoure. Le système biologique dont l'homme est doté est tellement performant qu'il attribue des caractéristiques aux objets comme si elles les décrivaient intrinsèquement, c'est souvent le cas pour la

couleur des objets. Par exemple, une orange semble être orange « par elle-même ». Pourtant, la couleur n'a pas d'existence propre. En effet, une perception colorée implique nécessairement trois éléments pour pouvoir être générée : i) une source lumineuse, ii) de la matière interagissant avec les radiations émises par la source lumineuse, et iii) un détecteur susceptible de capter les signaux lumineux résultant de l'interaction lumière-matière. (Figure 2)



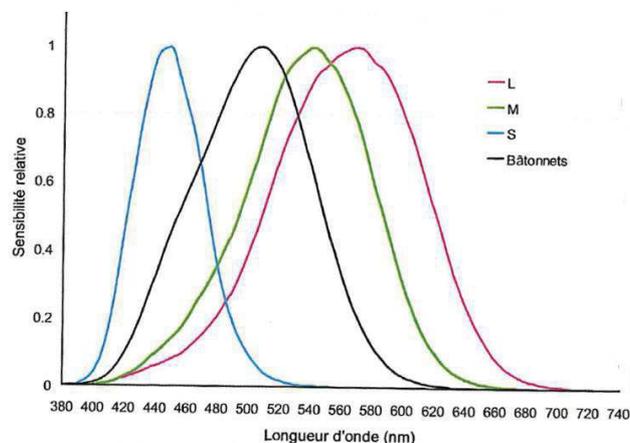
**Figure 2 - Couleur des objets : absorption de la lumière incidente et composante(s) de la lumière réémise (reproduit de (Cayot, 2011))**

La source lumineuse, qui peut être naturelle ou artificielle, émet des photons. Ces particules élémentaires se comportent à la fois comme des ondes et comme des particules, elles constituent les radiations électromagnétiques. Ces radiations peuvent varier, tant en termes d'intensité lumineuse que de composition spectrale. Le rayonnement perceptible par l'homme couvre la gamme de longueurs d'onde de 380 à 780-800 nm : c'est le domaine du visible. Les photons émis se déplacent en ligne droite jusqu'à ce qu'ils rencontrent de la matière, l'interaction avec cette matière génère alors un changement de comportement. Ils peuvent être absorbés, transmis ou réfléchis selon les propriétés de l'objet illuminé. Le facteur de luminance spectrale décrit les proportions de lumière absorbée et réfléchie le caractérisant. Pour qu'il y ait une « couleur » résultante, cette lumière doit atteindre un détecteur. Chez l'humain, l'œil constitue le capteur visuel naturel. Les stimuli lumineux traversent la cornée et le cristallin permettant, grâce à leur rôle de lentilles, la projection d'une image sur la rétine. Les photons sont captés au niveau de cellules photosensibles qui se trouvent alors excitées. Cela génère une succession d'événements physiologiques et neurologiques permettant au final une perception colorée résultant de l'interprétation du cerveau. Plus précisément, la rétine humaine comprend deux classes de photorécepteurs se distinguant par leur morphologie, leur nombre, leur répartition et leur photosensibilité (sensibilité à l'intensité lumineuse et à la composition spectrale) : il s'agit de cellules en bâtonnets et en cônes.

Les bâtonnets sont nettement plus nombreux que les cônes, on estime qu'il y en aurait environ 120 millions par rétine, localisés principalement en périphérie. Ils ne permettent qu'une perception

monochromatique, une distinction du niveau de clarté-obscurité (vision scotopique) et ne sont donc pas impliqués dans la vision en couleur. Leur réponse est liée à la présence d'un pigment photosensible particulier appelé rhodopsine. Ils ne peuvent générer un signal modulé qu'à de faibles intensités lumineuses ( $10^{-6}$  à  $20\text{-}30\text{ cd/m}^2$ ) car la rhodopsine, constamment renouvelée au niveau de l'œil, est détruite en cas d'exposition à des intensités trop fortes. Ces photorécepteurs présentent un maximum de sensibilité autour de 505 nm.

Les cônes sont, quant à eux, moins nombreux que les bâtonnets ; il y en aurait environ 6 millions par rétine. On les trouve localisés en forte densité dans l'axe visuel (au niveau de la fovéa) où ils sont de petite taille, en périphérie leur taille augmente mais leur densité décroît. Ils délivrent des réponses lors de stimulations par des intensités lumineuses fortes (de  $10^{-2}$  à  $10^6\text{ cd.m}^{-2}$ ) et permettent à la fois la perception de nuances sur l'échelle clarté-obscurité et la vision en couleur (vision photopique). Leur sensibilité est liée à la présence d'un autre photopigment, l'iodopsine. Il existe chez l'humain trois types de cônes dont les sensibilités spectrales diffèrent, on parle de trivariance visuelle. En effet, ils sont préférentiellement sensibles à certaines gammes de longueurs d'onde : les cônes L (*Long wavelength*) sont sensibles à la lumière rouge, les cônes M (*Middle wavelength*) à la lumière verte, et les cônes S (*Short wavelength*) à la lumière bleue. Leurs maxima de réponse sont respectivement de 565-585 nm, 535-545 nm et 440 nm. Cet « équipement biologique » permettrait à un observateur, en conditions idéales, de distinguer environ 2,3 millions de couleurs (Kuehni, 2015) (Figure 3).



**Figure 3 - Sensibilité des différents photorécepteurs de la rétine humaine (reproduit de J. Le Rohellec, 2011)**

Au final, l'excitation par des stimuli lumineux déclenche des modifications biochimiques dans le métabolisme des photorécepteurs. Ceux-ci délivrent un signal qui est capté, modulé et transmis vers le cerveau via différentes classes de neurones du réseau rétinien. Le système visuel est sensible aux contrastes, aux modulations, aux variations de l'environnement lumineux perçues. L'information finale ne peut être extraite que par la comparaison de signaux issus de photorécepteurs n'ayant pas la même sensibilité spectrale. Un photorécepteur seul est « aveugle à la couleur ». Par conséquent, la perception colorée résulte bien de l'intégration par le cerveau de la réponse des trois types de cônes à

une excitation par la lumière. Ainsi, la vision en couleur est la résultante de processus physiques, chimiques, biochimiques, physiologiques et neurologiques complexes.

## II. 1. 3. COMMENT CARACTERISER LA COULEUR D'UN ALIMENT ?

### II. 1. 3. 1. Caractériser une couleur : les modèles de représentation.

L'apparence et la couleur des aliments jouant un rôle crucial dans leur sélection et leur appréciation par le consommateur, les élaborateurs d'aliments aux échelles artisanale ou industrielle doivent être capables de fournir des produits dont la couleur sera conforme aux attentes des clients. Cela implique nécessairement de pouvoir caractériser, évaluer qualitativement et quantitativement des couleurs ou des différences de couleur, de manière standardisée. On distingue actuellement deux façons principales de caractériser une couleur : une description purement physique reflétant la présence de pigments ou une description au sein d'un modèle de représentation appelé espace ou système de couleurs.

La couleur peut être décrite sur un plan purement physique par évaluation d'un spectre de transmission (ou d'absorption) ou d'un spectre de réflexion. Les spectres d'absorption, en particulier, sont souvent utilisés pour faire le lien avec les structures chimiques des molécules qui contribuent à la couleur (par exemple en analyse, par corrélation entre la composition et le spectre UV/visible), en se servant des coefficients d'extinction molaire au maximum d'absorption (pour quantifier le pouvoir colorant du composé ou sa concentration). Cependant, cette caractérisation de la couleur ne tient pas compte de la perception par l'observateur, par l'œil humain ((Zollinger, 2003)).

C'est la raison pour laquelle, des modèles de représentations mathématiques ont été établis en s'appuyant sur les stimuli générés par l'œil en réponse à l'ensemble du spectre de la lumière visible. Ces modèles conduisent à des espaces de couleur ou espaces colorimétriques pour représentant les couleurs. Ils prennent en considération le mécanisme de la perception colorée par l'œil humain. Par principe, comme chaque couleur peut être décrite par la somme d'une certaine « quantité » de rouge, de bleu, et de vert, ces espaces de couleur doivent être définis en trois dimensions et la position d'un échantillon de couleur est donnée par rapport à trois coordonnées. A partir de 1931, les travaux de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE)<sup>1</sup> ont eu pour but de rassembler les travaux dans ce domaine et d'établir des modèles qui puissent servir de référence.

Il convient de trouver le modèle de représentation le plus approprié pour répondre aux questions que l'on se pose. Dans le contexte des denrées alimentaires ayant subi ou non un procédé de transformation, les espaces couleurs standardisés de la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) sont les plus couramment utilisés, en particulier le système CIE  $L^*a^*b^*$ .

---

<sup>1</sup> La Commission Internationale de l'Eclairage est une organisation technique, scientifique et culturelle, indépendante et à but non lucratif, créée en 1913. Elle vise à favoriser la coopération internationale dans tous les domaines relevant de la science, de la technologie et de l'art de la lumière et de l'éclairage. Il est précisé dans les statuts de la CIE que les termes lumière et éclairage s'entendent dans un sens large, englobant des sujets fondamentaux tels que la vision, la photométrie et la colorimétrie, comprenant le rayonnement naturel et artificiel dans les régions UV, visible et IR du spectre, et de sujets d'application couvrant toute les utilisations de la lumière à l'intérieur ( environnements intérieurs et « lighting design ») et à l'extérieur (éclairages urbains, éclairages pour la signalisation routière, ...) ainsi que la technologie de l'image.

**Modélisation des sources lumineuses, les illuminants** : Comme évoqué précédemment, la couleur ne peut exister sans l'interaction entre une source lumineuse, un objet illuminé et un observateur. Dans les modèles de représentation des couleurs, la source lumineuse est décrite mathématiquement par des illuminants. Entre 1931 et 1986, la CIE a développé 6 séries d'illuminants standards dont les distributions de puissance spectrale varient : l'illuminant A définit la lumière d'une lampe à filament de tungstène, l'illuminant B décrit la lumière solaire directe, l'illuminant C représente une lumière du jour moyenne (il n'est plus considéré aujourd'hui comme un standard par la CIE), la série d'illuminants D (D = Daylight) définit les différentes phases de la lumière du jour de façon plus précise et plus complète que les illuminants B et C, en faisant référence à leur température de couleur corrélée (4000-25000K) indiquée par les deux digits qui suivent la lettre D. Enfin, l'illuminant E présente une distribution de puissance spectrale relative constante et la série d'illuminants F permet de décrire des lumières fluorescentes (Figure 4).

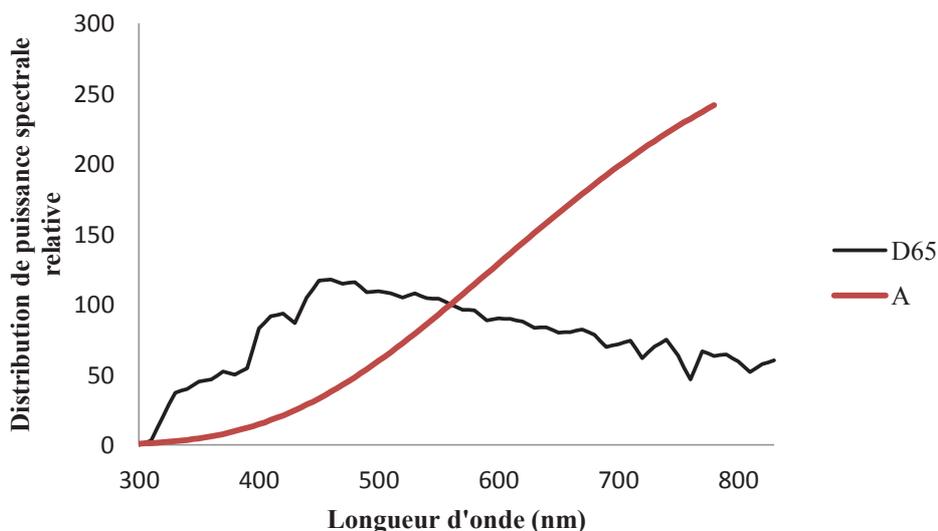


Figure 4 – Exemples de distribution de puissance spectrale relative pour les illuminants A et D65 développés par la CIE

**L'absorption lumineuse de l'objet observé et le spectre perçu par l'œil** : L'absorption d'une partie des radiations par l'objet observé est le phénomène responsable de la couleur. Elle est quantifiée par le spectre de réflectance dans le cas d'un objet opaque et par le spectre de transmittance dans le cas d'un liquide transparent. Les spectres de réflectance ou de transmittance donnent, pour chaque longueur d'onde, le rapport entre la lumière ré-émise ou transmise et la lumière incidente. Lorsqu'il s'agit de liquides transparents, la mesure de la densité optique (DO) à l'aide d'un spectrophotomètre permet d'accéder à la transmittance ( $T=I/I_0$ ) par le calcul  $T = 10^{-DO}$ . Le spectre de la lumière que perçoit l'œil

par transparence au travers d'un liquide coloré est calculé par le produit de ce spectre de transmittance du liquide du spectre de la lumière incidente (spectre de l'illuminant) à chaque longueur d'onde :

$$I(\lambda) \cdot T(\lambda)$$

**Modélisation de la perception par l'œil humain par la CIE , les espaces couleur** : La Commission internationale de l'éclairage (CIE) a tout d'abord défini en 1931 l'espace de couleur CIE RGB basé sur les expériences menées par John Guild et William David Wright sur la vision humaine entre 1926 et 1929 ([https://fr.wikipedia.org/wiki/CIE\\_RGB](https://fr.wikipedia.org/wiki/CIE_RGB), page consultée le 10/05/2016). Ce système RGB (Rouge Vert Bleu) prend en compte les trois couleurs primaires proches des maxima de réponse des trois types de cônes de la rétine humaine. Ces travaux ont été suivis la même année par la proposition de l'espace XYZ qui permet de s'affranchir de certaines contraintes de l'espace précédent. Ces travaux ont permis d'établir, à partir de mesures de la perception des couleurs par les panels de volontaires étudiés, une perception moyenne définie comme la perception d'un « observateur standard » sous la forme de trois courbes de réponse (ou fonctions colorimétriques  $x(\lambda)$ ,  $y(\lambda)$  et  $z(\lambda)$ ) d'un « œil standard » en fonction de la longueur d'onde.

Selon la taille de l'objet et sa distance à l'œil (c'est-à-dire l'angle d'observation), les spectres de réponse sont légèrement différents car la lumière atteint une zone plus ou moins étendue de la rétine. Les premières fonctions colorimétriques ont été définies pour un angle de  $2^\circ$  en 1929<sup>2</sup>. Puis, en 1964, la CIE a déterminé ces fonctions pour un angle de  $10^\circ$  c'est-à-dire pour l'observation d'un objet plus grand. Ces spectres de réponse normalisés sont multipliés par le spectre reçu par l'œil pour établir les 3 courbes de réponse de l'œil à la stimulation. En considérant un spectre d'illuminant  $I(\lambda)$  et un spectre de transmittance  $T(\lambda)$ , la couleur est alors exprimée en trois dimensions (X, Y et Z), les composantes trichromatiques, en intégrant les trois courbes de réponse.

$$X = k \int_{380}^{720} I(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot x(\lambda) \cdot d\lambda \quad Y = k \int_{380}^{720} I(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot y(\lambda) \cdot d\lambda \quad Z = k \int_{380}^{720} I(\lambda) \cdot T(\lambda) \cdot z(\lambda) \cdot d\lambda$$

Où k est fonction de la perception y pour l'illuminant

<sup>2</sup> ↑ a et b (en) John Guild, « The Colorimetric Properties of the Spectrum », *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 230, no 681-693, 1er janvier 1932, p. 149–187 (ISSN 0264-3952, DOI 10.1098/rsta.1932.0005, lire en ligne [archive])  
 ↑ a et b (en) William David Wright, « A Re-Determination of the Trichromatic Coefficients of the Spectral Colours », *Transactions of the Optical Society*, vol. 30, no 4, 1929, p. 141–164 (ISSN 0264-3952, DOI 10.1088/1475-4878/30/4/301, lire en ligne [archive])

$$k = \frac{100}{\int_{380}^{720} I(\lambda) \cdot y(\lambda) \cdot d\lambda}$$

Les coordonnées de chromaticité sont calculées à partir des composantes trichromatiques en normalisant par rapport à leur somme.

$$x = \frac{X}{X+Y+Z}$$

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

$$z = \frac{Z}{X+Y+Z}$$

Les coordonnées de chromaticité peuvent être utilisées pour représenter les couleurs sur le plan x,y (Figure 5). Pour la troisième dimension, perpendiculaire à ce plan, on garde en général la composante Y.

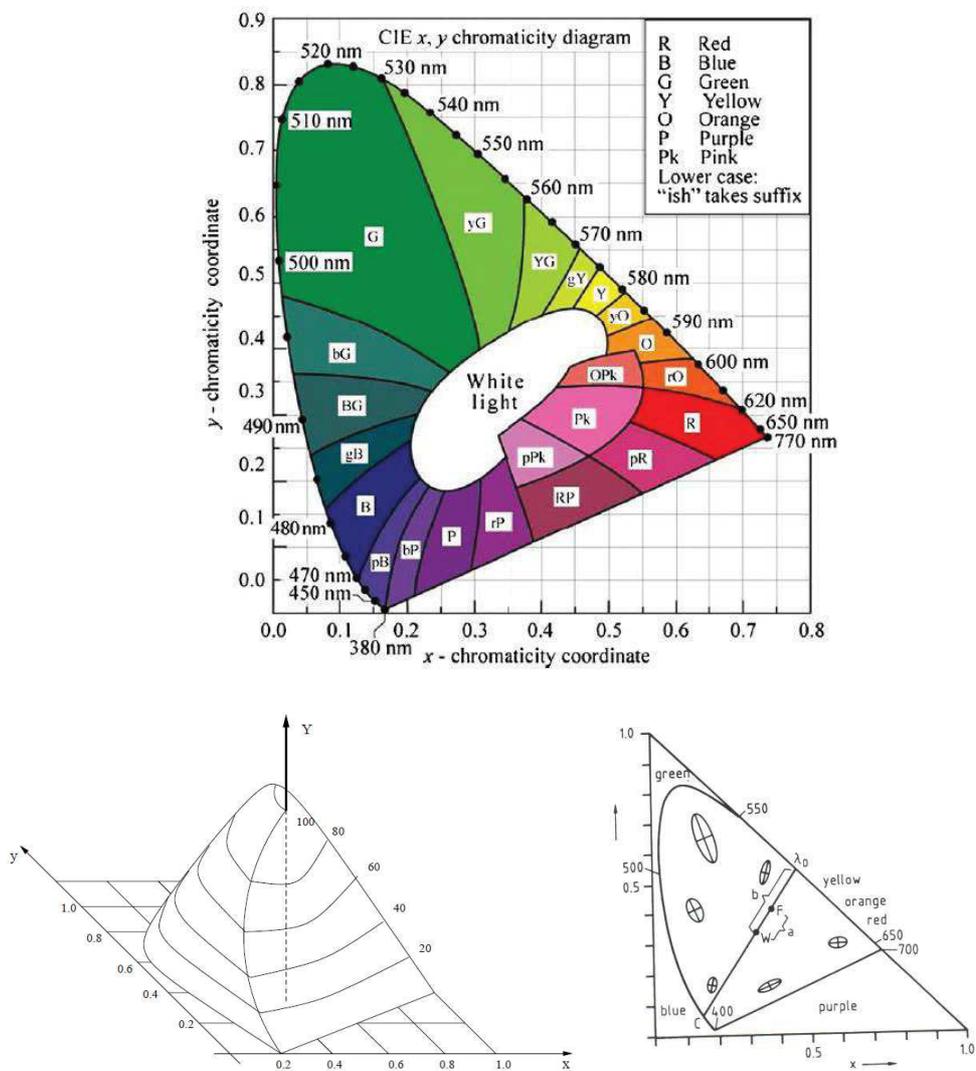


Figure 5 – Diagramme de chromaticité x, y de la CIE, CIE Yxy (extrait de (Zollinger, 2003))

Avec la volonté prendre en compte la sensation perceptuelle et de s'approcher des couleurs perçues par l'humain, la CIE a développé en 1976 un nouvel espace de couleur, CIE L\*a\*b\* à partir de l'espace CIE XYZ. Cet espace est considéré plus « uniforme » que l'espace CIE XYZ dont il est issu : des distances identiques entre deux points dans l'espace L\*a\*b\* sont supposées représenter des différences de perception identiques de l'œil ce qui n'est pas le cas du système XYZ.

Les coordonnées L\*a\*b\* sont des transformations non linéaires mais réversibles des composantes trichromatiques.

$$L^* = 116 \cdot f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - 16 \quad a^* = 500 \cdot \left[ f\left(\frac{X}{X_n}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \right] \quad b^* = 200 \cdot \left[ f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) \right]$$

Avec X<sub>n</sub>, Y<sub>n</sub> et Z<sub>n</sub> les valeurs des composantes pour l'illuminant (100% de transmission)

Les valeurs de  $f\left(\frac{Y}{Y_n}\right)$ ,  $f\left(\frac{Y}{Y_n}\right)$  et  $f\left(\frac{Y}{Y_n}\right)$  représentées par f(t) étant définies par la condition

suivante :

$$\text{Si } t > \left(\frac{6}{29}\right)^3 \text{ alors } f(t) = (t)^{1/3} \text{ sinon } f(t) = \frac{1}{3} \cdot \left(\frac{29}{6}\right)^2 \cdot t + \frac{4}{29}$$

Il s'agit du système le plus utilisé aujourd'hui pour caractériser la couleur des aliments, c'est donc celui qui sera utilisé dans le cadre de notre étude. Il est représenté en Figure 6. Il se compose de deux paramètres de chromaticité, représentés par les axes a\* et b\* situés dans un même plan appelé cercle chromatique. Le paramètre a\* prend des valeurs positives pour les couleurs tirant sur le rouge, et des valeurs négatives pour les couleurs tirant sur le vert. Le paramètre b\* prend des valeurs positives pour les couleurs tirant sur le jaune, et des valeurs négatives pour les couleurs tirant sur le bleu. A cela s'ajoute le paramètre de luminance, représenté par l'axe L\* perpendiculaire au cercle chromatique, qui correspond globalement à la luminosité d'un produit, positionnable théoriquement sur une échelle de gris. L\* peut prendre des valeurs allant de 0 à 100 %, ces extrêmes représentant respectivement les deux couleurs achromatiques noir (-100) et blanc (+100). Le modèle CIE L\*a\*b\* est décrit par un système de coordonnées orthogonales mais il peut également être décrit par un système de coordonnées angulaires, on parle alors de l'espace CIE L\*C\*h. Cette approche permet une compréhension plus intuitive du système CIE L\*a\*b\* car h° et C\* se rattachent davantage aux attributs compréhensibles par l'observateur en vocabulaire classique de la couleur : h° est un angle en degré (dans le sens trigonométrique depuis la valeur 0 ou 360 représentant la couleur rouge) qui décrit la teinte, les angles de 90°, 180° et 270° décrivant respectivement des teintes jaune, verte et bleue. Ainsi contrairement à l'expression d'une couleur en a\* et b\* un seul chiffre exprime la teinte en coordonnées angulaires. Le paramètre C\*, pour Chroma, déterminé par la distance entre la couleur et le centre du cercle chromatique, est un descripteur plus « quantitatif » de la couleur qui correspond à la

saturation de la couleur. Il représente l'intensité colorante ou l'inverse de la « pâleur » pour une teinte donnée c'est-à-dire une distance par rapport à un gris de même luminance. Les coordonnées angulaires sont reliées aux coordonnées  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  par les formules suivantes :

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \cdot h^\circ = \frac{\arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)}{\pi} \cdot 180 h^*$$

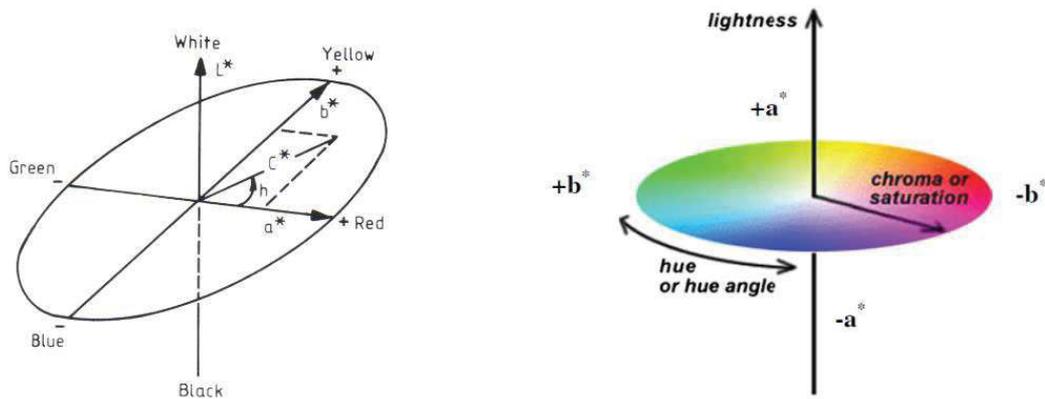


Figure 6 -Les référentiels CIE  $L^*a^*b^*$  et CIE  $L^*C^*h$  (extrait de (Zollinger, 2003))

Il existe également des indices qui servent d'outils dérivés de caractérisation et qui sont calculés dans le système  $L^*a^*b^*$ : ainsi le delta E ( $\Delta E$ ) est l'écart entre deux couleurs dans l'espace. Certains indices sont parfois développés selon les besoins des auteurs pour un type d'aliment afin de déterminer, par exemple, un écart de couleur, un indice de blanchissement, de jaunissement, un brunissement, ou une modélisation cinétique de la dégradation de la couleur.

### II. 1. 3. 2. Mesurer la couleur

Le développement de systèmes de représentation de la couleur, présentés au paragraphe II. 1. 3. 1., a permis de disposer d'outils pour caractériser, définir une couleur particulière. L'évaluation de la qualité des produits alimentaires s'appuie sur des mesures nécessaires pour positionner les objets considérés au sein des espaces de couleur. Il existe globalement deux types de méthodes de mesure : les méthodes subjectives et objectives.

Les méthodes de mesure dites **subjectives** désignent des méthodes d'analyse sensorielle. L'évaluation de la couleur du produit se fait au moyen des sens, par inspection visuelle. Il s'agit souvent de mesures qualitatives réalisées dans des conditions d'illumination et d'observations définies précisément et contrôlées. Elles ne nécessitent pas l'acquisition d'appareils de mesure mais elles imposent de disposer d'un panel entraîné dont les membres ne présentent aucun problème de vision en couleur. L'œil humain est assez performant pour discriminer les couleurs même lorsqu'il est confronté à des changements de sources lumineuses. Néanmoins, le cerveau ne mémorise pas aisément les

différentes nuances. Les observateurs utilisent généralement des échantillons de couleurs standards (disponibles par exemple dans des atlas ou dictionnaires de couleurs) qu'ils comparent avec la couleur des échantillons à caractériser (« *color matching experiments* »). De nombreuses études comportent ainsi une numérotation de chaque nuance sur une échelle de couleur qui permet de comparer des échantillons. Dans leur revue, (Pathare et al., 2013) indiquent que, selon les aliments et études considérées, des descriptions différentes sont parfois associées à un score différent, avec parfois des confusions avec une évaluation hédonique (appréciée ou non par des consommateurs). Au final, ce type de « mesures » aboutit à une description de couleur associée à une notation ou à un vocabulaire particulier. Assez robustes mais plus fastidieuses, ces mesures sont donc difficilement utilisables à grande échelle pour mesurer la couleur de produits alimentaires en routine.

Par opposition à ces méthodes subjectives, les mesures, dites **objectives**, mettant en œuvre des méthodes instrumentales, permettent d'atteindre des résultats reproductibles tout en fournissant une mesure quantitative simulant la manière dont l'œil humain perçoit la couleur d'un objet.

- Les colorimètres : Les colorimètres tristimulaires déterminent les paramètres de couleur optiquement et fournissent directement des données numériques et des différences de couleur entre échantillons de référence et échantillons à analyser. Ils sont utilisés couramment en contrôle qualité pour mesurer la couleur des produits alimentaires, car ils sont faciles et rapides à utiliser.
- Les spectrophotomètres : Les spectrophotomètres permettent d'analyser finement les spectres de transmittance ou de réflectance dans la gamme de longueurs d'onde UV-visible (190 à 800 nm). Il est alors possible de « recalculer la couleur » comme décrit plus haut. Les données sont précises et fiables mais les appareils sont moins adaptés aux mesures en routine.
- Les systèmes de vision assistée par ordinateur (caméra) : Cette technique relève du domaine de l'analyse d'image et connaît un fort développement en sciences des aliments, par exemple pour automatiser l'évaluation de certains critères de qualité des produits alimentaires (pour revue, (Zhang et al., 2014).

## II. 2. DES METABOLITES VEGETAUX SOURCES OU PRECURSEURS DE COULEUR : LES POLYPHENOLS

### II. 2. 1. LES POLYPHENOLS : DEFINITION ET NOMENCLATURE GENERALE

#### II. 2. 1. 1. Généralités

La nomenclature associée aux termes « polyphénols », « composés phénoliques », « tannins », n'est pas toujours clairement établie et est encore sujette à certaines controverses dans la communauté scientifique.

La fonction chimique ou noyau « phénol » correspond à un noyau aromatique substitué par une fonction « hydroxyle ». Lorsqu'il y a plusieurs fonctions hydroxyles sur un même noyau aromatique, on parle de di-, triphénol. Le terme « polyphénol » au sens strict devrait donc correspondre à une molécule qui contient au moins deux fonctions phénols ; c'est-à-dire au moins deux noyaux aromatiques substitués par une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Cependant, bien souvent, le terme polyphénols est aussi utilisé pour qualifier toute molécule simplement phénolique (qui par exemple ne contient qu'un seul noyau phénol- Figure 7) issue d'une voie générale de biosynthèse commune. Pour ces dernières, il convient de les dénommer « composés phénoliques » et non pas « polyphénols ». Pour plus de détails, il existe une note sur ces questions de nomenclature écrite par le Prof. Stéphane Quideau et disponible à l'adresse suivante, <http://www.groupepolyphenols.com/the-society/why-bother-with-polyphenols/>, sur le site internet du « Groupe Polyphénols » [consulté le 29/05/2017].

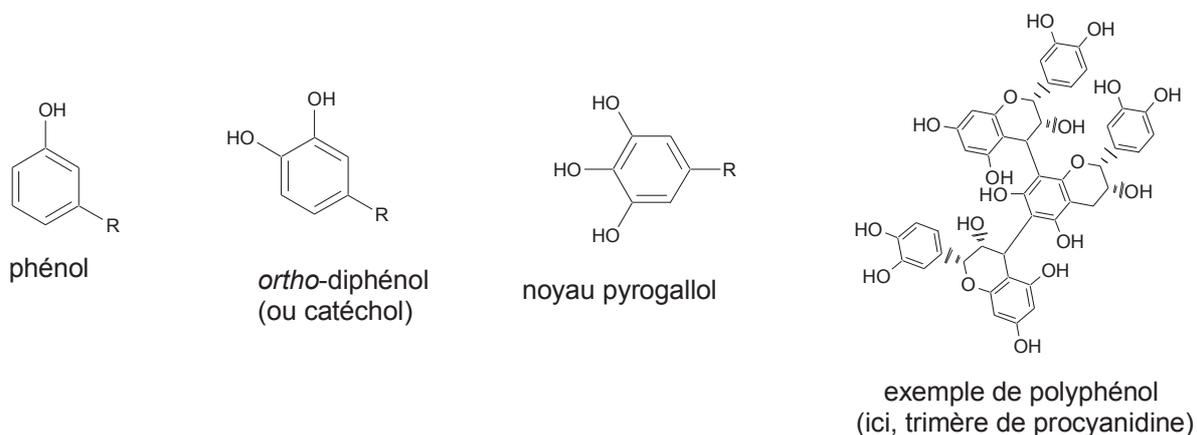


Figure 7 – Structure du noyau phénolique et exemples de motifs phénoliques

Il ne nous paraît pas opportun de faire ici une revue exhaustive des composés phénoliques rencontrés dans le règne végétal. En revanche, les six principales familles de composés phénoliques de la pomme seront présentées de manière synthétique. Quatre d'entre-elles sont prépondérantes par leur concentration et/ou leur large distribution dans les différents tissus du fruit: les acides hydroxycinnamiques, les catéchines, les procyanidines et les dihydrochalcones. Les deux autres classes, représentées par les flavonols et les anthocyanes, sont des molécules nativement colorées,

respectivement jaunes et rouges, qui sauf exception<sup>3</sup>, sont essentiellement présentes dans l'épiderme mais toutefois en concentrations faibles par rapport aux autres catégories. Notons qu'à l'exception des acides hydroxycinnamiques, toutes les autres catégories de polyphénols de la pomme appartiennent à la super classe des flavonoïdes.

## II. 2. 1. 2. Les acides hydroxycinnamiques

Cette sous-classe fait partie de la classe des acides phénoliques qui comprend aussi les acides hydroxybenzoïques. Ceux-ci ne seront pas décrits ici car ils sont inexistantes ou très minoritaires dans la pomme. En revanche, les acides hydroxycinnamiques représentent une classe majeure parmi les composés phénoliques retrouvés dans la pomme. Leur structure de base s'inscrit dans un schéma de type C6-C3, correspondant à un noyau phénolique substitué par une chaîne propénoïque. Dans le fruit frais et intègre, la fonction acide carboxylique n'est pas libre mais substituée par un acide organique qui, dans le cas de la pomme est quasiment toujours l'acide quinique. De ce fait, les acides hydroxycinnamiques de la pomme sont aussi des acides chlorogéniques selon la définition précisée par (Clifford, 1999). Le plus commun des acides hydroxycinnamiques est aussi celui retrouvé majoritairement dans la pomme : il s'agit de l'acide 5-caféoylquinique (Figure 8). Bien souvent et bien que cela ne soit pas rigoureusement correct, cette molécule est mentionnée comme étant « l'acide chlorogénique » dans la littérature. L'autre acide hydroxycinnamique bien représenté dans la pomme est l'acide *p*-coumaroylquinique, le 4-*p*-coumaroylquinique étant souvent la forme dominante (Clifford, 1999). D'autres formes isomères de ces deux principaux acides hydroxycinnamiques, différentes par la position de la liaison ester avec l'acide quinique, sont parfois présentes en plus faible teneur dans la pomme.

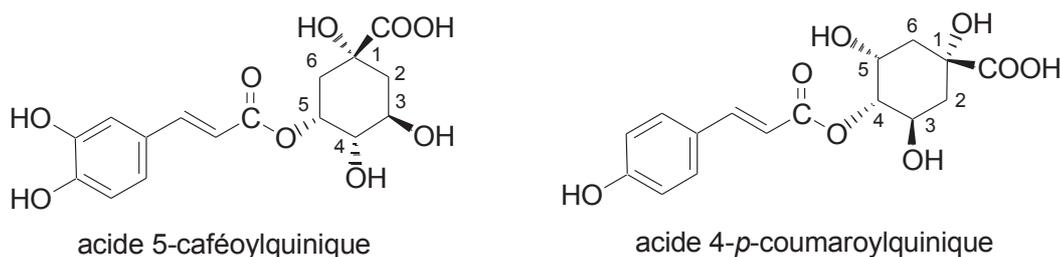


Figure 8– Structures des deux principaux acides hydroxycinnamiques de la pomme : l'acide 5-*O*-caféoylquinique et l'acide 4-*p*-coumaroylquinique

## II. 2. 1. 3. Les flavonoïdes

<sup>3</sup> Les variétés à chair rouge, du fait de la présence d'anthocyanes en concentration non négligeable dans la pulpe, connaissent actuellement un regain d'intérêt pour la fabrication des cidres rosés.

Ils correspondent à une grande famille de polyphénols pour laquelle on compte plusieurs milliers de structures différentes. Ce sont des métabolites secondaires des végétaux auxquels on attribue des rôles multiples dans la protection antioxydante, celle contre les radiations UV, dans la régulation du développement, et souvent dans la résistance aux pathogènes. Leur structure chimique se construit à partir d'un squelette de base à 15 atomes de carbone, en C6-C3-C6, de type 2-phénylchromane. La Figure 9 précise la numérotation conventionnelle des carbones. Plusieurs sous-classes de flavonoïdes se distinguent en particulier selon le niveau d'oxydation du cycle C. Quatre sous-classes sont présentes dans la pomme: les flavan-3-ols, les dihydrochalcones, les flavonols et les anthocyanes.

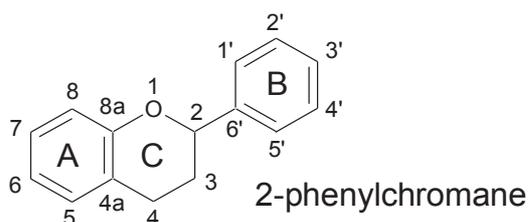


Figure 9 – Noyau 2-phénylchromane à la base de la structure des flavonoïdes

#### II. 2. 1. 4. Les flavan-3-ols

Par rapport aux autres composés phénoliques, c'est souvent une catégorie présente en concentration importante dans les fruits. C'est aussi la seule classe de flavonoïdes présente dans le végétal sous une forme purement phénolique non substituée par des sucres ou des acides organiques. Dans la pomme, deux sous-classes de flavan-3-ols sont identifiées : les monomères que l'on nomme aussi catéchines, et les formes polymérisées nommées « procyanidines » ou encore « tannins condensés », ce dernier terme faisant davantage référence à leurs propriétés tannantes, c'est-à-dire leur aptitude à former des complexes avec les protéines.

#### II. 2. 1. 5. Les flavan-3-ols monomères ou catéchines

Les flavan-3-ols monomères sont désignés communément sous le terme générique de catéchines. Ils se caractérisent par la présence d'un hydroxyle sur l'hétérocycle central en position 3. Dans le cas de la pomme, on trouve seulement deux molécules, basées sur un noyau A de type phloroglucinol, hydroxylé en positions 5 et 7 et un noyau B de type catéchol portant des fonctions hydroxyles en positions 3' et 4', tandis que l'hétérocycle C permet de distinguer deux épimères: la (+)-catéchine (2R,3S) et la (-)-épicatéchine (2R,3R). (Figure 10)

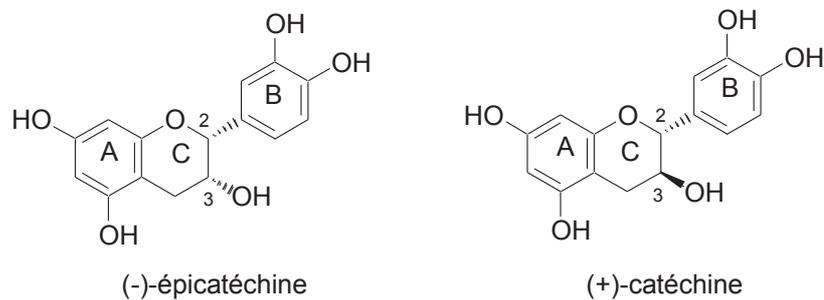


Figure 10 – Structure de la (-)-épicatéchine et de la (+)-catéchine

On peut noter que dans le raisin ou les feuilles de thé, on en retrouve aussi sous forme galloylée ou trihydroxylée, ce qui n'est pas le cas dans la pomme. Les gallocatéchines se caractérisent par un groupe hydroxyle supplémentaire sur le cycle B en position 5'.

Dans la pomme, on constate que les monomères de flavanols sont toujours moins abondants que les formes polymérisées et que très souvent, la (-)-épicatéchine est largement plus concentrée que la (+)-catéchine, avec des teneurs respectives pouvant atteindre 1400 mg.kg<sup>-1</sup> MF et environ 150 mg.kg<sup>-1</sup> MF (Sanoner et al., 1999). Le rapport entre les deux épimères peut varier considérablement selon les variétés. On souligne que certaines variétés de pommes à cidre, et notamment des variétés acidulées comme Avrolles et *Guillevic*, ne comprennent pratiquement pas de flavanols monomères (Sanoner et al., 1999).

### II. 2. 1. 6. Les flavan-3-ols polymères : procyanidines ou tannins condensés

Les flavan-3-ols oligomères et polymères de la pomme sont au sens strict les véritables tannins de ce fruit. Pour caractériser le terme « tannin végétal », on peut encore légitimement faire référence à la définition de Bate-Smith et Swain (Bate-Smith and Swain, 1962): un tannin végétal est défini comme « un composé phénolique hydrosoluble ayant une masse molaire comprises entre 300 et 3000 et présentant les réactivités habituelles des polyphénols, capacité en outre de précipiter les protéines comme la gélatine et les alcaloïdes », même si aujourd'hui on connaît des tannins de masses molaires bien supérieures qui respectent la définition, notamment sur le critère de l'hydrosolubilité. On distingue actuellement trois classes de tannins : (i) les tannins hydrolysables, qui sont des esters glucidiques d'acide gallique ou d'acide ellagique, absents dans la pomme, (ii) les tannins condensés, ou proanthocyanidines, présentant plusieurs sous-classes, dont seule la sous-classe des procyanidines est représentée dans la pomme et (iii) les phlorotannins, oligomères et polymères de phloroglucinol, dont les structures ne sont encore que incomplètement caractérisées.

Comme les catéchines, les « proanthocyanidines » sont incolores et correspondent à des oligomères et polymères de flavan-3-ols pour lesquels la liaison reliant chaque unité est labile en milieu acide fort. Ainsi, en milieu acide à chaud, ces composés se dégradent en libérant par acidolyse des anthocyanidols, pigments rouges correspondant à la partie aglycone des anthocyanes, d'où leur nom de proanthocyanidines. Les catéchines (flavan-3-ols monomères) n'ont pas cette propriété. Notons que, jusqu'au début des années 70, le terme de « leucoanthocyanes » était préféré à celui de proanthocyanidines. Les proanthocyanidines se définissent selon plusieurs critères: (i) la nature des unités flavan-3-ols constitutives, (ii) le degré de polymérisation et (iii) la position et le type de liaisons interflavoniques.

#### **II. 2. 1. 7. Nature des unités constitutives et distinction entre unité terminale et unités d'extension**

C'est ce critère qui détermine plusieurs sous-classes de proanthocyanidines telles que les procyanidines, les prodelphinidines,... Ainsi, les procyanidines, unique sous-classe de proanthocyanidines dans la pomme, sont définies par leurs unités flavan-3-ols constitutives présentant un noyau B de type catéchol (Figure 11). Cela les distingue des prodelphinidines, retrouvées par exemple dans le raisin, qui possèdent un noyau de type pyrogallol. Les procyanidines de la pomme ne sont constituées que de deux types d'unités flavan-3-ols : la (+)-catéchine, uniquement positionnée en unité terminale, elle demeure néanmoins minoritaire en cette position (rarement plus de 10 % de unités terminales) ; et la (-)-épicatéchine qui correspond à toutes les unités d'extension et à la majeure partie des unités terminales (Figure 11).

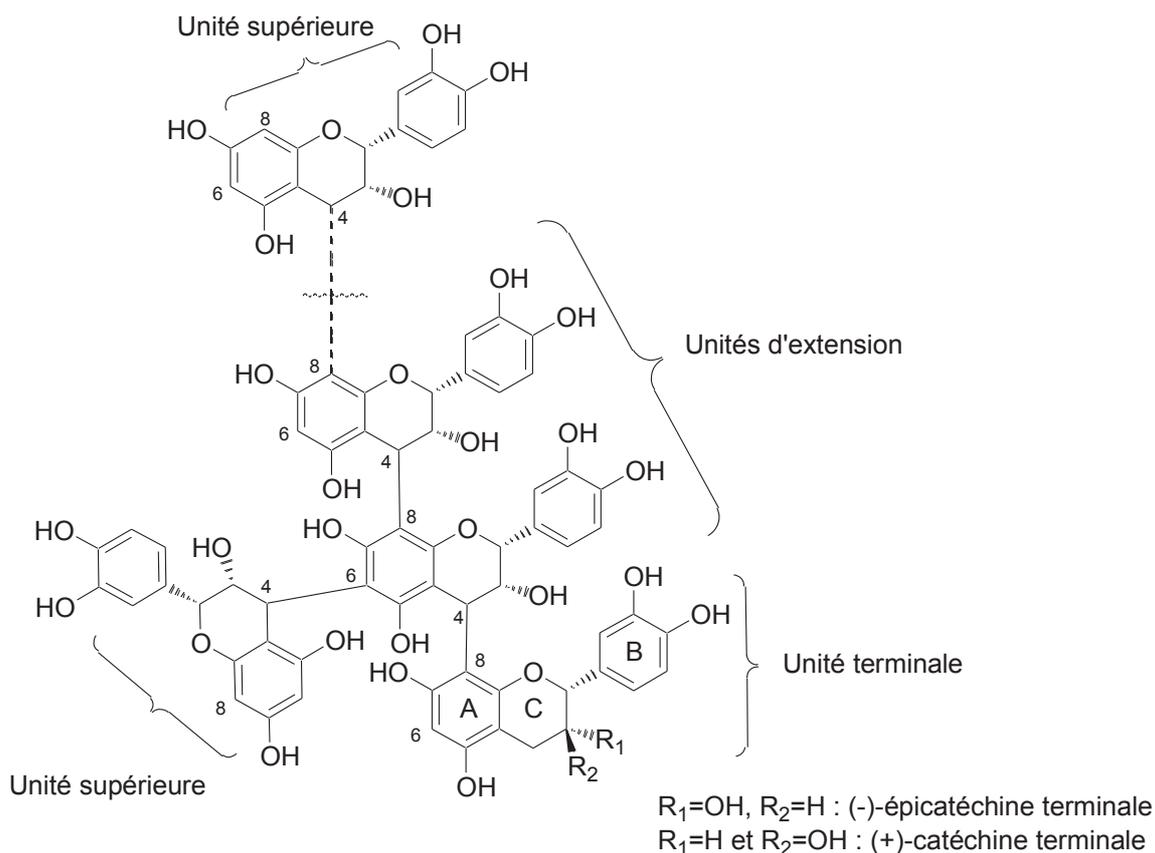


Figure 11 – Structure générale des procyanidines polymères de la pomme

### II. 2. 1. 8. Degré de polymérisation

Le degré de polymérisation (DP) correspond au nombre d'unités catéchiques par molécule de procyanidines. Ainsi, dans la pomme on trouvera des dimères (DP2), des trimères (DP3), etc... jusqu'à des molécules beaucoup plus polymérisées qui ne seront obtenues que sous la forme d'une fraction polydisperse contenant un pool de molécules de DP varié. Dans ce cas, on définira leur état de polymérisation par un degré moyen de polymérisation (DPM). Dans la pomme à cidre, les études ont mis en évidence un DPM variant le plus souvent de 4 à 7, les procyanidines s'y trouvent donc essentiellement sous forme d'oligomères. On note toutefois la présence de molécules fortement polymérisées dans certaines variétés telles que *Guillevic* ou *Avrolles*, pour lesquelles des DPM supérieurs à 40 ont pu être mesurés (Sanoner et al., 1999).

### II. 2. 1. 9. Type et position des liaisons interflavoniques

On distingue deux catégories de procyanidines selon le type de liaison existant entre les unités flavan-3-ols: les procyanidines de type B, comprenant une seule liaison entre les carbones C4 et C6 ou C4 et

C8, et les procyanidines de type A comprenant une liaison éther supplémentaire en positions C2-O-C7 ou C2-O-C5. (Figure 12).

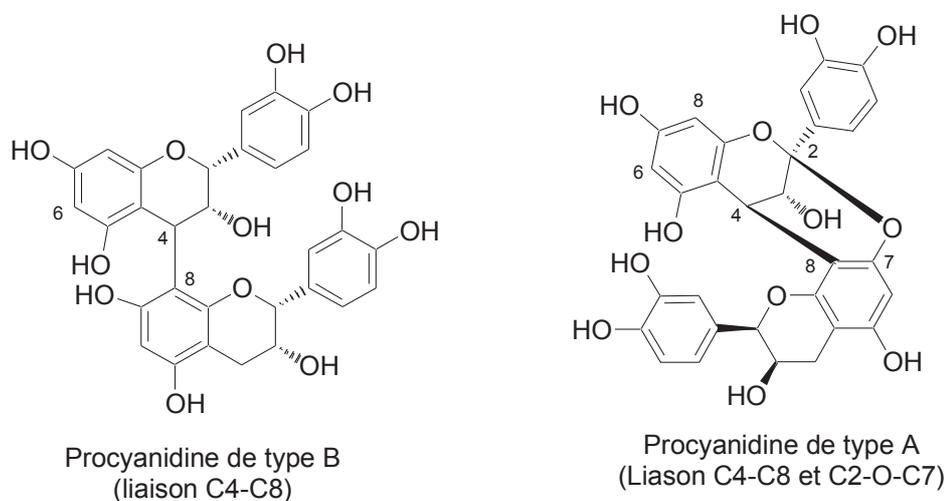


Figure 12 – Exemple de dimères de Procyanidines de type B versus Procyanidines de type A

Les polymères proanthocyanidiques les plus abondamment représentés dans les végétaux sont ceux de type B et les liaisons C4-C8 dominent largement par rapport aux liaisons C4-C6. Les procyanidines de type A sont beaucoup moins répandues mais identifiées dans un certain nombre d'extraits de plante (litchi, prune, canneberge, cannelle, avocat, curry, arachide, liqueur de cacao). Les procyanidines de type A ne sont *a priori* pas présentes dans la pomme. Cependant, il a été montré qu'une procyanidine de type A pouvait être produite par oxydation à partir d'une procyanidine de type B en solution modèle mimétique de l'oxydation enzymatique des polyphénols d'un jus de pomme (Poupard et al., 2011).

## II. 2. 1. 10. Les principales procyanidines de la pomme

Parmi les procyanidines majeures de la pomme, trois dimères, deux trimères et un tétramère (tous de type B) ont été caractérisés : le dimère **B2**, (-)-épicatéchine-(C4-C8)-(-)-épicatéchine, est le plus souvent majoritaire mais on trouve aussi en quantité moindre, le dimère **B1**, (-)-épicatéchine-(C4-C8)-(+)-catéchine, et le dimère **B5** : (-)-épicatéchine-(C4-C6)-(-)-épicatéchine. Sont aussi présents le trimère **C1**, (-)-épicatéchine-(C4-C8)-(-)-épicatéchine-(C4-C8)-(-)-épicatéchine, le trimère **EC-B5**, (-)-épicatéchine-(C4-C6)-(-)-épicatéchine-(C4-C6)-(-)-épicatéchine et le tétramère **D1**, 4 sous-unités (-)-épicatéchine liées en (C4-C8). D'autres formes isomères et/ou plus polymérisées sont également présentes pour constituer au final un « pool » de molécules correspondant à la fraction « tannins condensés » de la pomme (Figure 13). La concentration totale en procyanidines dans les variétés à cidre est très variable, avec une moyenne d'environ 2 g.kg<sup>-1</sup> de MF mais pouvant approcher les 5g.kg<sup>-1</sup> de MF dans le cas de certaines variétés (Sanoner et al., 1999). La concentration en dimères ne

représente généralement qu'une petite part de la fraction totale de procyanidines. Ainsi, le dimère B2 compte rarement pour plus de 20 % de toutes les procyanidines (Guyot et al., 2003).

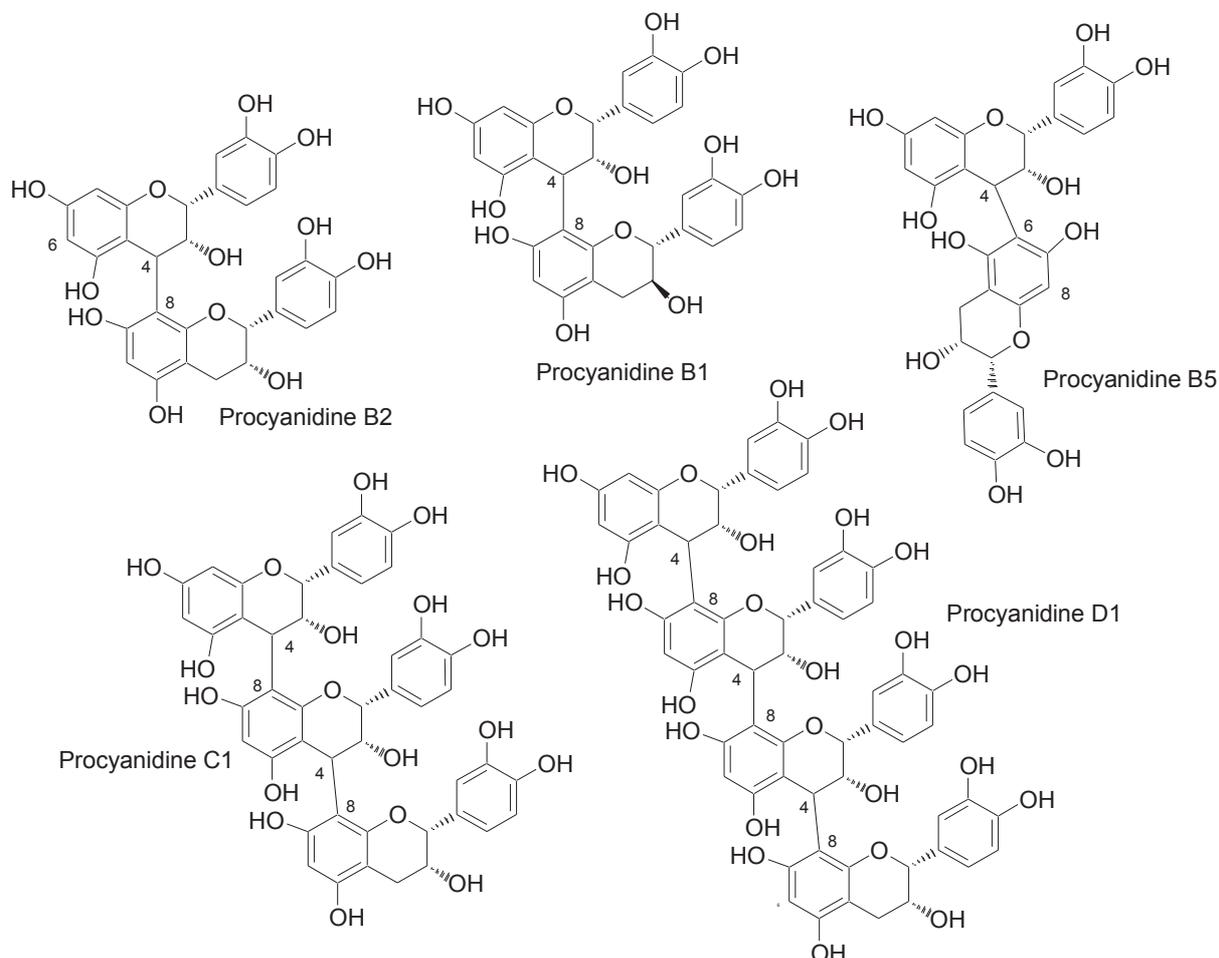


Figure 13 – Structure des principales procyanidines oligomères de la pomme

On soulignera que les procyanidines au total représentent **entre 40% et 90 % des polyphénols totaux** de la pomme et sont de ce fait les polyphénols majoritaires, qu'il s'agisse de variétés de pommes à cidre (Sanoner et al., 1999) ou de table (Guyot et al., 2002).

## II. 2. 1. 11. Les dihydrochalcones

Les dihydrochalcones constituent une catégorie particulière de flavonoïdes dans le sens où elles ne possèdent pas d'hétérocycle central et le noyau B ne comporte qu'un seul groupe hydroxyle. Près de 230 structures différentes de cette classe ont été décrites (Gosch et al., 2010).

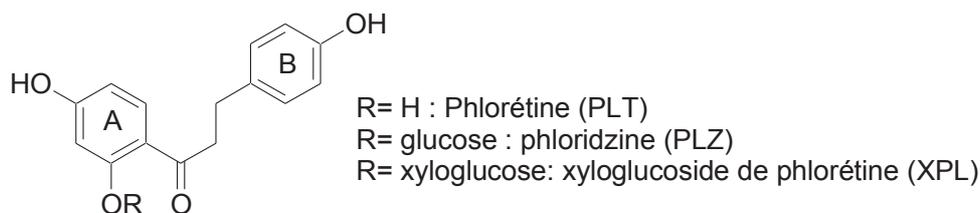


Figure 14 – Structure des principales dihydrochalcones de la pomme

Longtemps considérés comme assez spécifiques de la pomme, ces composés ont finalement été identifiés au sein de plusieurs espèces végétales appartenant principalement aux familles des Rosacées et des Ericacées (Gosch et al., 2010). Parmi les végétaux d'intérêt alimentaire, des dihydrochalcones ont à ce jour été identifiées dans la pomme, la fraise, la laitue et la grenade. Toutefois, c'est dans la pomme que ces composés sont présents en plus fortes concentrations, celles-ci pouvant atteindre 166 mg.kg<sup>-1</sup> de pulpe fraîche (Sanoner et al., 1999) mais en général, cette catégorie est présente à quelques dizaines de mg.kg<sup>-1</sup> de matière fraîche et compte pour **0.5 à 5 % des polyphénols totaux** (Wojdylo et al., 2008).

Dans la pomme, les dihydrochalcones ne sont retrouvées que sous la forme d'hétérosides, l'aglycone étant la phlorétine. Les deux représentants les plus largement décrits dans la littérature sont la phloridzine (2'-β-D-glucopyranoside de phlorétine) et le xyloglucoside de phlorétine (2'-β-D-xyloside(1→6)-β-D-glucoside de phlorétine) (Figure 14).

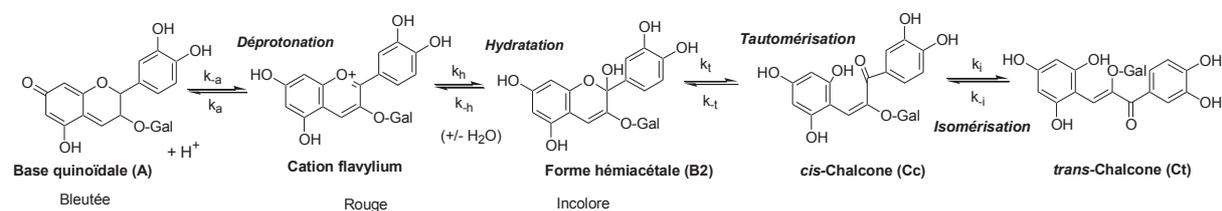
Cette classe de composés fera l'objet d'une attention particulière dans le cadre de notre étude. En effet, des travaux antérieurs ont montré que la phloridzine était un précurseur de composés colorés tels que le POPj (Produit d'Oxydation de la Phloridzine jaune), potentiellement utilisables en tant que colorants alimentaires (Guyot et al., 2007; Le Guernevé et al., 2004). Cette propriété sera davantage décrite et discutée au chapitre III. .

On souligne que la phloridzine, présente à la fois dans la peau et dans la chair du fruit, est plus fortement concentrée dans les pépins de la pomme où elle représente 75% des polyphénols totaux.

## II. 2. 1. 12. Les anthocyanes

Ce sont des pigments végétaux remarquables, largement impliqués dans la coloration rouge, bleue, pourpre des fleurs et des fruits. Les anthocyanes identifiées dans les pommes correspondent essentiellement à des glycosides du cyanidol. Le cyanidol-3-O-galactoside, aussi nommé idéaine, est l'hétéroside majoritaire. D'autres glycosides mineurs sont parfois détectés (arabinose, xylose, glucose). Les anthocyanes constituent une catégorie de flavonoïdes très complexe : en milieux aqueux, elles sont présentes sous plusieurs formes colorées et incolores en équilibre en fonction du pH (Figure 15). La forme colorée dite cation flavylum est d'autant plus présente que le pH est acide. Elle est

constituée d'un cycle C entièrement conjugué et possède une fonction hydroxyle en position 3. Les anthocyanes sont toujours présentes sous des formes glycosylées et ou acylées.



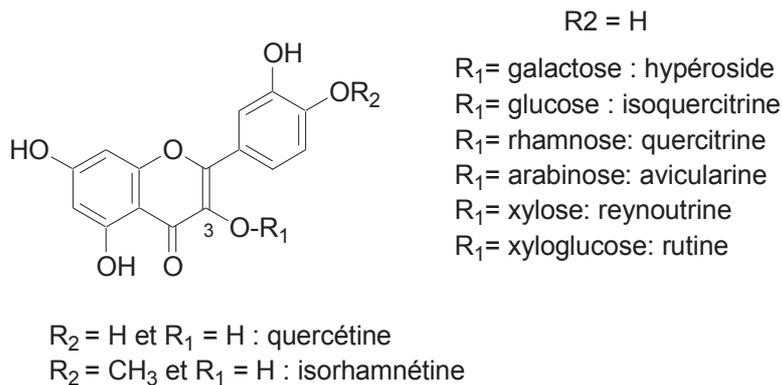
**Figure 15 - Différentes formes moléculaires de l'idéine (cyanidine galactoside) en équilibre, en solution acide à moyennement acide (adapté de Limon et al., 2013)**

Les anthocyanes sont en général présentes dans l'épiderme des pommes dont la peau est rouge et leur concentration dans les pommes à cidre dépassent rarement une vingtaine de  $mg.kg^{-1}$  de pomme fraîche. Cependant, depuis peu, un intérêt croissant est accordé aux variétés de pommes à chair rouge pour une utilisation dans l'élaboration des jus de pomme et cidres rosés. Certaines variétés présentent une concentration en anthocyanes supérieure à  $400 mg.kg^{-1}$  de pomme fraîche et leur extractabilité dans les jus atteint 26 % (Malec et al., 2014).

### II. 2. 1. 13. Les flavonols

Les flavonols sont des composés phénoliques jaunes largement répandus chez les végétaux supérieurs. Ils se retrouvent notamment dans les fruits de nombreuses espèces végétales et dans la pomme, ils contribuent à la coloration jaune de l'épiderme. Ils possèdent dans leur structure une double liaison entre les carbones 2 et 3, une fonction hydroxyle en C3 et une fonction cétone en C4 (Figure 16). Bien qu'ils puissent être présents sous forme libre dans les surfaces des feuilles ou dans les sécrétions épidermiques, les flavonols sont généralement présents sous forme glycosylée.

Dans la pomme, les flavonols sont essentiellement présents sous forme glycosylée. Le quercétol est l'aglycone le plus courant, l'hydroxyle en position 3 pouvant être substitué par différents sucres. Les hétérosides les plus fréquemment rapportés dans la littérature sont l'hyperoside (galactose), la quercitrine (rhamnose), l'isoquercitrine (glucose), la reynoutrine (xylose), la rutine (rutinose) et l'avicularine (arabinose).



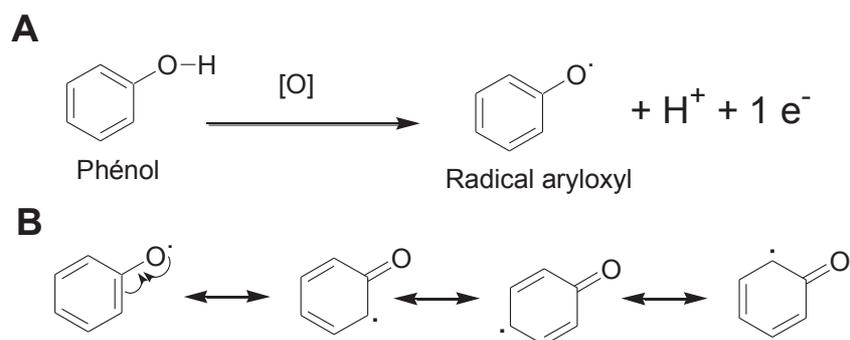
**Figure 16 – Structure des principaux flavonols de la pomme**

Dans la peau, les concentrations individuelles sont de l'ordre de 100-200 mg.kg<sup>-1</sup> MF pour la pomme de table et de 400-1000 mg.kg<sup>-1</sup> MF pour la pomme à cidre. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur, une fois ramenées à une concentration en matière sèche (coefficient de conversion : 5 - 7). Quand ils sont présents dans la chair, leurs concentrations individuelles sont de l'ordre de 10 mg.kg<sup>-1</sup> MF et la somme ne dépasse pas 100 mg.kg<sup>-1</sup> MF. Ces valeurs élevées dans la peau des fruits ne se retrouvent pas dans les jus où elles ne dépassent pas 5 mg.L<sup>-1</sup> en concentrations individuelles. En effet, les jus de pomme sont généralement obtenus par pressage rapide après broyage des fruits et sans phase de macération.

## II. 2. 2. GENERALITES SUR LA REACTIVITE ET LA PHYSICO-CHIMIE DES POLYPHENOLS

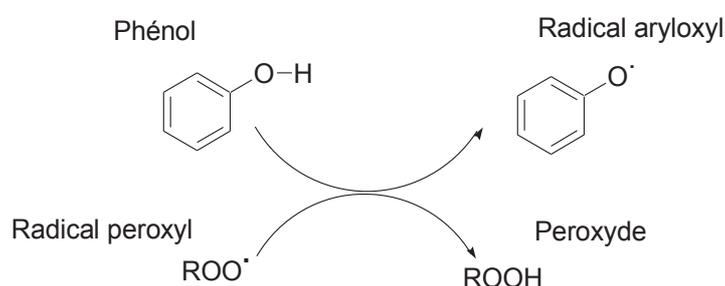
Dans ce paragraphe, sans être exhaustif, il s'agira de décrire brièvement les principales propriétés chimiques et physico-chimiques des composés phénoliques en les illustrant prioritairement par des exemples se rapportant aux principaux polyphénols de la pomme discutés précédemment. En résumé, les composés phénoliques sont des molécules ayant des propriétés réductrices, des propriétés nucléophiles, des propriétés acides (faible), et parfois des propriétés de chélation de métaux. Certains composés se voient aussi attribuer des propriétés dites « tannantes » qui reflètent leur capacité à interagir en milieux aqueux avec des protéines pour former des complexes plus ou moins réversibles.

**Caractère réducteur, pouvoir antioxydant et sensibilité à l'oxydation** : les phénols sont des composés réducteurs, cela signifie qu'ils ont une bonne aptitude à céder un électron. Dans le cas de la fonction phénol, la perte d'un électron est immédiatement suivie de la perte d'un proton pour conduire à la formation d'un radical aryloxy (Figure 17, A)



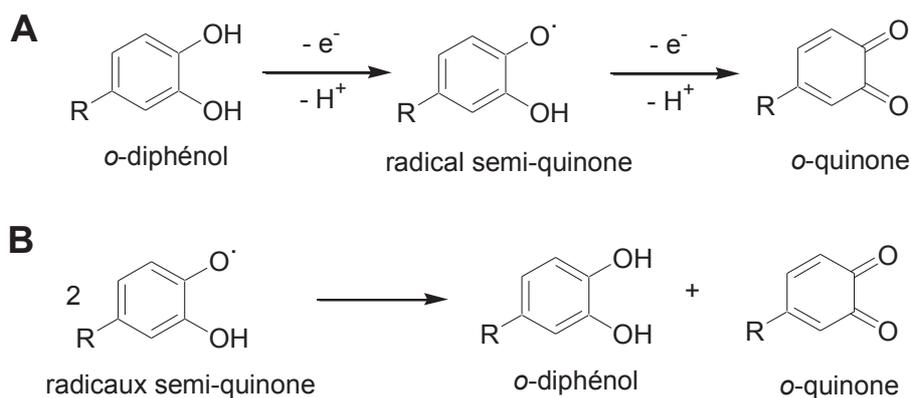
**Figure 17 – Formation du radical aryloxy suite à l'oxydation du phénol (A) et stabilisation de ce radical par ses formes mésomères (B)**

Le radical aryloxy est stabilisé par la possibilité de délocalisation de l'électron libre sur plusieurs autres sites du noyau aromatique (Figure 17, B). Même si d'autres mécanismes existent, cette propriété est largement responsable du caractère antioxydant des polyphénols car le faible potentiel rédox du couple phénol/radical aryloxy permet des réactions rapides avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que les radicaux oxyl (RO•) et peroxy (ROO•). Ces ERO sont connues comme étant impliquées dans l'apparition de certaines maladies (cancers, maladies dégénératives, maladies cardiovasculaires) lorsqu'elles sont produites en trop grandes quantités ou lorsque que les systèmes de leur régulation se trouvent débordés.



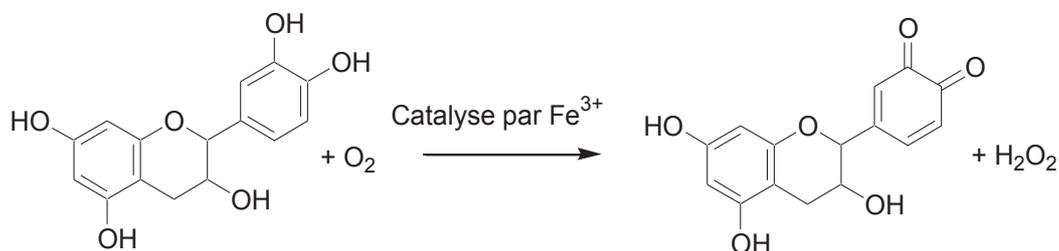
**Figure 18 – Exemple de stabilisation d'une ERO (ici, un radical peroxy) par un phénol**

L'oxydation des composés phénoliques est la conséquence de leur action réductrice. Parmi les composés phénoliques de la pomme, l'oxydation concerne d'abord les composés présentant dans leur structure des noyaux phénoliques de type *o*-diphénol (ou catéchol) qui sont de plus forts réducteurs. L'oxydation monoélectronique d'un catéchol conduit alors à un radical aryloxy correspondant à une semi-quinone (Figure 19, A). Par perte d'un électron ou par dismutation (Figure 19A et B), les radicaux semi-quinones conduisent à la formation d'*o*-quinones qui sont elles aussi des espèces très réactives.



**Figure 19 - Formation des semiquinones et des *o*-quinones par oxydations monoélectroniques successives (A) ou par dismutation (B)**

Dans les modèles alimentaires de transformation de la matière végétale fraîche, par exemple lors du broyage et du pressage des pommes, la formation des *o*-quinones directement à partir des *o*-diphénols, en présence d'oxygène, est largement catalysée enzymatiquement par l'activité polyphénoloxydase. Cependant, sans ce recours à une activité enzymatique mais sur des cinétiques plus lentes et simplement du fait de la présence d'oxygène dans le milieu, les espèces semiquinones et quinones peuvent se former lorsque les conditions sont favorables. On parle alors d'autoxydation des polyphénols (Figure 20). L'autoxydation est favorisée par les pH plus élevés et la présence de métaux de transition (Fe(II)/Fe(III) et Cu(I)/Cu(II)), même sous forme de traces.



**Figure 20 – Autoxydation de la catéchine par catalyse métallique (reproduit de Danilewicz, 2003)**

En effet, la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) permet à la réaction de Fenton de s'effectuer (Figure 21), ce qui conduit à la régénération du Fe(III) qui peut catalyser l'oxydation des polyphénols (Figure 20).



**Figure 21 – Réaction de Fenton**

**Caractère nucléophile des phénols et électrophile des quinones:** la densité électronique importante sur le noyau phénol lui confère une forte nucléophilie. Par délocalisation, celle-ci se positionne non seulement sur l'atome d'oxygène mais aussi en ortho et para (Figure 22).

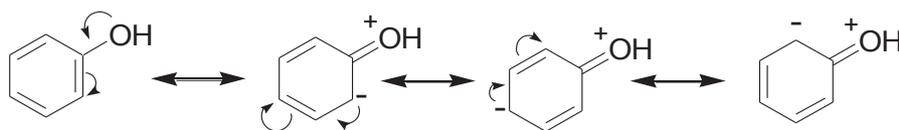


Figure 22 – Formes mésomères du phénol

Les substitutions par d'autres groupements -OH en position 3 (noyau réSORCINOL) ou 3 et 5 (noyau phloroglucinol) accentuent la densité électronique sur les positions C2, C4 et C6, ce qui augmente le caractère nucléophile en ces positions. Ainsi, les positions 6 et 8 sur le noyau A des catéchines et procyanidines correspondent à des sites nucléophiles (Figure 23).

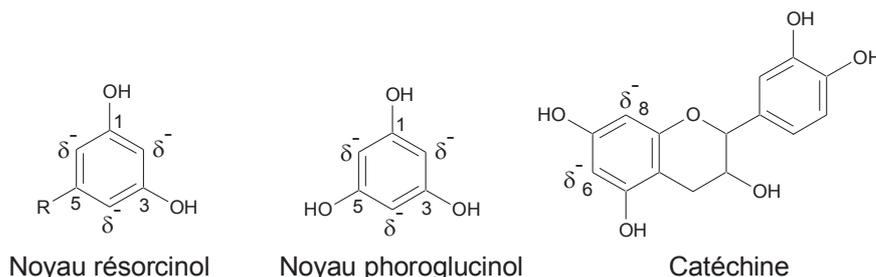


Figure 23 – Sites nucléophiles sur les noyaux réSORCINOL et phloroglucinol et extrapolation sur la molécule de catéchine

A l'inverse des phénols, les *o*-quinones formées par oxydation présentent un déficit électronique responsable de leur caractère électrophile qui se manifeste sur plusieurs positions du cycle comme l'illustrent les formes mésomères possibles (Figure 24).

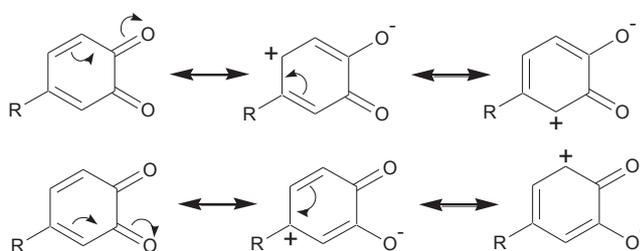


Figure 24 – Formes mésomères d'une *o*-quinone

**Caractère acide de la fonction phénol** : La fonction phénol peut se déprotoner pour former un ion phénolate dont la charge négative se trouve délocalisée sur le noyau aromatique. De ce fait, les phénols sont des acides faibles (valeur de pKa généralement comprise entre 8 et 10). Certaines propriétés caractéristiques des phénols telles que le pouvoir réducteur ou le caractère nucléophile se trouvent augmentées lorsque le pH augmente (Dangles, 2006).

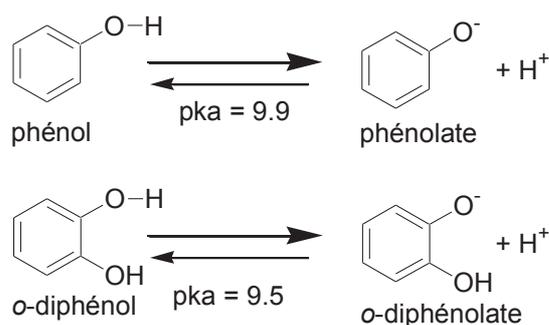


Figure 25 – Equilibres acide-base entre phénols et phénolates

**Réactions d'additions** : dans les conditions permettant l'oxydation des phénols et en particulier des *o*-diphénols, ces derniers, dotés de leur caractère nucléophile se trouvent en présence d'*o*-quinones électrophiles. Les conditions sont alors favorables à des réactions d'additions parmi lesquelles la réaction d'addition de type Michael apparaît souvent privilégiée (Figure 26).

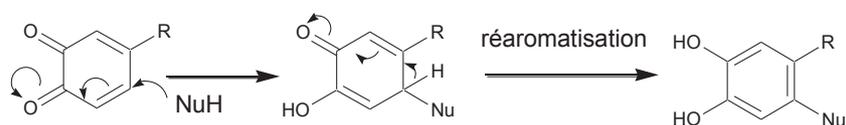


Figure 26 – Addition nucléophile de type Michael

Ces réactions d'addition de Michael sont par exemple responsables de la formation d'une structure de type biaryle dans le cas d'un couplage oxydatif entre une *o*-quinone, résultant de l'oxydation d'un catéchol, avec le phloroglucinol ou avec une molécule contenant un noyau de ce type, tel qu'on peut le trouver dans la catéchine (Poupard et al., 2008) (Figure 27).

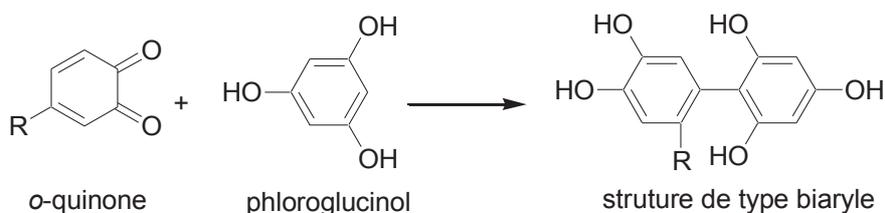


Figure 27 – Formation d'une structure de type biaryle par couplage oxydatif issu de l'addition de Michael entre une *o*-quinone et un noyau phloroglucinol

Les additions radicalaires sont aussi des voies réactionnelles possibles, impliquant notamment les espèces semi-quinones. Dans ce cas, des structures de type biaryléther sont potentiellement formées. Ceci a été observé en solution modèle d'oxydation enzymatique de (+)-catéchine avec la formation de certaines déhydrodicatéchines de type B (Guyot et al., 1996) (Figure 28).

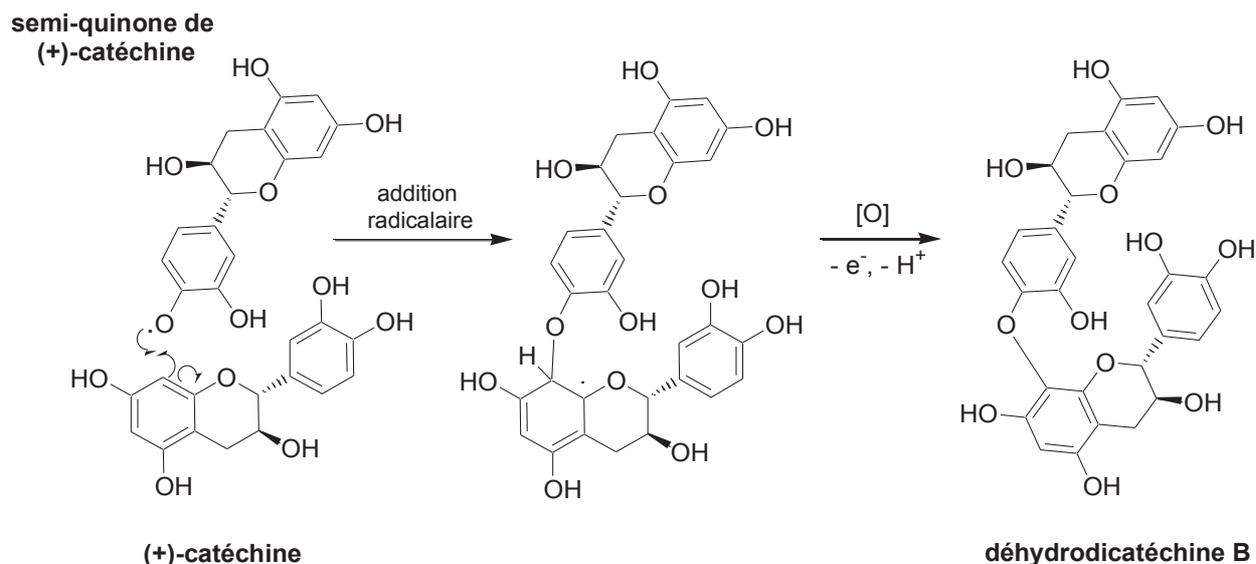


Figure 28 – Formation d’une liaison biaryléther par addition radicalaire dans le cas de la synthèse d’une déhydrocatéchine de type B (d’après Guyot et al., 1996)

**Propriétés tannantes des polyphénols** : il s’agit là d’une propriété essentielle de certains polyphénols qui prennent alors le nom de tannins. La définition d’un tannin a été donnée dans un paragraphe précédent (voir § II. 2. 1. 6. « *Flavan-3-ols polymères* »). Cette propriété correspond à leur aptitude à interagir en formant des complexes solubles et/ou insolubles, plus ou moins réversibles, avec la plupart des protéines. Aujourd’hui, cela inclut aussi leur capacité à s’associer à certaines structures polysaccharidiques (Le Bourvellec and Renard, 2012). De manière très simplifiée, on peut dire que ces associations sont gouvernées à la fois par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes dues au caractère polarisé et acide de la fonction phénol (« donneur de liaisons hydrogènes ») et à l’existence de fonctions « accepteur de liaisons hydrogènes » présentes dans la structure des protéines (fonctions carbonyles par exemple). Dans certaines conditions, des liaisons ioniques sont potentiellement impliquées mais elles ne semblent pas prépondérantes au pH des aliments, les molécules polyphénoliques étant alors peu chargées.

Les propriétés tannantes ont des conséquences majeures et trouvent de nombreuses applications impliquant les polyphénols en technologie alimentaire ou dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments. Sans être exhaustif, on peut citer (i) la perception de l’astringence d’un aliment quand elle est liée à la précipitation des protéines salivaires par les tannins, (ii) l’amertume d’aliments due à certains polyphénols comme les procyanidines oligomères du fait de leur capacité à se lier à certains récepteurs spécifiques de la cavité buccale, (iii) l’instabilité colloïdale de certaines boissons en raison de complexations tannins-protéines-polysaccharides pouvant générer des troubles et précipités lors du stockage, (iv) l’inhibition d’enzymes utilisées en technologie alimentaire pour

clarifier, stabiliser les boissons, (v) un effet anti-nutritionnel en alimentation animale car ces propriétés tannantes des polyphénols sont susceptibles d'impacter la digestion des protéines dans l'intestin des monogastriques mais aussi (vi) un effet pro-nutritionnel lorsqu'il s'agit de limiter et réguler une digestion des protéines dans le rumen des ruminants pour permettre ensuite une meilleure assimilation des protéines au niveau de l'intestin.

**Propriétés de copigmentation** : cette propriété ne concerne pas tous les composés phénoliques mais intéresse surtout les anthocyanes. Ces pigments phénoliques colorés, par la structure plane de leur forme cation flavylum, peuvent établir des interactions non covalentes de faible énergie de type  $\pi$ - $\pi$  responsables d'« empilements » (*stacking*) au niveau des noyaux aromatiques avec d'autres motifs phénoliques. Lorsque ces derniers sont présents dans la même molécule on qualifie la copigmentation d'intramoléculaire et lorsque les interactions se font avec d'autres molécules phénoliques colorées ou non, on parle alors de copigmentation intermoléculaire et la molécule en question est appelée copigment. En outre, pour que l'on puisse effectivement parler de phénomène de copigmentation, les interactions doivent en plus induire des modifications des propriétés optiques du pigment seul.

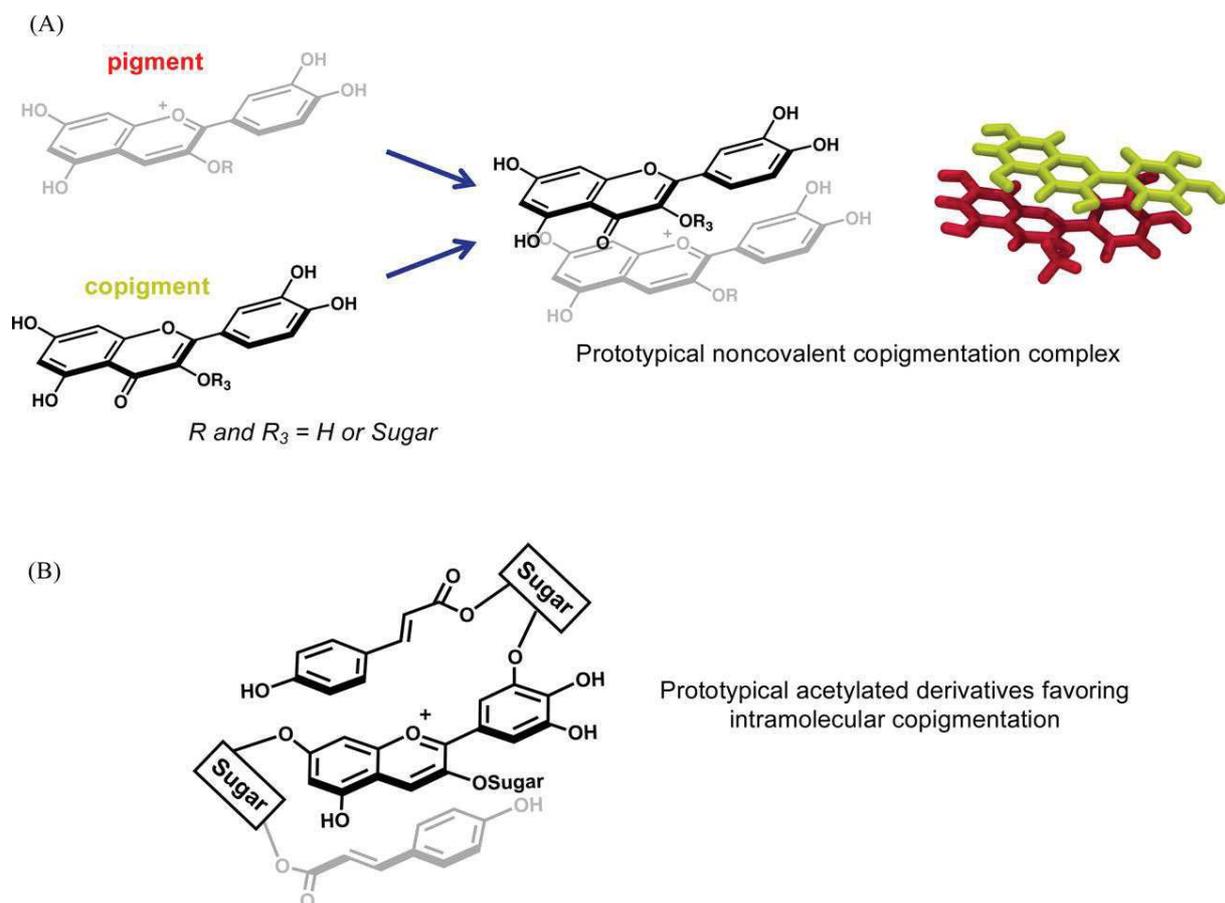
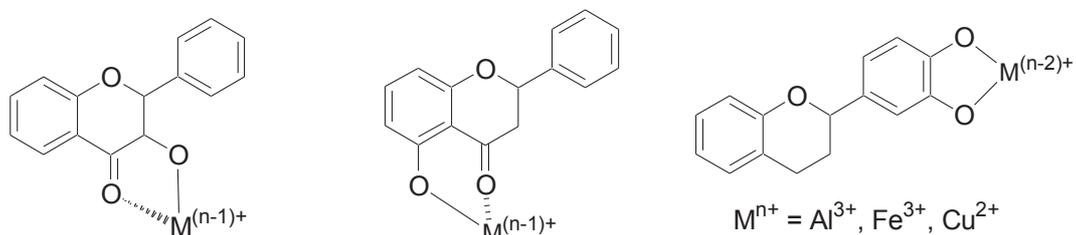


Figure 29 – Illustration du phénomène de copigmentation intermoléculaire (A) entre une anthocyanine et un flavonol et intramoléculaire (B) dans le cas d'une anthocyanine glycosylée doublement acylée par l'acide *p*-coumarique.(reproduit de (Trouillas et al., 2016) )

Ce phénomène a été particulièrement étudié dans le cas des vins rouges pour lesquels les anthocyanes et leurs potentiels co-pigments (flavonols, acides hydroxycinnamiques, et flavanols incluant catéchines et tannins condensés) sont en concentrations parfois importantes. Ce phénomène s'exprime aussi fortement dans le cas de la couleur des fleurs pour lesquelles les anthocyanes et co-pigments coexistent dans les vacuoles des cellules des pétales. En général, les conséquences d'un phénomène de copigmentation dans un vin est à la fois un effet hyperchrome (augmentation de l'intensité de la couleur) et bathochrome (décalage du spectre UV-visible vers les longueurs d'onde plus élevées, donc du rouge vers le bleu) (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2012). Dans une synthèse récente, Trouillas et Coll. ont revisité la question de la copigmentation des anthocyanes en confrontant les approches expérimentales et théoriques pour mieux comprendre le phénomène aux échelles moléculaires et atomiques (Trouillas et al., 2016).

**Complexation métallique** : il s'agit là d'une autre propriété essentielle des polyphénols même si elle concerne surtout les composés présentant dans leur structure un noyau catéchol ou une fonction C=O positionnée de façon coplanaire à proximité d'une fonction OH (Dangles, 2006). Ces conditions sont favorables à la formation de chélates avec les ions métalliques présentant une forte charge positive (ex :  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$ ), à condition de ne pas se trouver en situation trop fortement acide afin d'autoriser la substitution des protons phénoliques. Les pH des jus et des cidres, supérieurs à 3, permettent à cette complexation de s'exercer. (Figure 30)



**Figure 30 – Complexation métallique des flavonoïdes (reproduit de Dangles, 2006)**

Ce phénomène de complexation métallique avec le  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  est connu pour modifier et stabiliser la couleur d'anthocyanes vacuolaires dans des édifices supramoléculaires impliquant aussi des flavones et responsables de couleurs florales bleues (Kondo et al., 1992).

La complexation métallique est également responsable de la « casse ferrique » des cidres. Celle-ci se manifeste par un brunissement voire un noircissement du liquide exposé à l'air. Même si les mécanismes fins ne sont pas complètement connus, cette coloration peut s'interpréter comme le résultat d'une complexation métallique entre les tannins présents dans le cidre et le fer introduit dans le produit au cours de l'élaboration (par exemple, utilisation d'outils et d'équipements en acier non inoxydable et/ou mal entretenus).

## II. 2. 3. ROLES ET PROPRIETES DES POLYPHENOLS DE LA POMME ET DE LEURS PRODUITS D'OXYDATION

Les propriétés chimiques et physicochimiques des polyphénols se trouvent largement illustrées dans le cas de la pomme et de sa transformation en jus et en cidre.

**Dans le fruit**, ces composés issus du métabolisme secondaire jouent un **rôle protecteur vis-à-vis des radiations UV** et sont aussi très vraisemblablement impliqués dans **les défenses et la résistance vis-à-vis des bioagresseurs** même si les mécanismes ne sont pas encore bien identifiés.

Dans les boissons à base de pomme, les polyphénols sont surtout impliqués **dans les caractéristiques visuelles et sensorielles des produits finis** mais ils peuvent également avoir un impact sur les notes olfactives pour des cas particuliers.

Sur le visuel, les polyphénols de la pomme, ou plus exactement leurs produits d'oxydation, sont responsables de la **couleur** des jus et des cidres et c'est précisément l'objet de notre étude. Ces aspects seront donc davantage détaillés dans le chapitre III. Le visuel ne concerne pas seulement la couleur mais aussi la limpidité, la brillance et la transparence des jus et des cidres. On sait par exemple que dans les **jus troubles**, et voulus comme tels par un procédé qui ne fait pas intervenir de clarification, les teneurs en polyphénols et en particulier celles en procyanidines sont nettement plus élevées que dans les jus clarifiés (Oszmianski et al., 2007). Les particules en suspension dans un jus de pomme trouble correspondent à des édifices macromoléculaires incluant protéines et polysaccharides sur lesquels se sont adsorbées des procyanidines au moment du pressage. Un phénomène similaire semble impliqué dans l'apparition de troubles et de précipités au cours du stockage des jus clarifiés, bien que les mécanismes fins sous-jacents soient encore méconnus. Même après clarification, les jus et les cidres contiennent encore des peptides, oligosaccharides, protéines et polysaccharides solubles qui ont la possibilité de se complexer aux polyphénols encore présents. Parmi les composés phénoliques, les tannins (procyanidines oligomères et polymères) sont *a priori* plus directement concernés mais leur oxydation et éventuellement celle d'autres composés phénoliques joue probablement aussi un rôle important dans ce phénomène de déstabilisation colloïdale (Beveridge, 1997).

Les polyphénols des jus de pommes et des cidres, lorsqu'ils sont en concentration suffisamment importante, contribuent fortement aux **saveurs amères** et aux **perceptions d'astringence** des produits cidricoles. Là encore, les procyanidines sont les premières molécules responsables. Les contributions respectives de ces tannins condensés à l'amertume et à l'astringence dépendent du degré de polymérisation. Ainsi, les oligomères composés de 2 à 4 unités catéchines sont plutôt amers tandis que les formes plus polymérisées présentes dans les jus sont plus fortement astringentes (Lea and Arnold, 1978). L'astringence est encore beaucoup plus marquée pour les tannins hautement polymérisés (Vidal et al., 2003). Plus récemment, les impacts relatifs du degré de

polymérisation (DP) et de la concentration en procyanidines en solutions modèles « cidres » ont été revisités (Symoneaux et al., 2015). Les résultats confirment l'impact du DP sur l'amertume et l'astringence mais montrent en plus des effets sur les perceptions de l'acidité et du sucré. L'oxydation a probablement un impact sur les propriétés sensorielles des tannins dans les cidres. Cependant, à notre connaissance peu de travaux ont été réalisés dans ce sens.

Les polyphénols de la pomme sont des molécules hydrosolubles non odorantes qui de fait ne contribuent pas, au moins directement, à l'arôme des jus et des cidres. Cependant il s'avère, et c'est d'ailleurs un problème récurrent dans l'élaboration des cidres, que des **arômes indésirables de nature phénolique** se forment au cours de la fermentation. Certains de ces **phénols volatils** (en particulier l'éthylphénol, l'éthylguaicol, l'éthylcatéchol) génèrent des odeurs animales dans les cidres au détriment des arômes fruités. Ils proviennent d'une cascade de réactions faisant intervenir des désestérifications, des décarboxylations et des réductions à partir des esters quiniques des acides hydroxycinnamiques (Lea, 1995).

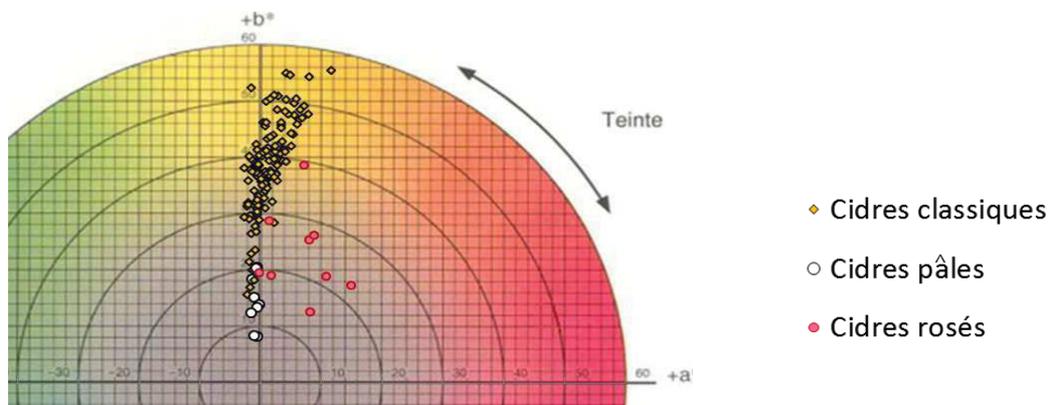
Enfin, on ne saurait être complet sans mentionner le **rôle nutritionnel** des composés phénoliques de la pomme. Cela s'inscrit dans le rôle général qu'occupent les composés phénoliques dans notre alimentation. En effet, la pomme et la fraise sont considérées comme les fruits qui contribuent le plus à l'apport de micronutriments phénoliques dans l'alimentation de la population française (Brat et al., 2006). On peut penser que les jus de pomme et les cidres y participent, même si les jus de pomme aujourd'hui disponibles sont majoritairement fabriqués à partir de pommes de table, peu concentrées en composés phénoliques, et sont souvent à base de concentrés de jus de pomme également très appauvris en polyphénols. Les purs jus de pommes contiennent néanmoins des quantités non négligeables de catéchines, d'acides hydroxycinnamiques et de procyanidines qui ont fait et font toujours l'objet de nombreux travaux pour mieux comprendre leurs propriétés nutritionnelles, avec parfois des mécanismes plus spécifiques à certaines classes. Sur ce point, la spécificité des dihydrochalcones est à souligner. Parmi nos aliments courants, elles sont surtout apportées par la pomme et les produits qui en dérivent même si beaucoup reste à faire pour mieux évaluer leur impact nutritionnel (Tomas-Barberén and Clifford, 2000). Mentionnons plus spécifiquement le cas de la phloridzine qui a fait l'objet de nombreuses publications en rapport avec ses effets sur l'assimilation du glucose et sur le diabète (pour revue, Ehrenkranz et al., 2005).

## II. 3. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

### II. 3. 1. POSITIONNEMENT DES CIDRES FRANÇAIS SUR LE CERCLE DES COULEURS L\*A\*B\*

L'exploitation des données colorimétriques d'une base de données recueillies sur 161 cidres français (disponible au sein de l'UMT Novacidre) a permis de caractériser la couleur des cidres qui sont actuellement produits en France et ainsi de définir l'espace couleur des cidres. Il s'agit principalement de cidres que l'on qualifiera de « classiques » (143), dont la couleur jaune-orangée est due à la présence de produits d'oxydation des polyphénols. Quelques cidres nouvellement apparus sur le marché, tels que les cidres pâles, peu colorés (9) ou les cidres rosés (9) dont la couleur est liée à la présence d'anthocyanes, sont également inclus dans l'étude.

Sur la Figure 31, les couleurs des différents cidres analysés ont été projetées sur le plan équatorial (plan  $a^*$ ,  $b^*$ ) du cercle de couleur CIE  $L^*a^*b^*$ .



**Figure 31 - Positionnement des cidres français sur le cercle des couleurs du système CIE  $L^*a^*b^*$**

Les cidres classiques se répartissent autour de l'axe  $b^*$ , c'est-à-dire dans les teintes correspondant aux jaunes orangés. Lorsque la saturation (la valeur de Chroma  $C^*$ ) est élevée, la teinte tend légèrement vers le rouge : le nuage de points s'éloigne de l'axe  $b^*$  et « se déplace vers la droite », les valeurs de  $a^*$  devenant plus positives. Inversement, pour les plus faibles valeurs de  $b^*$ , les points sont situés « plus à gauche » de l'axe  $b^*$  (valeurs de  $a^*$  plus négatives), ce qui les place dans les couleurs « jaune clair » avec une nuance tirant sur le vert. Les catégories de cidres plus innovants, identifiés par leurs couleurs pâles et rosées, se positionnent respectivement au niveau du « jaune très clair » et du « rouge clair » comme leur nom l'indique. Cependant, certains cidres rosés se situent sur la zone des cidres classiques, indiquant une probable oxydation.

Les histogrammes de la Figure 32 permettent de mieux situer la répartition des cidres dans chaque dimension. Les cidres classiques se situent à des angles de teinte compris entre  $80^\circ$  et  $100^\circ$  et cette fourchette restreinte suggère que les différents pigments qui constituent la couleur de ces produits conduisent à des teintes proches. La saturation (Chroma  $C^*$ ) est la dimension qui varie le plus : elle est comprise entre 8 et 70. Les couleurs des cidres se distinguent donc principalement par leur intensité. La luminance se situe entre 80 et 100 pour la plupart des cidres, ceci indiquant une forte transparence des produits.

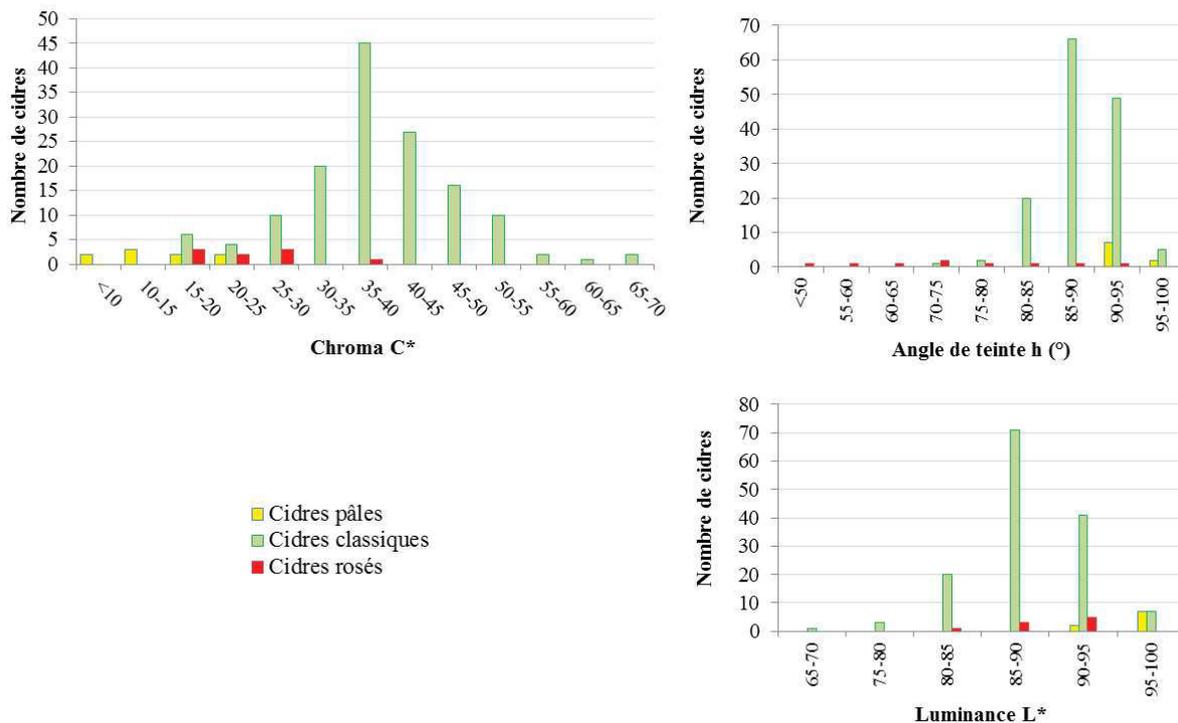


Figure 32 - Distribution des données colorimétriques pour les différents groupes de cidres français (classiques, pâles et rosés)

Les quelques cidres rosés dont la couleur a été mesurée présentent un angle de teinte compris entre 50° et 90°, ce qui confirme un net recouvrement de leur zone de teinte avec celle des cidres classiques. Dans les cas extrêmes, un cidre rosé oxydé ne se distingue plus d'un cidre classique de couleur orangée.

### Relation entre la luminance et les autres dimensions

Des données en trois dimensions restent toujours difficiles à exploiter et nécessitent de procéder par des projections sur plusieurs plans. Or il existe, dans cet échantillonnage de cidres, une corrélation forte entre la luminance et les autres dimensions, en particulier le Chroma (la saturation). Un modèle linéaire permet d'expliquer la luminance L\* par le Chroma C\* et par l'interaction [h°. C\*]:

$$L^* = 100 - 1.2449 \cdot C^* + 0.01096 \cdot h^\circ \cdot C^*$$

Les coefficients des deux termes du modèle sont hautement significatifs et ce modèle explique 81 % de la variance de L\*. Cela peut vraisemblablement s'interpréter par une relative homogénéité des pigments; une augmentation de la teneur en pigments conduirait alors à la fois à une augmentation de la saturation C\* et à une réduction de la luminance L\*. L'interaction indique que les teintes plus orangées réduisent davantage la luminance pour une même valeur de chroma.

Ainsi, pour la couleur des cidres, cette relation permet de s'affranchir des interprétations concernant l'évolution de  $L^*$  car elle est liée à celle des autres variables. La couleur des cidres reste, bien sûr, définie par ses trois dimensions mais sa description sur le seul plan  $a^*.b^*$  permet de présenter l'essentiel de l'information.

### II. 3. 2. PROBLEMATIQUE DE L'ETUDE

La couleur des jus de pomme et des cidres est liée à la formation de pigments jaunes-orangés lors de la transformation des fruits. Les variétés de pommes à cidre françaises sont particulièrement riches en polyphénols. Ces composés sont impliqués dans des réactions d'oxydations initiées par catalyse enzymatique. Les espèces résultantes subissent des réactions chimiques ultérieures pouvant aboutir à la génération de couleur. Différents facteurs sont susceptibles d'influencer et d'orienter les mécanismes de formation des molécules colorées. Parmi ceux-ci, on note par exemple la diversité des substrats phénoliques, l'activité de la polyphénoloxydase ou encore la disponibilité en oxygène. Les structures des molécules colorées des jus de pomme sont à ce jour largement méconnues.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit se positionne sur les aspects de recherches suivants, à savoir :

- (i) **la caractérisation globale d'une fraction phénolique colorée dérivée d'un jus de pomme et l'élucidation de certaines structures impliquées dans la coloration.** Enrichir la connaissance sur ces éléments structuraux devrait permettre de poser des hypothèses quant aux mécanismes moléculaires participant à leur formation ;
- (ii) **l'influence de certains paramètres physico-chimiques sur l'expression de la couleur jaune-orangée.** Il s'agira notamment d'évaluer l'impact de l'étape fermentaire sur la coloration globale d'un jus de pomme puis de fournir des éléments de compréhension en se focalisant sur l'étude en solution modèle de l'effet du pH et du potentiel rédox sur des molécules colorées sélectionnées comme « chromophores » modèles des produits cidricoles.

### III. COMPOSES PHENOLIQUES JAUNES-ORANGES DES JUS DE POMME FRANÇAIS : PROFILAGE, ELEMENTS STRUCTURAUX ET APPREHENSION DES MECANISMES DE FORMATION

#### III. 1. TRAVAUX ANTERIEURS

La plupart des fruits ou des produits végétaux alimentaires « frais » subissent des détériorations post-récolte. S'ils sont soumis à des chocs lors des manipulations, lors de la conservation ou durant les différentes étapes des procédés de transformation technologiques, l'intégrité cellulaire des tissus est rompue et une coloration brune se développe relativement rapidement sur les zones abîmées. Ce phénomène est communément appelé « le brunissement enzymatique ». Les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits alimentaires peuvent être impactées par l'apparition de ces « pigments bruns ». Selon le type d'aliments considéré, la formation de ces composés colorés peut s'avérer tout à fait indésirable, d'où les nombreuses méthodes développées pour contrôler et limiter le brunissement enzymatique : par exemple, pour n'en citer que quelques-unes, l'utilisation de sulfites, d'acide ascorbique ou encore le conditionnement sous atmosphère contrôlée et protectrice. Néanmoins, pour certains produits, l'apparition d'une coloration peut être un critère de qualité recherché par les transformateurs. C'est notamment le cas des boissons fermentées, comme le vin, le thé, le rooibos ou le cidre, pour lesquelles la couleur est un critère de typicité du produit. Précisons ici que les molécules brunes formées, désignées pendant longtemps par le terme générique de « mélanines », se forment à l'issue de l'oxydation par voie enzymatique de composés phénoliques initialement présents dans la matrice végétale. L'expression de ce brunissement va dépendre de l'activité des enzymes impliquées, de la disponibilité en O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des substrats phénoliques. Les composés colorés formés peuvent aussi dériver de réactions non enzymatiques incluant des réactions de Maillard, des phénomènes d'autoxydation ou encore la formation de complexes métalliques.

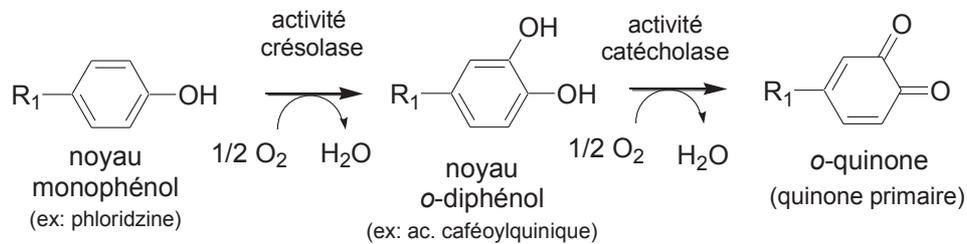
#### III. 1. 1. LA FORMATION DE CHROMOPHORES PHENOLIQUES DANS L'ALIMENTATION : UNE PREMIERE ETAPE D'OXYDATION PAR VOIE ENZYMATIQUE SUIVIE DE REACTIONS CHIMIQUES ULTERIEURES

Si l'on se focalise sur l'étape enzymatique initiant l'oxydation des polyphénols, il faut dès lors mentionner les enzymes impliquées dans le brunissement : on distingue les polyphénols oxydases (PPOs), qui regroupent en fait deux sous-catégories : lescatéchol oxydases (EC1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2.), et les peroxydases. Ces dernières agissent sur les polyphénols en faisant intervenir le

peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  comme co-substrat alors que les deux autres catégories d'enzymes nécessitent la présence de dioxygène.  $H_2O_2$  étant rapidement éliminé au niveau cellulaire, il est faiblement présent donc les peroxydases ne sont que peu impliquées dans la génération de molécules brunes.

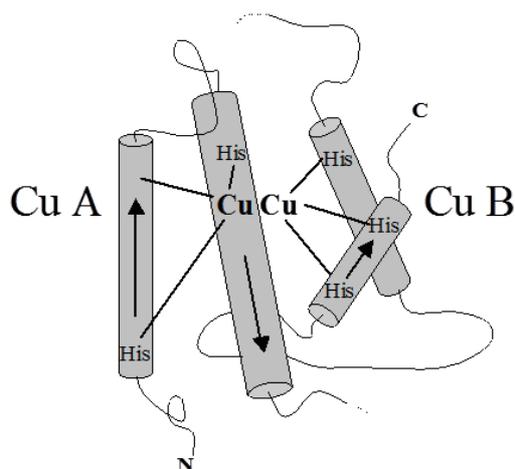
Les catéchol oxydases (EC1.10.3.1) correspondent à des enzymes végétales et sont aussi désignées par les termes diphenol oxydases, et *o*-diphénolases. Le terme *tyrosinases* (EC1.14.18.1) s'applique davantage à des polyphénoloxydases fongiques ou bactériennes et aussi aux enzymes animales capables d'oxyder la tyrosine.

Les catéchol oxydases catalysent deux types d'activité enzymatique (Figure 33): l'activité crésolase ou monophénolase, correspondant à l'oxydation d'un monophénol en *o*-diphénol, et l'activité catécholase permettant l'oxydation d'un *o*-diphénol en *o*-quinone.



**Figure 33 - Activités crésolase et catécholase des polyphénoloxydases végétales (Catécholoxydases)**

Il s'agit d'enzymes plastidiales associées aux structures membranaires et contenant deux atomes de cuivre II coordonnés par des histidines (Figure 34).



**Figure 34 - Domaines Cu A et Cu B décrivant le site actif de la polyphénoloxydase de pomme (d'après Murata et al., 1995)**

Ces atomes peuvent se trouver sous trois états d'oxydation : *met*, *deoxy* et *oxy*. L'état *deoxy* ne permet pas la réaction avec les substrats phénoliques mais il peut être activé par fixation de l'oxygène en première étape de catalyse. Les substrats phénoliques vont se lier à la partie *oxy*, permettant ainsi la catalyse de la réaction (Figure 35).

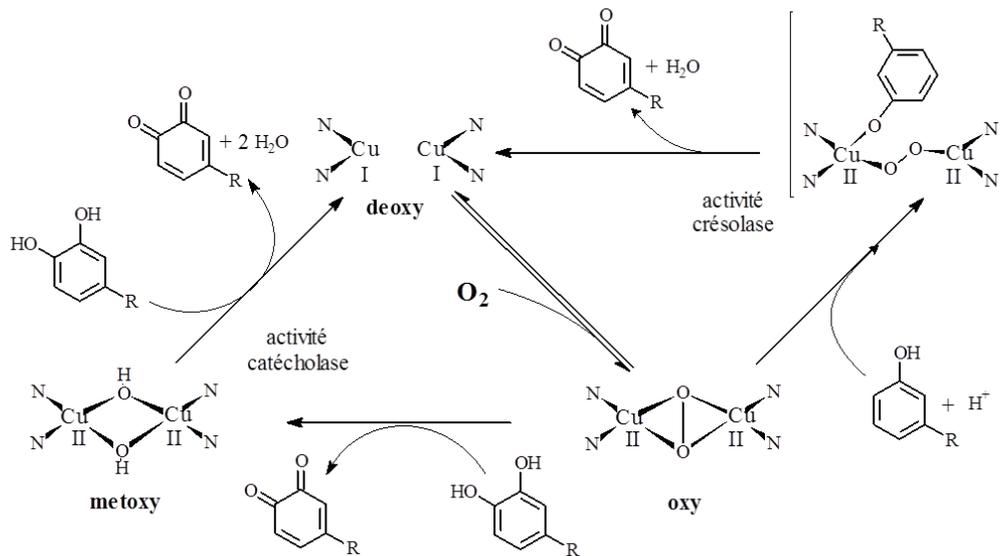


Figure 35 - Mécanisme catalytique par les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase (extrait de (Lerch, 1994))

La polyphénoloxydase est très largement présente dans la pomme et son activité globale dans le fruit peut significativement varier selon les variétés et l'année de récolte (Figure 36). Dans les tissus parenchymateux de la pomme mure, les protéines enzymatiques de polyphénoloxydase se trouvent imbriquées dans les structures membranaires internes des plastides. Par conséquent, dans un moût de pomme immédiatement après pressage, une partie de ces structures plastidiales est extraite du contenu cellulaire et les PPOs se trouvent alors sous formes particulières en suspension dans le moût. Ainsi, les opérations de clarification et de filtration permettent d'éliminer presque totalement l'activité PPO du jus (résultats internes non publiés).

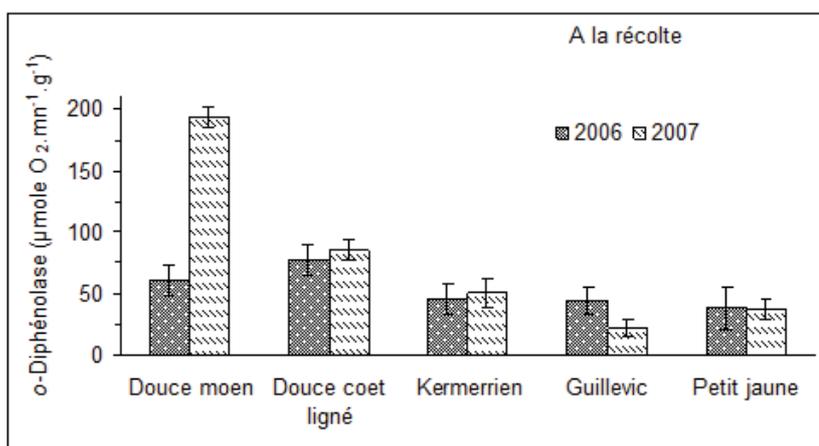


Figure 36 – Activité catécholase de la PPO mesurée par polarographie pour plusieurs variétés de pomme à cidre sur 2 années de récolte (Extrait de Rapport scientifique du projet Interrégional CIMAITRI, octobre 2010).

L'activité laccase n'est pas présente dans le fruit sain. Cependant, cette activité peut apparaître lorsque les tissus de la pomme sont altérés par des développements fongiques. Les laccases agissent *a priori* comme les catécholoxydases en ayant la possibilité de convertir certains *o*-diphénols en *o*-quinones. On considère qu'elles ont en outre un spectre plus large de substrats avec la possibilité de convertir aussi certains *p*-diphénols en *p*-quinones. Les laccases seraient des enzymes solubles et plus stables que les catécholoxydases des fruits. De ce fait, on pourrait les retrouver dans un cidre embouteillé et non pasteurisé avec une possibilité d'activité à l'ouverture de la bouteille lorsque le dioxygène est à nouveau disponible. Il en résulte parfois un brunissement rougeâtre voire un noircissement rapide du cidre appelé « casse oxydasique ».

### III. 1. 1. 1. Principaux substrats de la PPO

Certains critères structuraux sont importants pour qu'un composé phénolique soit substrat de la PPO. Ainsi, la présence d'un noyau *o*-diphénol est évidemment un prérequis pour que l'activité catécholase puisse s'exercer mais cela ne suffit pas. De même, tous les monophénols ne sont pas des substrats de l'activité monophénolase. Si l'on considère seulement les composés phénoliques présents dans la pomme, les principaux substrats polyphénoliques de l'activité catécholase de ce fruit sont l'acide 5-caféoylquinique et la (-)-épicatechine, le premier étant un bien meilleur substrat que le second en terme « d'efficacité catalytique » que l'on peut définir par le rapport  $V_m/K_m$  (Nicolas et al., 1994) (Figure 37). La (+)-catéchine est aussi un bon substrat mais elle est généralement présente en faible concentration dans la pomme. Les dihydrochalcones (phloridzine et xyloglucoside de phlorétine) sont, à notre connaissance, les deux seuls substrats de l'activité crésolase (monophénolase) de la pomme. Cependant, il faut souligner que l'efficacité catalytique de la PPO pour la phloridzine est très faible par rapport à celle constatée pour les substrats *o*-diphénoliques tels que l'acide 5-

caféoylquinique et la (-)-épicatéchine (Nicolas et al., 1994). Précisons aussi que les procyanidines, même dans leurs formes les moins polymérisées (dimères), ne sont pas des substrats de la PPO (Le Bourvellec et al., 2004).

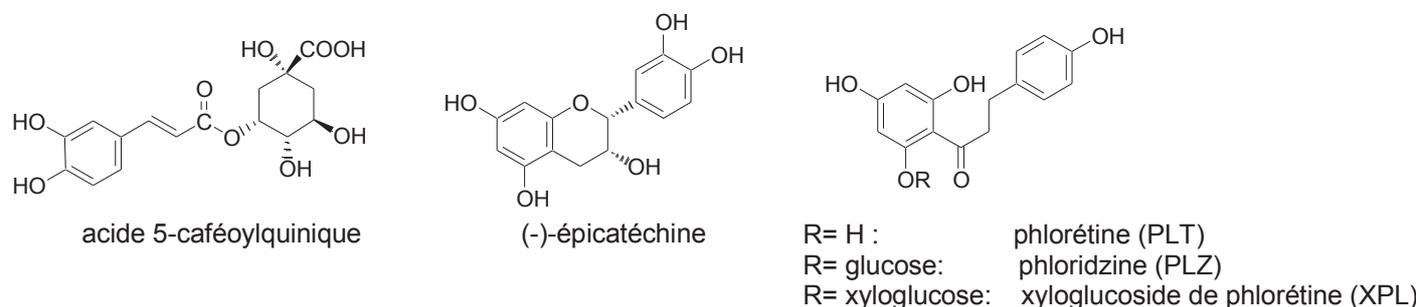


Figure 37 – Principaux composés phénoliques de la pomme substrats de la PPO de pomme.

### III. 1. 1. 2. Vue d'ensemble des principaux pigments phénoliques néoformés par oxydation dans des boissons fermentées

Comme indiqué précédemment, la couleur étant le premier critère organoleptique à marquer le consommateur, elle se révèle importante pour l'évaluation de la qualité des boissons fermentées. De nombreuses recherches ont donc été dédiées aux molécules responsables de la couleur de ces produits alimentaires. L'objectif n'est pas ici de rendre compte de façon exhaustive des produits colorés identifiés dans les boissons fermentées ou les boissons à base de fruits. Il s'agit simplement de donner un aperçu de la diversité structurale des pigments qui peuvent s'y former.

Le vin rouge compte parmi les modèles les plus étudiés sur ces aspects « expression et stabilité de la couleur ». Les anthocyanes, et en particulier la malvidine-3-*O*-glucoside et ses dérivés, sont les pigments les plus représentés dans le raisin et dans les produits qui en sont issus. Lors du vieillissement des vins rouges, les anthocyanes de couleur rouge à violacée peuvent évoluer par oxydation pour former des structures néoformées de type pyranoanthocyanes (Figure 38 A) dont la couleur présente davantage des nuances cuivrées (de Freitas and Mateus, 2011).

Le thé est une boisson très riche en catéchines et l'oxydation enzymatique de celles-ci est à l'origine de nombreux pigments responsables de la couleur. Certaines catéchines du thé présentent dans leur structure un noyau pyrogallol (épigallocatechine) et certaines sont aussi substituées en position 3 par l'acide gallique (épigallocatechine gallate). De ce fait, les quinones formées présentent une réactivité particulière qui permet la formation d'un noyau benzotropolone (Figure 38 B), chromophore jaune des structures de type théaflavines (Tanaka et al., 2010).

Plus récemment, un produit jaune issu de l'oxydation d'une dihydrochalcone, l'aspalathine, a été caractérisé dans les rooibos (Heinrich et al., 2012). La formation de ce composé montre beaucoup

de similarités avec celle d'un colorant jaune issu de l'oxydation de la phloridzine, une dihydrochalcone de la pomme (Figure 38C) (Le Guernevé et al., 2004).

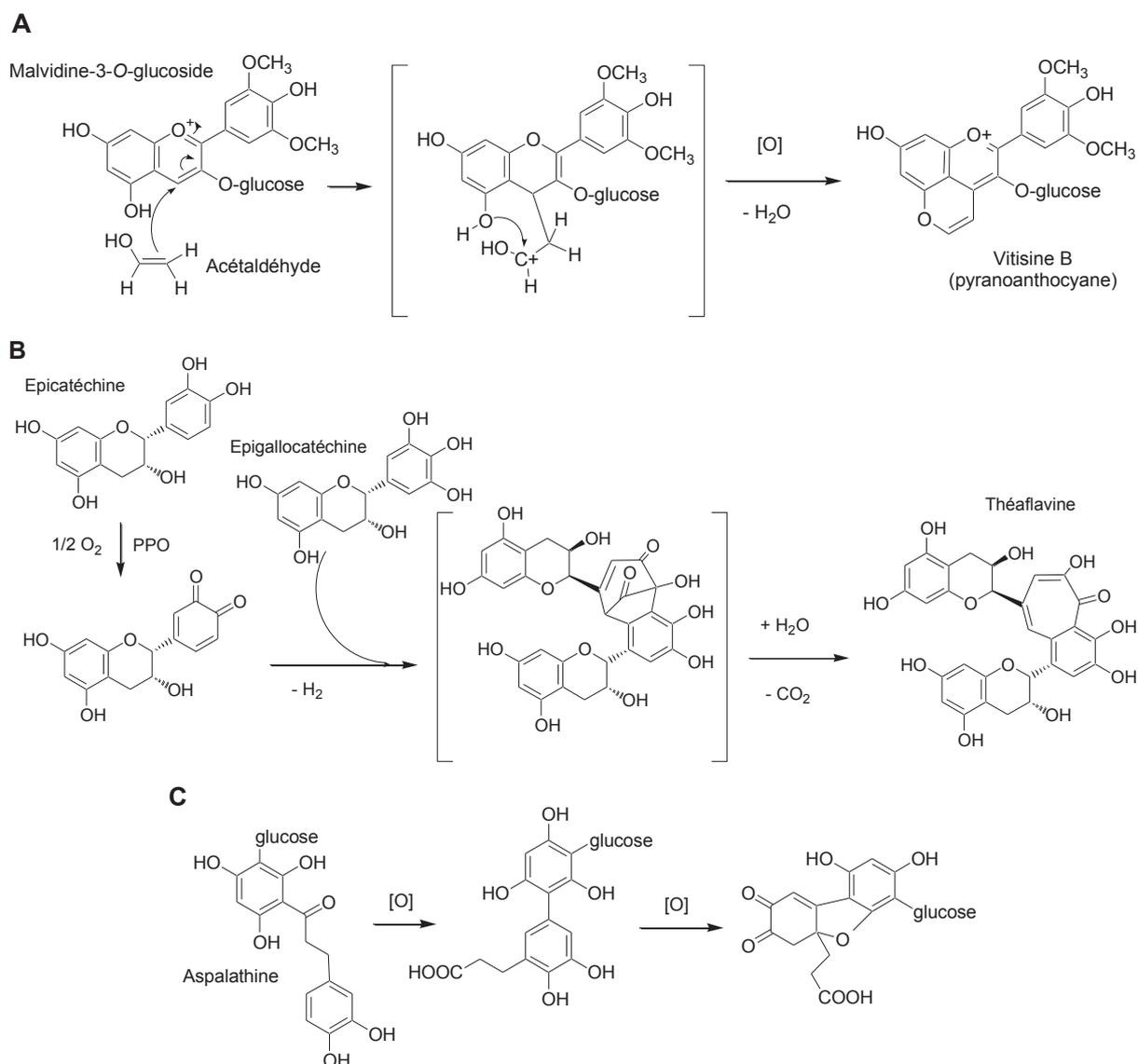


Figure 38– Exemples de produits d'oxydation colorés retrouvés dans les modèles de boissons fermentées de type vin rouge (A, pyranoanthocyanes), thé noir (B, Théaflavine) et rooibos (C)

En comparaison, les composés responsables de la couleur « traditionnelle » jaune-orangée des jus de pomme et des cidres n'ont été que peu étudiés et sont aujourd'hui encore très largement inconnus.

### III. 1. 2. MOLECULES PHENOLIQUES COLOREES DES JUS DE POMME

La couleur du jus de pomme se développe durant les premières étapes de la transformation des fruits. Le brunissement débute dès le broyage des pommes, lorsqu'il y a rupture de l'intégrité cellulaire. Comme il a été précisé dans les paragraphes précédents, le brunissement est la conséquence de l'activité des PPOs qui catalysent, en présence d'oxygène, l'oxydation des polyphénols vacuolaires. Ceci aboutit à la formation d'*o*-quinones. Ces espèces très instables sont rapidement impliquées dans des réactions non-enzymatiques générant des produits secondaires. Ils sont majoritairement incolores mais certains pigments sont formés.

Les différences observées en termes de teintes et d'intensité du brunissement sont associées au profil polyphénolique de la pomme (nature et concentrations des différentes molécules phénoliques), à la vitesse de la réaction enzymatique et à certains paramètres du milieu tels que le pH, la température, la présence de substances réductrices ou de cations métalliques. Plusieurs études ont tenté d'établir une corrélation entre l'intensité du brunissement et le contenu en polyphénols ou l'activité PPO mais les résultats présentés dans la littérature peuvent se révéler contradictoires. La première difficulté à mentionner est le choix de la méthode appropriée pour mesurer le degré de brunissement. Amiot et al. ont évalué la sensibilité des pommes au brunissement en mesurant l'absorbance à 400 nm et la luminance (paramètre  $L^*$  du système psychométrique CIE  $L^*a^*b^*$ ) pour les pigments solubles et insolubles, respectivement. Précisons ici que la plupart des études considérées ont été menées en solution modèle. D'une façon générale, ces travaux ont révélé le rôle déterminant de l'équilibre relatif entre les acides hydroxycinnamiques et les monomères de flavanols (catéchines) dans le brunissement oxydatif. Une analyse en régression linéaire multiple a en effet montré que ces deux classes phénoliques contribuaient à la fois à la perte de clarté en solution (diminution de  $L^*$ ) et à la composante jaune de la couleur (augmentation de  $b^*$ ).

Dans les pommes, l'acide 5-caféoylquinique (acide chlorogénique) est le meilleur substrat naturel de la PPO. Son oxydation génère des *o*-quinones légèrement jaunes mais les produits secondaires sont plus clairs, ce qui suggère que ce ne sont pas les composés majoritairement responsables de la couleur. En revanche, en présence de flavanols monomères (catéchines), les quinones d'acide chlorogénique, par des réactions d'oxydoréductions couplées, accélèrent la dégradation de ces flavanols en produits d'oxydation néoformés dont certains peuvent être intensément colorés et présenter des maxima d'absorbance vers 380 et 420 nm.

Certains dimères de catéchines colorés ont été proposés comme molécules impliquées dans la couleur des jus de pomme et des cidres. Leur structure serait similaire à celle de la déhydrodicatéchine A caractérisée par Weinges et ses collaborateurs (Weinges and Mattauch, 1971) dans leurs travaux sur l'oxydation des catéchines par les activités peroxydase (Figure 39).

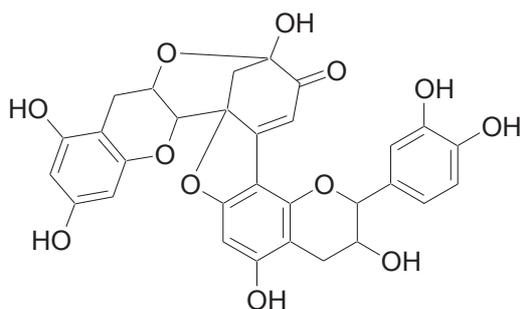


Figure 39 – Structure de la déhydrocatéchine A (Weinges and Mattauch, 1971)

Par la suite, Guyot et al., 1996 ont obtenu le même type de structures dans leur travaux sur l'oxydation de la (+)-catéchine par un extrait de polyphénoloxydase de raisin. En plus de la déhydrocatéchine de type A, un dimère jaune présentant une structures de type méthylène quinone a été caractérisé (Guyot et al., 1996) (Figure 40).

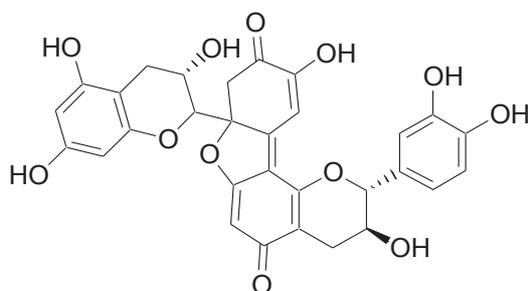
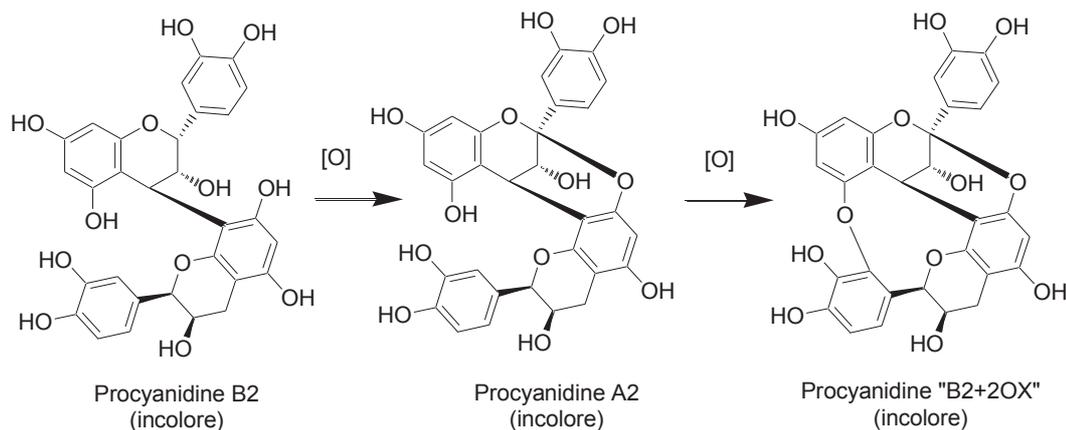


Figure 40 – Déhydrocatéchine présentant une structure de type méthylène quinone (Guyot et al., 1996)

Par ailleurs, les procyanidines n'apparaissent pas comme de bons substrats de la PPO ; elles agiraient plutôt comme des inhibiteurs de l'enzyme. Néanmoins, Oleszek et ses collaborateurs (Oleszek et al., 1989) ont montré que l'oxydation enzymatique des procyanidines B2 et C1 pouvait générer la même intensité de couleur dans le milieu d'incubation que celle des catéchines, bien que la vitesse d'apparition du brunissement soit plus faible. Ainsi, une contribution potentielle de cette classe phénolique dans la couleur des jus de pomme pourrait être à envisager. Cependant, des travaux plus récents concernant l'oxydation des procyanidines en modèle jus de pomme ne vont pas vraiment dans ce sens (Poupard et al., 2011). Ils mettent en évidence la conversion oxydative de procyanidines de type B en privilégiant les réarrangements intramoléculeaires conduisant par exemple à des structures de type A, elles-mêmes pouvant être à nouveau oxydées mais toujours pour former des structures *a priori* incolores (Figure 41).



**Figure 41 – Oxydation de la procyanidine B2 et réarrangements par voies d'addition intramoléculaires d'après (Poupard et al., 2011)**

Enfin, les dihydrochalcones, malgré leur faible concentration dans les jus, sont impliquées dans la formation de cette coloration et pourraient y participer selon deux voies différentes. En premier lieu, en tant que substrats de la PPO, leur oxydation mène directement à la formation de composés jaunes. Par exemple, Le Guernevé et al. (Le Guernevé et al., 2004) ont caractérisé en solution modèle un Produit d'Oxydation de la Phloridzine jaune (POPj, Figure 42). Ce pigment hydrosoluble a la particularité d'arborer une couleur jaune brillant jusqu'à pH 5 et de virer au orange pour des pH supérieurs. Il pourrait donc contribuer à la couleur jaune des jus de pomme et des cidres. En outre, les glycosides de phlorétine pourraient, en présence de catéchines ou d'acide chlorogénique, présenter des effets de synergie sur le développement d'une coloration jaune-orangée. Dès lors, ils pourraient jouer un rôle significatif dans la formation de la couleur des milieux complexes que sont les jus de pomme et les cidres.

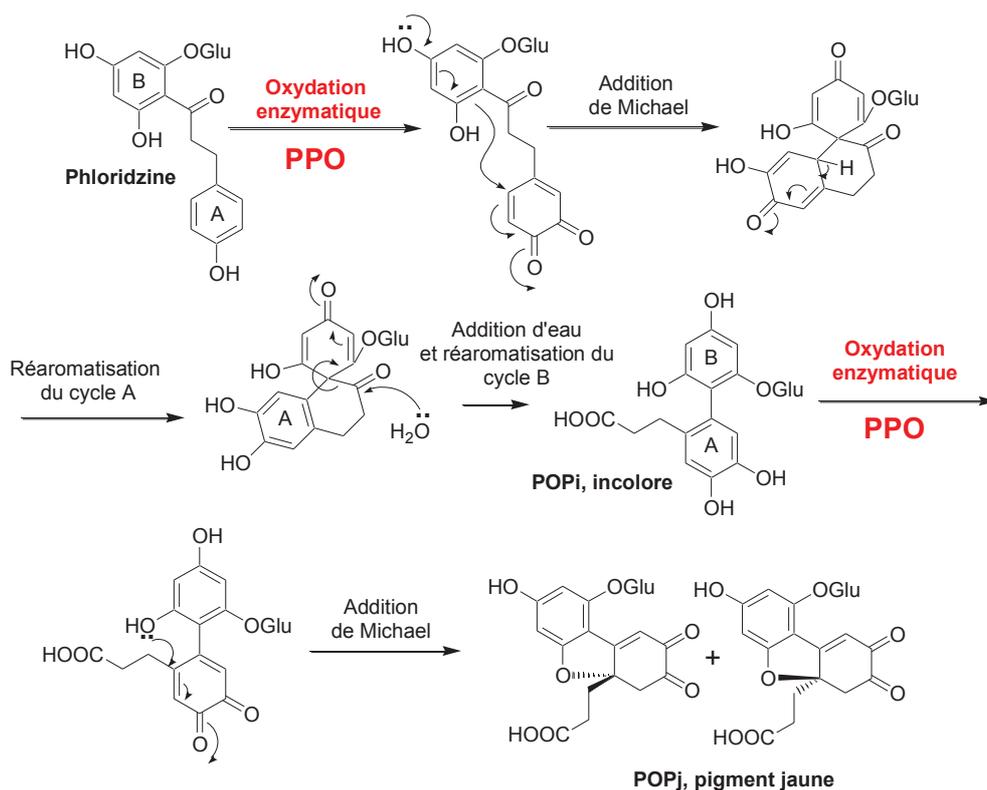


Figure 42 – Mécanisme de formation du colorant POPj par oxydation enzymatique à partir de la phloridzine d'après (Le Guernevé et al., 2004)

A notre connaissance, aucune étude ne s'est réellement focalisée sur l'identification de composés colorés directement dans les jus de pomme ou les cidres. Pour le présent travail, quatre jus de pomme ont été réalisés à partir de variétés de pommes à cidre françaises très différentes en termes de contenus en polyphénols natifs. Les jus résultant couvrent une large gamme de couleurs. L'objectif de cette étude était donc dans un premier temps d'explorer les profils en pigments phénoliques jaunes-oranges de ces jus. Après avoir établi la diversité variétale des chromophores, il nous est apparu essentiel de progresser dans la connaissance des molécules responsables de la couleur en identifiant la structure de certaines molécules impliquées. Pour cela, différentes stratégies ont été utilisées : une approche en milieu réel nécessitant la purification de composés colorés à partir des jus, et une approche en milieu modèle permettant la synthèse de chromophores hautement susceptibles de se former dans les jus. Les structures et autres éléments structuraux mis en évidence dans cette étude seront discutés dans ce chapitre.

## III. 2. MATERIEL ET METHODES

### III. 2. 1. PRODUITS CHIMIQUES

Les standards phénoliques commerciaux, tels que le phloroglucinol, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'acide chlorogénique, l'acide *p*-coumarique, la phloridzine et l'avicularine (quercétine-3-O-arabinoside), ont été fournis par Sigma-Aldrich (Lyon, France). L'hyperoside (quercétine-3-O-galactoside), la procyanidine B1, et la procyanidine B2 provenaient d'Extrasynthèse (Genay, France). Le méthanol, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle et le butan-1-ol utilisés étaient de qualité CLHP ; l'éthanol 96° était de qualité analytique (Carlo Erba reagents, Val de Reuil, France). L'acide formique, l'acide malique et le fluorure de sodium ont été fournis par NORMAPUR (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France). L'acide acétique était de qualité analytique (Carlo Erba reagents). L'acide chlorhydrique et l'acétate de sodium ont été fournis par Emprove exp, Merck (Darmstadt, Germany). L'eau ultra-pure utilisée a été purifiée sur un système PURELAB Classic (Classic model, Elga Véolia, Antony, France). L'eau osmosée a été purifiée par un système PURELAB Prima (0.18S/cm ; PRIMA 15, Véolia Waters Rennes, France). La solution de gélatine utilisée pour les expériences de collage a été préparée à partir de poudre de gélatine de peau de porc (Rousselot, Courbevoie, France).

### III. 2. 2. MATERIEL VEGETAL

Les variétés de pomme à cidre françaises sont particulièrement riches en polyphénols. Elles sont souvent classées en différents types variétaux selon cette teneur en polyphénols totaux et leur acidité (Tavernier and Jacquin 1959). Quatre variétés, figurant parmi les plus cultivées et les plus couramment utilisées dans les assemblages de produits cidricoles français, ont été utilisées pour cette étude : il s'agit des variétés « *Dous Moen* » (douce-amère), « *Marie Ménard* » (amère), « *Petit Jaune* » (acidulée-aigre) et « *Guillevic* » (acidulée). Les fruits ont été récoltés à l'automne 2012 chez un producteur dans un verger en conduite basse-tige (M. Huby, Iffendic, Ille-et-Vilaine, Bretagne, France), excepté pour la variété *Guillevic* dont les fruits ont été récoltés dans un verger basse-tige (M. Nicol, Surzur, Morbihan, Bretagne, France). A maturité technologique (c'est-à-dire, lorsqu'environ 50% des fruits étaient tombés au sol), les pommes ont été prélevées à la main directement dans les arbres afin d'éviter au maximum les chocs pouvant générer une altération des tissus (marques d'oxydation). Après récolte, les fruits ont été conservés en chambre froide à 10°C jusqu'à régression totale de l'amidon, ce qui correspond à une maturité complète des fruits sur le plan physiologique. Cette régression a été suivie par réalisation du « test amidon » à l'iode précisé dans les procédures du Ctifl (Vaysse and Landry, 2004).

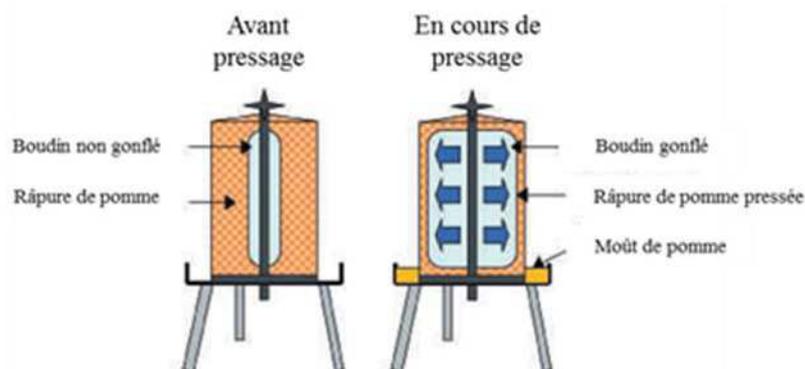
### III. 2. 3. PRODUCTION DE JUS DE POMME A CIDRE FORTEMENT ET FAIBLEMENT OXYDES

### III. 2. 3. 1. Production d'une vingtaine de litres de jus à partir de quatre variétés de pommes à cidre (hydropresse)

Les jus ont été produits selon deux procédures distinctes. Pour un premier lot de fruits, l'oxydation a été favorisée par contact de la râpüre avec l'air afin de générer des jus colorés. Ce mode opératoire s'apparente au procédé de transformation appliqué par les transformateurs de l'industrie cidricole. Pour un second lot de pommes, la présence d'oxygène a été soigneusement limitée durant toutes les étapes de la transformation afin de prévenir l'oxydation et de limiter le brunissement du jus. Avant transformation, les lots de fruits récoltés ont été homogénéisés et les fruits altérés ont été écartés.

Pour le mode de transformation en présence d'oxygène, deux lots de 20 kg de fruits à maturité ont été broyés et pressés séparément pour chaque variété. Après broyage, la râpüre a subi un cuvage de 20 min en présence d'air puis elle a été pressée à 2,5 bars avec une presse de type « hydropresse » (Hydropresse IT80, Fourage CTI, La Haye Fouassière, France) modifiée par Demoisy (Baune, France) (Figure 43). Les substances pectiques ont été dégradées par voie enzymatique à 10°C, par ajout de 2.5 mL de préparation enzymatique pectinolytique (Endozym Pectofruit, Spindal, Gretz-Armainvilliers, France) par hectolitre de jus brut. Le jus traité a été stocké une nuit à 2°C afin de laisser décanter la majeure partie des particules du moût brut. Ce moût a ensuite été soutiré et microfiltré à 0.14 µm par microfiltration tangentielle (membrane Inside Céram, 39 canaux, diamètre hydraulique de 2.5, Siva Diam, Nyons, France) de manière à éliminer tout élément particulaire tel que la PPO et à stabiliser le produit du point de vue microbiologique. Il a été échantillonné puis conservé à -25°C en vue d'utilisations ultérieures.

Pour le mode de transformation en conditions d'oxygénation limitée, les pommes à maturité ont d'abord été placées sous vide dans une cuve durant 15 min afin d'éliminer l'air qu'elles contenaient. Le vide a été cassé par incorporation de CO<sub>2</sub> puis la mise sous vide a été répétée une nouvelle fois. Les autres étapes de transformation des fruits se sont avérées identiques à celles appliquées pour la production de jus en conditions d'oxydation favorisée, si ce n'est qu'elles se sont déroulées sous atmosphère inerte (présence de CO<sub>2</sub> ou de N<sub>2</sub>, absence d'oxygène).



### III. 2. 3. 2. Production de 100 L de jus de *Dous Moen* fortement et faiblement oxydés (presse à paquets)

Un grand volume de jus a été préparé afin de disposer d'un extrait phénolique en quantité suffisante pour permettre la purification de produits d'oxydation colorés ou de composés phénoliques natifs incolores non disponibles commercialement. La variété *Dous Moen* génère des moûts fortement colorés, elle a donc été sélectionnée pour produire environ 100 L de jus oxydé. Comme indiqué dans le paragraphe précédent, les lots de fruits ont été homogénéisés et triés avant transformation.

### III. 2. 3. 3. Production de moût oxydé

Un lot de 50 kg et trois lots de 40 kg de fruits à maturité ont été broyés. La râpure a subi un cuvage de 20 min en présence d'air, avec brassage manuel au bout de 10 min dans le but de favoriser le contact de la pulpe avec l'oxygène. Des gâteaux de râpure ont ensuite été chargés sur une presse à paquets puis pressés en conditions standards. Les substances pectiques ont été dégradées par voie enzymatique à 10°C, par ajout de 2.5 mL de préparation enzymatique pectinolytique (Endozym Pectofruit, Spindal, Gretz-Armainvilliers, France) par hectolitre de jus brut. Le jus traité a été stocké une nuit à 2°C afin de laisser décanter la majeure partie des particules du moût brut. De la même façon que pour les jus réalisés en petits volumes sur l'hydropresse (cf III. 2. 3. 1. ), ce moût a été soutiré puis microfiltré à 0.14 µm par microfiltration tangentielle (membrane Inside Céram, 39 canaux, diamètre hydraulique de 2.5, Siva Diam, Nyons, France). Il a été échantillonné puis conservé à -25°C en vue d'utilisations ultérieures.

Par ailleurs, certains composés phénoliques natifs incolores ne sont pas disponibles commercialement, c'est notamment le cas de l'acide *para*-coumaroylquinique et du xyloglucoside de phlorétine. Les études ultérieures en solution modèle entreprises au cours de ce travail impliquaient de disposer de ces composés, il a donc fallu les purifier à partir d'un extrait phénolique complexe préservé au mieux de l'oxydation. Pour obtenir cet extrait, 100 L de jus de *Dous Moen* « faiblement oxydé » ont été produits.

### III. 2. 3. 4. Production de moût non oxydé

Le matériel de transformation disponible en halle technologique pour produire de tels volumes de jus (râpe et presse à paquets) (Figure 44) ne permettent pas un inertage total du système sous CO<sub>2</sub> ou sous N<sub>2</sub> lors de la transformation des fruits. Par conséquent, le procédé a été adapté au mieux et des précautions ont été prises tout au long de la transformation pour limiter au maximum l'impact de

---

<sup>4</sup> Dans ce type de presse, la pulpe contenue dans une toile est comprimée contre une grille de drainage, appelée corbeille, par un boudin gonflé d'eau. Le rendement d'extraction est plus faible que dans le cas d'une presse à paquets.

l'oxygène sur le moût résultant. Les pommes à maturité ont d'abord été placées une nuit à 10 °C dans une atmosphère dépourvue d'oxygène, dans des fûts contenant de la neige carbonique (CO<sub>2</sub>). Quatre lots d'environ 45 kg de fruits ont été transformés successivement. Les fruits ont été introduits dans la râpe en présence de galets de neige carbonique et une pulvérisation à débit constant d'une solution d'acide malique et de fluorure de sodium, respectivement à 1 et 2 g.kg<sup>-1</sup> de pommes transformées, a été appliquée à la pulpe en sortie de râpe. Le fluorure de sodium agit comme un inhibiteur de l'activité de la polyphénol oxydase (Janovitz-Klapp et al., 1990). Le pH acide permet de potentialiser l'action de cet inhibiteur. En fin de pulvérisation, la râpura a subi un brassage manuel de manière à permettre une meilleure diffusion de la solution parmi les fragments de matériel végétal. S'en est suivi un cuvage de 20 min, comme pour la transformation au cours de laquelle le contact de la pulpe avec l'air avait été favorisé. Les gâteaux de râpura ont été installés rapidement sur la presse à paquets puis le pressage s'est déroulé dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Le moût brut a été récupéré dans des seaux inertés préalablement par de la neige carbonique (CO<sub>2</sub>) puis stocké dans une cuve dont l'atmosphère avait été également enrichie en CO<sub>2</sub>. Les moûts résultant des quatre pressées successives ont été rassemblés et homogénéisés puis l'enzymage a été réalisé de la même façon que pour le moût brut fortement oxydé. Le produit a été stocké une nuit à 2°C sous azote. Après soutirage et microfiltration tangentielle, le jus de pomme faiblement oxydé a été conditionné et conservé à -25°C jusqu'à analyse.



**Figure 44 - Photographie de la presse à paquets utilisée pour produire les jus de *Dous Moen* en grand volume<sup>5</sup>**

<sup>5</sup> Dans ce type de presse, classiquement utilisée dans les cidreries fermières et artisanales, la mise en pression est réalisée par un vérin hydraulique. La râpura à presser est répartie en différentes sous-unités appelées « paquets ». Chaque paquet comprend une couche de râpura (gâteau) retenue par des toiles en fibres synthétiques séparées par des grilles pour drainer le jus.

### III. 2. 3. 5. Description de la couleur des jus au sein du système

#### CIE $L^*a^*b^*/L^*C^*h$

La couleur des jus de pomme a été caractérisée en se référant aux paramètres de couleurs définis par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Les spectres d'absorption dans la gamme du visible ont été mesurés entre 400 et 700 nm, par pas de 5 nm, en spectrophotométrie (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne). Ces données ont ensuite été converties en paramètres CIE  $L^*$ ,  $a^*$ , et  $b^*$  par traitement mathématique comme décrit au paragraphe II. 1. 3. 1. , en considérant un observateur standard selon un angle de  $10^\circ$  et avec l'illuminant de référence D65 (correspondant à une lumière naturelle en plein jour en zone tempérée, avec une température de couleur de 6500 K). Ces paramètres de couleur ont également été exprimés et discutés en termes de coordonnées angulaires : luminance  $L^*$ , chroma  $C^*$  (« intensité colorante ») et angle de teinte  $h$ .

### III. 2. 3. 6. Extraction en phase solide des polyphénols présents dans les jus de pomme

Les polyphénols présents dans les jus produits en petits volumes ont été extraits sur phase solide de silice greffée en C18 (5 g Sep-Pak Vac 20cm<sup>3</sup>, cartouche C18, Waters, Milford, MA, USA) (Figure 45). La phase de silice a d'abord été pré-conditionnée avec 30 mL de méthanol et 40 mL d'eau ultra-pure acidifiée à l'acide acétique 1%, V/V.



Figure 45 – Photographie des différents jus oxydés chargés sur les cartouches de silice greffée en C18 pour l'extraction des polyphénols (De gauche à droite : jus de *Dous Moen* produit en grand volume, jus de *Dous Moen* produit en petit volume, jus de *Marie Ménard*, jus de *Guillevic* et jus de *Petit Jaune*.)

L'activité polyphénol oxydase (PPO) résiduelle, potentiellement présente dans les jus microfiltrés, a été inhibée par addition de fluorure de sodium à  $0.2 \text{ g.L}^{-1}$  en concentration finale. Les jus ont été dilués deux fois avec de l'eau acidifiée (acide acétique 1%, V/V) puis transférés sur la phase solide. Celle-ci a été lavée par rinçage avec 40 mL d'eau acidifiée (acide acétique 1%, V/V), les sucres présents dans les jus ont ainsi été éliminés. Les polyphénols retenus sur la silice ont ensuite été élués avec 40 mL

d'un mélange méthanol/eau acidifiée à l'acide acétique 1%, 50/50, V/V. Les extraits phénoliques purifiés ont été concentrés sous vide, congelés à -25°C et lyophilisés. Ils ont été conservés sous Argon, en dessiccateur, jusqu'à analyse.

### **III. 2. 3. 7. Extraction des polyphénols du jus de *Dous Moen* produit en grand volume**

Les polyphénols des 100 L de jus fortement et faiblement oxydés de *Dous Moen* ont été extraits en phase solide sur une résine Amberlite™ FPX66 prévue pour un usage alimentaire (constituées de billes de 0.60-0.75 mm de diamètre en moyenne, Rohm and Haas Company, Philadelphia, USA). Cette résine a été introduite dans une colonne en verre de 200 mm de diamètre et 500 mm de hauteur utile, munie d'un plateau fritté en entrée et en sortie, pour un volume de résine de 16 L. Les transferts de liquide vers la colonne ont été réalisés à l'aide d'une pompe péristaltique (Gear Pump Drive, modèle 75211-27) équipée de tuyaux en silicone ( $\emptyset$  interne/externe : 4.8/10 Masterflex® - Cole Parmer, Instrument Company). Les liquides en sortie de colonne ont été contrôlés par mesure de la densité optique à 280 nm et par mesure de conductivité à l'aide d'un appareil de chromatographie basse pression (Bio-Rad Biologic LP).

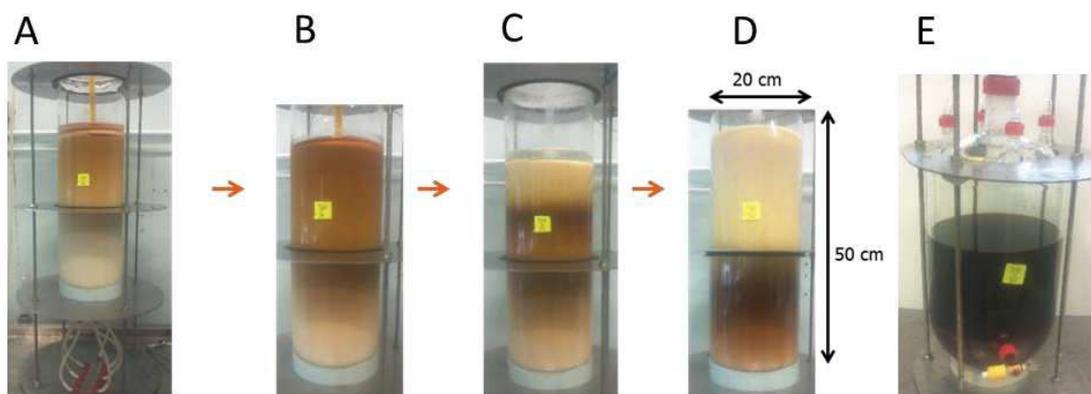
La résine, initialement conservée dans l'éthanol 96°, a été conditionnée par un premier rinçage avec 50 L d'eau osmosée afin d'éliminer l'alcool. Après avoir subi un brassage délicat, elle a été à nouveau rincée en flux descendant avec 15 L d'eau osmosée.

Après décongélation, le moût oxydé de *Dous Moen* microfiltré (103 L) a été chargé sur la colonne en flux descendant, à un débit constant de 30 L.h<sup>-1</sup> (Figure 46). Le chargement s'est poursuivi jusqu'à l'observation d'une augmentation d'absorbance mesurée en sortie de colonne. En effet, ceci indique une « fuite » de polyphénols, signifiant que la capacité de rétention maximale de la résine est atteinte. Un rinçage avec 50 L d'eau osmosée a alors été opéré, toujours au même débit et en flux descendant puis les composés d'intérêt ont été élués par un flux descendant de 20 L d'éthanol 96° de qualité alimentaire. La résine a été régénérée par passage de 20 L d'alcool supplémentaires puis stockée dans ce solvant.

L'extrait hydro-éthanolique de polyphénols a été concentré sous vide jusqu'à obtenir un volume final inférieur à 4 L. Il a ensuite été congelé à -25°C, lyophilisé et la poudre ainsi obtenue (290 g) a été conservée à l'obscurité, en bocal hermétique, en présence d'absorbants d'oxygène (ATCO, sachets HV, laboratoires STANDA, Caen, France). Cette fraction lyophilisée a été dénommée DMOX.

La même procédure a été employée pour l'extraction des polyphénols du jus faiblement oxydé de *Dous Moen* produit en grand volume (93L).<sup>6</sup> Ce jus a ensuite été chargé sur la colonne en flux

ascendant jusqu'à la fin de l'opération. Deux rinçages successifs (50 puis 40 L) à l'eau osmosée acidifiée à 0.1% d'acide acétique ont été réalisés avant élution à l'éthanol 96° comme décrit pour le jus fortement oxydé. Cette légère acidification était une précaution employée pour limiter les risques d'oxydation des polyphénols natifs adsorbés sur la résine. Les étapes de concentration et de conditionnement de l'extrait final se sont également déroulées de la même façon que pour le moût oxydé. Dans ce cas, la fraction lyophilisée obtenue a été dénommée DMNOX.



**Figure 46 – Fractionnement à l'échelle préparative des polyphénols du jus oxydé de *Dous Moen* sur résine Amberlite™ FPX66 pour la production de la fraction DMOX (A : dépôt du jus, B : rinçage à l'eau acidifiée, C & D: début et fin d'élution de la fraction phénolique par l'alcool à 96°, E : Fraction de polyphénols récupérée)**

### III. 2. 4. ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES COLORES PRESENTS DANS LES JUS DE POMME

#### III. 2. 4. 1. Profilage des polyphénols colorés par CLHP-DBD-SM

Les extraits phénoliques ont été analysés sur un système constitué d'un dégazeur SCM1000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), d'une pompe binaire haute pression 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), et d'un injecteur Autosampler Surveyor dont le portoir d'échantillons était thermostaté à 4°C (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Deux détecteurs sont connectés en série : un détecteur UV-Visible à barrette de diodes (modèle UV6000 LP, Thermo Finnigan) et un spectromètre de masse de type « piège à ions » équipé d'une source à électronebulisation (ESI - modèle LCQ Deca, Thermo Finnigan). Les séparations chromatographiques ont été réalisées en phase inverse greffée en C18 sur une colonne ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 x 150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies). Cette colonne était munie d'une pré-colonne ZORBAX

<sup>6</sup> Néanmoins, il faut préciser ici que l'injection de ce jus sur la colonne a entraîné très rapidement un bouchage des frittés situés en sortie basse. Il a donc été nécessaire de décolmater ces frittés par des successions de pompages en flux ascendant/descendant (back-flush) durant une heure.

Eclipse XDB-C8 (2.1 x 12.5 mm, 5  $\mu$ m, Agilent Technologies). Les conditions d'analyse pour cette partie de l'étude ont été adaptées de la méthode utilisée par (Guyot et al., 1998).

Le four contenant la colonne était thermostaté à 30°C. Deux microlitres d'échantillon ont été injectés pour chaque analyse. Le système de solvant était composé d'un gradient d'eau acidifiée à 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile acidifié à 0.1% d'acide formique (solvant B). Ces solvants ont été filtrés respectivement sur acétate de cellulose et sur PTFE à 0.45  $\mu$ m (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), avant utilisation. Le gradient d'élution suivant a été appliqué à un débit de 0.2 mL.min<sup>-1</sup> : conditionnement initial, 3% de B ; 0-5 min, augmentation linéaire à 9% de B ; 5-15 min, augmentation linéaire à 16% de B ; 15-45 min, augmentation linéaire à 50% de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement.

La détection en UV-Visible couvrait la gamme de longueurs d'onde de 240 à 600 nm. Une attention particulière a été accordée aux profils chromatographiques obtenus à 420 nm puisque les composés phénoliques jaunes-oranges ciblés dans cette étude présentent une forte absorbance à cette longueur d'onde dans la gamme du visible.

L'éluat est dirigé vers la source du spectromètre de masse à partir de 2 min d'élution et jusqu'à 47 min afin d'éviter son encrassement. La détection est effectuée en mode négatif, plus adapté à l'analyse des polyphénols qui nous concernent. Dans le cas le plus courant, les signaux obtenus correspondent aux molécules déprotonées [M-H]<sup>-</sup>. Les paramètres de source appliqués sont les suivants : tension de spray, 3.7 kV ; tension du capillaire, -70V ; gaz principal, 67 u.a.; gaz auxiliaire, 5 u.a.; et température de capillaire, 240°C. Le diazote (N<sub>2</sub>) sert à pulvériser l'échantillon sous forme de gouttelettes et à les assécher afin d'obtenir les ions pseudo-moléculaires. L'hélium est utilisé comme gaz de stabilisation, de focalisation et de collision pour fragmenter les ions en SM<sup>n</sup>. Les acquisitions en « Full Scan » permettent d'obtenir des spectres sur une gamme de masses (m/z) comprises entre 50 et 2000. Un mode de scan MS/MS automatique dépendant du « Full scan » a également été inclus dans la méthode d'analyse : il permet d'obtenir à chaque instant le spectre de fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire le plus intense détecté en « Full scan ». Une énergie de collision de 35% a été sélectionnée arbitrairement pour ce mode MS/MS. Les données obtenues ont été traitées avec le logiciel Xcalibur 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

### **III. 2. 4. 2. Collage à la gélatine de l'extrait phénolique oxydé du jus de *Dous Moen***

La gélatine est un agent de collage bien connu, couramment utilisé lors de la production de boisson pour éliminer une partie des tannins (Lea, 1995). Dans cette étude, la solution de gélatine et l'extrait purifié de polyphénols issu du jus oxydé de la variété « *Dous Moen* » (produit en grand volume, III. 2. 3. 2. ), ont été solubilisés dans un tampon malate à 20 mM, pH 4.2. Les concentrations finales en

gélatine et en extrait phénolique étaient de 1 g.L<sup>-1</sup>. Le milieu d'incubation a été placé à température ambiante sous agitation douce durant les 30 premières minutes puis sans agitation durant 15 min. Après centrifugation de 30 min (4000 tr/min, modèle de rotor JA-10, Beckman Coulter, Villepinte, France), le surnageant a été récupéré et analysé en CLHP-DBD-SM dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (§ III. 2. 4. 1. ).

### **III. 2. 4. 3. Analyse des polyphénols natifs par CLHP-DBD-SM**

Des aliquotes (500 µL) de jus lyophilisés ont été extraits par 1.2 mL de méthanol acidifié à 1% d'acide acétique, V/V, pour l'analyse des polyphénols natifs, incluant les catéchines, les procyanidines de faible poids moléculaire, les acides hydroxycinnamiques, les dihydrochalcones et les flavonols. Les extractions ont été réalisées en triplicata. Après homogénéisation, les milieux d'extraction ont été placés dans la glace et aux ultra-sons pendant 15 min. Les échantillons ont ensuite été filtrés sur PTFE 0.45 µm (VWR) puis analysés par CLHP-DBD-SM. Lorsque cela s'est avéré nécessaire pour éviter la saturation du détecteur UV-visible, des dilutions ont été réalisées avec un mélange de méthanol/eau acidifiée à l'acide formique 0.5%, 50/50, V/V. Le système analytique CLHP-DBD-SM est le même que celui décrit précédemment (§ III. 2. 4. 1. ), exceptée pour la colonne de séparation chromatographique : il s'agissait ici d'une colonne Hibar HR Purospher STAR RP-18 (150 mm x 2.1mm, 3 µm, Merck) à nouveau munie d'une pré-colonne ZORBAX Eclipse XDB-C8 (2.1 x 12.5 mm, 5 µm, Agilent Technologies). Les conditions d'analyse étaient identiques également. Le système de solvant était composé d'un gradient d'eau acidifiée à 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile acidifié à 0.1% d'acide formique (solvant B). Ces solvants ont été filtrés respectivement sur acétate de cellulose et sur PTFE à 0.45 µm (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), avant utilisation. Le gradient d'élution suivant a été appliqué à un débit de 0.2 mL.min<sup>-1</sup> : conditionnement initial, 3% de B ; 0-3 min, augmentation linéaire à 7% de B ; 3-21 min, augmentation linéaire à 13% de B ; 21-27 min, linéaire à 13% de B ; 27-41 min, augmentation linéaire à 20% de B ; 41-51 min, augmentation linéaire à 45% de B ; 21-27 min, linéaire à 13% de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement.

Les composés natifs ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention, leurs spectres UV/visible, et leurs spectres « full MS » avec ceux des standards disponibles. Ils ont été quantifiés en intégrant l'aire des pics obtenus sur les chromatogrammes en UV/visible. L'intégration s'est faite à 280 nm pour la quantification des flavan-3-ols, des procyanidines et des dihydrochalcones, à 320 nm pour celle des acides hydroxycinnamiques et à 350 nm pour celle des flavonols, en fonction du maximum d'absorbance de chaque classe de composés. La (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la procyanidine B2, l'acide caféoylquinique, la phloridzine et l'hyperoside ont été quantifiés en utilisant leurs propres coefficients de réponse obtenus pour le système analytique utilisé. La quantification des autres composés a été effectuée en utilisant les coefficients de réponse de composés appartenant aux mêmes classes phénoliques et présentant des spectres UV/visible similaires. Dans le détail, la

procyanidine B1 a été quantifiée en se référant au coefficient de réponse de la procyanidine B2, les trimères et tetramères de procyanidines selon celui de la (-)-épicatéchine, les isomères de l'acide p-coumaroylquinique selon la réponse de l'acide p-coumarique, le xyloglucoside de phlorétine en se référant à la phloridzine et les flavonols par rapport à l'hyperoside.

### III. 2. 4. 4. Détermination de la concentration totale en procyanidines et de leur degré moyen de polymérisation par analyse en CLHP après phloroglucinyse

La phloroglucinyse est une réaction de dépolymérisation des procyanidines en milieu acide en présence d'un excès de phloroglucinol. Les sous-unités terminales sont libérées dans le milieu réactionnel en tant que monomères de flavan-3-ols. En revanche, les sous-unités d'extension sont libérées en tant qu'intermédiaires électrophiles (carbocations) immédiatement piégés par un agent nucléophile, ici le phloroglucinol. Cette réaction génère donc des adduits facilement analysables par les méthodes de chromatographie utilisées couramment pour l'analyse des polyphénols. Ainsi la phloroglucinyse donne accès à la concentration totale en flavanols (incluant les catéchines et les procyanidines), à la concentration totale en procyanidines (par soustraction des catéchines) et à la composition en sous-unités flavanoliques des procyanidines, on peut alors calculer un degré de polymérisation moyen ( $DP_m$ ) de celles-ci.

$$DP_m = \frac{\sum([Xf] - [Xi]) + \sum([Xadd])}{\sum([Xf] - [Xi])}$$

Avec [Xf]: concentration molaire totale en monomères flavan-3-ols après phloroglucinyse ; [Xi]: concentration molaire des monomères flavan-3-ols sans traitement par phloroglucinyse ; [Xadd]: la concentration en adduits flavan-3-ols monomères phloroglucinol ; X : les différentes unités monomériques possibles : (+)-catéchine, (-) épicatechine.

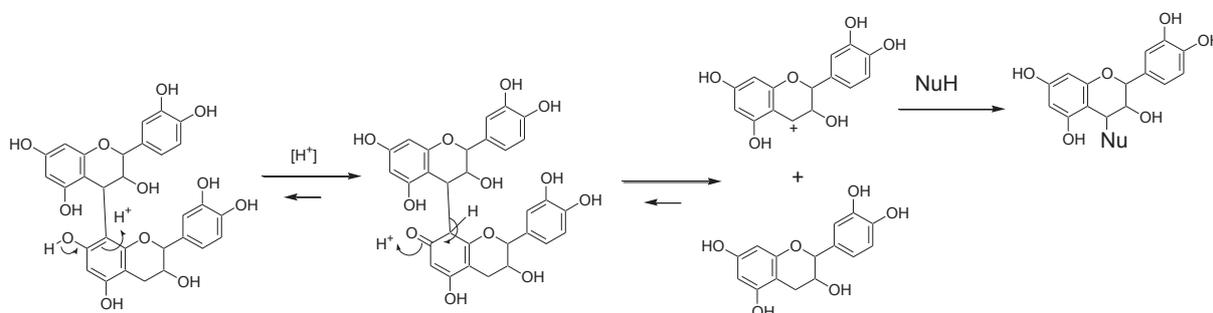


Figure 47 – Mécanisme réactionnel hypothétique expliquant la dépolymérisation des procyanidines en milieu organique acide (Kennedy and Jones 2001) ; NuH : composé nucléophile en excès dans le milieu réactionnel, par exemple ici le phloroglucinol

Le mode opératoire pour la phloroglucinolyse a été adapté des travaux de Kennedy et Jones (Kennedy and Jones, 2001) (Figure 46). Les réactions ont été faites en triplicata pour chaque jus considéré (pour les quatre variétés, jus fortement et faiblement oxydés). Une extraction a d'abord été réalisée sur 500  $\mu\text{L}$  de jus préalablement lyophilisé, en utilisant 400  $\mu\text{L}$  de méthanol acidifié par l'acide chlorhydrique à 0.3 N au final. Après ajout de phloroglucinol (à 50  $\text{g.L}^{-1}$ ) et d'acide ascorbique (à 10  $\text{g.L}^{-1}$ ), le milieu réactionnel a été incubé à 50°C pendant 30 min. La réaction a été arrêtée en plaçant les tubes dans la glace et en ajoutant 1,2 mL d'acétate de sodium à 0.2 M au milieu de phloroglucinolyse. Les échantillons ont ensuite été filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$  sur PTFE (VWR) puis analysés par CLHP-DBD-SM. Lorsque cela s'est avéré nécessaire afin d'éviter la saturation du détecteur UV-visible, des dilutions ont été réalisées avec un mélange de méthanol/eau acidifiée à l'acide formique 0.5%, 50/50, V/V. Le système d'analyse est identique à celui décrit pour l'analyse des polyphénols natifs (cf § III. 2. 4. 3. ). Le gradient d'élution suivant a été appliqué à un débit de 0.2  $\text{mL.min}^{-1}$  : conditionnement initial, 3% de B ; 0-3 min, augmentation linéaire à 7% de B ; 3-21 min, augmentation linéaire à 13% de B ; 21-27 min, linéaire à 13% de B ; 27-30 min, augmentation linéaire à 14.5% de B ; 41-51 min, augmentation linéaire à 45% de B ; 21-27 min, linéaire à 13% de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement. L'aire des pics correspondant aux produits de la réaction de phloroglucinolyse (c'est-à-dire (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, et adduit (-)-épicatéchine-phloroglucinol) a été intégrée sur les chromatogrammes à 280 nm et la quantification a été réalisée en utilisant les coefficients de réponse des standards de référence.

### **III. 2. 4. 5. Purification et analyse d'un nouveau composé coloré à partir de la fraction DMOX**

Des méthodes de Chromatographie de Partage Centrifuge et de Chromatographie Liquide Haute Performance à l'échelle semi-préparative ont été mises en œuvre dans l'objectif de purifier les composés jaunes responsables de la couleur des jus de pomme.

#### **▪ Fractionnement des molécules phénoliques colorées par Chromatographie de Partage Centrifuge**

##### Rappel du principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est une technique de chromatographie liquide-liquide dont le principe repose sur la différence de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un système biphasique : une phase stationnaire et une phase mobile. Il s'agit d'une technique de Chromatographie à Contre-Courant (CCC) hydrostatique car le mouvement de rotation de la colonne ne s'effectue qu'autour d'un seul axe. La sélection du système de solvants en CPC est une étape essentielle dans la mesure où cela s'apparente au choix d'une colonne et d'un éluant en CLHP. (Figure 48)

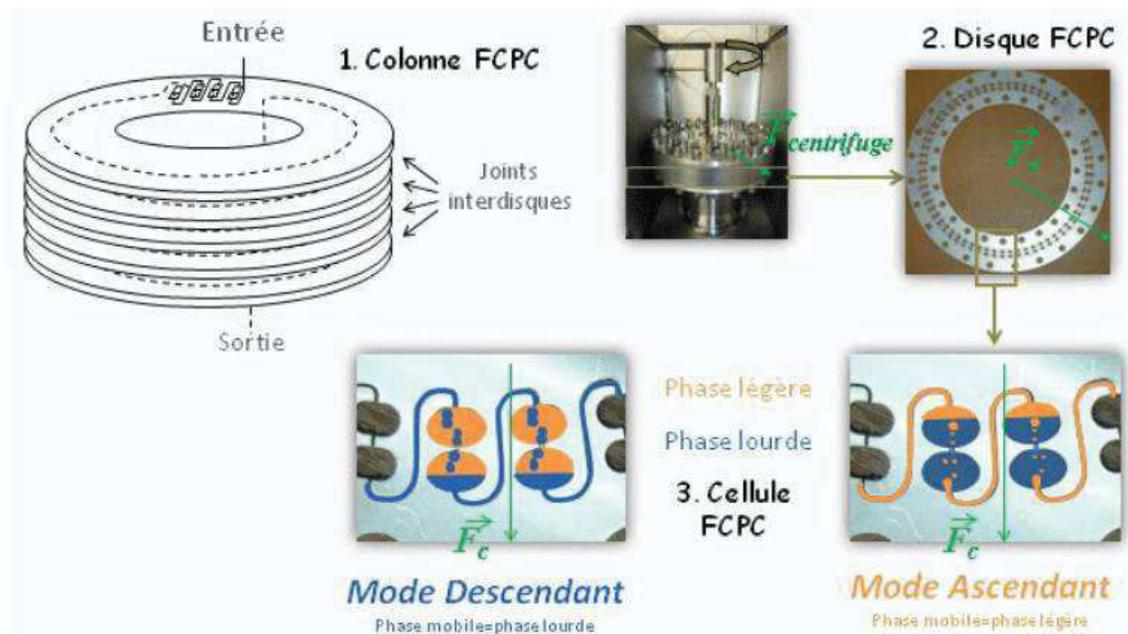
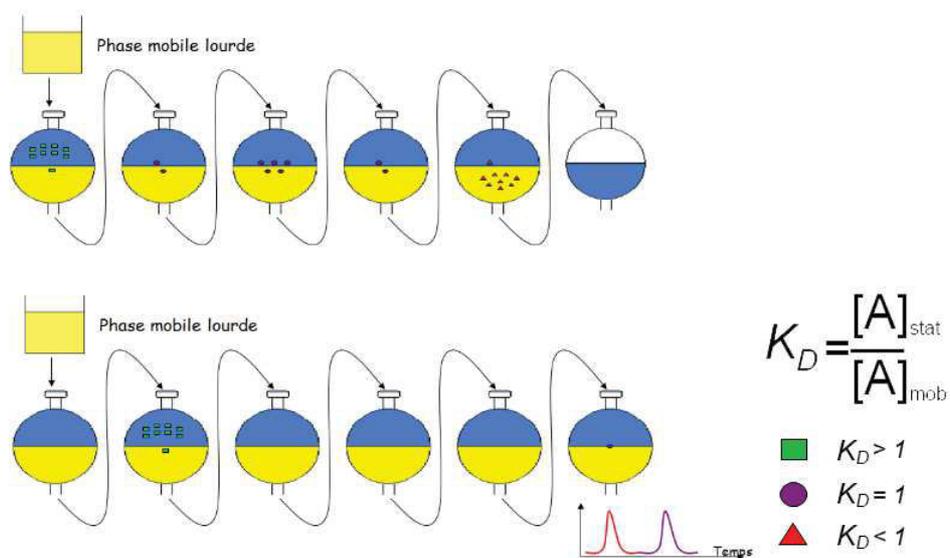


Figure 48 - Schéma du principe de Chromatographie de Partage Centrifuge (illustration provenant du site du fournisseur Kromaton)

Il doit être bien adapté à l'objectif de séparation des composés ciblés dans un mélange complexe, l'idéal étant d'approcher un coefficient de partage ( $K_D$ ) proche de 1. La Figure 49 donne une explication du calcul du  $K_D$ . Le calcul de ce coefficient permet de définir l'affinité du soluté pour chacune des phases et de choisir le mode de pompage, ascendant ou descendant, à utiliser pour permettre une bonne séparation du composé d'intérêt. En mode ascendant, la phase mobile correspond à la phase légère alors qu'en mode descendant la phase mobile correspond à la phase lourde.



**Figure 49 - Schéma explicatif pour le calcul du coefficient de partage (illustration provenant du site internet du fournisseur Kromaton)**

Des systèmes multi-solvants ont été développés en faisant varier la proportion de chaque solvant : des séries de systèmes tels que chloroforme/méthanol/eau ou n-hexane/acétate d'éthyle/n-butanol/méthanol/eau permettent de couvrir une gamme de polarité assez large, tout en fournissant des systèmes biphasiques avec un ratio de volume proche de un. Une série de systèmes de solvants numérotés de 1 à 16 ont été décrits par Oka et al. (Oka et al., 1991) et permettent de trouver simplement et rapidement un système permettant d'obtenir un coefficient de partition proche de 1 pour nos composés d'intérêt.

#### Appareil, système de solvant et mode opératoire utilisé :

L'appareil de CPC utilisé est composée d'une pompe (Pump 307 Gilson), d'un rotor de 200 mL (FCPC®-A Kromaton), et d'un détecteur UV-visible mono-longueur d'onde (UV-VIS 151 Gilson) couplé au logiciel d'acquisition DataQ Instrument Hardware Manager. La colonne située dans le bâti de la CPC est constituée de disques TwinCell. Afin d'isoler les cellules d'un disque à un autre, des joints sont positionnés entre les disques adjacents. Ceux-ci sont alignés de façon à ce que les cellules soient positionnées en série pour créer des centaines d'étages d'extraction (Figure 48).

Des tests préliminaires de partage liquide/liquide de la fraction DMOX ont été effectués pour sélectionner un système de solvants adapté à la séparation de plusieurs composés jaunes orangés associés aux pics bien résolus sur les chromatogrammes à 420 nm. Les tests se sont portés sur 8 systèmes de solvants en se basant sur la bibliographie ((Delaunay et al., 2002); (Foucault and Chevotot, 1998); (Lu et al., 2009)). La distribution des composés entre les deux phases a été déterminée par analyse en CLHP-DBD-SM afin de calculer leur  $K_D$ , ce qui a permis de choisir le système de solvants le plus adapté pour leur séparation en CPC.

#### Mode opératoire retenu pour le fractionnement de la fraction DMOX (en vue de la purification du produit 6, XPL-EC/Ox) :

Le système de solvant retenu a été le système n°13 proposé par Oka et al., 1991 : acétate d'éthyle/n-butanol/eau, 3/5/2, V/V/V, en mode descendant.

Le fractionnement a porté sur Xx grammes de fraction DMOX solubilisée dans un mélange des deux phases, le débit était de 10 mL.min<sup>-1</sup> et un total de 23 fractions a été collecté. Le produit 6 a été élué de façon préférentielle dans les fractions n° 11 et n°12. Le produit 6 a ensuite fait l'objet d'une purification par CLHP en phase inverse à l'échelle semi-préparative.

- **Purification du produit 6 par CLHP en phase inverse à l'échelle semi-préparative**

Les fractions collectées en CPC et contenant le produit 6 ont fait l'objet d'une purification par CLHP à l'échelle semi-préparative sur un système composé de deux pompes haute pression Dynamax SD300 Rainin, d'un injecteur manuel équipé d'une vanne Rheodyne et d'une boucle d'injection de 5 mL, d'une colonne Eclipse XDB C18, 21 x 150 mm, l'ensemble étant couplé à un détecteur UV-visible Gilson UV/vis 151. Le système de solvants utilisé était composé d'eau acidifiée à 0.5% d'acide acétique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution suivant a été appliqué à un débit de 20 mL.min<sup>-1</sup> : conditionnement initial, 3% de B; 0-5 min, augmentation linéaire à 9% de B ; 5-10 min, augmentation linéaire à 16 % de B; 10-25 min, augmentation linéaire à 20% de B; 25-27 min, augmentation linéaire à 90% de B puis 2 min de lavage de la colonne et reconditionnement. La détection à 420 nm a été utilisée pour la collecte du produit jaune. Au final, les fractions collectées ont été regroupées, évaporées sous vide et lyophilisées.

#### Analyse en spectrométrie de masse du produit 6 en mode MS<sup>n</sup> (piège ionique) :

Le spectromètre de masse est une trappe ionique (piège à ions) LCQDECA (ThermoFinnigan, San Jose, USA) équipée d'une source d'électronébullition axiale utilisée ici en mode négatif. La fraction purifiée a été dissoute dans un mélange méthanol/eau/acide formique 999/999/2. Le débit d'infusion est 3-5 µL.min<sup>-1</sup>. Les conditions de source sont les suivantes: tension de source, 3,7 kV; gaz principal, 30 Da; température de capillaire, 200 °C. L'optique électronique a été préalablement ajustée par l'appareil en prenant comme composé de référence l'acide caféoylquinique. L'analyseur est en mode "Auto Gain Control". Un pré-scan permet à l'appareil d'optimiser les temps d'accumulation des ions dans le piège. Les acquisitions en "Full Scan" permettent d'obtenir des spectres de masse sur une grande gamme de masse. Les « Full Scan » sont acquis sur la gamme de masse 100-2000. Les acquisitions en MS/MS permettent d'isoler un ion spécifique, de le fragmenter et d'obtenir son spectre de fragmentation.

### **III. 2. 4. 6. Synthèse en solution modèle des deux colorants décrits précédemment**

La caractérisation complète par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de la structure du composé coloré 6 de 870 Da, noté XPL-EC/Ox, n'ayant pas été possible, la formation de ce composé par voie enzymatique a été explorée en solution modèle afin de valider l'hypothèse structurale d'un produit de couplage oxydatif entre une molécule de (-)-épicatéchine et une autre de xyloglucoside de phlorétine dans le cadre d'une catalyse enzymatique par la polyphénoloxydase. Les deux substrats phénoliques ont donc été incubés en présence d'un extrait de PPO de pomme à cidre.

#### Purification de xyloglucoside de phlorétine (XPL) issu d'un extrait phénolique de jus de *Dous Moen* faiblement oxydé

En premier lieu, le xyloglucoside de phlorétine n'étant pas disponible commercialement, il a été purifié pour les besoins de l'étude à partir de l'extrait DMNOX. La quantification des polyphénols

natifs a révélé que ce composé représentait environ 2 % de la fraction DMNOX. Il a fait l'objet d'une purification par CLHP à l'échelle semi-préparative. La détection en UV-visible s'est faite à 280 nm. Dans ces conditions, le xyloglucoside de phlorétine présente un temps de rétention de 20,4 min. Huit injections successives de 100 mg d'extrait DMNOX ont permis de collecter huit fractions qui ont par la suite été regroupées, concentrées sous vide et lyophilisées. Au final, une fraction de 18,3 mg a été récupérée. Avant utilisation pour l'incubation enzymatique, la pureté du composé a été vérifiée par analyse en CLHP-DBD-SM.

#### Incubation de (-)-épicatéchine (EC) et de xyloglucoside de phlorétine (XPL) en présence de PPO en solution modèle type jus oxydé de *Dous Moen*

Afin de se placer dans les conditions du jus de *Dous Moen* oxydé à partir duquel XPL-EC/Ox a été extrait et purifié, un tampon malate à 29 mM et pH 3.9 a été préparé puis dégazé sous Argon et conservé une nuit dans une enceinte hermétique en présence d'absorbants d'oxygène (ATCO, sachets HV, laboratoires STANDA, Caen, France).

L'extrait de polyphénol oxydase (PPO) utilisé était disponible au laboratoire et avait été préalablement préparé à partir de la variété de pomme à cidre *Dous Coet* selon le protocole de Le Bourvellec et al (Le Bourvellec et al., 2004).

#### Préparation du milieu réactionnel

Le milieu réactionnel a été préparé de manière à ce que XPL et EC se retrouvent aux mêmes concentrations massiques que dans le jus oxydé de *Dous Moen*, c'est-à-dire respectivement à 38,9 mg.L<sup>-1</sup> et 85,2 mg.L<sup>-1</sup> (se référer au tableau détaillé récapitulant les teneurs en polyphénols natifs dans les différents jus étudiés, Tableau 4), dans un volume final de 5 mL après ajout de 500 µL d'extrait enzymatique. Il est considéré qu'en diluant 10 fois l'extrait enzymatique, le niveau d'activité enzymatique obtenu est proche de celui qui a été mesuré pour la PPO de *Dous Moen* (Baron et al., 2011). Le milieu est resté sous agitation tout au long de l'incubation enzymatique, à 25°C, et sous flux d'air saturé en eau. Cette dernière disposition a permis d'éviter l'évaporation au cours du temps (cinétique de 29h).

#### Suivi de la cinétique enzymatique

La cinétique de formation du codimère XPL-EC/Ox et celle du PXGOPj ont été suivies en réalisant dix prélèvements de 200 µL de milieu réactionnel, à 0 min (juste avant ajout de l'enzyme), 2, 5, 10, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h et 29h. Lors des prélèvements, la réaction a été stoppée par addition d'un inhibiteur de l'activité PPO, le fluorure de sodium (0.2 g.L<sup>-1</sup> en concentration finale) et le milieu a été dilué cinq fois avec un mélange de méthanol/eau acidifiée à l'acide formique 0.5%, 50/50, V/V.

Les échantillons homogénéisés ont été filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$  sur PTFE puis 2  $\mu\text{L}$  ont été analysés en CLHP-DBD-SM sur la colonne Eclipse XDB-C18. Le système et la méthode d'analyse sont identiques à ceux décrits au paragraphe III. 2. 4. 1. .

### **III. 2. 4. 7. Incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine en présence d'un extrait de PPO de pomme**

Les conditions d'incubation enzymatique, en termes de concentration en substrat phénolique, de pH et de niveau d'activité enzymatique, ont été sélectionnées en se basant sur des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Weber 2011; Caël 2014). Ceux-ci visaient à optimiser le rendement de la synthèse de produits jaunes-orangés dérivant de l'oxydation de la (-)-épicatéchine catalysée par la PPO de pomme. La (-)-épicatéchine a été préparée à 5 mM dans un tampon citrate-phosphate (respectivement à 22.1 et 55.7 mM) à pH 5.6. L'extrait de PPO utilisé était le même que celui précédemment préparé selon (Le Bourvellec et al., 2004). Il a été décongelé sous flux d'argon et soniqué extemporanément.

Le volume final de milieu réactionnel était de 1 L : 19,4 mL de l'extrait brut de PPO ont été ajoutés à 980 mL de la solution d'épicatéchine, ce qui équivalait à une activité enzymatique de 36 nkatal dans le milieu. L'incubation s'est déroulée à 25°C sous agitation continue et sous bullage d'air pour favoriser l'oxygénation du milieu. Après 40 min, la réaction d'oxydation a été arrêtée par ajout de 20 mL d'une solution de NaF à 10 g.L<sup>-1</sup>, soit 0,2 g.L<sup>-1</sup> en concentration finale, et le milieu a été placé dans la glace. Après 10 minutes de centrifugation à 8000g à 4°C pour éliminer la PPO particulaire, le surnageant a été filtré sous vide à 0.45  $\mu\text{m}$  sur nylon puis conservé sous CO<sub>2</sub> à 4°C jusqu'à purification en CLHP à l'échelle préparative. 2  $\mu\text{L}$  de ce milieu ont été prélevés et analysés en CLHP-DBD-SM selon les conditions décrites précédemment (§III. 2. 4. ).

#### Purification de produits d'oxydation jaunes-orangés dérivant de l'épicatéchine

Le tampon citrate-phosphate présent dans le surnageant du milieu d'incubation a été éliminé par CLHP à l'échelle préparative. Les quatre composés colorés repérés suite à l'analyse en CLHP-DBD-SM (deux dimères et deux trimères d'épicatéchine) ont alors fait l'objet d'une première étape de fractionnement. Le système utilisé était composé de deux pompes haute pression A et B (Dynamax SD 300 Rainin), d'un mélangeur, d'une colonne de séparation chromatographique équipée d'une phase inverse greffée en C18 (Lichrospher 100 RP, 50 x 200 mm, 12  $\mu\text{m}$ , Merck) et d'un détecteur UV-visible (Model UV1, Dynamax). Le système de solvant était composé d'un gradient d'eau acidifiée à 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution suivant a été appliqué à un débit de 40 mL.min<sup>-1</sup> : conditionnement initial, 0% de B ; 0-3 min, augmentation linéaire à 8% de B ; 3-10 min, augmentation linéaire à 15% de B ; 10-20 min, constant à 15 % de B ; 20-30 min, augmentation linéaire à 35% de B ; 30-40 min, constant à 35% de B ; 40-45 min, augmentation linéaire à 50% de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement.

La collecte des fractions a été réalisée par un suivi d'absorbance des produits jaunes à 420 nm. Après analyse en CLHP-DBD-SM (selon le protocole décrit au § III. 2. 4. 1.), les fractions collectées et contenant un même composé d'intérêt ont été regroupées, concentrées par évaporation sous vide et enfin lyophilisées. A ce stade, des extraits de 204 mg, 221 mg, 169 mg, 107 mg ont été respectivement obtenus pour le trimère de 862 Da, le trimère de 864 Da, le premier dimère de 576 Da à être élué (noté 576-1 par la suite) et le second dimère de 576 Da (noté 576-2).

La purification des composés a nécessité une seconde étape de fractionnement à l'échelle semi-préparative. L'équipement utilisé était le même que précédemment, excepté pour la phase inverse greffée en C18 (20 x 150 mm, 7 µm, ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent Technologies). Le système de solvants était également le même que celui mentionné ci-dessus. Les gradients, appliqués à un débit de 20 mL.min<sup>-1</sup>, ont été optimisés pour chaque composé d'intérêt :

- Pour le trimère de 862 Da : conditionnement initial, 3% de B ; 0-5 min, augmentation linéaire à 9% de B ; 5-15 min, augmentation linéaire à 16% de B ; 15-22 min, constant à 23,9 % de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement ;
- Pour le trimère de 864 Da : conditionnement initial, 3% de B ; 0-5 min, augmentation linéaire à 9% de B ; 5-15 min, augmentation linéaire à 16% de B ; 15-26 min, constant à 28,5 % de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement ;
- Pour les dimères de 576 Da : conditionnement initial, 3% de B ; 0-5 min, augmentation linéaire à 9% de B ; 5-15 min, augmentation linéaire à 16% de B ; 15-35 min, constant à 38,7 % de B ; puis lavage de la colonne à 90% de B et reconditionnement.

Les fractions collectées ont été analysées en CLHP-DBD-SM dans les conditions décrites au § III. 2. 4. 1. , regroupées selon leur composition, concentrées par évaporation sous vide puis lyophilisées. Au final, une fraction de 27,0 mg a été récupérée pour le trimère de 862 Da, 70,8 mg pour le trimère à 864 Da, 68,1 mg pour le dimère 576-1 et enfin 9,5 mg pour le dimère 576-2.

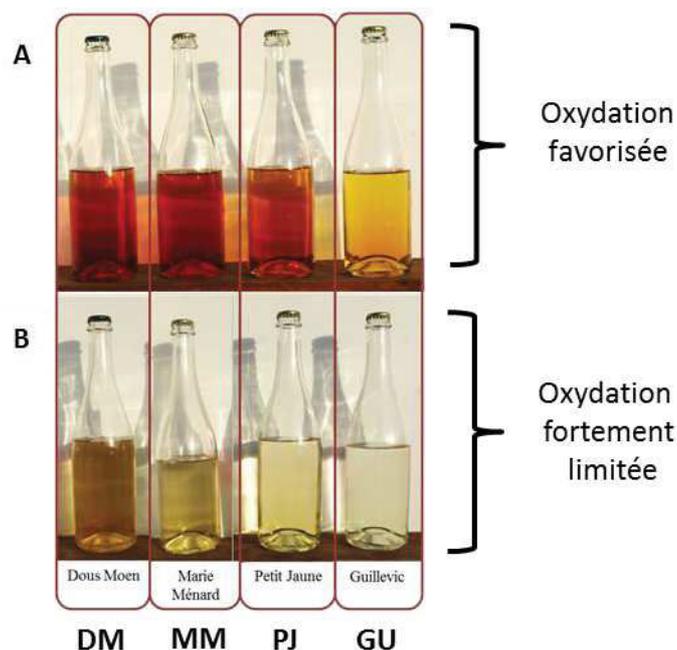
#### Caractérisation de deux déhydrotriépicatéchines de type A par RMN uni et bidimensionnelle (HMBC, HSQC)

Les fractions de trimères mentionnées précédemment étaient suffisamment pures pour que les composés fassent l'objet d'une caractérisation structurale par RMN. Les échantillons ont été dissous dans du méthanol deutéré. Les spectres RMN ont été enregistrés à 298 K sur un spectromètre RMN Bruker Avance 500 équipé d'une cryosonde 5 mm triple résonance (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N). L'attribution des déplacements chimiques a été réalisée à l'aide d'une série de spectres 2D homonucléaires et hétéronucléaires : DQF-COSY, TOCSY, <sup>13</sup>C-HSQC édité, <sup>13</sup>C-HSQC-TOCSY, <sup>13</sup>C-IMPACT-HMBC en utilisant les séquences standards fournies par Bruker. Ces spectres ont été enregistrés en mode phasé States-TPPI ou Echo-antiécho et ils ont été traités avec le logiciel Topspin.

### III. 3. RESULTATS & DISCUSSION

#### III. 3. 1. Diversité variétale de la couleur des jus de pomme

Quatre variétés de pomme à cidre ont été choisies pour leur classification dans des catégories de saveurs différentes en lien avec leurs différences marquées de composition en polyphénols (Sanoner et al., 1999). Des moûts clarifiés ont été produits à partir de ces fruits selon deux modalités contrastées vis-à-vis de l'oxydation au moment du râpage et du pressage des fruits (Figure 50).



**Figure 50 – Photographie des jus obtenus pour les quatre variétés de pomme à cidre utilisées (DM : *Dous Moen*, MM : *Marie Ménéard*, PJ : *Petit Jaune*, GU : *Guillevic*) ; A, favorisation de l'oxydation ; B, protection contre l'oxydation au cours du procédé de transformation.**

L'observation des produits obtenus après clarification (Figure 50) montre clairement les contrastes de couleur obtenus tant en termes de teinte que d'intensité.

**Tableau 2 - Paramètres colorimétriques CIE L\*, a\*, b\*, C\* et h correspondant aux différents jus de pomme produits en absence et en présence d'oxygène.**

| Variété             | Type d'oxydation | L*   |            | a*    |             | b*   |             | C*   |             | h     |            |
|---------------------|------------------|------|------------|-------|-------------|------|-------------|------|-------------|-------|------------|
| <i>Guillevic</i>    | O <sub>2</sub> - | 100  | <i>0,2</i> | -0,36 | <i>0,05</i> | 1,99 | <i>0,09</i> | 2,03 | <i>0,09</i> | 100   | <i>1</i>   |
|                     | O <sub>2</sub> + | 97,3 | <i>0,7</i> | -4,86 | <i>0,06</i> | 24,2 | <i>0,3</i>  | 24,7 | <i>0,3</i>  | 101,4 | <i>0,2</i> |
| <i>Petit Jaune</i>  | O <sub>2</sub> - | 99,8 | <i>0,1</i> | -0,49 | <i>0,06</i> | 4,11 | <i>0,06</i> | 4,13 | <i>0,07</i> | 96,8  | <i>0,8</i> |
|                     | O <sub>2</sub> + | 93,5 | <i>0,3</i> | -1,09 | <i>0,08</i> | 40,7 | <i>0,5</i>  | 40,8 | <i>0,5</i>  | 91,5  | <i>0,1</i> |
| <i>Dous Moen</i>    | O <sub>2</sub> - | 99,6 | <i>0,2</i> | -0,68 | <i>0,04</i> | 4,38 | <i>0,10</i> | 4,43 | <i>0,10</i> | 98,8  | <i>0,5</i> |
|                     | O <sub>2</sub> + | 86,6 | <i>0,4</i> | 5,55  | <i>0,37</i> | 79,0 | <i>0,9</i>  | 79,2 | <i>1,0</i>  | 86,0  | <i>0,2</i> |
| <i>Marie Ménard</i> | O <sub>2</sub> - | 99,3 | <i>0,3</i> | -0,80 | <i>0,07</i> | 4,45 | <i>0,04</i> | 4,52 | <i>0,05</i> | 100,1 | <i>0,8</i> |
|                     | O <sub>2</sub> + | 84,9 | <i>0,2</i> | 9,44  | <i>0,40</i> | 77,6 | <i>0,9</i>  | 78,1 | <i>1,0</i>  | 83,1  | <i>0,2</i> |

O<sub>2</sub>- : jus protégé de l'oxygène ; O<sub>2</sub> + : jus fortement oxydé ; L\* : Luminance ; a\* : valeur sur l'axe vert-rouge ; b\* : valeur sur l'axe bleu-jaune ; C\* : Chroma (« saturation ») ; h : valeur de l'angle de teinte en °.

Les valeurs en italique correspondent à l'écart-type (n=3).

Ce résultat est cohérent avec la gamme de couleurs attendue classiquement pour les produits cidricoles français et présentée au paragraphe II. 3. 1. . Les jus produits en conditions inertées (présence d'O<sub>2</sub> limitée) sont au contraire très pâles et très brillants, comme le confirment leurs valeurs de luminance L\* comprises entre 99.3 et 100.1 (Tableau 2). Les très faibles valeurs de C\* indiquent qu'ils sont presque incolores ou très légèrement colorés. Leur composante rouge, exprimée par les valeurs positives de a\*, est pratiquement nulle. Leur composante jaune, exprimée par les valeurs positives de b\*, est sensiblement différente pour le jus de *Guillevic*, les autres moûts préservés de l'oxydation se révèlent légèrement plus jaunes (b\*=2.0 pour *Guillevic*, et valeurs de 4.1 à 4.5 pour les trois autres). Les écarts de couleur considérables entre les jus oxydés et ceux préservés de l'oxydation mettent en évidence le rôle crucial et attendu de l'oxydation enzymatique dans la formation de la couleur des jus de pomme. En 2012, Falguera et al ont décrit les paramètres CIE L\*a\*b\* obtenus pour des jus produits à partir de six variétés de pommes (Falguera et al., 2012). La comparaison de leurs données avec nos résultats atteste d'une grande disparité dans les valeurs obtenues, en particulier pour L\* et a\*. Ces différences sont probablement liées aux procédés de transformation des fruits et au choix des variétés étudiées. En effet, ces auteurs ont utilisé des variétés de pommes de table or leurs teneurs et leurs profils polyphénoliques diffèrent clairement de ceux des variétés de pommes à cidre. Après oxydation, les valeurs de luminance restent particulièrement élevées pour les quatre jus considérés dans notre étude, variant de 84.9 à 97.3, tandis que celles des six jus produits dans l'étude de Falguera et al varient de 30.3 à 62.7. Ces derniers jus n'avaient subi qu'une seule centrifugation avant mesure de la couleur, ce qui pourrait expliquer leur luminance nettement plus faible. Dans nos travaux, les jus ont

été microfiltrés, générant ainsi des produits très brillants, très limpides. Les jus oxydés ont été réalisés dans des conditions relativement proches de celles des différentes étapes mises en œuvre en filière cidricole française. Malgré tous les facteurs de variations mentionnés ici, deux conclusions similaires se dégagent de ces deux études. En premier lieu, la couleur des jus diffère significativement selon la variété de pomme utilisée pour les produire. Ensuite, tous les jus oxydés présentent une composante jaune plus forte, dominant la composante rouge : des variations plus importantes ont été observées pour les valeurs de  $b^*$  que pour les valeurs de  $a^*$ , pour les quatre produits. Les systèmes CIE  $L^*a^*b^*$  et CIE  $L^*C^*h$  correspondent au même système de représentation des couleurs mais le premier définit une couleur par des coordonnées orthogonales alors que le second la définit en coordonnées angulaires. Les nuances colorées sont plus facilement décrites en faisant appel à la notion d'angle de teinte ( $h$ ) car ce paramètre reflète directement toute l'information colorée du jus, alors que les paramètres  $a^*$  et  $b^*$  doivent nécessairement être renseignés tous les deux pour fournir l'intégralité de cette information. Par conséquent, dans le cadre de ce travail, les couleurs des jus ont été définies principalement en utilisant l'angle de teinte. Le Tableau 2 récapitule les valeurs  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  et  $h$  caractérisant les différents jus réalisés. Si l'on s'intéresse au paramètre  $h$ , les quatre moûts oxydés présentent une teinte globalement jaune, mais des nuances significatives sont à souligner. La valeur de  $h$  pour le jus de 'Guillevic' est de  $101.4^\circ$  (qui correspond à une valeur négative de  $a^*$  de  $-4.9$ ), soit plus de  $90^\circ$  (= teinte **jaune**), le jus de 'Guillevic' est donc devenu **jaune « tirant sur le vert »** après oxydation. Les jus oxydés de 'Dous Moen' ( $h$  de  $86.0^\circ$ ) et 'Marie Ménard' ( $h$  de  $83.1^\circ$ ) ont une teinte davantage **jaune-orangé**, le dernier étant plus orangé puisque l'angle est plus petit. Enfin, le jus de 'Petit Jaune' affiche une dominante **clairement jaune**, la valeur de  $h$  étant très proche de  $90^\circ$  ( $91.5^\circ$ ). Dans ce cas particulier, avec une valeur de  $a^*$  proche de 0 ( $-1.1$ ), la couleur jaune de ce jus peut être décrite directement et totalement par la valeur positive du paramètre  $b^*$  ( $40.7$ ).

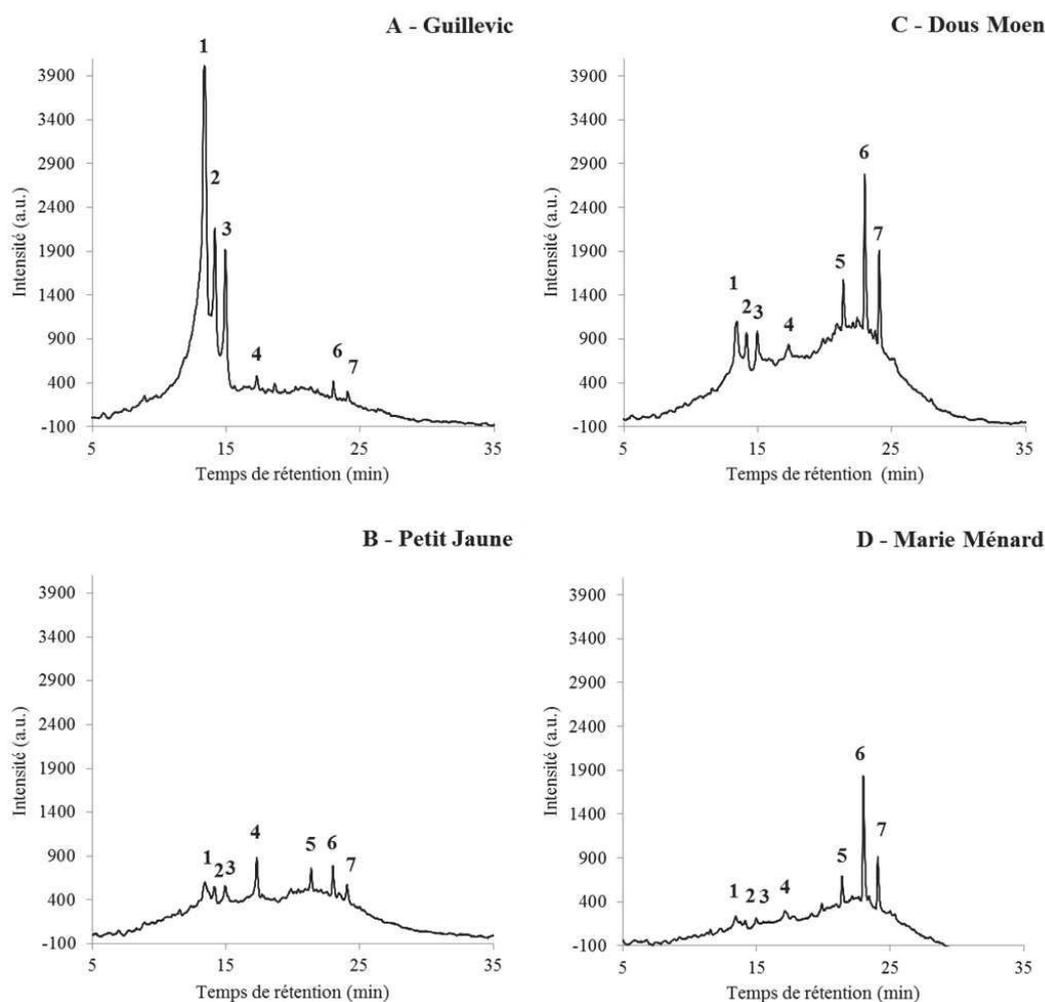
Si l'on s'intéresse aux valeurs de  $C^*$ , les couleurs des jus oxydés de *Dous Moen* et *Marie Ménard* sont trois fois plus intenses que celle du jus de *Guillevic* pour lequel la luminance s'est maintenue à une valeur proche de 100 même après oxydation.

D'une façon générale, plus la valeur de  $C^*$  est élevée, plus la valeur de  $L^*$  est faible. Les différences variétales en termes de teinte et d'intensité colorée perçue (=Chroma) sont liées au contenu en chromophores résultant de l'oxydation des polyphénols au cours de la transformation des fruits. En définitive, les structures et les concentrations relatives de ces chromophores vont jouer un rôle crucial dans la couleur finale des jus.

### III. 3. 2. PROFILAGE DES PRODUITS D'OXYDATION COLORES PRESENTS DANS LES JUS DE POMME

Les composés jaunes-oranges absorbent le rayonnement visible dans la gamme de longueurs d'onde de 380 à 450 nm. Les extraits polyphénoliques issus des jus de pomme oxydés ont été analysés par CLHP-DBD-SM ; les profils chromatographiques obtenus à 420 nm sont présentés en Figure 51.

Comme décrit précédemment, les quatre jus de pomme oxydés présentent des caractéristiques de couleur contrastées. Ces variations sont à mettre en relation avec des profils de composés colorés différents selon les variétés de pomme utilisées.



**Figure 51 – Chromatogrammes à 420 nm des extraits polyphénoliques obtenus à partir des moûts oxydés des variétés *Guillevic* (A), *Dous Moen* (B), *Petit Jaune* (C) et *Marie Ménéard* (D).**

Deux types de réponse à 420 nm sont clairement observées sur les chromatogrammes: d'une part, des pics bien résolus correspondant à des composés jaunes-oranges (pics numérotés de (1) à (7) sur les chromatogrammes A à D, Figure 51) et d'autre part, un massif d'absorbance mal résolu. Si l'on se focalise sur les composés donnant des pics bien résolus, deux groupes de molécules se distinguent par leur comportement chromatographique. Les composés (1) à (3) sont élués en début de gradient (sur phase inverse, élution entre 13 et 15 min, environ 13,4 à 16 % d'acétonitrile dans la phase mobile) tandis que les composés (5) à (7) sont retenus plus longtemps sur la colonne (21-24 min, environ 22,8 à 26,2 % d'acétonitrile). Les composés du premier groupe se révèlent donc plus polaires que les autres et se caractérisent également par une tendance à générer des pics chromatographiques plus larges. Le

composé (4), majoritairement représenté dans le jus de la variété *Petit Jaune*, présente quant à lui une polarité intermédiaire.

La coloration particulière du jus de *Guillevic*, assez claire et tirant sur le jaune-vert, est liée à un profil en colorants phénoliques spécifique (Figure 51, A), apparemment moins complexe que celui des autres jus. Les composés polaires (1) à (3) y apparaissent prédominants et la présence du massif mal résolu est plus limitée (Figure 51). Les profils de produits colorés des extraits de *Dous Moen* et *Marie Ménard* sont très proches, ce qui semble en accord avec leurs caractéristiques de couleur (paramètres CIE) assez similaires. Contrairement au profil de *Guillevic*, ces deux extraits présentent plus de composés apolaires (5-7), signalés sur le chromatogramme à 420 nm par d'intenses pics, que de composés plus polaires (1-3). En outre, le massif d'absorbance mal résolu décrit précédemment est bien représenté dans les profils de ces jus fortement colorés, clairement plus orangés que ceux de *Guillevic* et *Petit Jaune*. Cela suggère que ces composés plus apolaires et ceux responsables du massif d'absorbance à 420 nm pourraient être impliqués dans les différences de teintes observées, en conférant aux jus une couleur plus orangée. Si l'on s'intéresse aux maxima d'absorbance dans la région du visible des composés générant des pics bien résolus (Tableau 3), on constate que les composés (4), (6) et (7) présentent un maximum proche de 435 nm soit un décalage bathochrome d'environ 20 nm par rapport aux composés polaires (1) à (3). Il faut toutefois nuancer cette assertion en précisant que les spectres commentés ici ont été acquis dans les conditions d'analyse CLHP (solvants acidifiés) puisque l'on ne dispose pas des composés purifiés. Ces conditions de solvant sont donc différentes de celles des jus de pomme avec un impact potentiellement non négligeable sur les propriétés optiques mesurées par le DBD. Cependant, la comparaison des spectres des composés « entre eux » sur les chromatogrammes reflète *a priori* de vraies différences de structure de chromophore car il nous paraît peu probable que le seul gradient de solvants (soit une dizaine de % d'acétonitrile en plus pour les pics les plus tardifs) puisse expliquer une telle différence dans les spectres UV-visible.

**Tableau 3 - Absorbance maximale dans la région visible (400-700 nm) des composés jaunes donnant des pics bien résolus sur les chromatogrammes à 420 nm.**

| <b>Composé</b> | <b>T<sub>R</sub> (min)</b> | <b>λ<sub>max</sub> (nm) dans la région visible</b> |
|----------------|----------------------------|--|
| (1)            | 13.17                      | 417  |
| (2)            | 13.95                      | 418  |
| (3)            | 14.73                      | 419  |
| (4)            | 17.10                      | 437  |
| (5)            | 21.20                      | 424  |
| (6)            | 22.80                      | 437  |
| (7)            | 23.88                      | 433  |

Soulignons que ces composés ne donnant pas de réponse claire en spectrométrie de masse, il n'a pas été possible d'identifier de premiers éléments structuraux les concernant, excepté pour le composé (1). La caractérisation structurale de ce dernier sera rediscutée au paragraphe III. 3. 5. . Il est important de préciser ici que, outre les molécules colorées, les extraits phénoliques sont aussi largement constitués de composés phénoliques incolores correspondant à des polyphénols natifs ou à des produits d'oxydation. Bien que cela ne soit pas visible sur les chromatogrammes à 420 nm, de nombreuses co-élutions surviennent avec ces polyphénols incolores, ce qui rend l'étude des chromophores plus difficile. Par conséquent, les réponses détectées en spectrométrie de masse aux temps de rétention des composés colorés correspondent, en majeure partie, aux réponses de polyphénols natifs ou de produits d'oxydation incolores co-élus. En 1984, Lea suggérait que certains composés colorés formés dans les jus de pomme après oxydation présentaient des structures similaires à celles d'une déhydrocatéchine de type A (Lea 1984). Il mentionnait des dimères jaunes résultant d'un couplage oxydatif entre deux molécules de catéchines. Cependant, les chromatogrammes d'ion extrait pour la molécule déprotonée  $[M-H]^-$  de déhydrocatéchine A, à  $m/z = 575$ , ne montrent pas clairement la présence de ce composé dans les différents moûts oxydés considérés. Notons en outre que les ions à  $m/z = 575$ , s'ils étaient détectés, pourraient également correspondre à des produits d'oxydation incolores de type dimères de procyanidines (Poupard et al., 2011) ou à des ions fragments de procyanidines polymérisées pouvant être produits dans la source du spectromètre de masse.

Des étapes ultérieures de purification et une optimisation plus poussée de la séparation des composés seront nécessaires pour obtenir des informations supplémentaires sur la structure des composés responsables de la couleur des jus de pomme. Dans la suite de cette étude, des éléments complémentaires seront notamment fournis pour les composés notés (1) et (6) sur les chromatogrammes.

### III. 3. 3. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE TANNINS COLORES

Le collage à la gélatine d'une solution de DMOX (l'extrait polyphénolique purifié à partir du jus oxydé de *Dous Moen*) a entraîné une précipitation des tannins, la plupart de ces procyanidines étant incolores. Néanmoins, le profil polyphénolique à 420 nm (Figure 52) met en évidence une nette diminution du massif mal résolu dans le surnageant analysé, ce qui laisse supposer une implication de tannins oxydés dans la couleur des jus de pomme. Les pics bien résolus à 420 nm sont, pour la plupart, peu affectés par le collage protéique : les composés correspondant ne présentent pas spécialement de propriétés tannantes. Dans la littérature, l'existence de « polymères bruns » a souvent été évoquée pour expliquer le brunissement des tissus de pomme dont l'intégrité cellulaire a été rompue (Lozano). Pourtant, à notre connaissance, il n'y a pas de preuve clairement établie de la formation de colorants résultant de molécules fortement polymérisées. De plus, par principe même, les réactions de polymérisation oxydative des molécules phénoliques, quand elles existent, sont le plus souvent basées sur la formation de liaisons biaryles ou biaryléther, *a priori* non susceptibles par elles-mêmes de

générer de nouveaux chromophores. Ceux-ci résulteraient plutôt de la formation de fonctions carbonyles ou de quinoïdes conjugués avec des systèmes carbonés plus ou moins insaturés. Oleszek et al se sont intéressés au rôle des produits d'oxydation des procyanidines dans les phénomènes de brunissement enzymatique (Oleszek et al., 1989). Les auteurs ont montré, par des études en solution modèle, que l'oxydation enzymatique des procyanidines B2 et C1 pouvait aboutir au développement d'une coloration intense même si la vitesse de réaction était très faible. Il faut toutefois nuancer ces résultats en précisant que leurs expériences ont été réalisées en milieu modèle à pH 5.5, c'est-à-dire à un pH certes proche du pH optimal pour l'activité de la PPO mais nettement supérieur à celui des jus de pomme. Ces conditions particulières ont pu favoriser l'autoxydation des polyphénols. Les tannins oxydés colorés, mis en évidence par collage dans cette étude, pourraient résulter d'addition ou de couplage de certains chromophores supposés, tels que celui des déhydrocatéchines ou déhydrotricatéchines de type A, à des oligomères ou polymères de procyanidines. De tels mécanismes pourraient permettre d'expliquer pourquoi les molécules déprotonées correspondant à ces chromophores ne sont pas directement détectées dans les jus.

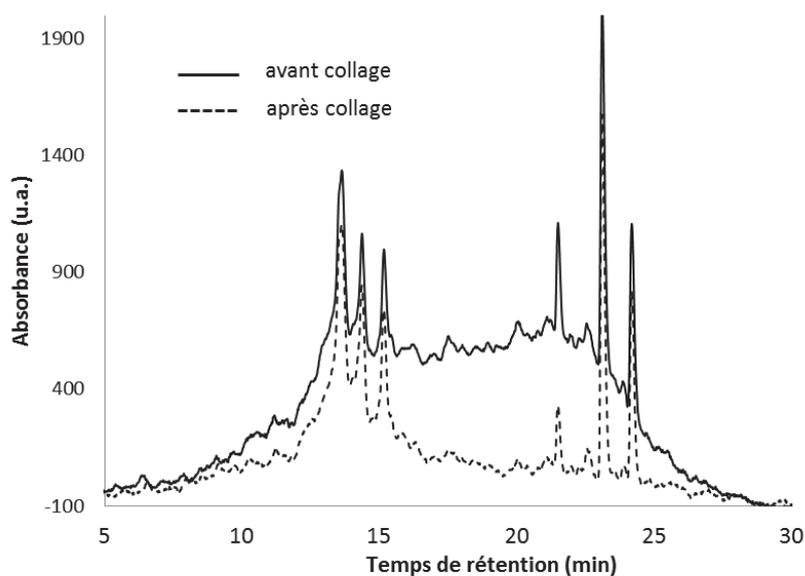


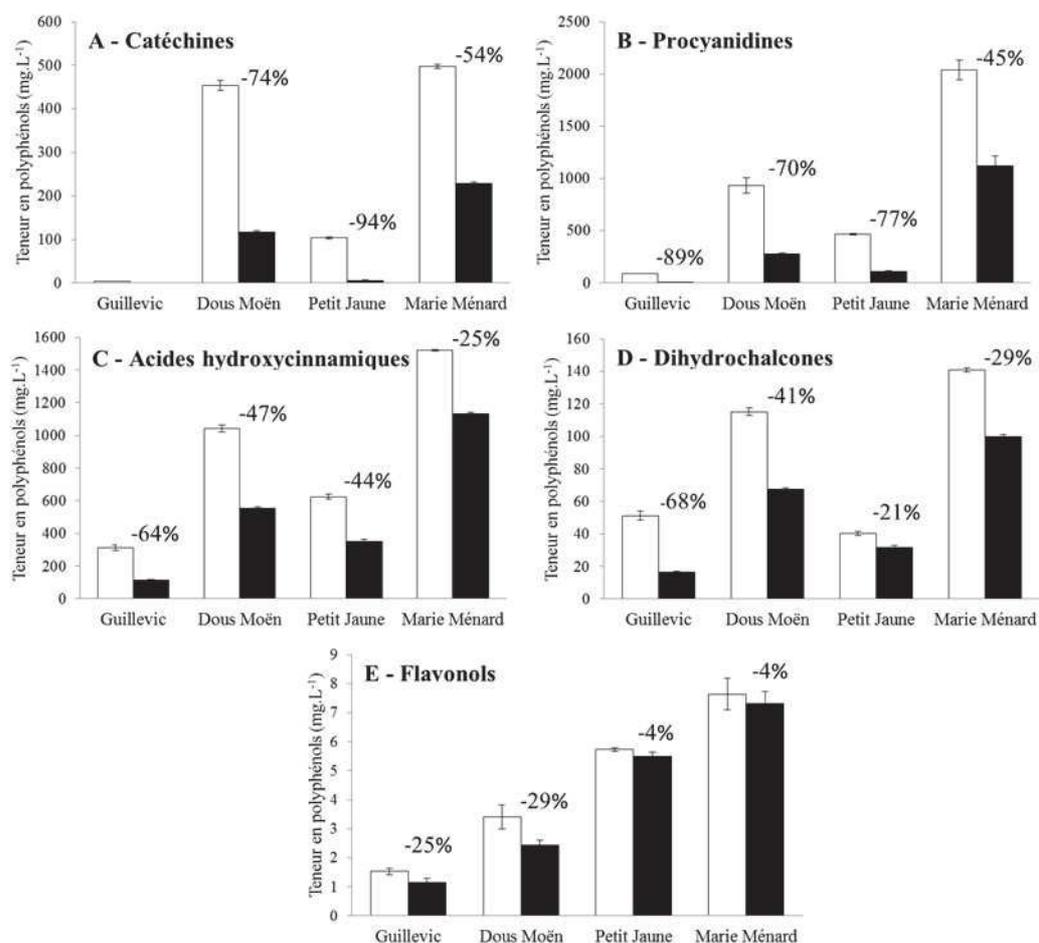
Figure 52 - Chromatogramme à 420 nm de l'extrait phénolique issu du jus de *Dous Moen* oxydé (trait plein) et du surnageant obtenu après collage à la gélatine de ce même extrait (pointillés)

### III. 3. 4. QUANTIFICATION DES POLYPHENOLS NATIFS PRESENTS DANS LES JUS DE POMME FORTEMENT ET FAIBLEMENT OXYDES

La diversité de couleurs des jus de pomme reflète la diversité des produits d'oxydation colorés coexistant dans les jus. Ces colorants dérivent de composés phénoliques natifs incolores. Goupy et al. (Goupy et al., 1995), par des analyses en régression linéaire multiple, ont démontré que les valeurs des paramètres CIE L\*, a\* et b\* d'une solution composée de polyphénols de pomme étaient corrélées à la fois aux quantités de composés natifs et oxydés des différentes classes de polyphénols. Dans notre

étude, les contenus en polyphénols natifs des jus faiblement et fortement oxydés, produits pour les quatre variétés de pommes, ont été discutés en évaluant l'impact des processus d'oxydation sur les différentes classes phénoliques.

Les détails concernant les différents composés quantifiés dans ces classes sont présentés dans le Tableau 4. Des variabilités de composition en polyphénols natifs ont été mises en évidence selon la variété de pomme utilisée pour produire les jus, ce qui concorde avec des résultats publiés antérieurement. Un profil se détache tout particulièrement, celui des jus de la variété *Guillevic* : ainsi, son profil singulier de composés colorés peut être corrélé avec une composition initiale en composés natifs particulière. Tout d'abord, la quantité de polyphénols totaux dans ce jus (Tableau 5) apparaît faible comparativement aux autres moûts étudiés. Si l'on considère les jus oxydés, *Guillevic* contient presque vingt fois moins de polyphénols que *Marie Ménéard*. Par ailleurs, les histogrammes présentés en Figure 53 et le Tableau 4 attestent de l'absence quasi-totale de monomères de flavan-3-ols ((-)-épicatéchine et (+)-catéchine) dans les jus de *Guillevic* or ces composés sont identifiés dans la littérature comme des précurseurs de produits d'oxydation fortement colorés (Nicolas et al., 1994). Les procyanidines, qui apparaissent impliquées dans la génération de couleur d'après les résultats présentés en Figure 53, ne sont présentes qu'en très faibles concentrations dans le jus de *Guillevic*.



**Figure 53 – Teneurs en composés phénoliques natifs dans les jus non oxydés (barres blanches) et oxydés (barres noires) obtenus à partir des quatre variétés de pommes à cidre. Le chiffre en % correspond à la différence relative entre les deux modalités d'oxydation.**

Ainsi, l'absence de flavan-3-ols dans le jus oxydé de la variété *Guillevic* est susceptible d'expliquer les différences de couleur considérables observées entre ce jus faiblement saturé arborant une teinte jaune tirant légèrement vers le vert et les jus de *Dous Moën* et *Marie Ménéard*, beaucoup plus riches en flavanols, et montrant une teinte jaune-orange soutenue.

Tableau 4 - Profils en polyphénols natifs des différents jus de pomme à cidre étudiés

| Classe phénolique | Composés phénoliques (mg.L <sup>-1</sup> ) | <i>Guillevic</i> |                  | <i>Petit Jaune</i> |                  | <i>Dous Moen</i> |                  | <i>Marie Ménéard</i> |                  |      |     |      |      |      |      |      |     |
|-------------------|--|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------|-----|------|------|------|------|------|-----|
|                   |  | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -   | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -     | O <sub>2</sub> + |      |     |      |      |      |      |      |     |
| <b>FA</b>         | (-)-épicatéchine                           | 3.5              | 0.2              | n.d.               | -                | 84.2             | 2.4              | 5.3                  | 1.1              | 317  | 8   | 85.4 | 1.7  | 468  | 5    | 217  | 3   |
|                   | (+)-catéchine                              | n.d.             | -                | n.d.               | -                | 19.2             | 0.5              | 1.0                  | 0.1              | 136  | 3   | 31.8 | 0.8  | 29.7 | 0.4  | 11.6 | 0.2 |
|                   | procyanidine B1                            | 0.57             | 0.03             | n.d.               | -                | 65.1             | 0.9              | 3.7                  | 0.3              | 163  | 4   | 17.8 | 0.3  | 122  | 1    | 34.6 | 2.0 |
|                   | procyanidine B2                            | 5.3              | 0.4              | 1.6                | 0.1              | 157              | 3                | 11.0                 | 0.3              | 230  | 6   | 37.1 | 0.2  | 677  | 4    | 267  | 2   |
|                   | trimère de procyanidine                    | n.d.             | -                | n.d.               | -                | 128              | 4                | n.d.                 | -                | 302  | 12  | 38.8 | 2.7  | 810  | 10   | 299  | 6   |
|                   | tetramère de procyanidine                  | 2.5              | 0.9              | 10.1               | 0.6              | 106.2            | 0.8              | 55.4                 | 3.5              | 305  | 3   | 61.3 | 2.4  | 711  | 4    | 313  | 7   |
|                   | procyanidines (total)                      | 91.6             | 2.0              | 10.4               | 0.2              | 468              | 7                | 108                  | 11               | 933  | 75  | 280  | 7    | 2038 | 96   | 1124 | 91  |
|                   | D <sup>P</sup> m <sup>e</sup>              | 4.2              | 0.1              | 1.21               | 0.01             | 3.3              | 0.1              | 2.15                 | 0.02             | 4.4  | 0.5 | 3.6  | 0.1  | 4.1  | 0.2  | 4.3  | 0.3 |
| <b>AHC</b>        | acide 5- <i>O</i> -caféoylquinique         | 176              | 11               | 53.8               | 1.9              | 565              | 13               | 308                  | 13               | 869  | 18  | 433  | 8    | 1387 | 7    | 1041 | 8   |
|                   | acide caféoylquinique (isomère 1)          | 13.6             | 3.0              | 1.8                | 0.1              | 19.3             | 0.9              | 10.1                 | 0.6              | 29.1 | 1.1 | 8.5  | 1.0  | 52.6 | 6.9  | 17.1 | 3.3 |
|                   | acide coumaroylquinique (isomère 1)        | 0.6              | 0.1              | 0.5                | 0.1              | 6.2              | 0.2              | 5.8                  | 0.2              | 15.6 | 0.4 | 13.1 | 0.3  | 29.7 | 0.1  | 28.5 | 0.5 |
|                   | acide coumaroylquinique (isomère 2)        | 112              | 8                | 50.7               | 1.9              | 31.4             | 0.9              | 25.7                 | 0.9              | 124  | 3   | 96.9 | 1.7  | 48.8 | 0.1  | 42.5 | 0.2 |
|                   | acide coumaroylquinique (isomère 3)        | 10.0             | 1.4              | 5.7                | 0.1              | 1.7              | 0.1              | 2.2                  | 0.3              | 2.6  | 0.1 | 2.50 | 0.04 | 1.1  | 0.1  | 4.2  | 0.1 |
| <b>DHC</b>        | xyloglucoside de phlorétine                | 33.0             | 1.8              | 9.7                | 0.3              | 24.6             | 0.8              | 17.8                 | 0.7              | 67.1 | 1.4 | 38.8 | 0.6  | 99.7 | 0.8  | 70.4 | 0.6 |
|                   | phloridzine (glucoside de phlorétine)      | 18.2             | 1.0              | 6.9                | 0.3              | 15.6             | 0.5              | 14.1                 | 0.5              | 48.0 | 1.0 | 28.6 | 0.5  | 41.0 | 0.5  | 29.7 | 0.5 |
| <b>FO</b>         | quercetin 3- <i>O</i> -arabinoside         | 0.19             | 0.04             | 0.2                | 0.2              | 0.98             | 0.03             | 0.98                 | 0.01             | 0.9  | 0.1 | 0.9  | 0.1  | 2.3  | 0.2  | 2.1  | 0.2 |
|                   | quercetin 3- <i>O</i> -galactoside         | 0.48             | 0.03             | 0.34               | 0.01             | 1.993            | 0.004            | 1.84                 | 0.05             | 1.2  | 0.2 | 0.8  | 0.1  | 1.51 | 0.04 | 1.4  | 0.2 |
|                   | quercetin 3- <i>O</i> -glucoside           | 0.19             | 0.02             | 0.11               | 0.02             | 0.4              | 0.1              | 0.35                 | 0.05             | 0.6  | 0.1 | 0.3  | 0.3  | 1.0  | 0.8  | 1.4  | 0.2 |
|                   | quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside          | 0.59             | 0.04             | 0.47               | 0.01             | 1.58             | 0.04             | 1.5                  | 0.1              | n.d. | -   | n.d. | -    | 1.1  | 0.1  | 1.0  | 0.1 |
|                   | quercetin 3- <i>O</i> -xyloside            | 0.08             | 0.01             | n.d.               | -                | 0.74             | 0.03             | 0.8                  | 0.1              | 0.7  | 0.1 | 0.49 | 0.02 | 1.7  | 0.1  | 1.3  | 0.2 |

*FA* : Flavanols ; *AHC* : Acides Hydroxycinnamiques ; *DHC* : Dihydrochalcones ; *FO* : Flavonols ; *D<sup>P</sup>m* : Degré moyen de polymérisation des procyanidines ; O<sub>2</sub> - : jus protégé de l'oxygène ; O<sub>2</sub> + : jus fortement oxydé ; n.d : non détecté.

Les valeurs en italiques correspondent aux écarts-types pour n=3.

De plus, le jus oxydé de *Guillevic* est le seul moût, dans cette étude, présentant un rapport ACQ/PCQ inférieur à 1 (Tableau 5).

Tableau 5 – Paramètres qualitatifs de caractérisation du profil polyphénolique des moûts

| Variété  | <i>Guillevic</i> |                  | <i>Petit Jaune</i> |                  | <i>Dous Moen</i> |                  | <i>Marie Ménard</i> |                  |
|--|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|
|  | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -   | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -    | O <sub>2</sub> + |
| <b>Etat d'oxydation</b>                              | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -   | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> - | O <sub>2</sub> + | O <sub>2</sub> -    | O <sub>2</sub> + |
| <b>PLZ/XPL</b>                                       | 0.55             | 0.72             | 0.64               | 0.79             | 0.72             | 0.74             | 8.12                | 0.42             |
| <b>EC/CAT</b>  | –                | –                | 4.38               | 5.33             | 2.32             | 2.68             | 15.76               | 18.65            |
| <b>FA/AHC</b>  | 0.30             | 0.09             | 0.92               | 0.33             | 1.33             | 0.72             | 1.67                | 1.19             |
| <b>ACQ/PCQ</b>                                       | 1.55             | 0.98             | 14.85              | 9.43             | 6.30             | 3.92             | 18.09               | 14.06            |
| <b>DPm PCAs</b>                                      | 4.17             | 1.21             | 3.28               | 2.15             | 4.38             | 3.55             | 4.14                | 4.34             |
| <b>Polyphénols totaux (mg.L<sup>-1</sup> de jus)</b> | 460              | 140              | 1242               | 504              | 1881             | 1021             | 4204                | 2593             |

*PLZ* : Phloridzine ; *XPL* : Xyloglucoside de phlorétine ; *EC* : (-)-Epicatechine ; *CAT* : (+)-Catéchine ; *FA* : Flavanols ; *AHC* : Acides Hydroxycinnamiques ; *ACQ* : Acides caféoylquiniques ; *PCQ* : Acides para-coumaroylquiniques ; *DPm* : Degré moyen de polymérisation ; *PCAs* : Procyanidines ; O<sub>2</sub>- : jus protégé de l'oxygène ; O<sub>2</sub>+ : jus fortement oxydé .

Cette répartition singulière au sein de la classe des acides hydroxycinnamiques peut aussi être un facteur à prendre en compte pour expliquer le profil coloré de ce jus. En effet, l'acide *p*-coumarique a été identifié comme inhibiteur de l'activité *o*-diphénolase (Gunata et al., 1987). Les acides *p*-coumaroylquiniques pourraient également jouer un rôle d'inhibiteurs de la PPO et limiteraient ainsi la formation de couleur à l'échelle du produit cidricole.

Quant aux autres jus, les réactions d'oxydation ont fortement impacté leur contenu en flavan-3-ols, et en particulier les teneurs en monomères (catéchines). Dans le cas du jus oxydé de *Petit Jaune* par exemple, on constate une diminution de 94% de la teneur en catéchines par rapport au jus faiblement oxydé (Figure 53). Notons aussi que les teneurs en procyanidines se révèlent significativement plus faibles, ce qui pourrait être liée à l'adsorption d'une partie des tannins oxydés sur du matériel pariétal lors de la transformation des fruits. En outre, sous l'effet de l'oxydation, certaines procyanidines peuvent devenir partiellement résistantes à la phloroglucinolyse, le contenu total en procyanidines pourrait donc être ici sous-estimé. La majeure partie des produits d'oxydation néoformés sont certes incolores mais il paraît logique de s'attendre à ce que les classes de polyphénols les plus affectées par les phénomènes d'oxydation soient impliquées dans la génération d'espèces oxydées colorées.

Les acides hydroxycinnamiques sont assez bien représentés dans les jus de pomme à cidre. Les différences de teneurs entre les jus fortement et faiblement oxydés, illustrées en Figure 53, témoignent de l'impact clair de l'oxydation sur ces composés mais dans une moindre mesure comparée aux flavanols monomères. Les acides hydroxycinnamiques semblent en effet davantage « protégés » contre l'oxydation, ce qui peut s'expliquer par l'existence de réactions d'oxydoréductions couplées. Plusieurs auteurs ont effectivement souligné le rôle essentiel de l'équilibre entre dérivés hydroxycinnamiques et flavanols dans la sensibilité au brunissement (Nicolas, Richard-Forget et al. 1994). Les acides caféoylquiniques, composés majoritaires de la classe des acides hydroxycinnamiques dans la plupart des variétés de pomme, sont les substrats préférentiels de la PPO. La première étape d'oxydation enzymatique génère des *o*-quinones d'acide caféoylquinique qui sont capables d'oxyder les monomères de flavanols. Au cours de ces réactions, ces *o*-quinones se trouvent régénérées sous leur forme *o*-diphénolique tandis que l'oxydation des monomères flavanoliques aboutit à la formation de produits néoformés dont certains peuvent être très colorés. En ce sens, les résultats obtenus au cours de notre étude sont cohérents avec les données de la littérature.

La Figure 53 permet aussi de souligner l'importance de la classe des dihydrochalcones dans les phénomènes d'oxydation qui se produisent au cours de la transformation de pomme. On rappelle que si l'on considère les végétaux alimentaires, ces composés sont retrouvés assez spécifiquement et en concentrations non négligeables dans la pomme même si leur présence en très faible concentration est avérée dans la fraise (Hilt et al., 2003) et ils sont aussi présents dans certains végétaux de la famille des Ericacées. En effet, bien que les teneurs initiales en dihydrochalcones soient nettement plus faibles que celles des flavanols et des acides hydroxycinnamiques, en proportion leur diminution après oxydation est du même ordre de grandeur que pour ces derniers, excepté dans le cas du jus issu de la variété *Petit Jaune* pour lequel la diminution est moindre. Dans la littérature, des études en solution modèle ont mis en évidence la formation de produits jaunes dérivant de dihydrochalcones, les auteurs mentionnant même de potentiels effets de synergie sur le taux de brunissement lorsque ces composés se trouvent en présence d'acide chlorogénique ou de catéchines (Amiot et al., 1992). Le Guernevé et Guyot (Guyot et al., 2007; Le Guernevé et al., 2004) ont pu caractériser un colorant jaune phénolique résultant de l'oxydation de la phloridzine, le POPj (Produit d'Oxydation de la Phloridzine <sub>jaune</sub>). Dans le cadre de notre étude, les variations constatées dans l'évolution du contenu en dihydrochalcones pour les quatre jus incitent à considérer tout particulièrement le rôle de cette classe de polyphénols dans la formation de la couleur des produits cidricoles.

Au final, il convient de souligner également que la classe des flavonols est très faiblement représentée dans les moûts (environ 1 à 7 mg.L<sup>-1</sup>). Les glycosides de quercétine sont principalement retrouvés dans l'épiderme des fruits et de toute évidence, ils ne diffusent que très peu dans les jus. Ainsi, bien qu'étant la seule classe de polyphénols de la pomme comprenant des composés natifs de couleur jaune, les flavonols ne jouent clairement pas un rôle déterminant dans la couleur des jus de pomme.

### III. 3. 5. IDENTIFICATION DU PXGOPJ, UN NOUVEAU PRODUIT JAUNE DES JUS DE POMME RESULTANT DE L'OXYDATION DU XYLOGLUCOSIDE DE PHLORETINE.

Le jus issu de la variété *Guillevic* se distingue clairement des autres jus par sa composition en polyphénols natifs (Tableau 4). Dès lors, l'oxydation de ces composés au cours de la transformation des fruits génère un profil de molécules colorées particulier. Cela se traduit à l'échelle du produit fini par une coloration caractérisée par une teinte et une intensité colorante spécifiques. La nuance très jaune, tirant sur le vert, apparaît principalement liée à la présence de 3 composés polaires donnant des pics relativement intenses sur le chromatogramme à 420 nm, retrouvés également en concentrations plus faibles dans les autres jus étudiés (Figure 51). En spectrométrie de masse, le composé (1) - correspondant à un pic intense observé à 13 minutes- donne un signal correspondant à une molécule déprotonée [M-H]<sup>-</sup> dont le m/z est de 597, soit un produit d'oxydation de 598 Da. Les trois principaux fragments détectés en MS/MS présentent des m/z de 553, 259 et 303 (Tableau 6).

**Tableau 6 - Caractéristiques en CLHP-UV-visible-SM du pic n° 1 correspondant à la molécule PXGOPj**

| T <sub>R</sub> (min) | λ <sub>max</sub> (nm) | [M-H] <sup>-</sup> | Principaux ions fragments sur le spectre SM/SM* |
|----------------------|-----------------------|--------------------|---|
| 13.03                | 417                   | 597                | 553 (100); 259 (79); 303 (26)                   |

\*les valeurs entre parenthèses correspondent aux intensités relatives

Le poids moléculaire de ce composé et le schéma de fragmentation ainsi obtenu s'avèrent conformes avec l'hypothèse selon laquelle ce colorant serait vraisemblablement l'analogue xyloglucoside du POP<sub>j</sub>. En effet, le premier fragment à m/z= 553 peut être généré lors de la perte du groupement acide carboxylique libre (perte de 44 u.m.a.). Le fragment à m/z=259 (perte de 294 et 44 u.m.a.) résulte des pertes successives du groupement carboxylique et de la partie glucidique. Enfin, le troisième fragment à m/z=303 correspond à la partie phénolique de la molécule après perte du xyloglucose. La structure de ce composé nouvellement identifié dans les jus est présentée en Figure 54. Il est dénommé PXGOP<sub>j</sub> pour Phloretin XyloGlucoside Oxidation Product «jaune», parallèlement à la dénomination employée pour le POP<sub>j</sub>. Dans des travaux antérieurs s'intéressant à l'oxydation enzymatique d'extraits de pépins de pomme, Fromm et al. avaient déjà mentionné la probable formation d'un colorant analogue au POP<sub>j</sub>, dérivant du xyloglucoside de phlorétine (Fromm et al., 2013). Néanmoins, le composé n'avait pas pu être clairement détecté et les auteurs en avaient conclu qu'il devait être co-élué avec le POP<sub>j</sub> dans leurs conditions d'analyse.

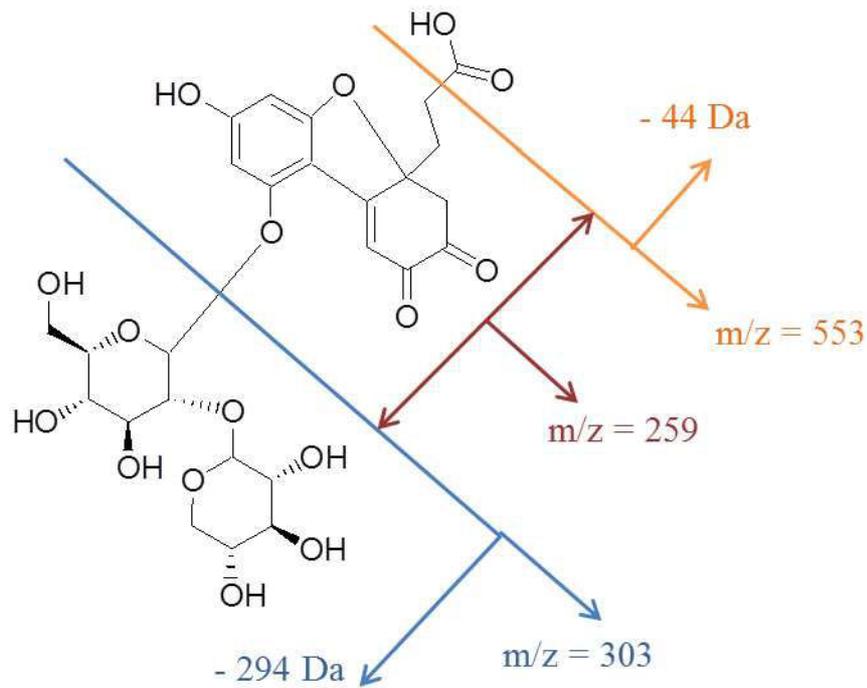


Figure 54 – Structure et schéma de fragmentation proposé pour le PXGOP<sub>j</sub> (MS<sup>2</sup>)

En considérant que la présence d'un groupe xyloglucose à la place d'un glucose n'impacte pas la réactivité de la molécule vis-à-vis de son oxydation, nous faisons l'hypothèse que le PXGOP<sub>j</sub> se forme très probablement dans les jus selon la même voie réactionnelle que celle décrite pour le POP<sub>j</sub> (Le Guernevé et al., 2004) (Figure 55) : l'oxydation du xyloglucoside de phlorétine serait alors initiée par la PPO, impliquant les activités crésolase et catécholase de l'enzyme, puis la molécule subirait successivement un réarrangement moléculaire, une ré-aromatisation et une addition d'eau.

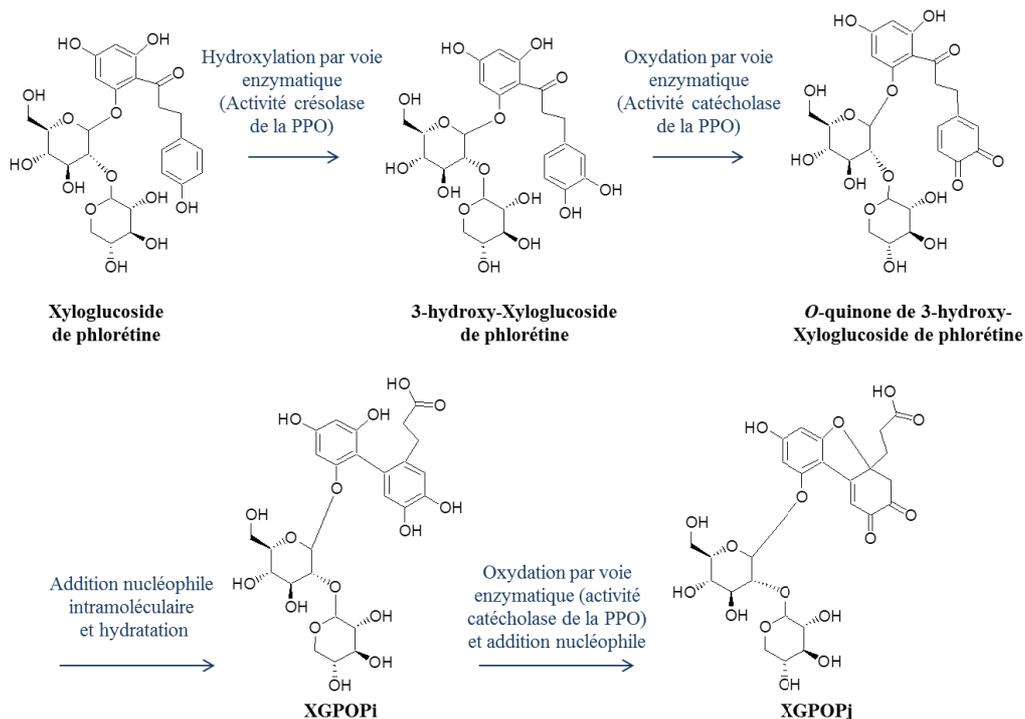


Figure 55 – Mécanisme de formation de la molécule PXGOP<sub>j</sub> (adapté de Le Guernevé et al., 2004)

Le spectre UV-visible du composé (1) se révèle très similaire à celui du POP<sub>j</sub> (Figure 56), ce qui est cohérent avec l'hypothèse de structure avancée.

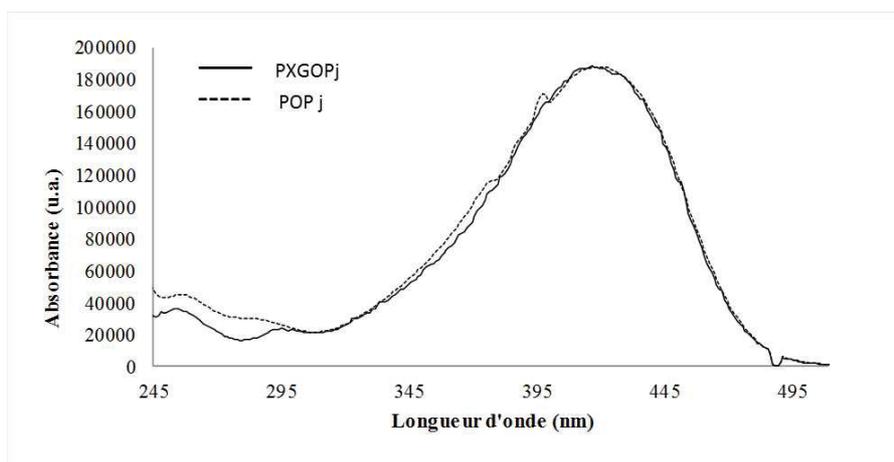


Figure 56 – Comparaison des spectres UV-visible des molécules POP<sub>j</sub> (pointillés) et PXGOP<sub>j</sub> (trait plein)

En effet, si les deux colorants ne diffèrent qu'au niveau du sucre, *a priori* la délocalisation électronique n'est pas impactée et donc le chromophore ne doit pas être modifié. Bien que la phloridzine (PLZ) ait été retrouvée en concentration molaire sensiblement du même ordre que le xyloglucoside de phlorétine (XPL) dans les jus faiblement oxydés (Tableau 7), le chromatogramme d'ion extrait à  $m/z = 465$  (correspondant à la molécule déprotonée de POP<sub>j</sub>) révèle que ce colorant n'est présent qu'à l'état de traces dans les jus oxydés.

Tableau 7 – Teneurs des deux dihydrochalcones (en  $\mu\text{M}$ ) dans les jus faiblement oxydés

|                       | GU   | PJ   | DM    | MM    |
|-----------------------|------|------|-------|-------|
| XPL ( $\mu\text{M}$ ) | 58.1 | 43.3 | 118.1 | 175.5 |
| PLZ ( $\mu\text{M}$ ) | 41.7 | 35.8 | 110.1 | 94.0  |

Cette formation préférentielle de PXGOP<sub>j</sub> pourrait suggérer une plus forte affinité de la polyphénoloxydase pour le xyloglucoside de phlorétine que pour la phloridzine, ce qui serait en accord avec les observations mentionnées dans les travaux d'Oleszek et al. (Oleszek et al., 1989). En effet, ces auteurs ont montré au cours d'études en solution modèle que le xyloglucoside de phlorétine était plus facilement oxydé par la PPO que la phloridzine, bien que les deux puissent en être les substrats.

Ils soulignaient également que l'oxydation enzymatique de ces deux dihydrochalcones natives aboutissait à la formation de nouveaux produits jaunes.

### III. 3. 6. CARACTERISATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE D'UN NOUVEL HETERODIMERE COLORE PRESENT DANS LES JUS DE POMME ET RESULTANT D'UN COUPLAGE ENTRE LE XYLOGLUCOSIDE DE PHLORETINE ET LA (-)-EPICATECHINE

L'exploration des produits colorés dans les jus oxydés a révélé certains produits jaunes élués en fin de chromatogramme à 420 nm et correspondant donc à des produits d'oxydation relativement apolaires (voir Figure 51). Ces composés présentent probablement des structures originales et franchement différentes de celles des produits POPj et PXGOPj élués en début de gradient en CLHP, issus de la seule oxydation des dihydrochalcones et discutés dans les paragraphes précédents. Il est apparu important d'aller plus loin dans la caractérisation de ces produits. L'effort a porté sur la caractérisation du produit (6) clairement détecté sur le chromatogramme à 420 nm de l'extrait de polyphénols d'un jus oxydé de la variété *Dous Moen* (Figure 57, A). Cependant, on s'aperçoit qu'il ne correspond qu'à un pic très petit, à peine émergeant de la ligne de base sur le chromatogramme à 280 nm permettant de « visualiser » la complexité polyphénolique de l'extrait (Figure 57, B). Pour cette raison, il n'a pas été possible d'obtenir d'information fiable sur la réponse en spectrométrie de masse de ce composé directement à partir de ces analyses. Un travail de purification de ce produit (6) à l'échelle semi-préparative a été mené dans l'objectif initial d'obtenir le produit pur en concentration suffisante pour en réaliser la caractérisation structurale complète par RMN.

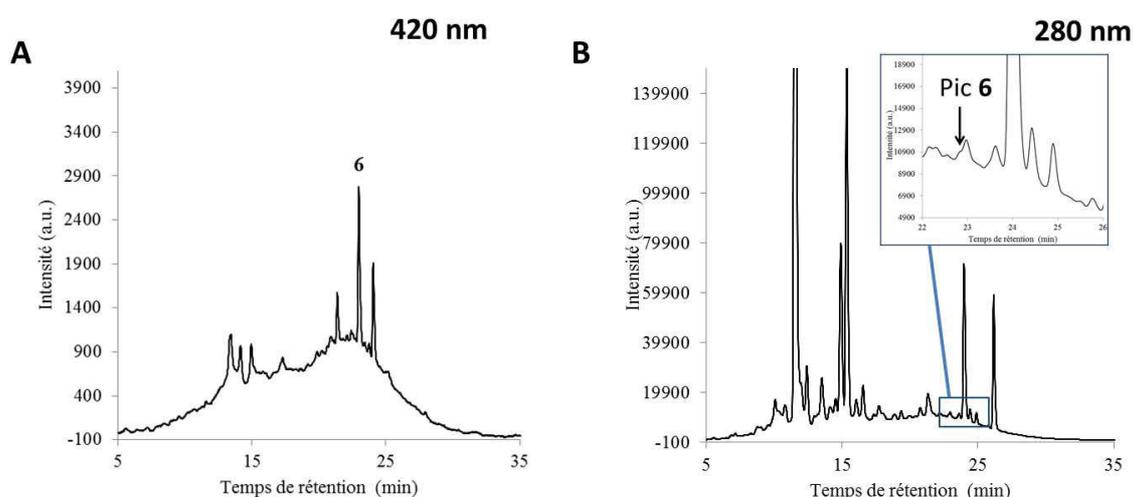


Figure 57 – Chromatogramme à 420 nm (A) et à 280 nm (B) d'un extrait de polyphénols de jus oxydé de la variété *Dous Moen* – Focalisation sur le produit (6).

Pour ce faire, une grande quantité (près de 100 g) de fraction polyphénolique a été préparée par fractionnement sur résine polymère Amberlite™ FPX66 à partir de 100 litres de jus oxydé de la variété *Dous Moen*. Une partie de l'extrait de polyphénols a ensuite fait l'objet d'une purification à l'échelle semi-préparative par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). De cette façon, le produit (6) a pu être concentré dans une fraction dont la composition est visualisée sur la Figure 58.

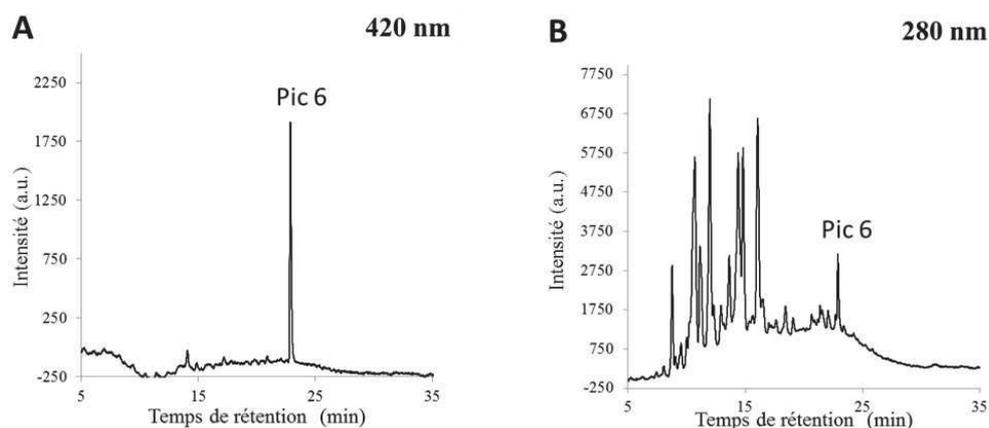
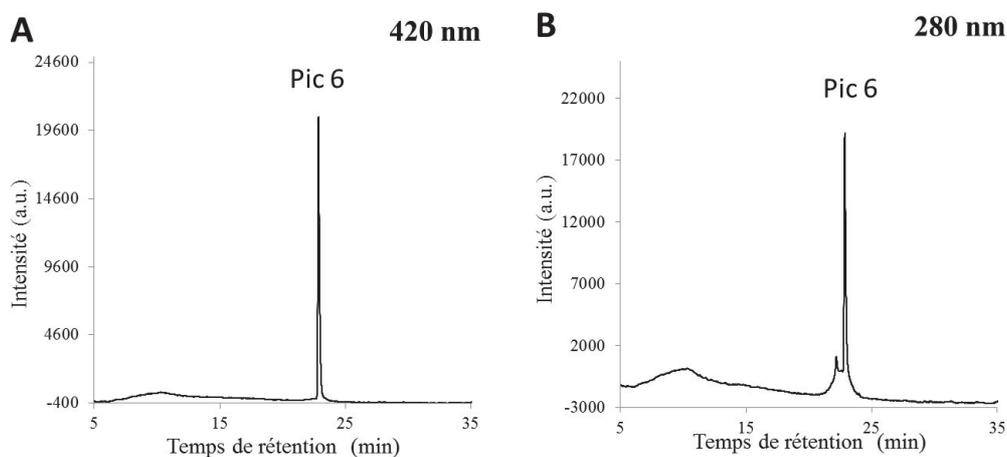


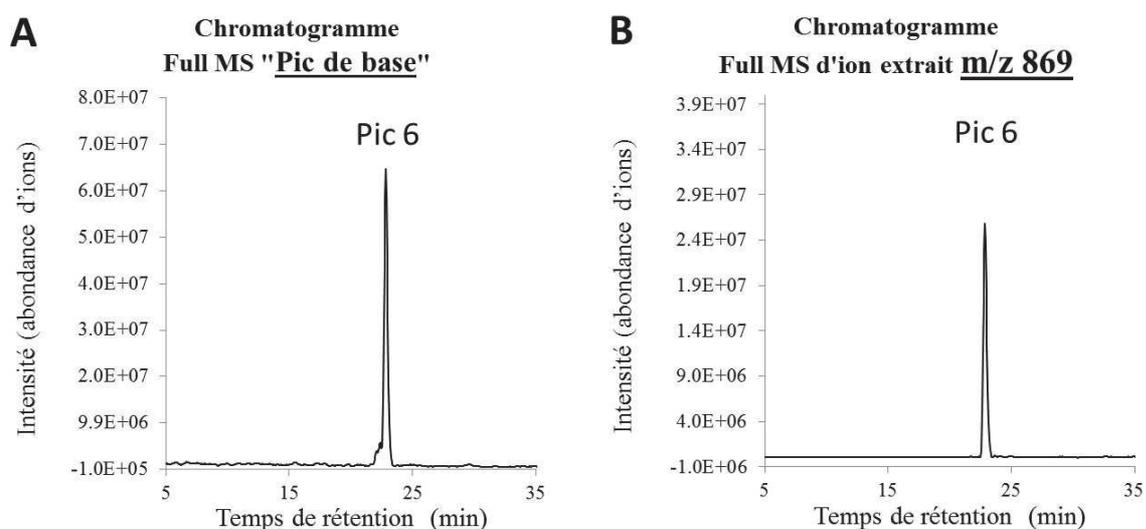
Figure 58 – Chromatogramme à 420 nm (A) et à 280 nm (B) de la fraction 11 collectée en CPC et enrichie en produit (6)

Même si le produit (6) apparaît cette fois comme le seul produit jaune (Figure 59 A), il n'en demeure pas moins que la fraction CPC 11 contient encore une très large majorité de composés phénoliques incolores qu'il faudra éliminer. Pour ce faire, les fractions CPC 11 issues de 3 fractionnements en CPC ont été combinées puis fractionnées par CLHP en phase inverse à l'échelle semi-préparative. La détection à 420 nm sur ce système a été choisie pour collecter précisément le composé jaune. La Figure 59 montre le résultat de cette ultime étape de purification.

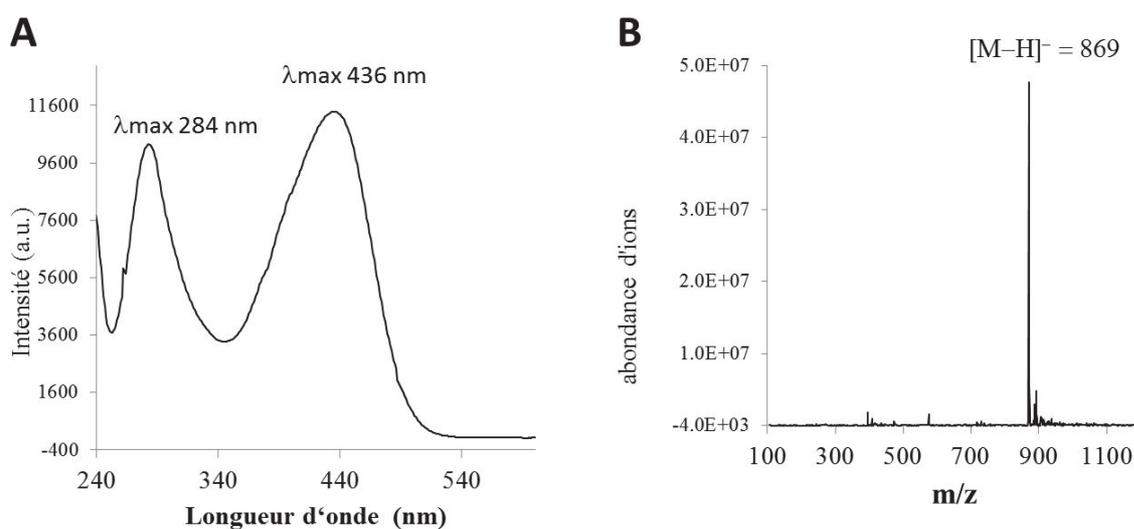


**Figure 59 – Analyse chromatographique du produit (6) à l'issue de la purification par CLHP à l'échelle semi-préparative**

Au final 1,45 mg de la fraction purifiée de produit 6 ont pu être obtenus et l'analyse chromatographique (Figure 60) indique un stade de pureté qui semble satisfaisant. Malheureusement, l'analyse en RMN a révélé que la fraction contenait encore trop d'impuretés pour une acquisition de spectres de qualité suffisante en vue d'une identification structurale complète. La fraction a pu néanmoins être utilisée efficacement pour une exploration fine par spectrométrie de masse.



**Figure 60 – Chromatogramme « Pic de base » en « Full MS » (A) et chromatogramme d'ion extrait à m/z 869 (B) de la fraction purifiée du produit (6)**



**Figure 61 – Spectre UV-Visible (A) et Spectre de Masse « Full MS » (B) du produit (6)**

Le produit (6) est donc un produit jaune qui présente deux bandes d'absorption dans son spectre UV-visible avec des maxima respectifs à 284 et 436 nm. Le **spectre de masse révèle un ion moléculaire  $[M-H]^-$  à m/z 869 indiquant une masse molaire de 870 g.mol<sup>-1</sup>.**

Le produit purifié a fait l'objet d'une analyse par SM<sup>2</sup> et SM<sup>3</sup> afin d'obtenir des informations sur sa structure et permettre de proposer des hypothèses structurales. Les Tableau 8 et Tableau 9 présentent respectivement les principaux ions fils de l'ion moléculaire à m/z 869 (SM<sup>2</sup>) et les principaux ions « petit-fils » 869→575 (SM<sup>3</sup>).

**Tableau 8 – Principaux ions fils en SM<sup>2</sup> de l'ion moléculaire du produit (6),  $[M-H]^-$  à m/z 869**

| $[M-H]^-$  | ions fragments SM <sup>2</sup> |          |          |         |         |         |         |
|------------|--------------------------------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|
| <b>869</b> | 575 (100)                      | 473 (30) | 407 (21) | 395 (8) | 449 (8) | 689 (5) | 717 (5) |

*Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intensités relatives.*

**Tableau 9 – Principaux ions « petit-fils » en SM<sup>3</sup> de l'ion 869→575**

| ion fragment SM <sup>2</sup> | ions fragments SM <sup>3</sup> |          |          |          |         |
|------------------------------|--------------------------------|----------|----------|----------|---------|
| <b>575</b>                   | 407 (100)                      | 395 (72) | 449 (61) | 179 (11) | 423 (8) |

*Les valeurs entre parenthèses correspondent aux intensités relatives.*

La perte de 294 uma à partir de l'ion moléculaire à m/z 869 (ion fragment à m/z 575) a rapidement fait penser à une perte de xyloglucose telle qu'elle est observée dans le cas du xyloglucoside de phlorétine (XPL, produit d'oxydation dérivé XGOPj de 598 Da), molécule significativement présente dans les jus et déjà connue pour générer des produits jaunes par oxydation (voir §, III. 3. 5. ). Par conséquent, cette première observation nous a mis sur la voie de l'implication de XPL dans la synthèse du produit (6). Ensuite, en considérant la possibilité d'une activité crésolase sur le XPL, il était concevable que la molécule évolue vers une forme hydroxylée (3-OH XPL) puis vers l'*o*-quinone correspondante, nous faisant ainsi considérer un intermédiaire réactionnel probable correspondant à la quinone de 3-hydroxyphloridzine ayant une masse molaire de 582 Da. Ensuite, la soustraction de cette masse à l'ion moléculaire m/z 869 donnait une masse de 287 Da relativement proche de celle d'une molécule de (-)-épicatéchine, autre composé largement présent dans le jus de *Dous Moen*. Ces éléments nous ont orientés vers une hypothèse de structure correspondant à un produit de couplage oxydatif faisant intervenir plusieurs étapes d'oxydation successives et impliquant une molécule de xyloglucoside de 3-hydroxyphlorétine et une molécule d'épicatéchine. Les principales fragmentations observées en SM<sup>3</sup> à partir du m/z 575 nous ont confortés dans cette hypothèse (Figure 62).

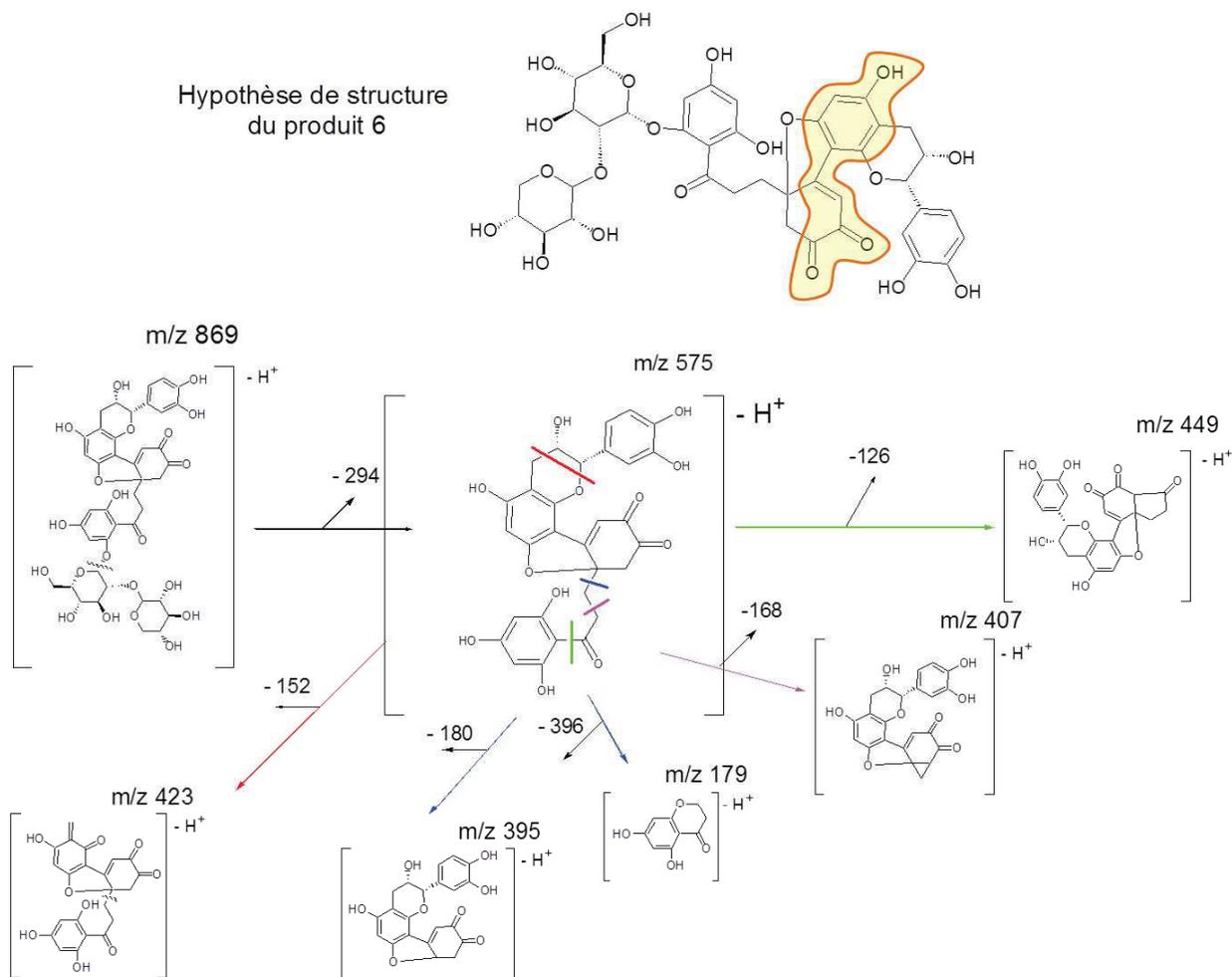


Figure 62 – Hypothèse structurale et schéma de fragmentation en SM<sup>2</sup> et SM<sup>3</sup> du produit (6) (la partie chromophore de la molécule est surlignée en jaune)

Le mécanisme de formation proposé est illustré dans la Figure 63. L'oxydation par voie enzymatique de XPL, catalysée par des activités de type crésolase et catécholase, génère l'*ortho*-quinone de 3-hydroxyphloridzine. Celle-ci réagit avec la (-)-épicatechine au niveau du noyau A (site nucléophile en position 8) par addition de type Michael 1,4 pour former une structure de type biaryle après réaromatation. Le catéchol ainsi reformé est à nouveau oxydé en *o*-quinone par voie enzymatique ou plus vraisemblablement par un mécanisme d'oxydo-réduction couplé avec d'autres quinones présentes dans le milieu. Cette *o*-quinone secondaire suit la voie de l'addition intramoléculaire de type Michael pour conduire au produit final (6), codé XPL-EC/Ox.

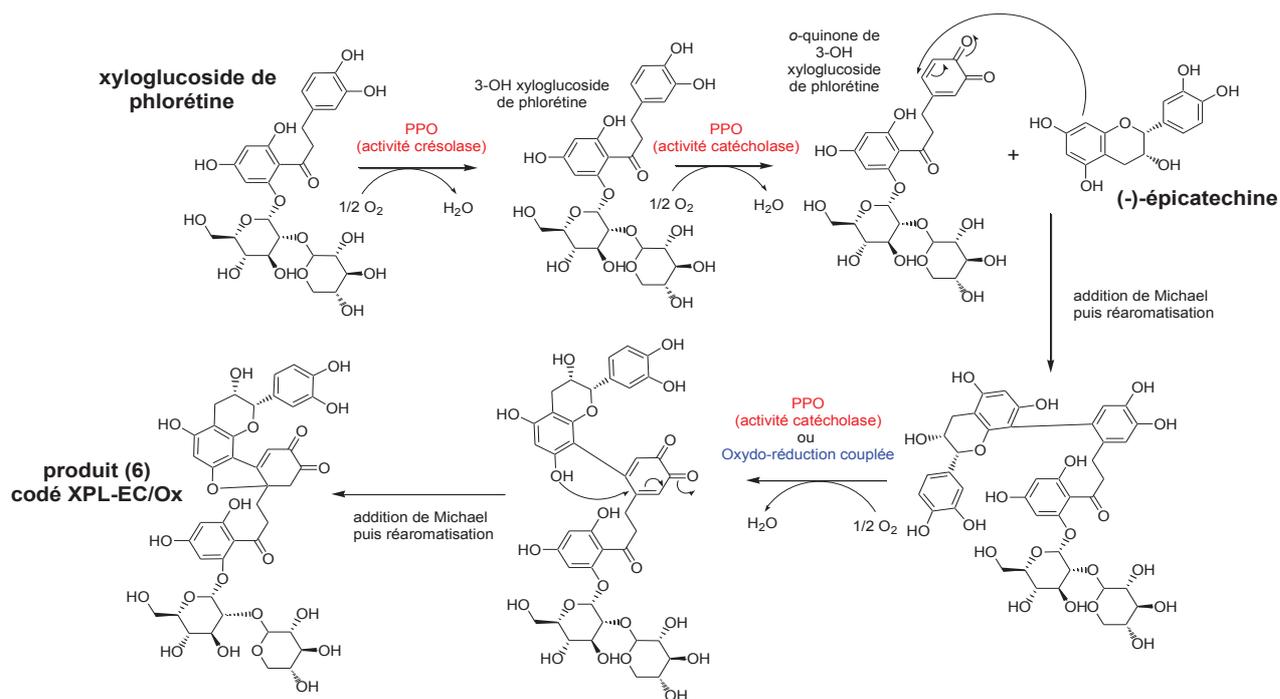


Figure 63 – Mécanisme hypothétique de formation du produit 6 (XPL-EC/Ox)

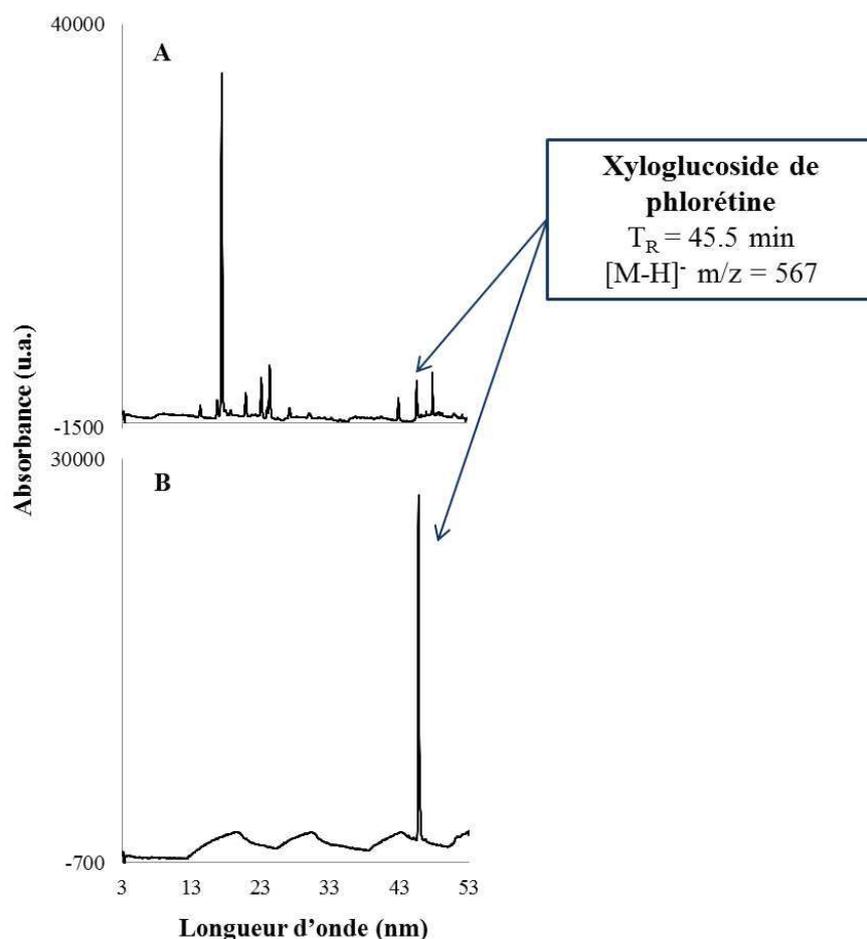
### III. 3. 7. SYNTHÈSE EN SOLUTION MODÈLE DES DEUX MOLÉCULES COLOREES

#### (1) (PXGOPj) ET (6) (XPL-EC/Ox) TROUVÉES DANS LES JUS

Afin d'apporter des éléments complémentaires permettant de consolider les hypothèses de structures et de mécanismes de formation des deux molécules jaunes identifiées dans des moûts de pomme PXGOPj (produit 1) et XPL-EC/Ox (produit 6), une étude en solution modèle a été menée en mettant en œuvre une incubation d'un mélange de xyloglucoside de phlorétine (XPL) et de (-)-épicatéchine (EC) en présence d'un extrait de polyphénoloxydase (PPO) de pomme. Étant donné que le xyloglucoside de phlorétine n'est pas disponible commercialement, un prérequis à ce travail était la purification de cette molécule à partir d'une fraction de polyphénols issue d'un jus de pomme.

#### Purification de xyloglucoside de phlorétine (XPL) issu d'un extrait phénolique de jus de *Dous Moen* faiblement oxydé

Dans notre étude, il a été choisi de purifier le XPL à partir de l'extrait de jus de *Dous Moen* faiblement oxydé disponible en grande quantité.



**Figure 64 - Chromatogrammes à 280 nm de l'extrait phénolique issu du jus de *Dous Moen* protégé de l'oxydation (A) et de la fraction obtenue après purification à l'échelle semi-préparative du xyloglucoside de phlorétine (B)**

Sa teneur en composé d'intérêt s'est révélée clairement plus importante que dans l'extrait oxydé, à l'image de ce qui a été constaté pour les quantifications dans les jus produits en petits volumes ( $48.0 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le jus de *Dous Moen* protégé de l'oxydation contre  $28.6 \text{ mg.L}^{-1}$  dans le jus oxydé, Figure 4). En outre, dans nos conditions d'analyses chromatographiques, ce composé relativement apolaire est élué en fin de gradient à 45,5 min comme illustré en Figure 64 sur le chromatogramme A, dans une zone où l'on note peu de co-élutions. Ainsi, l'obtention d'une fraction purifiée a été, dans ce contexte, plutôt aisée. Le chromatogramme à 280 nm de cette fraction est présenté en Figure 64 B : le xyloglucoside de phlorétine y apparaît comme étant le seul composé phénolique présent dans l'extrait. Au vu de ces résultats, il a été considéré que le produit était suffisamment pur dans cette fraction lyophilisée pour pouvoir l'utiliser directement comme substrat au cours de l'incubation enzymatique envisagée.

#### **Incubation d'épicatéchine et de xyloglucoside de phlorétine en présence de PPO en solution modèle type jus oxydé de *Dous Moen***

Un composé coloré présentant une masse moléculaire de 870 Da a été repéré dans les jus de pomme (cf –§ III. 3. 6. ). Les informations obtenues en spectrométrie de masse permettent de proposer une hypothèse quant à sa structure : il s’agirait d’un codimère oxydé d’(-)-épicatéchine (EC) et de xyloglucoside de phlorétine (XPL), noté XPL-EC/Ox (cf –§ III. 3. 6. ). Malgré plusieurs étapes de purification, il n’a pas été possible d’obtenir un produit totalement pur et disponible en quantité suffisante pour caractériser la structure en RMN. Par conséquent, afin de valider l’hypothèse structurale proposée, une incubation enzymatique des précurseurs phénoliques incolores supposés (EC et XPL) a été mise en œuvre en milieu modèle, dans des conditions proches de celles du jus de *Dous Moen* oxydé à partir duquel le composé coloré d’intérêt a été mis en évidence, extrait et purifié. La dégradation des substrats et la formation des produits ont été suivies par CLHP couplée à un détecteur UV-visible. La Figure 65 présente les chromatogrammes obtenus à 420 nm, à deux temps d’incubation différents.

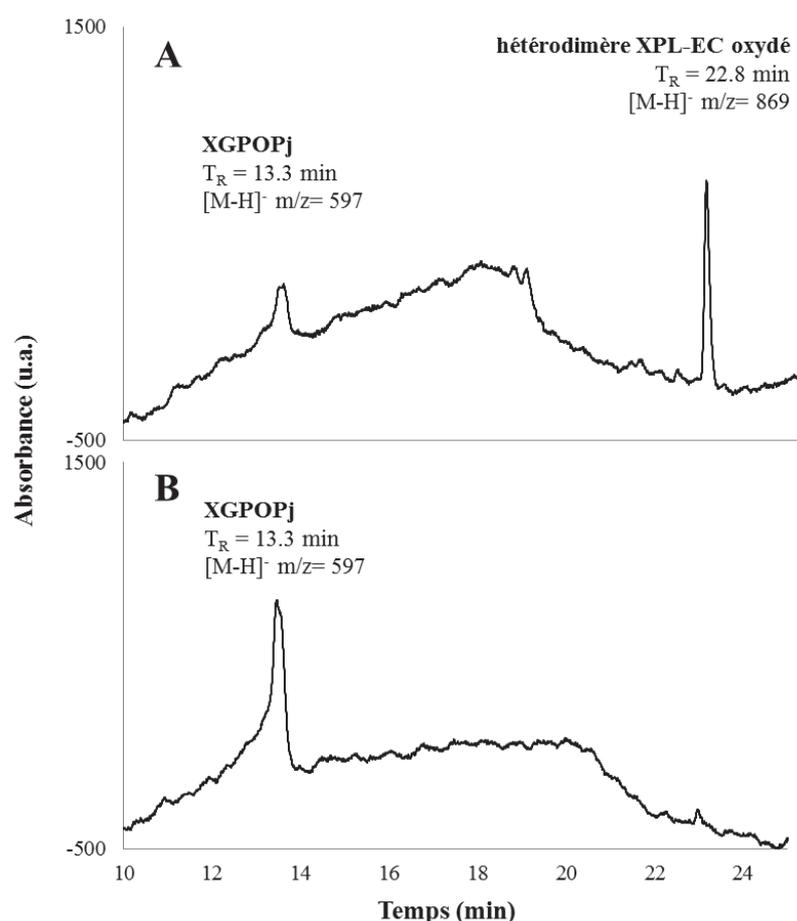
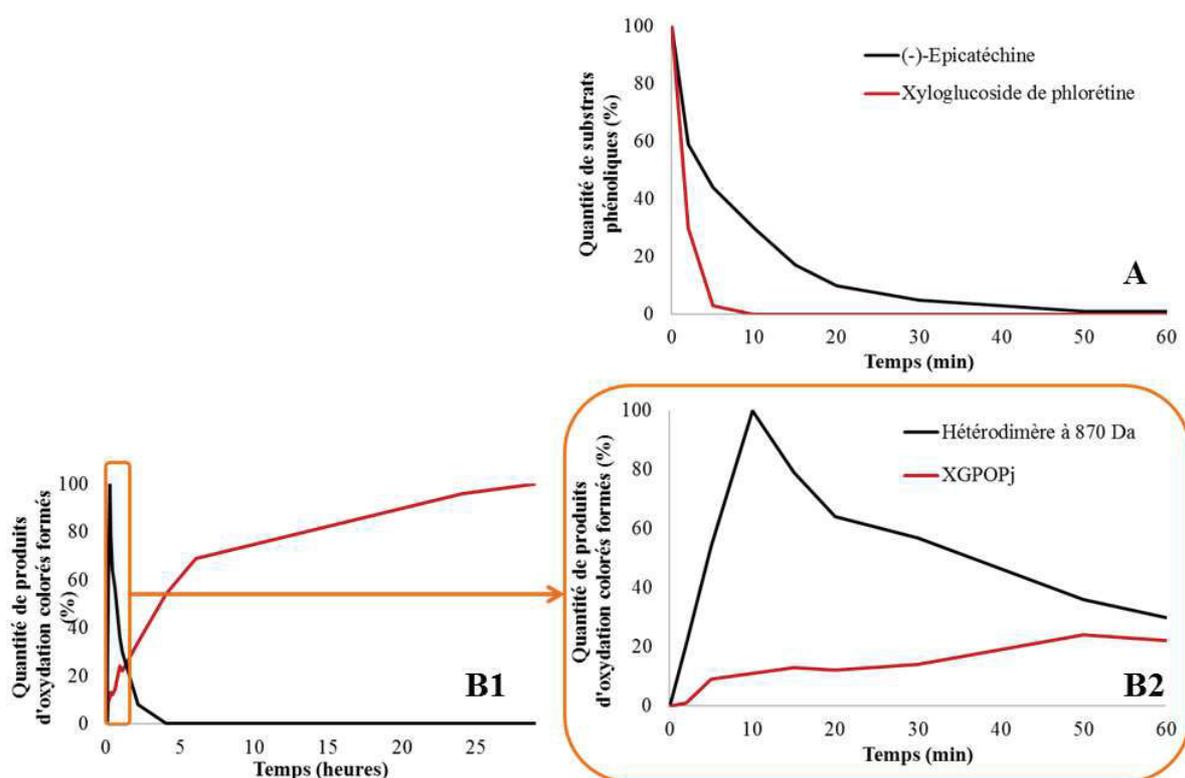


Figure 65 - Chromatogrammes à 420 nm montrant les produits d’oxydation colorés obtenus après (A) 10 min et (B) 4 h d’incubation de XPL et EC en présence de PPO de pomme

Après 10 min d’incubation (Figure 65 A), un pic correspondant à un composé coloré est visible au temps de rétention de 22,8 min et la molécule déprotonée  $[M-H]^-$  correspondante présente un  $m/z = 869$ . Ceci correspond bien au produit d’oxydation coloré (6) identifié dans les jus oxydés (Tableau 3)

et qui a fait l'objet du travail de purification présenté précédemment. L'hypothèse structurale d'un codimère oxydé émise en §III. 3. 6. apparaît donc tout à fait vraisemblable. Il convient de noter également la présence au bout de 10 min d'un autre pic correspondant à un composé jaune, pic qui se retrouve avec une plus forte intensité aux temps d'incubation ultérieurs et notamment au bout de 4 h (Figure 65 B). Ce composé, élué à 13,3 min et dont le m/z est de 597, correspond au PXGOPj, analogue du POPj, également identifié dans les jus, en particulier dans celui produit avec la variété *Guillevic*. La formation de ce produit d'oxydation était prévisible puisqu'il dérive directement du xyloglucoside de phlorétine par catalyse enzymatique de l'oxydation.



**Figure 66 – Suivi de la cinétique de disparition des substrats (A) et de formation des produits colorés (B1 et B2) au cours de l'incubation enzymatique en présence de PPO de pomme.**

Le xyloglucoside de phlorétine ( $38.9 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et l'épicatéchine ( $85.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ont été incubés en présence d'un extrait de PPO de pomme, en tampon malate  $29 \text{ mM}$  et à  $\text{pH } 3.9$ .

- (A) Les proportions indiquées en % sont obtenues par intégration de l'aire des pics chromatographiques à  $280 \text{ nm}$ , en considérant que l'aire du pic à  $0 \text{ min}$  correspond à  $100 \%$  pour chaque substrat.
- (B) Les proportions indiquées en % sont obtenues par intégration de l'aire des pics chromatographiques à  $420 \text{ nm}$ , en considérant arbitrairement que l'aire du pic le plus intense obtenu au cours de cette cinétique correspond à  $100 \%$  pour chaque produit considéré.

La Figure 66 présente les cinétiques de disparition des substrats et de formation des deux produits d'oxydation colorés.

La consommation des substrats par la réaction enzymatique est assez rapide, en particulier dans le cas du xyloglucoside de phlorétine. En effet, au bout de 2 min d'incubation, la teneur en xyloglucoside de phlorétine initiale a déjà diminué de 70% contre 41 % pour l'épicatéchine. Au bout de 10 min, le xyloglucoside de phlorétine n'est plus détecté dans le milieu alors qu'une heure est nécessaire pour voir l'épicatéchine disparaître totalement. Notons tout de même que les concentrations massiques initiales sont différentes pour les deux substrats, l'épicatéchine étant plus de deux fois plus concentrée que le xyloglucoside de phlorétine. On rappelle que l'objectif était de se placer au plus près des conditions d'un jus de *Dous Moen* oxydé.

Incontestablement, l'épicatéchine est un substrat de la PPO (Nicolas et al., 1994) et son oxydation enzymatique par la polyphénoloxydase en solution modèle peut conduire à des produits d'oxydation de type déhydro(oligo)catéchines. Cela a pu être montré dans des travaux antérieurs concernant l'oxydation enzymatique des catéchines (Guyot et al., 1996; Weinges et al., 1972). Etonnamment, ces produits, bien que recherchés par les chromatogrammes d'ions extraits à  $m/z = 577$ ,  $m/z = 865$ ,  $m/z = 1153$  correspondant respectivement aux dimères, trimères ou tétramères de type déhydrocatéchines (CIE non présentés dans ce manuscrit), n'ont pas été détectés dans le milieu. Ils ne sont donc pas formés ou alors en trop faibles quantités pour être détectables dans nos conditions d'analyse. Ces résultats tendent à montrer que l'affinité de l'enzyme est beaucoup plus forte pour le xyloglucoside de phlorétine que pour l'épicatéchine. Dans ce sens, Richard-Forget (Forget-Richard, 1992) a montré qu'à pH 4,5 dans une solution saturée en air, le  $K_m$  de la PPO de pomme était de 5,9 pour la (-)-épicatéchine et de 0,5 pour la phloridzine. Son étude atteste ainsi d'une affinité largement plus forte de l'enzyme pour la dihydrochalcone que pour le flavanol. Nos observations sont donc assez cohérentes avec les données de cette étude. Oleszek et al. (Oleszek et al., 1989) ont d'ailleurs mentionné que le xyloglucoside de phlorétine était même un substrat plus facilement oxydable par une *o*-diphénolase que la phloridzine. Cela pourrait expliquer la prédominance du PXGOPj dans les jus étudiés dans notre étude par rapport à la présence du POPj. Néanmoins, il est important d'émettre quelques réserves concernant cette affirmation puisque dans leurs travaux, ces auteurs ont uniquement tenu compte du brunissement de la solution pour tirer leurs conclusions et n'ont donc pas considéré les nombreux produits d'oxydation incolores pouvant se former. En effet, dans leur étude en solution modèle à pH 5,5, ils ne se sont intéressés qu'au suivi de l'absorbance à 420 nm par spectrophotométrie : la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine sont alors apparues comme les substrats les plus facilement oxydables par l'enzyme.

L'incubation enzymatique de xyloglucoside de phlorétine et d'épicatéchine réalisée dans notre étude permet de soutenir l'hypothèse formulée après analyse de la fragmentation en  $MS^n$  du composé à 870

Da : puisque le composé se forme dans le milieu, il s'agit bien d'un produit oxydé dérivant d'un couplage entre un xyloglucoside de phlorétine et une épicatechine.

La dihydrochalcone apparaissant ici comme le substrat préférentiel de l'enzyme, le mécanisme de formation proposé en Figure 63, c'est-à-dire l'addition d'une *o*-quinone de xyloglucoside de phlorétine sur une unité épicatechine, semble être le plus probable.

Si l'on considère à présent les cinétiques de formation des produits colorés, elles se révèlent très différentes pour le PXGOPj et pour XPL-EC/Ox. En effet, XPL-EC/Ox commence à se former dans le milieu dès la mise en présence des substrats et sa teneur maximale est atteinte après 10 min. Le xyloglucoside de phlorétine étant totalement consommé après 10 min, le composé coloré ne peut dès lors plus se former. On note toutefois une diminution rapide de sa teneur dans le milieu et sa disparition complète après 4 heures d'incubation. Dans les conditions de la solution modèle, XPL-EC/Ox est donc un produit coloré transitoire. On suppose en effet que ce composé présente un noyau catéchol libre, celui-ci pourrait donc subir une oxydation supplémentaire dans le milieu, soit en étant directement la cible de la réaction catalysée par la PPO, soit dans le cadre de réactions d'oxydoréductions couplées. Il évoluerait ainsi vers un nouveau produit incolore présentant un degré d'oxydation supérieur.

En parallèle, la quantité de PXGOPj augmente lentement et continuellement tout au long du suivi cinétique, cette augmentation se poursuivant bien après la consommation totale du xyloglucoside de phlorétine, le substrat dont il dérive. Ceci concorde avec les données de la littérature concernant la formation du POPj. En effet, l'étude de Guyot et al (Guyot et al., 2007) a mis en évidence, suite à une incubation en milieu modèle de phloridzine en présence de PPO de champignon, que la formation du POPj nécessitait plusieurs étapes successives se déroulant sur plusieurs heures (Guyot, Serrand et al. 2007). Après une phase de latence, durant laquelle n'intervient aucune réaction d'oxydation, la phloridzine est hydroxylée en 3-OH phloridzine dont l'oxydation en son *o*-quinone est catalysée par l'activité *o*-diphénolase de la PPO. Cette *o*-quinone est rapidement transformée en POPi, composé incolore qui s'accumule dans le milieu jusqu'à être converti en POPj, cette dernière réaction étant particulièrement lente. On s'attend dans notre étude à retrouver les mêmes mécanismes réactionnels pour aboutir à la formation du PXGOPj. Pourtant ici, aucune phase de latence n'est clairement notée. En réalité, l'existence de cette période serait liée au temps nécessaire pour que s'opère la conversion de la PPO de l'état *met* en état *oxy*, seul état structural dans lequel l'enzyme est capable d'exercer son activité crésolase (monophénolase). Oszmianski & Lee (Oszmianski and Lee, 1991) ont néanmoins montré que cette latence pouvait significativement diminuer voire disparaître lorsqu'un substrat *o*-diphénolique, et notamment la catéchine ou l'acide chlorogénique, était présent en plus des glycosides de phlorétine dans le milieu, dès le début de réaction (Oszmianski and Lee, 1991). La réaction d'oxydation peut alors démarrer sans attendre qu'une quantité suffisante d'*o*-diphénols soit produite à

partir des monophénols. Ainsi, la présence d'(-)-épicatéchine dans le milieu d'incubation explique probablement l'absence notable de phase de latence dans les conditions de notre étude.

L'étape *a priori* limitante d'hydroxylation du xyloglucoside de phlorétine en 3-hydroxy-xyloglucoside de phlorétine (3-OH-XPL) devrait donc pouvoir s'opérer très rapidement. Le chromatogramme d'ion extrait à  $m/z = 583$ , correspondant à la molécule de 3-OH-XPL déprotonée, est présenté en Figure 67A pour différentes durées d'incubation. Cette espèce intermédiaire est effectivement détectée dans le milieu très rapidement après le début de la réaction enzymatique : le 3-OH-XPL est fortement présent après 2 min d'incubation puis sa concentration dans le milieu diminue progressivement. Le composé n'est plus détecté après 15 min d'incubation, ce qui semble logique puisqu'alors le xyloglucoside de phlorétine a été totalement consommé par la réaction. Ce 3-OH-XPL, converti en son *o*-quinone correspondante, réagit rapidement pour former du PXGOPi incolore (600 Da), comme en attestent les chromatogrammes d'ion extrait à  $m/z = 599$  en Figure 67 B. Le composé incolore est lui aussi détecté dans le milieu après 2 min d'incubation. Il s'y accumule et atteint une concentration maximale au bout de 15 min, ce qui correspond à la conversion totale du 3-OH-XPL formé en PXGOPi. La concentration en PXGOPi diminue ensuite lentement mais continuellement et il n'est plus détecté après plus de 2 heures d'incubation. Cette diminution est à mettre en lien avec la conversion progressive du PXGOPi en PXGOPj, étape particulièrement lente si l'on se réfère aux données disponibles pour la formation du POPj (Guyot et al., 2007). En effet, elle nécessite l'intervention de la PPO or l'enzyme présente une affinité plus faible pour le PXGOPi que pour le xyloglucoside de phlorétine, le 3-OH-XPL, et probablement dans notre étude pour l'épicatéchine. L'enzyme est donc plus facilement disponible pour cette réaction lorsque tous les autres substrats ont été consommés. Notons par ailleurs que le PXGOPj continue à s'accumuler dans le milieu même après disparition du PXGOPi (Figure 66 et Figure 67 B). Ceci est probablement lié au temps nécessaire pour que l'ensemble des molécules de PXGOPi oxydées présentes dans le milieu subissent l'addition nucléophile intramoléculaire indispensable à la formation du colorant.

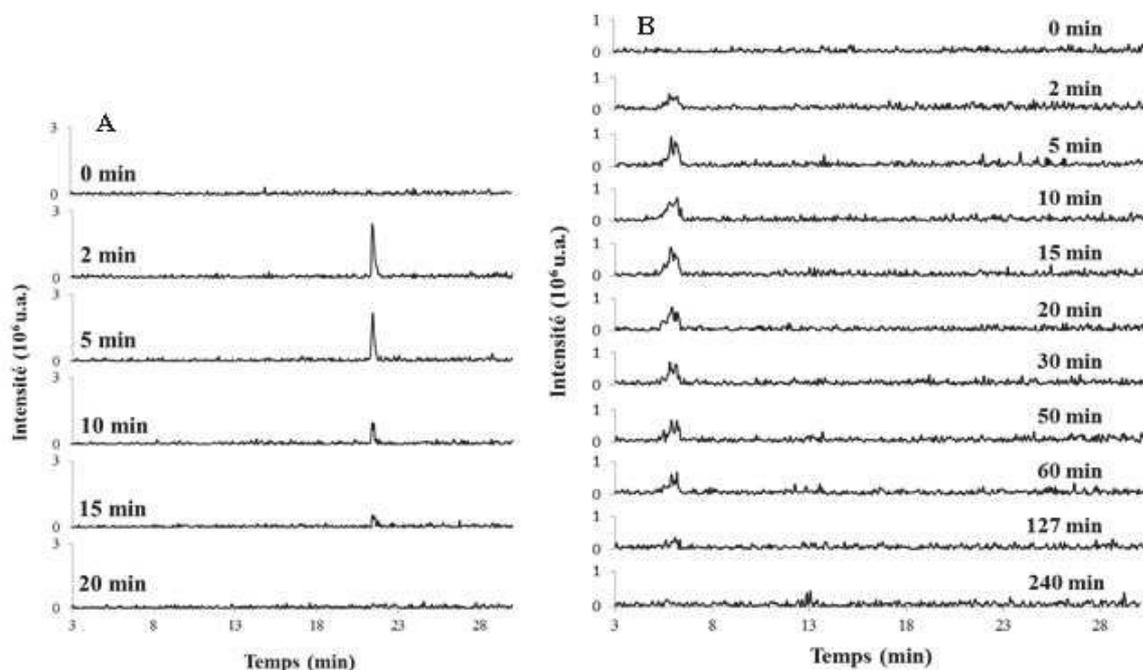


Figure 67 - Chromatogrammes d'ions extraits (A) à  $m/z = 583$  pour le 3-hydroxy-xyloglucoside de phlorétine et (B) à  $m/z = 599$  pour le produit d'oxydation incolore du xyloglucoside de phlorétine (PXGOP<sub>j</sub>), à différents temps d'incubation

En définitive, cette incubation enzymatique a mis en évidence, conformément à ce que l'on attendait, que le PXGOP<sub>j</sub> se forme selon un mécanisme spécifique et séquentiel similaire à celui rencontré dans le cas de la formation du POP<sub>j</sub>.

### III. 3. 8. SYNTHÈSE ENZYMATIQUE EN MILIEU MODÈLE DE COMPOSÉS COLORES ISSUS DE L'OXYDATION DE LA (-)-EPICATECHINE

Les composés de la classe des catéchines sont connus pour être fortement impliqués dans le brunissement enzymatique de la pomme et des jus (Nicolas et al., 1994). Ainsi, des variétés plus riches en catéchines donnent généralement des jus plus colorés (Amiot et al., 1992). Nous avons pu l'observer dans le cas des jus de *Dous Moen*, une variété très riche en catéchines donnant un jus de coloration orange très intense. Notre objectif était ici d'explorer en milieu enzymatique modèle l'oxydation de la (-)-épicatéchine, catéchine majoritaire de la pomme. Le but concret de cette étape de synthèse était de disposer en quantité suffisante de molécules jaunes bien caractérisées, représentatives de l'oxydation de l'épicatéchine afin de pouvoir en étudier les propriétés colorantes et la stabilité par comparaison avec les molécules issues de l'oxydation des dihydrochalcones (Chapitre IV. ).

L'incubation a été réalisée à pH 5,6 soit proche de celui de l'activité optimale de la PPO de pomme (Rocha and Morais, 2001; Trejo-Gonzalez and Soto-Valdez, 1991). Un travail antérieur réalisé au

laboratoire avait permis de préciser les conditions de concentration en substrat et en enzyme permettant de favoriser la synthèse des produits jaunes. Nous ne présentons ici que les résultats de l'incubation en gros volume (1 litre) mise en œuvre pour la synthèse réalisée à l'échelle préparative pour la purification des produits jaunes.

### **III. 3. 8. 1. Analyse en CLHP-DBD-SM du milieu d'incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine**

Le profil chromatographique à 280 nm du milieu d'oxydation de l'épicatéchine par la polyphénoloxydase obtenu après 40 min d'incubation est présenté en Figure 68 A. Il met en évidence un milieu particulièrement complexe. Le pic le plus intense, élué à 22,9 min, correspond à l'épicatéchine résiduelle qui présente un ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z = 289$ . De nombreux pics, plus ou moins bien résolus, sont observés : l'oxydation de la (-)-épicatéchine par voie enzymatique aboutit donc à la formation d'un grand nombre de produits néoformés. Cela avait déjà été montré dans la littérature lors d'études de l'oxydation en solution modèle de monomères de flavanols par la polyphénol oxydase (Guyot et al., 1995; Oszmianski and Lee, 1990), la peroxydase (Weinges et al., 1972), les deux (Lopez-Serrano and Barcelo, 2002), par voie chimique (Young et al., 1987) ou encore par autoxydation (He et al., 2009; Sun and Miller, 2003). Les extractions d'ions à  $m/z = 577$ , 865, 1153 (CIE non présentés dans ce manuscrit), mettent en évidence la présence de déhydro - dimères, -trimères et -tétramères, respectivement. Ces oligomères correspondent à des déhydrooligoépicatéchines de type B, molécules incolores, isomères des procyanidines naturelles de type B. Ils en diffèrent par la nature et la position de leurs liaisons interflavoniques.

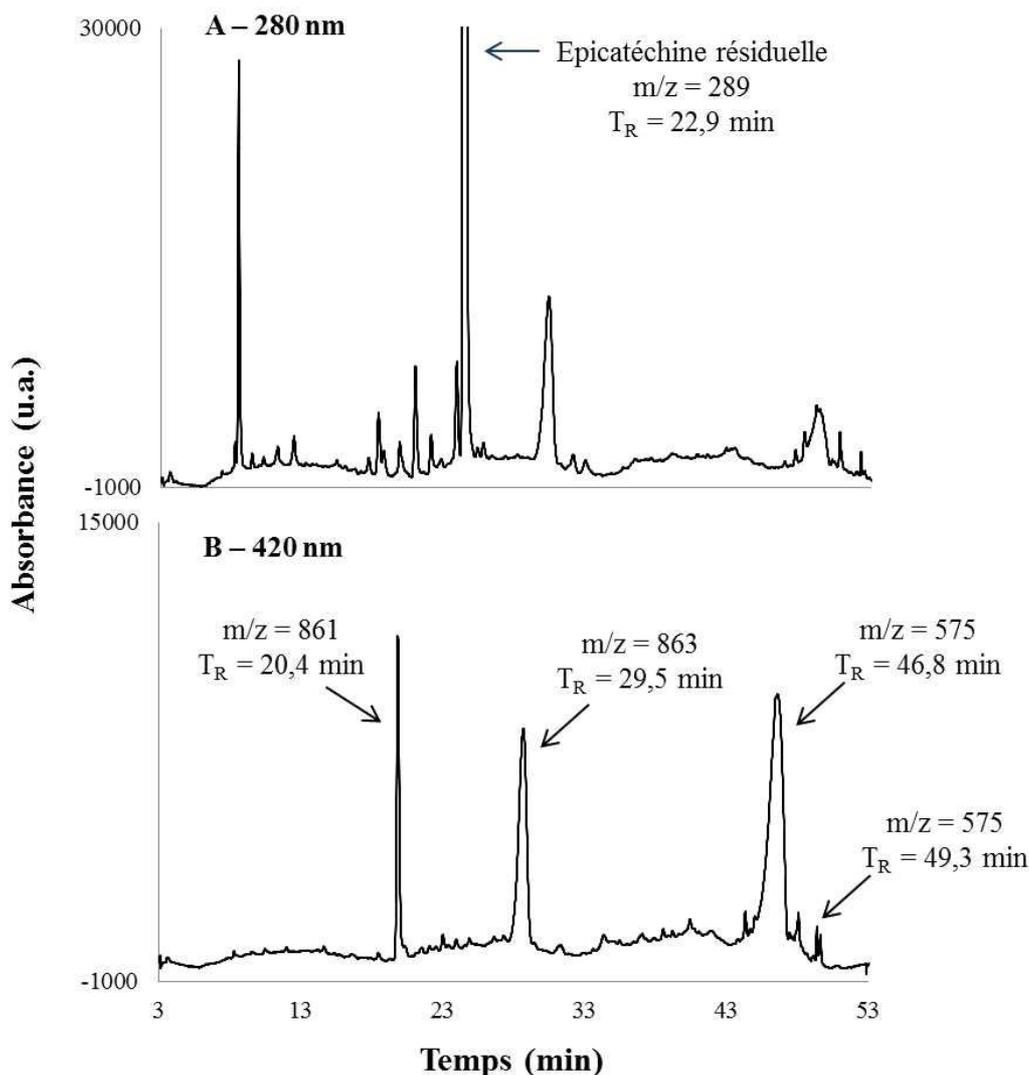


Figure 68 - Profils chromatographiques à 280 nm (A) et à 420 nm (B) des produits d'oxydation obtenus après incubation de l'épicatéchine à pH 5,6 en présence de PPO de pomme

Dans le contexte de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au profil chromatographique à 420 nm du milieu d'incubation qui permet la visualisation des produits jaunes. Celui-ci se révèle également assez complexe. De nombreux pics inclus dans un massif global mal résolu et de faible intensité sont visibles. Néanmoins, trois composés jaunes se démarquent nettement par la présence de trois pics intenses clairement majoritaires. Ils sont élués à 20,4 min, 29,5 min et 46,8 min et leurs ions pseudo-moléculaires respectifs  $[M-H]^-$  présentent des rapports  $m/z$  de 861, 863 et 575, soit des composés de masses molaires 862, 864 et 576 Da. Dans les conditions d'incubation de notre étude et en ne considérant que les produits colorés, la réaction d'oxydation de l'épicatéchine catalysée par la PPO favorise clairement la formation de deux trimères et d'un dimère. Le composé à 576 Da laisse penser à une déhydrodi(épi)catéchine de type A semblable à son équivalent déhydrodicatéchine caractérisée par Weinges (Weinges and Mattauch, 1971) et mentionnée

notamment par (Callemien and Collin, 2007; Guyot et al., 1996; Lea, 1984; Lopez-Serrano and Barcelo, 2002). Le chromatogramme d'ion extrait à  $m/z= 575$  (non présenté ici) indique en réalité la présence de deux dimères colorés de même masse. Le second dimère présente un pic fin et peu intense en CLHP-DBD, il est élué plus tardivement que le premier, à 49,3 min. Sa présence est indiquée sur le chromatogramme à 420 nm en Figure 68 B.

Pour la suite de la discussion, ces dimères seront décrits par les codes D-576-1 ( $T_R = 46,8$  min) et D-576-2 ( $T_R = 49,3$  min) tandis que les deux trimères seront notés T-862 ( $T_r = 20,4$  min) et T-864 ( $T_r = 29,5$  min).

En termes de polarité, il faut remarquer que le trimère T-862 est étonnamment plus polaire que l'épicatéchine puisqu'il est élué plus tôt, le trimère T-864 est moins polaire que le premier tandis que les deux dimères D-576-1 et D-576-2 sont élués en fin de gradient et sont donc les plus apolaires des composés colorés sur lesquels l'étude a été ciblée. Notons par ailleurs que le trimère à T-862 et le dimère D-576-2 présentent tous deux des pics très fins, très bien résolus en chromatographie, contrairement au trimère de T-864 Da et au dimère D-576-1 dont le comportement est assez différent puisque les pics correspondant sont très élargis.

En intégrant l'aire des pics correspondant à ces composés colorés et en calculant le rapport de ces aires sur l'aire totale des produits jaunes-orangés (380-420 nm), alors on peut estimer que les trimères T-862 et T-864 et les dimères D-575-1 et D-575-2 représentent respectivement 3,4 ; 17,8 ; 16,0 et 0,8 % de la « couleur totale » observée sur le chromatogramme moyen pour cette gamme de longueurs d'onde, dans les conditions d'analyse appliquées. La même opération à 280 nm indique qu'ils ne représentent que 1,3 ; 6,2 ; 2,2 et 0,1 % de la fraction phénolique globale. Même si nous sommes conscient que cette estimation basée directement sur une absorbance ne peut être qu'approximative, on peut penser que les produits colorés formés apparaissent donc faiblement concentrés dans le milieu d'incubation : les voies réactionnelles d'oxydation de l'épicatéchine évoluent principalement vers la formation de produits incolores. Les faibles concentrations associées à de nombreuses co-élutions avec des molécules oxydées incolores rendent le travail de purification de ces composés colorés difficile. Les mêmes contraintes ont été rencontrées lors de la tentative de purification du composé coloré à 870 Da à partir du moût de *Dous Moen*. Les difficultés étaient même amplifiées dans la mesure où l'extrait phénolique oxydé issu d'un « vrai » jus de pomme s'avère nettement plus complexe qu'un extrait résultant de l'oxydation en solution modèle d'un seul composé phénolique.

### **III. 3. 8. 2. Comparaison des spectres UV-visible des quatre composés d'intérêt**

Les spectres UV-visibles considérés ici sont ceux obtenus pour les composés par le détecteur UV-visible à barrette de diodes dans les conditions d'analyse chromatographique. Le spectre de la (-)-

épicatéchine est présenté en Figure 69, il présente une seule bande avec un maximum d'absorption à 278 nm. Les spectres UV-visible des composés colorés étudiés (Figure 70) présentent tous cette même bande d'absorption vers 280 nm mais à celle-ci s'ajoutent au moins une à deux bandes supplémentaires dont une est décalée vers les plus fortes longueurs d'onde, dans le visible, témoignant ainsi que la structure de ces composés s'éloigne de celle du monomère initial: les étapes d'oxydation, d'additions et/ou réarrangements éventuels conduisent à la formation de structures dont la conjugaison est clairement augmentée.

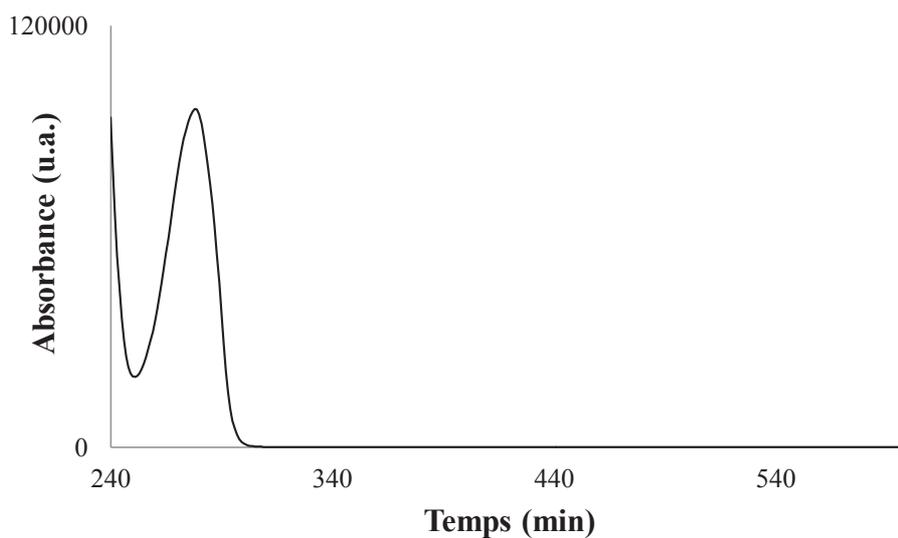
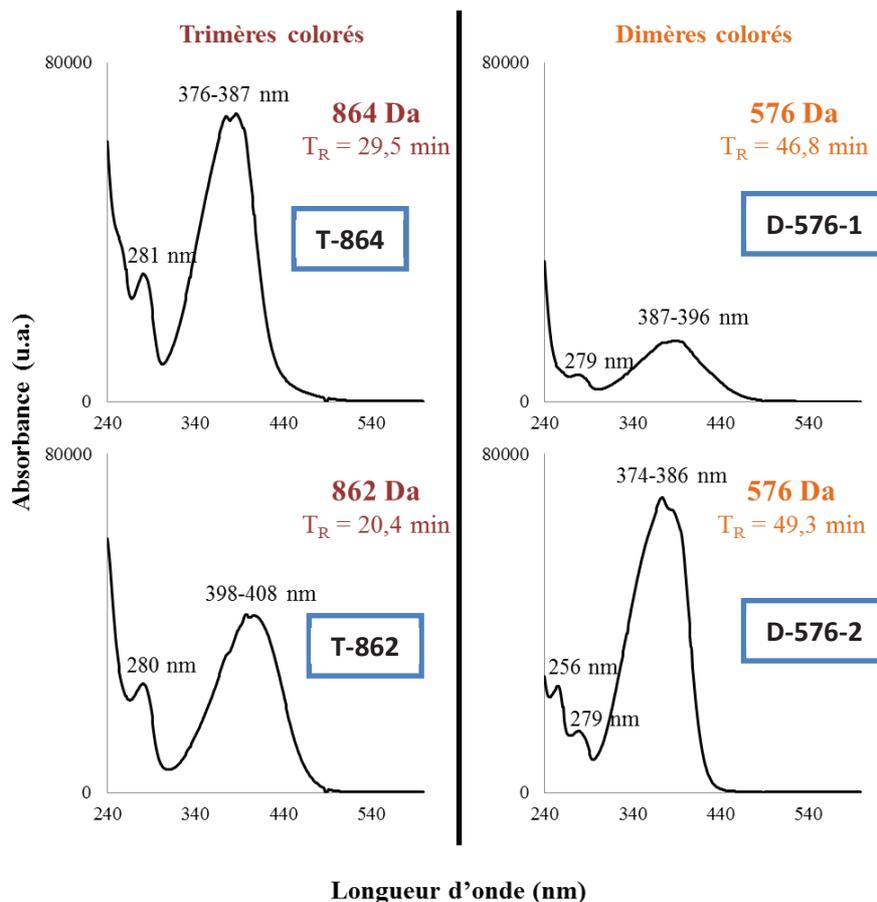


Figure 69 – Spectre UV-visible de la (-)-épicatéchine obtenu dans les conditions d'analyse en CLHP-DBD du milieu d'incubation enzymatique



**Figure 70** – Spectres UV-visible des dimères D-576-1 et D-576-2 et des deux trimères T-862 et T-864 obtenus dans les conditions d'analyse chromatographique du milieu d'incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine en présence d'un extrait de PPO de pomme.

Si l'on s'intéresse en premier lieu aux deux dimères colorés 576-1 et 576-2, leurs spectres diffèrent en termes de nombre de bandes, de forme de la bande dans le visible et de maximum d'absorption. On s'aperçoit que les caractéristiques chromatographiques et UV-Visible de ces deux dimères sont sensiblement similaires à celles observées par Guyot et al. (Guyot et al., 1995) dans leur étude des produits de l'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine par la PPO de raisin. Ainsi, le composé 576-1 présente 2 bandes d'absorption, l'une à 279 nm et l'autre, beaucoup plus large avec un maximum compris entre 387-396 nm. Le composé 576-2 présente trois bandes d'absorption, dont les maxima sont de 256 nm, 279 nm dans l'UV et dans une zone élargie entre 374-386 nm dans le visible. On peut donc supposer que ces deux dimères présentent aussi des caractéristiques structurales proches voire similaires aux structures dimériques de type déhydrodicatéchines A purifiées, identifiées et publiées ensuite par ces mêmes auteurs (Guyot et al., 1996).

Le spectre UV-Visible du trimère T-864 présente en fait beaucoup de similitudes avec celui du dimère D-576-2 (Figure 70) tandis que le spectre du trimère T-862 est lui très semblable à celui du dimère D-576-1. On peut donc en conclure que le motif moléculaire directement responsable de la couleur (« chromophore » de la molécule) est vraisemblablement le même pour ces deux couples de produits d'oxydation pourtant dans deux états de polymérisation différents. En revanche, les deux

trimères, entre eux, possèdent des spectres bien différents : le T-862, avec sa large bande dans le visible présentant un maximum d'absorption entre 398 et 408 nm, correspond à un produit beaucoup plus jaune-orange que le trimère T-864, dont la bande dans le visible culmine à 376-387 nm et présente une pente plus forte, ce qui correspond à une teinte jaune plus pure et plus brillante.

### **III. 3. 8. 3. Purification des produits par CLHP à l'échelle semi-préparative**

Il ne nous a pas été possible d'obtenir ces dimères en quantité suffisante ou sous une forme suffisamment stable pour en réaliser l'analyse RMN approfondie permettant d'accéder aux structures des composés. En particulier, le produit D-576-1, pourtant présent en concentration relativement élevée dans le milieu d'incubation, s'est avéré trop instable lors du travail de purification pour en disposer sous forme suffisamment pure pour une analyse RMN pertinente. Nous avons donc concentré nos efforts de purification sur les deux trimères T-864 et T-862. La Figure 71 présente les chromatogrammes à 280 nm et à 420 nm des fractions contenant les deux trimères purifiés T-864 et T-862. La comparaison avec le chromatogramme à 280 nm du milieu d'incubation initial nous permet de constater le degré élevé de purification atteint pour les deux composés, même si des contaminants visiblement mineurs apparaissent encore sous la forme de petits pics à proximité de la base du pic principal. Sur ces considérations, les niveaux de pureté chromatographique mesurés sur le chromatogramme à 280 nm ont été jugés suffisants pour entreprendre des analyses en RMN.

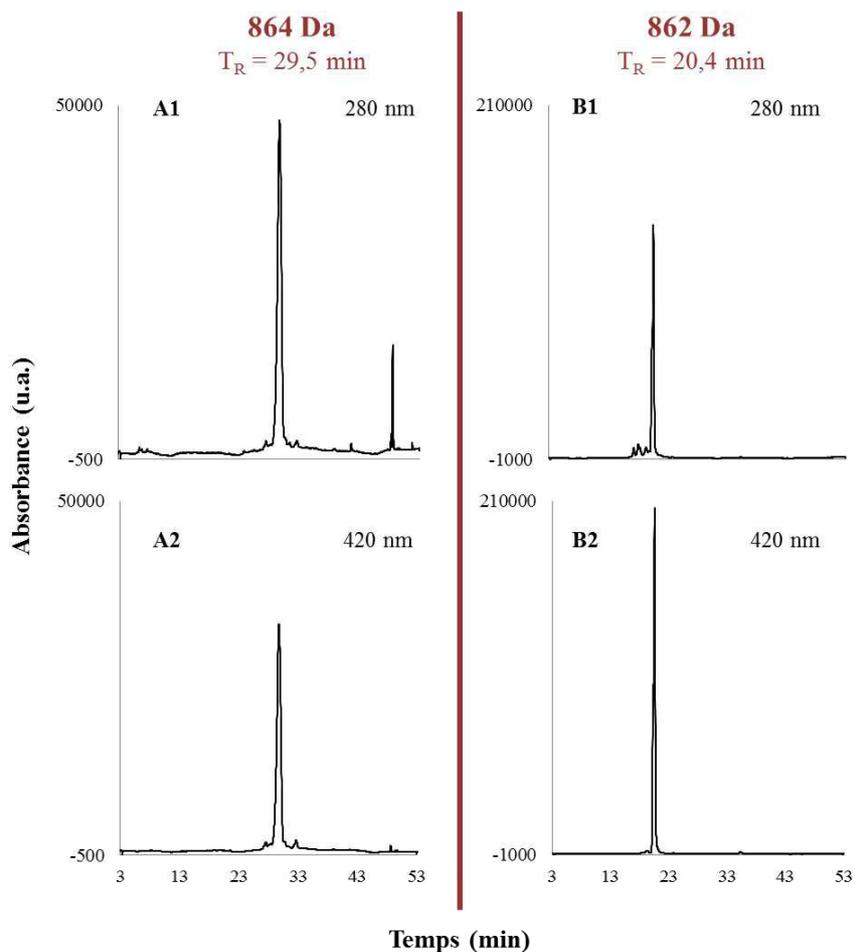


Figure 71 – Chromatogrammes CLHP à 280 nm (A1, B1) et à 420 nm (A2, B2) des fractions purifiées contenant les deux trimères T-864 (A) et T-862 (B)

### III. 3. 8. 4. Analyse RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ des produits colorés issus de l'oxydation enzymatique de la (-)-épicatéchine en solution modèle

- T-864, Déhydrotri(épi)catéchine de masse molaire  $864 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , m/z 863)

L'analyse RMN mono et bidimensionnelle du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  et l'interprétation des spectres ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC et HMBC) nous a permis de proposer la structure présentée en Figure 72. Les attributions des signaux du spectre du proton et du carbone correspondant à la molécule sont listées dans le Tableau 10.

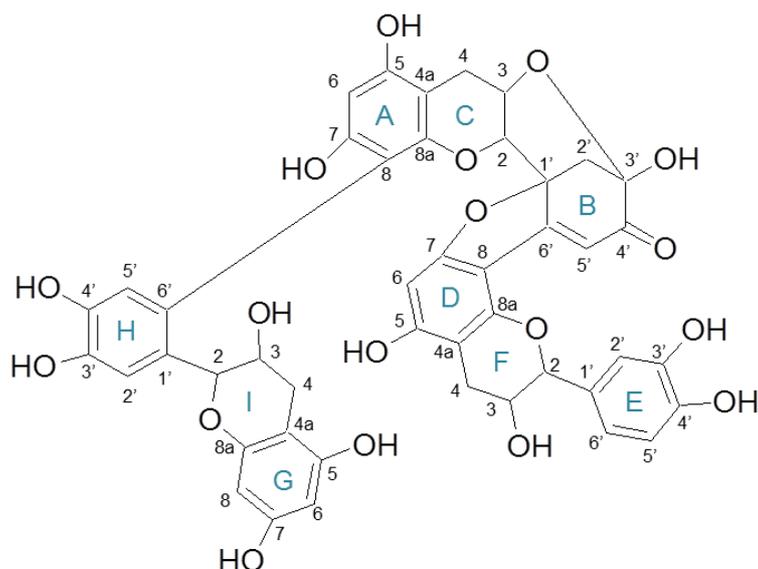


Figure 72 - Structure proposée pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 864 Da.

Les points clés de l'analyse structurale qui ont permis de proposer cette structure sont les suivants :

- Distinction des 3 carbones en position 8a : L'attribution des signaux des 3 carbones en position 8a pour chacun des 3 motifs catéchiques est essentielle. En effet, si l'on considère les 3 noyaux phloroglucinols A, D et G, on s'aperçoit que, pour chacun, l'environnement atomique immédiat du carbone en position 8a est très proche de celui des carbones en positions 5 et 7 (ces deux derniers sont liés d'une part à un atome d'oxygène phénolique, et d'autre part à deux carbones aromatiques). Leurs déplacements chimiques sont proches, dans la fourchette 150-160 ppm. Ainsi, le seul moyen de distinguer avec certitude chaque carbone en position 8a est d'observer, sur le spectre HMBC, le pic de corrélation entre le carbone en position 8a et le proton en position 2 (couplage  $^3J$  via l'époxy). Cette corrélation a été observée sans ambiguïté pour les trois carbones 8a.

-

Tableau 10 - Attributions  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la déhydrotri(épi)catéchine de type A de masse molaire 864 Da

| Position | Déplacement chimique<br>du $^{13}\text{C}$ (ppm) * | Déplacement chimique<br>du $^1\text{H}$ (ppm) | Multiplicité | Constante<br>de couplage (Hz) |
|----------|--|---|--------------|-------------------------------|
| A4a      | 100.9  |   |              |                               |
| A5       | 157.2  |   |              |                               |
| A6       | 97.8   | 6,05  | s            |                               |
| A7       | 155.7  |   |              |                               |
| A8       | 109.6  |   |              |                               |
| A8a      | 153.5  |   |              |                               |
| B1'      | 92.2   |   |              |                               |
| B2'      | 41.5   | 2,26  | d            | 12,6                          |
| -        | -  | 3,15  | d            | 12,6                          |
| B3'      | 96.2   |   |              |                               |
| B4'      | 193.6  |   |              |                               |
| B5'      | 110.9  | 6,15  | s            |                               |
| B6'      | 167.3  |   |              |                               |
| C2       | 81.1   | 4,19  | d            | 2,8                           |
| C3       | 70.3   | 5,02  | ddd          |                               |
| C4       | 25.3   | 2,6   | dd           | 18,4 ; 1,9                    |
| -        | -  | 3,12  | dd           | 18,4 ; 7,8                    |
| D4a      | 103.8  |   |              |                               |
| D5       | 165.8  |   |              |                               |
| D6       | 92.9   | 6,09  | s            |                               |
| D7       | 166.4  |   |              |                               |
| D8       | 106.8  |   |              |                               |
| D8a      | 155.9  |   |              |                               |
| E1'      | 133.2  |   |              |                               |
| E2'      | 116.2  | 7,06  | d            | 2,0                           |
| E3'      | 146,7 ou 146,8                                     |   |              |                               |
| E4'      | 146,7 ou 146,9                                     |   |              |                               |
| E5'      | 116.9  | 6,82  | d            | 8,2                           |
| E6'      | 120.4  | 6,93  | dd           | 8,2 ; 2,0                     |
| F2       | 80.9   | 5,27  |              |                               |
| F3       | 67.8   | 4,26  | m            |                               |
| F4       | 29.8   | 2,84  | dd           | 16,5 ; 2,2                    |
| -        | -  | 3,27  | dd           | 16,5 ; 4,3                    |
| G4a      | 100.8  |   |              |                               |
| G5       | 158.7  |   |              |                               |
| G6       | 96.9   | 5,95  | d            | 2,4                           |
| G7       | 158.1  |   |              |                               |
| G8       | 97.5   | 6,15  | d            | 2,4                           |
| G8a      | 159  |   |              |                               |
| H1'      | 131.9  |   |              |                               |
| H2'      | 116.4  | 6,94  | s            |                               |
| H3'      | 145.5  |   |              |                               |
| H4'      | 145.5  |   |              |                               |
| H5'      | 120  | 6,43  | s            |                               |
| H6'      | 124.4  |   |              |                               |
| I2       | 78.5   | 4,4   |              |                               |
| I3       | 66.4   | 3,72  | m            |                               |
| I4       | 30.1   | 2,29  | dd           | 16,7 ; 4,9                    |
| -        | -  | 2,56  | dd           | 16,7 ; ?                      |

s : singulet ; d : doublet ; dd : doublet de doublet ; ddd : doublet de doublet de doublet ; m : multiplet.

\*Les valeurs des déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}$  ont été obtenues en ajustant le  $\delta^{13}\text{C}$  du méthanol à 49,9 ppm.

- Caractérisation des 3 systèmes C6-C3-C6 : Sur la base de l'identification des 3 carbones 8a, il est ensuite possible d'élucider séparément les trois motifs structuraux C6-C3-C6 correspondant à la structure classique des flavonoïdes (ici de type flavanol). En premier lieu, les carbones 8a occupent une position assez centrale dans les motifs de type dihydrobenzopyranes, ce qui permet l'observation de corrélations stratégiques sur les spectres HMBC. Ainsi, après l'attribution de corrélations protons avec les carbones 8a, l'observation des systèmes de couplage proton-proton aliphatiques CH-CH-CH<sub>2</sub>- en position 2, 3 et 4 sont possibles. On peut ainsi montrer que les 3 systèmes dihydrobenzopyranes (cycles A-C, D-F et G-I) sont bien présents dans la structure. Ensuite, ces derniers sont distingués les uns des autres par l'observation des signaux des protons et des carbones des cycles B, E, et H en corrélation avec les signaux du proton et du carbone en position 2. Ainsi, les cycles E et H sont aisément identifiés comme des noyaux catéchols tels que présents dans la structure de l'épicatéchine. Ils se distinguent l'un de l'autre par le système de protons : le cycle H montre seulement 2 protons 2' et 5' apparaissant comme deux singulets tandis que le cycle E montre un système de couplage classique à 3 protons en position 2' (doublet), 5' (doublet) et 6' (doublet de doublet) tel que présent dans la structure de l'épicatéchine. Le cycle B se distingue aisément des cycles E et H car il n'a plus une structure de type catéchol : on y détecte en revanche un signal correspondant à un -CH<sub>2</sub> en position 2' ainsi qu'un carbone très déblindé en position 4' en accord avec une fonction cétone conjuguée. Un proton singulet est observé en accord avec un positionnement en 5' du cycle B.
- Liaisons entre les 3 systèmes C6-C3-C6: Enfin, un dernier point clé est la détermination des positions des liaisons interflavoniques entre les 3 unités catéchiques.

Liaison entre les carbones 6' et 8 des cycles H et cycles A : L'implication de la position 6' dans la liaison avec le cycle H ne pose pas de problème particulier d'identification. En effet, l'absence de proton en 6' qui en résulte est en accord avec le système de deux singulets discutés ci-dessus pour ce cycle. Toute autre position pour cette liaison ne permettrait pas d'avoir un tel système de protons sur le cycle H. En revanche, la position de l'autre extrémité est moins simple à valider car la possibilité d'une liaison en 6 sur le cycle A n'était *a priori* pas exclue. Cette question a pu être résolue en observant le spectre HMBC: le carbone 5 du cycle A, préalablement attribué par une corrélation avec les protons 4 du cycle C, est aussi fortement vu par un proton singulet attribuable à la position 6 du cycle A. Ce même proton 6 a aussi des corrélations fortes avec les carbones en position 7, 8 et 4a du cycle A. En conséquence, la liaison du cycle H ne peut se faire qu'en position 8 du cycle A.

Liaison entre les carbones 6' et 8 des cycles B et D : le raisonnement est ici le même que celui décrit précédemment. L'observation du spectre HMBC montre que le carbone 5 du cycle D, préalablement attribué par une corrélation avec les protons 4 du cycle F, est aussi vu par un proton singulet attribuable sans ambiguïté à la position 6 du cycle D. Seule la position 8 est disponible pour la liaison avec le cycle B.

- T-862, Déhydrotri(épi)catéchine de masse molaire 862g.mol<sup>-1</sup> ([M-H]<sup>-</sup>, m/z 861)

L'analyse RMN mono et bidimensionnelle du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C et l'interprétation des spectres (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMQC et HMBC) nous a permis de proposer la structure présentée en Figure 73. Les attributions des signaux du spectre du proton et du carbone correspondant à la molécule sont listées dans le Tableau 11.

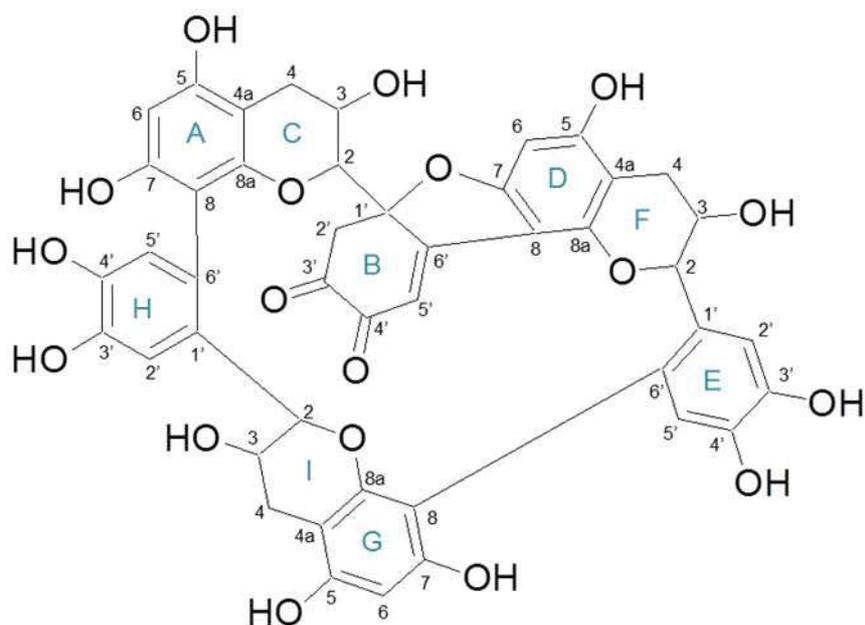


Figure 73 - Structure proposée pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 862 Da.

La structure proposée présente beaucoup de similitudes avec celle du trimère de 864 Da discutée précédemment et l'argumentation des attributions des signaux RMN est donc, pour beaucoup, similaire à celle décrite ci-dessus. Par exemple, l'attribution des 3 carbones C8a est ici aussi confirmée par l'observation des corrélations avec les protons en position 2 au travers de l'oxygène de la fonction époxy. La molécule présente cependant une structure différente par la présence de deux fonctions cétones conjuguées sur le cycle B, comme le montrent les déplacements chimiques très élevés pour les carbones C3'-B et C2'-B, respectivement à 180.6 et 194.4 ppm. Les positions de ces deux fonctions sont argumentées par l'observation des taches de corrélation des protons 2' du cycle B avec les 2

cétones ainsi qu'avec le carbone en position 2 du cycle C. Une tache de corrélation entre le singulet 5' du cycle B et le carbone en position 8 du cycle D est également observée.

L'autre différence majeure, qui explique notamment l'écart de 2 unités de masse entre les deux structures (862 au lieu de 864 Da), réside dans la formation d'une liaison supplémentaire de type C-C biaryle entre le noyau E et le cycle G. La position en C6' sur le cycle G est avérée par l'observation des protons 2' et 5', tous deux singulets et donc positionnés en *para* l'un par rapport à l'autre. Toute autre position pour cette liaison ne permettrait pas d'avoir un tel système de protons sur le cycle E. Pour l'autre extrémité, la position en 8 plutôt qu'en 6 sur le noyau G est avérée en observant le spectre HMBC: le carbone 5 du cycle G, préalablement attribué par une corrélation avec les protons 4 du cycle I, est aussi vu par un proton singulet attribuable sans ambiguïté à la position 6 du cycle G.

Tableau 11 - Attributions  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la déhydrotri(épi)catéchine de type A de masse molaire 862 Da

| Position | Déplacement chimique du $^{13}\text{C}$ (ppm) * | Déplacement chimique du $^1\text{H}$ (ppm) | Multiplicité | Constante de couplage (Hz) |
|----------|---|--|--------------|----------------------------|
| A4a      | 101.4   |  |              |                            |
| A5       | 158.4   |  |              |                            |
| A6       | 97.8  | 6,09                                       | s            |                            |
| A7       | 156.1   |  |              |                            |
| A8       | 109.1   |  |              |                            |
| A8a      | 152.7   |  |              |                            |
| B1'      | 92.4  |  |              |                            |
| B2'      | 49.1  | 2,87                                       | ~d           | 14,5                       |
| -        | -   | 4,5  | d            | 14,5                       |
| B3'      | 180.6   |  |              |                            |
| B4'      | 194.4   |  |              |                            |
| B5'      | 119.4   | 6,27                                       | s            |                            |
| B6'      | 165.4   |  |              |                            |
| C2       | 79.6  | 3.46                                       |              |                            |
| C3       | 63.8  | 4,53                                       | dd           | 2,2 ; 3,9                  |
| C4       | 31.6  | 2,71                                       | dd           | 16,9 ; 4,5                 |
| -        | -   | 2,87                                       | dd           | 16,9 ; ?                   |
| D4a      | 104.8   |  |              |                            |
| D5       | 166.9   |  |              |                            |
| D6       | 92.5  | 6,05                                       | s            |                            |
| D7       | 166.8   |  |              |                            |
| D8       | 105.5   |  |              |                            |
| D8a      | 158.5   |  |              |                            |
| E1'      | 131.8   |  |              |                            |
| E2'      | 117.8   | 7,83                                       | s            |                            |
| E3'      | 146.3   |  |              |                            |
| E4'      | 147.2   |  |              |                            |
| E5'      | 120.4   | 6,91                                       | s            |                            |
| E6'      | 130.2   |  |              |                            |
| F2       | 79.2  | 4.7  |              |                            |
| F3       | 66.8  | 4,42                                       | dd           | 4,2 ; 1,9                  |

|     |       |      |     |            |
|-----|-------|------|-----|------------|
| F4  | 33    | 2,66 | dd  | 17 ; 4,5   |
| -   | -     | 2,77 | ddd | 17 ; ?     |
| G4a | 100.8 |      |     |            |
| G5  | 157.6 |      |     |            |
| G6  | 96.1  | 5,98 | s   |            |
| G7  | 155.5 |      |     |            |
| G8  | 109.7 |      |     |            |
| G8a | 156.1 |      |     |            |
| H1' | 133   |      |     |            |
| H2' | 117   | 6,90 | s   |            |
| H3' | 146.2 |      |     |            |
| H4' | 147.5 |      |     |            |
| H5' | 122.2 | 6,36 | s   |            |
| H6' | 122.8 |      |     |            |
| I2  | 78.9  | 4.3  |     |            |
| I3  | 65.4  | 3,83 | dd  | 4,2 ; 2,2  |
| I4  | 29.8  | 2,23 | dd  | 16,6 ; 4,4 |
| -   | -     | 2,56 | ddd | 16,7 ; ?   |

s : singulet ; d : doublet ; dd : doublet de doublet ; ddd : doublet de doublet de doublet.

\*Les valeurs des déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}$  ont été obtenues en ajustant le  $\delta^{13}\text{C}$  du méthanol à 49,9 ppm.

En conséquence, la liaison du cycle E ne peut se faire qu'en position 8 du cycle G. La cyclisation de la molécule par une liaison entre les cycles E et G est confirmée par l'observation de deux taches de corrélation du carbone 8 du cycle G avec deux protons du cycle E : l'une forte avec le proton 5' et l'autre faible avec le proton 2'. On souligne que cette liaison cyclisante confère à l'ensemble de la molécule une structure de type « couronne » en formant un « macrocycle ».

Enfin, on note que trois signaux du spectre du  $^{13}\text{C}$  apparaissent dédoublés. Ces signaux correspondent tous à des carbones du cycle B: ceux des cétones B3' et B4' à 180.6 et 194.4 ppm, ainsi que le carbone quaternaire B1' à 92.4 ppm. Cela suggère la possibilité de l'existence de deux formes isomères. Il est vrai que le carbone B1' est un nouveau carbone asymétrique créé lors de la synthèse de cette déhydrotri(épi)catéchine. Il pourrait être à l'origine de l'existence de deux formes isomères dans la fraction purifiée. Cela pourrait d'ailleurs expliquer l'épaulement observé au niveau du pic chromatographique obtenu en phase inverse pour le composé (Figure 74). En effet, le spectre UV-visible et l'ion pseudo-moléculaires restent les mêmes tout au long de l'élution du pic malgré cet épaulement marqué, il pourrait donc s'agir d'une co-élution des deux isomères qui, s'ils existent bien, ne pourraient être séparés en chromatographie que sur des phases stationnaires adaptées de type phases chirales.

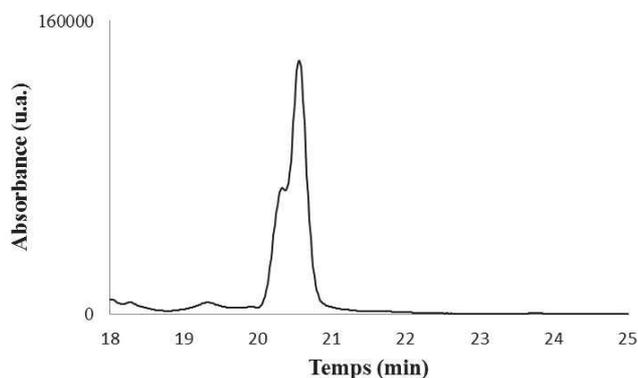


Figure 74 – Chromatogramme à 420 nm de la fraction purifiée obtenue pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 862 Da

- Mécanismes proposés pour la formation des deux déhydrotri(épi)catéchines jaunes.

La Figure 75 propose un mécanisme général pour la formation des deux déhydrotriépicatechines de type A de masses molaires 864 et 862 Da dont les structures ont été identifiées par RMN.

La (-)-épicatechine (**1**) étant substrat de la polyphénoloxydase de la pomme, on admet que la première espèce formée dans nos conditions d'oxydation est l'*o*-quinone de (-)-épicatechine (**2**). Celle-ci peut en partie évoluer vers des formes radicalaires de type semi-quinones par réaction de dismutation inverse (Guyot et al., 1996). *o*-Quinones et/ou semi-quinones de catéchines peuvent se dimériser par couplage oxydatif pour conduire à la formation de déhydrodimères présentant des structures de type biphenyle ou biphenyle éther nommées déhydrodicatéchines de type B (Weinges et al., 1972).

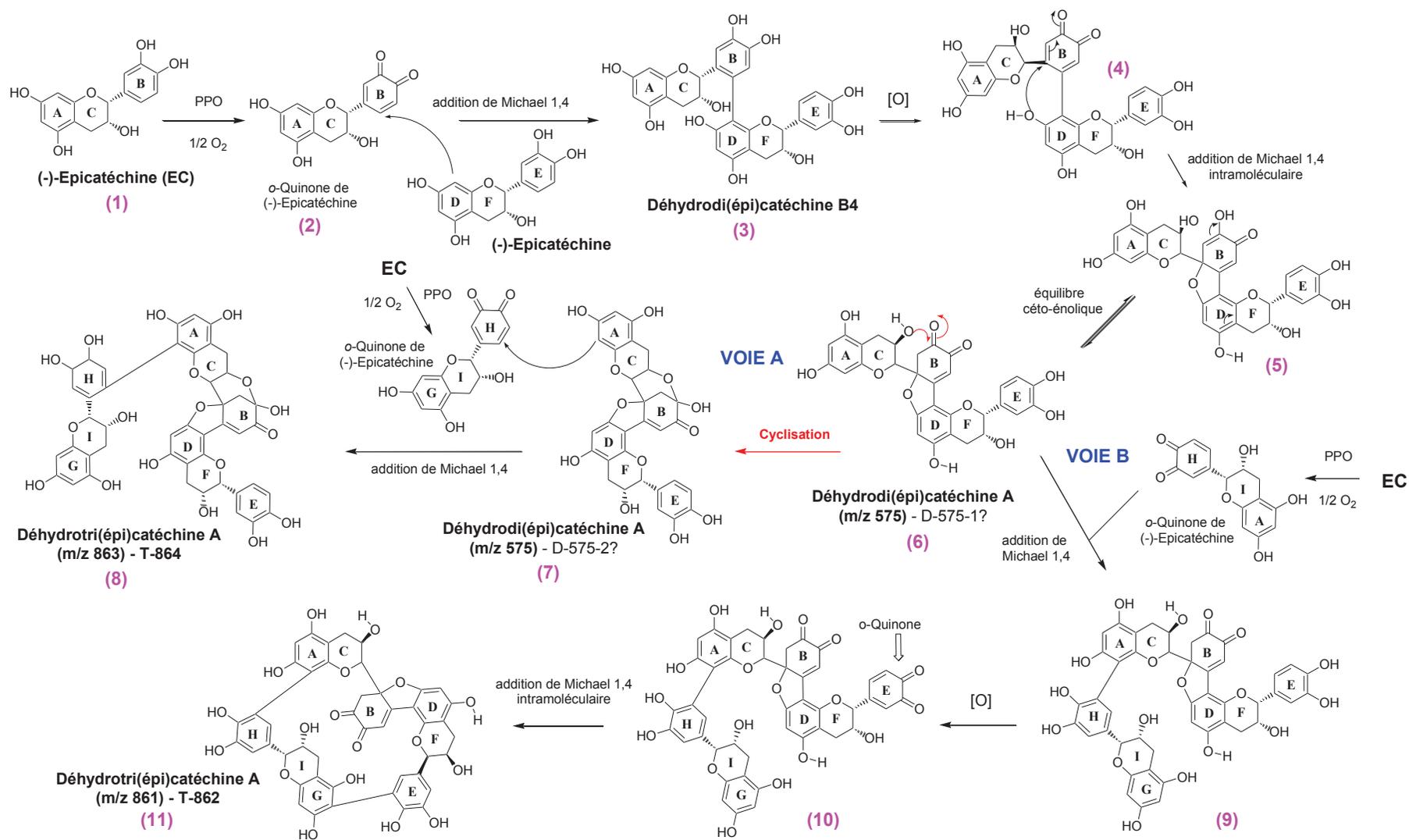


Figure 75 – Mécanisme de formation des dehydrotri(épi)catéchines de type A, priorité au réarrangement intramolécule après la dimérisation

Dans le schéma réactionnel qui nous concerne ici, l'*o*-quinone d'épicatéchine, espèce fortement électrophile, réagit au niveau de la position 8 nucléophile du noyau phloroglucinol d'une molécule d'épicatéchine non oxydée, selon une réaction d'addition de type Michael 1,4. Cela conduit à la formation de **(3)** correspondant à la déhydrodi(épi)catéchine B4, analogue de la déhydrodicatéchine B4 identifiée à l'origine par Weinges et Huthwelker (Weinges and Huthwelker, 1970). Cette déhydrodicatéchine incolore peut être oxydée, probablement par un mécanisme d'oxydoréduction couplée avec une *o*-quinone d'épicatéchine pour conduire à l'*o*-quinone intermédiaire **(4)**. Celle-ci peut se stabiliser en donnant le composé **(5)** par une addition de Michael 1,4 intramoléculaire. Ce composé est en équilibre céto-énolique *a priori* en faveur de la structure **(6)** qui correspond à une structure dicétonique cyclique,  $\alpha$ - $\beta$  éthylénique conjuguée avec un noyau aromatique. Cette structure **(6)** correspondrait au dimère jaune 575-1 et serait un intermédiaire réactionnel commun dans la synthèse des deux trimères jaunes de masse molaire 864 et 862 Da:

- Voie A (Figure 75), formation de la déhydrotri(épi)catéchine de 864 Da : le dimère **6** subit une étape de cyclisation conduisant à la formation d'une fonction hémiacétale à la place d'une des deux fonctions cétones pour former une déhydrodi(épi)catéchine A **(7)**. Celle-ci correspond à l'exact analogue « épi » de la déhydrodicatéchine A décrite comme un produit de l'oxydation de la (+)-catéchine par une peroxydase de raifort (Weinges and Mattauch, 1971) ou une polyphénoloxydase de raisin (Guyot et al., 1996). Cette molécule correspond très probablement au dimère 575-2 décrit précédemment. On rappelle que ce dimère présente une bande spectrale moins large et décalée vers les plus petites longueurs d'onde par rapport au dimère 575-1, ce qui nous semble en cohérence avec la disparition de la fonction cétone et son remplacement par une fonction hémiacétale. Enfin, dans une dernière étape, la molécule **(7)**, par la position 8 de son noyau A phloroglucinol, vient s'ajouter par réaction de Michael 1,4 sur le noyau *o*-quinone d'une nouvelle molécule d'épicatéchine oxydée pour conduire à la liaison biphenyl entre les noyaux A et H pour former le composé **(8)** correspondant à la déhydrotri(épi)catéchine de 864 Da. Cette structure avait été caractérisée en milieu synthétique par (He et al., 2009).

- Voie B (Figure 75), formation de la déhydrotri(épi)catéchine de 862 Da : dans ce cas, la molécule **(6)** vient d'abord s'ajouter par réaction de Michael 1,4 sur le noyau *o*-quinone d'une nouvelle molécule d'épicatéchine oxydée pour conduire à la liaison biphenyl entre les noyaux A et H, de la même façon que pour la dernière étape décrite ci-dessus, pour former la molécule **(9)**. Cette dernière subit une nouvelle étape d'oxydation conduisant à une *o*-quinone intermédiaire **(10)** qui se stabilise par une nouvelle addition intramoléculaire de type Michael 1,4 pour former un autre motif biphenyl, cette fois entre les noyaux E et G. Le trimère **(11)** ainsi formé correspond bien à la structure de déhydrotri(épi)catéchine de 862 Da identifiée par RMN. La présence du motif de type double

cétone  $\alpha$ - $\beta$  éthylénique sur le noyau B, conjuguée avec le noyau D, est en accord avec les caractéristiques UV-visible de ce trimère jaune intense. Un tel trimère cyclisé a été mis en évidence par (Uchida et al., 2016).

- Autres voies possible via la formation d'un trimère incolore évoluant ensuite vers des formes jaunes :

Nous rappelons que l'observation du chromatogramme à 280 nm du milieu d'oxydation de la (-)-épicatéchine révélait la présence de nombreux produits d'oxydation incolore et l'analyse par spectrométrie de masse indiquait que certains d'entre eux correspondaient à des trimères de masse moléculaire 866 Da (résultats non présentés dans ce manuscrit). Certains de ces trimères incolores, en particulier ceux présentant des liaisons interflavoniques de type biphenyl, seraient des déhydrotri(épi)catéchine de type B qui pourraient subir de nouvelles oxydations pour conduire *in fine* aux déhydrotri(épi)catéchines de type A T-864 et T-862. Cette alternative réactionnelle que nous faisons démarrer à partir de la déhydrodicatéchine B4 est illustrée en **Figure 76**.

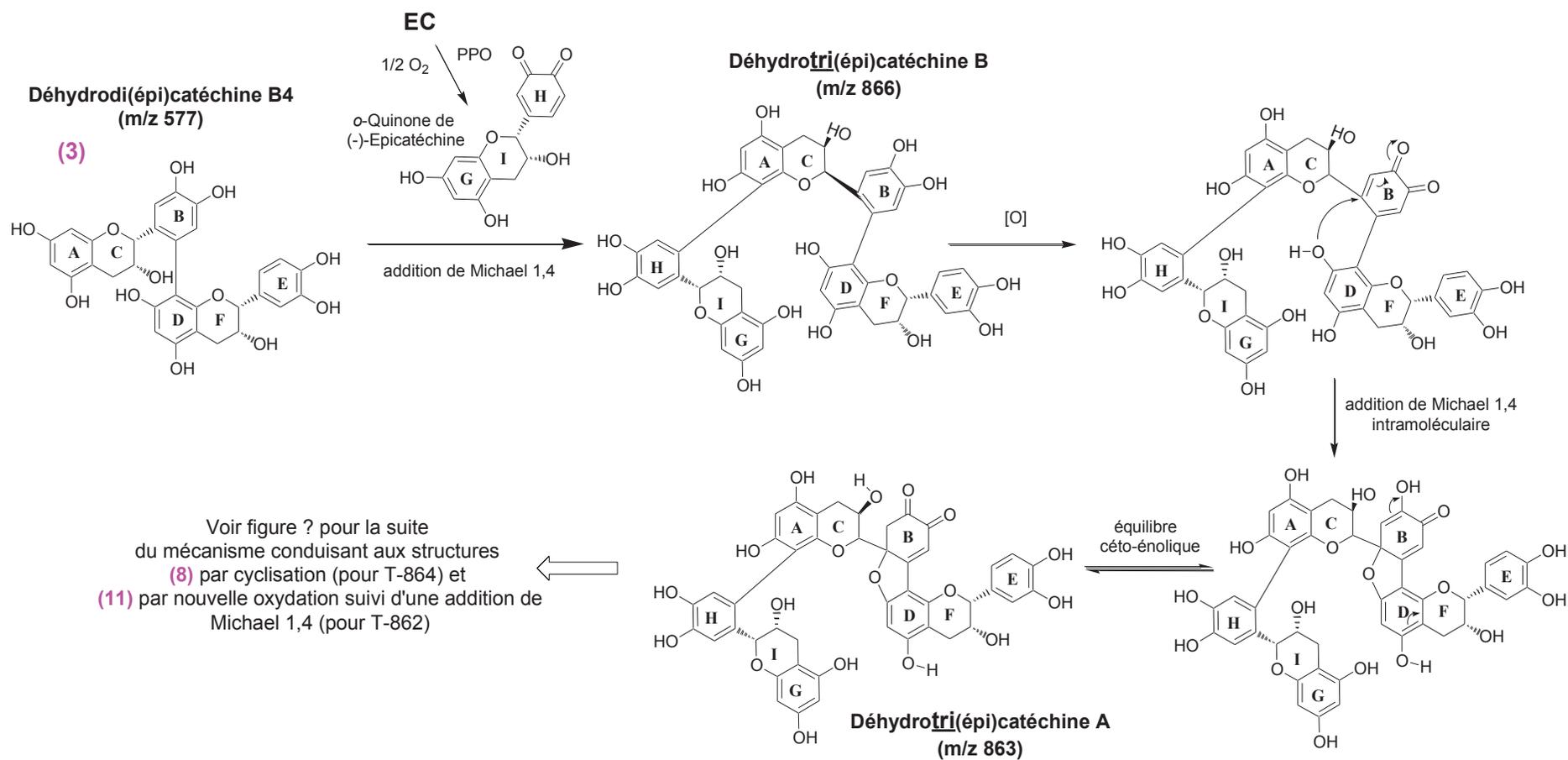


Figure 76 – Mécanisme de formation des dehydrotriépicatechines de type A, priorité à l'addition intermoléculaire après la dimérisation

### III. 4. CONCLUSION

Une première caractérisation globale de jus de pomme par profilage en CLHP-DBD-SM a mis en évidence la présence de deux types de molécules colorées : des tannins oxydés colorés et des composés peu tannants de polarités variables. D'autre part, des approches par spectrométrie de masse ont permis de confirmer la présence de POPj dans les jus de pomme, qui n'avait jusqu'alors jamais été détecté, et surtout d'identifier le PXGOPj, plus représenté que le POPj et dérivant de l'oxydation du xyloglucoside de phlorétine. Un composé coloré de 870 Da peu tannant et faiblement polaire a également été purifié à partir d'un jus oxydé très coloré et une hypothèse de structure a pu être formulée. La pureté obtenue était insuffisante pour confirmer cette hypothèse par RMN mais une approche par incubation enzymatique en solution modèle a permis de valider le mécanisme moléculaire proposé. Ainsi, il s'agirait d'un pigment hétérodimère, noté EC-XPL/Ox, résultant d'un couplage oxydatif entre un flavan-3-ol, l'(-)-épicatéchine, et une dihydrochalcone, le xyloglucoside de phlorétine. Enfin, deux déhydrotrimères de (-)-épicatéchine colorés susceptibles de se former dans les jus ont été synthétisés par voie enzymatique en solution modèle. Ces composés ont ensuite été purifiés et caractérisés par RMN. Bien que leur présence dans les jus de pomme soit vraisemblable, ces espèces n'y ont pas été détectées directement sous cette forme.

Pour conclure, nous nous sommes intéressés dans la première partie de ce travail à l'identification des molécules impliquées dans la couleur des jus de pomme. La seconde étape de cette étude se focalise davantage sur la compréhension de la modulation de la couleur en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu.

## IV. IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU SUR L'EXPRESSION DE LA COULEUR DES CHROMOPHORES DES JUS DE POMME

### IV. 1. Impact du processus fermentaire sur l'expression de la couleur des jus

Ce second volet de l'étude s'intéresse à l'influence de l'environnement chimique sur l'expression de la couleur des molécules phénoliques jaunes et/ou oranges formées au cours de la production des jus de pomme. Considérant la technologie cidricole, la production de cidre nécessite une étape fermentaire susceptible d'influencer la couleur initiale des jus. Pour évaluer cet impact, les quatre jus oxydés de *Guillevic*, *Dous Moen*, *Marie Ménard* et *Petit Jaune*, dont la composition en polyphénols natifs et les profils en composés colorés ont été déterminés dans la première partie de ce travail (Erreur ! Source du renvoi introuvable.), ont été mis en fermentation. Afin de limiter les variations liées aux jus de pommes issus de quatre variétés différentes et de pouvoir comparer l'évolution de leur couleur au cours du processus fermentaire, des traitements ont été préalablement réalisés sur les moûts. En effet, pour une fermentation optimale, il faut permettre la croissance et la multiplication de levures or pour cela, ces dernières ont besoin de puiser certaines ressources, certains nutriments indispensables pour leur survie dans le milieu environnant (en l'occurrence ici, le moût de pomme).

L'azote se révèle être généralement le nutriment le plus limitant dans les moûts de pomme, il joue un rôle essentiel dans la cinétique fermentaire. Les concentrations en azote assimilable peuvent varier significativement selon les variétés de pommes utilisées car elles sont influencées par différents facteurs (géographie, conditions de culture des pommiers, maturité des fruits, ...). Si l'on se réfère aux dosages d'azote total et d'acides aminés réalisés sur les mêmes jus oxydés non enzymés (source : rapport de stage M2, Millet, 2013), le jus de *Guillevic* apparaît comme le produit le plus riche en matières azotées. Dans les jus destinés à la réalisation de boissons fermentées, l'azote assimilable par les levures se trouve souvent sous la forme d'acides aminés. Les moûts de *Dous Moen*, *Marie Ménard*, *Petit Jaune* ont donc été supplémentés en asparagine (principal acide aminé dans les jus de pomme) afin de tous les amener à la même teneur en azote assimilable que le moût de *Guillevic*.

Une concentration minimale en O<sub>2</sub> dissous est également nécessaire pour assurer un démarrage correct de la croissance des levures : cette consommation d'oxygène est principalement dédiée à la synthèse de stérols et de composés lipidiques qui servent de constituants membranaires. Ainsi, cela permet d'assurer un bon maintien de l'intégrité cellulaire et donc *in fine* une bonne viabilité des levures en fin de fermentation. Les quatre moûts oxydés, après stérilisation sur filtres liquides, ont été totalement

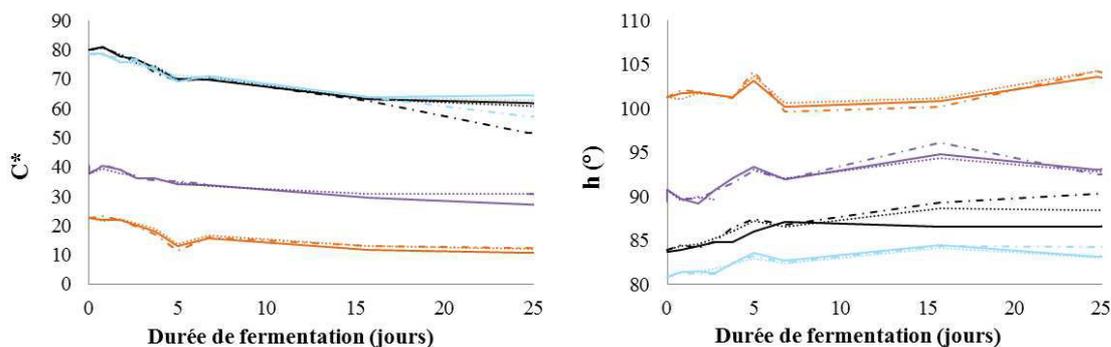
désoxygénés (<1 ppm) puis tous rapportés au même niveau d'oxygène dissous par injection d'air stérile.

Pour chacun des quatre jus, trois réplicats de 700 mL ont été répartis dans de petits fermenteurs adaptés et stérilisés, connectés à une canalisation de N<sub>2</sub> pour éviter toute infiltration d'oxygène. Les fermentations ont été démarrées en inoculant les quatre moûts avec la souche de levures *Saccharomyces uvarum* 73 (souche déposée et identifiée comme CLIB399 au sein du Centre Internationale de Ressources Microbiennes – Levures). Des suivis réguliers de biomasse levurienne et de masses volumiques des échantillons prélevés ont permis de s'assurer que ces fermentations « à petite échelle » se déroulaient de façon classique (données non présentées dans le manuscrit). Un premier arrêt de fermentation a été réalisé au bout de 37 jours pour deux réplicats de chaque jus oxydé, puis un arrêt tardif a été observé après 3 mois de fermentation pour les derniers échantillons. Tout au long de ce processus fermentaire, des suivis colorimétriques et analytiques ont été réalisés.

\*\*\*

La Figure 77 présente l'évolution des paramètres colorimétriques C\* (Chroma) et h (angle de teinte) durant les 25 premiers jours de fermentation. Les suivis de masse volumique ont été réalisés en parallèle et la durée de 25 jours a été choisie car elle correspond au délai de stabilisation de la masse volumique de la variété *Guillevic*.

C\* est le paramètre le plus impacté au cours de la fermentation des jus, en particulier pour les variétés *Dous Moen* et *Marie Ménard* dont les intensités colorantes initiales sont assez fortes (valeurs autour de 80) et qui atteignent finalement des valeurs comprises entre 60 et 70. Pour la variété *Guillevic*, la composante quantitative C\* de la couleur, initialement proche de 25, diminue jusqu'à atteindre une valeur de 10 ce qui, au sein de l'espace couleur CIE L\* C\* h, tend vers un produit incolore. Le jus de *Petit jaune* présente une situation intermédiaire avec une valeur initiale de 40 et une valeur finale de 30. L'angle de teinte est très légèrement modifié : il augmente légèrement ce qui correspond à un déplacement vers une teinte plus jaune pour les jus de *Dous Moen* et *Marie Ménard* et jaune-vert pour ceux de *Guillevic* et *Petit jaune*. Il est à noter que le paramètre h évolue peu pour le jus de *Guillevic* : il présente initialement un angle de teinte dont la valeur est déjà assez élevée. Le paramètre de luminance n'est pas présenté ici car il évolue à peine au cours de la fermentation, on peut simplement souligner une augmentation légère et continue de la valeur de L\* pour les 4 moûts.



**Figure 77 – Evolution des paramètres colorimétriques C\* (Chroma) et h (angle de teinte) au cours de la fermentation des quatre jus de pomme oxydés**

Tracé noir : *Dous Moen*  
 Tracé orange : *Guillevic*  
 Tracé bleu : *Marie Ménéard*  
 Tracé violet : *Petit Jaune*

Pour chaque jus, trois répliquats ont été mis en fermentation.

La fermentation fait donc évoluer la couleur globale d'un moût de pomme : C\* étant le paramètre colorimétrique le plus impacté d'après notre étude, cela se traduit pour l'observateur par une baisse d'intensité colorante perçue pour les quatre produits. Ces observations sont en accord avec les travaux de Lea et Drilleau (Lea and Drilleau, 2003) qui constataient une diminution d'environ 50% de la couleur suite à la fermentation. Le travail réalisé ici apporte des précisions supplémentaires sur l'impact de cette étape technologique sur les différentes composantes de la couleur (L\*, C\* et h).

La mise en fermentation a également été prolongée jusqu'à 3 mois sur les mêmes moûts. A l'évidence, les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits précédemment mais il convient de noter que les effets sont légèrement accentués après cette durée. Le Tableau 12 présente l'écart de couleur  $\Delta E$  obtenu pour chaque jus entre le point de départ de la fermentation et le point final. On observe des  $\Delta E$  du même ordre de grandeur pour les jus issus de variétés acidulées comme *Guillevic* et *Petit Jaune*, les deux produits les moins colorés de l'étude. Les deux jus produits à partir des variétés amère et douce-amère (à savoir, *Dous Moen* et *Marie Ménéard*) connaissent un impact plus fort du processus fermentaire sur l'expression de leur couleur (valeurs de  $\Delta E$  presque deux fois plus élevées que pour les deux jus plus pâles). Le rendu visuel de ces écarts de couleur pré- et post-fermentation est illustré sur la photographie présente en Figure 78.

**Tableau 12 – Ecart de couleur  $\Delta E$  et évolution des paramètres colorimétriques après 3 mois de fermentation**

| Variété              | Durée de fermentation | L*   | C*   | h     | $\Delta E$ |
|----------------------|-----------------------|------|------|-------|------------|
| <i>Guillevic</i>     | Avant                 | 96.5 | 26.8 | 101.2 | 14.9       |
|                      | Après 3 mois          | 95.9 | 12.1 | 95.7  |            |
| <i>Petit Jaune</i>   | Avant                 | 90.5 | 41.8 | 89.1  | 16.8       |
|                      | Après 3 mois          | 92.5 | 25.2 | 92.4  |            |
| <i>Dous Moen</i>     | Avant                 | 81.9 | 84.3 | 82.7  | 29.6       |
|                      | Après 3 mois          | 88.0 | 56.4 | 89.1  |            |
| <i>Marie Ménéard</i> | Avant                 | 80.6 | 83.2 | 79.8  | 26.9       |
|                      | Après 3 mois          | 86.3 | 57.5 | 84.1  |            |

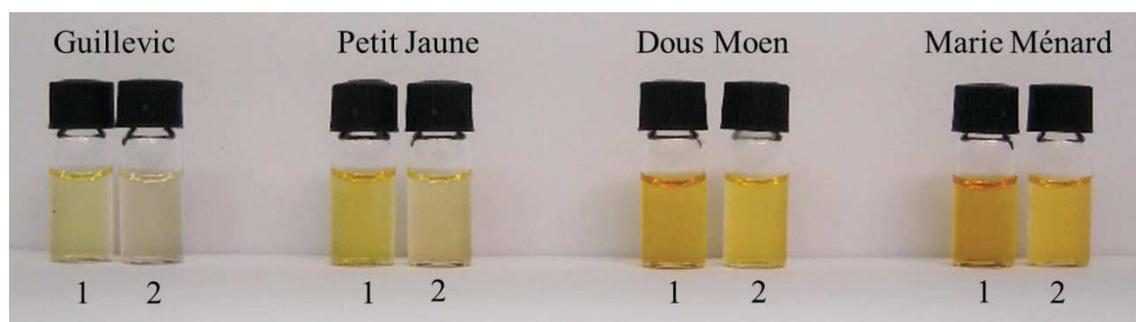


Figure 78 - Photographie illustrant l'évolution de la couleur des jus de pomme avant (1) et après (2) 3 mois de fermentation.

La Figure 79 met en évidence que les composés colorés donnant des pics bien résolus sur les chromatogrammes à 420 nm (molécules colorées peu tannantes, repérées dans les jus de pommes, cf. III. 3. 2. ) tendent à disparaître après trois mois de fermentation.

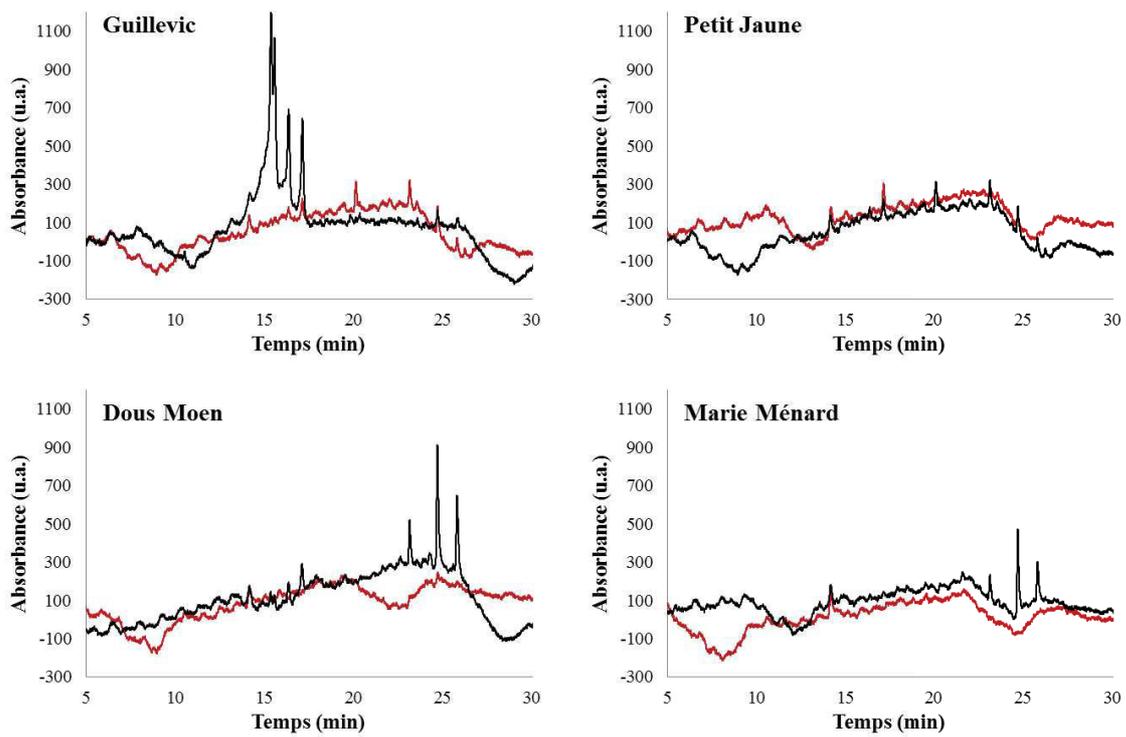


Figure 79 – Profils chromatographiques à 420 nm des extraits polyphénoliques issus des jus de pomme avant fermentation (tracé noir) et après 3 mois de fermentation (tracé rouge).

Lors de l'analyse des différents jus (III. 2. 4. 1. ), il a été montré que les compositions en molécules phénoliques colorées étaient très différentes entre les échantillons : les jus des variétés *Dous Moen* et *Marie Ménard* se sont révélés bien plus riches en composés tannants colorés que *Petit Jaune*, et le jus de *Guillevic* présente un profil particulier sans catéchines. Après fermentation, les jus de *Dous Moen* et *Marie Ménard* présentent les plus grandes variations du paramètre C\*. La diminution marquée de C\* pourrait alors s'interpréter comme une diminution de la quantité de pigment. Des études antérieures dans le modèle vin ont montré que certains polyphénols (notamment des tannins condensés et des anthocyanes) étaient susceptibles de s'adsorber sur les lies des levures mortes, engendrant une diminution de ces molécules dans le moût (Lopez-Toledano et al., 2004; Mazauric and Salmon, 2005; Mekoue Nguela et al., 2015; Morata et al., 2016). Il est probable que de telles interactions puissent aussi se produire dans le modèle cidre et cela expliquerait alors en partie la perte de couleur observée pour les jus de *Marie Ménard* et *Dous Moen*. Néanmoins, la fermentation est un processus complexe qui mène à une évolution de la composition du milieu. Plusieurs paramètres physico-chimiques sont susceptibles d'être modifiés comme, par exemple, le pH ou le potentiel rédox. L'évolution de ces paramètres pourrait jouer un rôle important dans la perte de couleur. Akin a en effet montré que le pH diminuait en début de fermentation alcoolique (sur un modèle moût de raisin) et Lea et Drilleau (Lea and Drilleau, 2003) (sur un modèle cidre) ont pour leur part proposé que le fort pouvoir réducteur des levures génèrait une perte de chromophores par transformation de molécules colorées vers des formes incolores.

L'étude de l'impact de la fermentation sur la couleur des moûts telle qu'elle est présentée dans ce manuscrit reste très descriptive. Néanmoins, afin d'approfondir l'hypothèse d'un collage éventuel de composés colorés sur les lies, les culots de levures obtenus en fin de fermentation ont été conservés et conditionnés pour des analyses ultérieures. L'étude de ces culots nécessitera un développement méthodologique pour permettre l'accès aux informations structurales des composés phénoliques colorés éventuellement adsorbés sur ces lies. Dans le cadre de ce travail, la suite de l'étude s'est focalisée sur les deux autres hypothèses mentionnées, c'est-à-dire le rôle éventuel de variations de pH et de potentiel rédox sur la modulation de la couleur exprimée. L'impact de ces paramètres a été évalué en milieu synthétique, en se focalisant sur deux « chromophores modèles » des jus de pommes, appartenant à deux classes de polyphénols différentes :

- le **POPj** dérivant d'une dihydrochalcone
- une **déhydrotriépicatéchine DTEC\_864** dérivant de flavanol.

Ces composés ayant été purifiés au cours des travaux présentés au Chapitre III. , ils étaient disponibles en quantité suffisante pour réaliser ce volet de l'étude.

## IV. 2. EVALUATION DE L'EFFET DU pH SUR LE POPJ ET LA DTEC\_864 DE TYPE A, DEUX CHROMOPHORES PHENOLIQUES CHOISIS COMME PIGMENTS MODELE DES JUS DE POMME

### IV. 2. 1. INTRODUCTION

Le pH est un paramètre physico-chimique à considérer lors de l'étude des systèmes aqueux. Dans les matrices alimentaires comme les boissons à base de plantes ou de fruits, la valeur du pH dépend fortement des matières premières utilisées. Ainsi, le pH des moûts de pomme à cidre dépend notamment de la variété des pommes utilisées et peut être compris entre 3,2 et 4,5 (Base de données interne de l'UMT Novacidre). En outre, les processus biochimiques qui se déroulent au cours des procédés de transformation des produits alimentaires impliquent souvent des modifications de pH du milieu. Cela génère des protonations et déprotonations susceptibles d'influencer l'état des biomolécules présentes. Des travaux en solution modèle ont montré que des changements de pH aboutissaient à la formation de molécules plus ou moins colorées. Il faut toutefois souligner ici que le pH peut jouer également un rôle primordial concernant la stabilité et l'expression de la couleur déjà formée.

Si l'on considère, par exemple, les processus fermentaires, il est mentionné dans la littérature que beaucoup de microorganismes, et notamment les levures, acidifient le milieu externe (Sigler, 2013(Akin, 2008)). Dans un modèle de moût de raisins, Akin (Akin, 2008) a montré que le début de fermentation alcoolique était en effet toujours marqué par une chute de pH concomitante avec la croissance de la biomasse levurienne et la consommation de l'azote. Une remontée de pH était ensuite notée en fin de fermentation. Selon l'auteur, la baisse de pH est liée à l'assimilation des sources azotées par les levures donc leur métabolisme serait directement responsable de cette acidification du milieu. L'étude présentée en IV. 1. a montré que la couleur des jus de pomme était modifiée et perdait en intensité au cours de la fermentation. Certains composés colorés initialement présents disparaissent. Parmi les hypothèses émises pour expliquer cette perte de coloration, on doit donc également envisager un possible effet de la variation du pH sur l'expression de la couleur des moûts.

Plus généralement, lorsque l'on s'intéresse aux polyphénols et à la couleur exprimée par certaines de ces molécules, le pH est un paramètre physico-chimique du milieu qu'il est indispensable d'examiner. Concernant les variations de couleur au sein de cette famille de composés, le cas des anthocyanes est le plus probant : leur couleur est étroitement liée au pH du milieu environnant. En effet, le cation flavylium rouge, qui est l'espèce prédominante à pH acide, coexiste à l'équilibre avec d'autres formes que sont les bases quinonoïdales bleu-violet, les formes hémi-acétaliques B incolores et les chalcones jaunes pâles. Les changements des rapports entre ces différentes formes provoquent alors une modification de la couleur du mélange (pour revue, Pina et al., 2012). En raison de ces propriétés, les anthocyanes sont qualifiées de composés halochromiques. Dans le cas des jus de pomme,

généralement dépourvus d'anthocyanes pour les jus dits « classiques » (intégrant une gamme de couleurs allant du jaune à l'orangé), le POPj présente aussi cette propriété d'halochromisme. Ce composé, breveté précisément pour ses capacités colorantes, présente des teintes très différentes selon le pH ((Guyot et al., 2007), Sanoner, brevet EP1685120B1)). L'objectif de cette partie de l'étude (IV.2) était d'évaluer les conséquences d'une variation de pH sur le comportement de deux composés jaunes dérivant de classes de polyphénols très différentes et utilisés ici comme « chromophores modèles » d'un jus de pomme.

Au préalable, rappelons à nouveau ici que la couleur d'une molécule organique est essentiellement basée sur sa capacité à absorber des radiations électromagnétiques dans la gamme du visible (380-700 nm). Cette capacité dépend de la structure de la molécule. En effet, pour être colorée, elle doit présenter un système suffisamment  $\pi$ -conjugué (chromophore) lié à des groupements dits auxochromes, susceptibles de modifier sa fréquence d'absorption. Ainsi, de légers changements dans la structure d'un composé peuvent être à l'origine de modifications de ses propriétés spectrales. Dans le cas des polyphénols, le spectre d'absorption est influencé par de nombreux facteurs tels que la nature du solvant, la nature des substituants donneurs et accepteurs d'électrons sur les noyaux benzéniques, la présence de liaisons hydrogènes et d'effets stériques et la formation de formes de résonance dépendant du pH.

Prédire et comprendre à l'échelle atomique la relation entre la structure d'un composé et ses propriétés optiques présente un intérêt certain dans des domaines aussi variés que la recherche sur les cellules solaires à pigments photosensibles, le design de pigments utilisés dans les teintures et/ou peintures ou encore la description de la couleur du vin (Trouillas et al., 2015). Ces aspects ont été appréhendés dans un grand nombre de travaux par le biais d'outils de modélisation moléculaire. Ils s'appuient souvent sur des méthodes computationnelles de chimie quantique basées sur le formalisme DFT (Density Functional Theory) et plus précisément sur des méthodes de TD-DFT (Time-Dependent DFT). Celles-ci permettent de généraliser la DFT à une situation dans laquelle un système subit une perturbation dépendant du temps. Cet outil est donc particulièrement adapté pour étudier le passage d'une molécule d'un état fondamental à un état excité, dans la mesure où il s'agit d'un phénomène dynamique. La TD-DFT apporte une description complète des états excités, composés par les transitions électroniques entre les orbitales moléculaires  $\pi \rightarrow \pi^*$ , responsables de chaque bande d'absorption dans l'UV-visible. Au cours de la dernière décennie, la (TD)-DFT a été très utilisée pour évaluer les propriétés conformationnelles, optiques et électroniques des polyphénols. Ces composés présentent une grande diversité de structures et leur absorption dans l'UV-visible peut être facilement modulée par la nature, le nombre et la position de leurs substitutions. Des modifications structurales peuvent également être induites par certains paramètres physico-chimiques du milieu, notamment le pH ou encore la présence de co-pigments métalliques ou phénoliques pouvant donner lieu à des phénomènes de copigmentation. Récemment, des méthodes DFT incluant les forces de dispersion (DFT-D) ont d'ailleurs permis de

rationaliser le phénomène de copigmentation impliquant les anthocyanes (Di Meo et al., 2012; Rustioni et al., 2013). Par analogie avec les études réalisées sur les pigments du vin, il nous a semblé naturel d'utiliser le même type d'approche pour explorer la couleur des jus de pomme et des cidres. La TD-DFT permettant d'allier à la fois précision et temps de calculs raisonnables pour des systèmes  $\pi$ -conjugués de taille moyenne (300 à 600 Da), cette méthode a été utilisée pour établir la relation entre la structure chimique du POPj (466 Da) et ses propriétés optiques. Les états excités responsables des bandes d'absorption dans l'UV-visible ont été décrits en termes de transitions électroniques et d'orbitales moléculaires. Notre objectif était en particulier d'apporter des éléments de compréhension pour expliquer l'influence du pH sur la modulation de la couleur du POPj. Les résultats théoriques ont été confrontés aux données expérimentales.

#### IV. 2. 2. MATERIEL ET METHODES

##### IV. 2. 2. 1. Purification des deux chromophores modèles, le POPj et la DTEC de type A

La **déhydrotriépicatéchine de type A à 864 Da (DTEC)** a été synthétisée par incubation de la (-)-épicatéchine en présence d'un extrait de PPO de pomme puis purifiée par CLHP à l'échelle semi-préparative. Les modalités de synthèse et purification ont été décrites au § III. 2. 4. 7. .

Le **POPj** a été synthétisé par voie enzymatique à l'échelle pilote après optimisation préalable des conditions d'incubation (Dugé de Bernonville et al., 2011). Une solution de phloridzine à 2.3 mM a été préparée dans 100 L de tampon malate (5 mM), le pH ayant été ajusté à 6.5 par ajout d'une solution de NaOH 1N. Après ajout de l'extrait de PPO pour une activité enzymatique crésolase dans le milieu de 0.22  $\mu$ katal d'O<sub>2</sub> consommé/L, l'incubation a été réalisée à 20°C en deux étapes. La première, pour la conversion enzymatique de la phloridzine en POPi a été menée pendant 8 heures en maintenant le pH entre 6.0 et 6.5 par ajout régulier de NaOH 1N. Puis, un changement de pH à 9.0 a été effectué par addition de bicarbonate de sodium et l'incubation a été poursuivie pendant 20 heures afin de permettre la conversion chimique du POPi en POPj. Le milieu a ensuite été acidifié à pH 3,8 par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20%. Après microfiltration à 0.14  $\mu$ m, le filtrat résultant a été congelé à -20°C jusqu'à l'étape de purification.



**Figure 80 - Purification sur résine amberlite Amberlite™ FPX66 de la fraction colorée résultant de l'oxydation enzymatique de la phloridzine (Photo T. Dugé de Bernonville(Dugé de Bernonville et al., 2011))**

Ce filtrat a été fractionné selon un principe d'extraction en phase solide sur une colonne constituée de 10 L de résine Amberlite™ FPX66 prévue pour un usage alimentaire (constituées de billes de 0.60-0.75 mm de diamètre en moyenne, Rohm and Haas Company, Philadelphia, USA). La résine, initialement conservée dans l'éthanol 96°, a été conditionnée par un rinçage à l'eau osmosée afin d'éliminer l'alcool. Après décongélation, le filtrat issu du milieu d'oxydation de la phloridzine a été chargé sur la colonne, à un débit constant de 20 L.h<sup>-1</sup> (Figure 80). La fraction phénolique colorée est restée adsorbée sur la phase solide. Après un rinçage par 46 L d'eau ultrapure dégazée pour éliminer les sels, les polyphénols ont été élués par un volume de 16 L d'éthanol 96° de qualité alimentaire. L'extrait de polyphénols hydro-éthanolique collecté a été concentré sous vide jusqu'à obtenir un extrait aqueux qui a alors été congelé à -25°C puis lyophilisé.

A ce stade, la fraction (79 g) contenait 85 % de POPj, 11% de POPi et environ 4 % de composés secondaires générés lors de la production ou de la conservation. Afin de disposer de la molécule de POPj totalement pure, une aliquote (500 mg) de cette fraction a ensuite fait l'objet d'une dernière étape de purification en CLHP à l'échelle semi-préparative. Le système CLHP utilisé était le même que celui présenté dans le chapitre III. 2. 4. 5. . Le système de solvants utilisé était composé d'eau acidifiée à 0.1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). 500,5 mg de poudre ont été dissous dans un mélange de solvants A et B (83/17 ; V/V) et 3 injections de 2 mL ont été réalisées successivement sur la colonne. Le gradient d'éluion suivant a été appliqué à un débit de 20 mL.min<sup>-1</sup> : conditionnement initial, 3% de B ; 0-3 min, constant à 3% de B ; 3-8 min, augmentation linéaire à 9 % de B ; 8-18 min, augmentation linéaire à 16% de B; 18-22 min, constant à 16% de B ; 22-26 min, augmentation linéaire à 90 % puis 4 min de lavage de la colonne et reconditionnement. La détection en UV-visible s'est faite à 420 nm. Les fractions collectées pour chaque injection ont été regroupées, concentrées sous vide puis lyophilisées. Cela a permis d'obtenir 226.5 mg de POPj sous forme de poudre. La pureté a été vérifiée en CLHP-DBD-SM (résultats non présentés dans ce manuscrit).

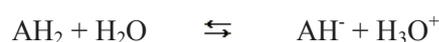
#### IV. 2. 2. 2. Acquisition des spectres UV-visibles en fonction du pH

Des solutions de tampon citrate-phosphate (McIlvaine, 1921) couvrant la gamme de pH de 2.5 à 8 par pas de 0.5, ont été préparées à partir de solutions mères d'acide citrique 0.1 M et de disodium hydrogénophosphate à 0.2 M. Les solutions de POPj et de DTEC de type A ont été préparées à 1 mM dans du méthanol acidifié à 0.1% d'acide formique puis elles ont été diluées à 50 µM (méthanol/eau ; 5/95 ; V/V ; 0.005% d'acide formique) dans les solutions tampon pour la mesure des spectres UV-visibles. Il a préalablement été vérifié qu'il n'y avait pas de saturation du détecteur à cette concentration et que la molarité du tampon n'influçait pas les spectres. L'acquisition s'est faite en spectrophotométrie (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne) dans des cuvettes en Quartz dont le trajet optique mesure 1 cm, sur une gamme de longueurs d'ondes de 220 à 700 nm, par pas de 1 nm.

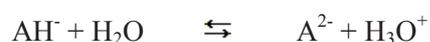
#### IV. 2. 2. 3. Détermination des valeurs de pKa du POPj

Il existe une large gamme de techniques permettant de déterminer une constante logarithmique de dissociation d'un acide (ou pKa), par exemple la titration par potentiométrie, la spectroscopie UV-visible, la conductimétrie (Albert et Sergeant, 1984), la spectroscopie RMN, la calorimétrie, l'électrophorèse capillaire ou encore la prédiction par des calculs théoriques (Reijenga et al., 2013). Parmi les méthodes expérimentales, la potentiométrie est la plus couramment utilisée en solution aqueuse car en plus d'être assez précise, elle est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, et fournit rapidement des résultats qui sont généralement bien reproductibles. Néanmoins, cette méthode présente certaines limites, notamment aux pH extrêmes, pour une concentration d'analyte inférieure à  $10^{-4}$  M ou encore lorsque la molécule présente plusieurs valeurs de pKa proches. C'est le cas du POPj pour lequel la méthode potentiométrique ne permet d'observer qu'un seul saut de pH après ajout de deux équivalents de titrant (NaOH) (données non présentées dans ce manuscrit). La détermination par spectrophotométrie UV-visible est alors apparue comme une alternative intéressante pour la mesure des pKa dans la mesure où le chromophore du POPj est sensible aux variations de pH.

Appelons  $AH_2$  la forme du POPj doublement protonée,  $AH^-$  la forme déprotonée au niveau de l'acide carboxylique (ion carboxylate) et  $A^{2-}$  la forme complètement déprotonée de la molécule, les équilibres suivants peuvent alors être écrits:



$$K_{a_1} = \frac{[AH^-][H_3O^+]}{[AH_2]} \quad (\text{Eq. 1})$$



$$Ka_2 = \frac{[A^{2-}][H_3O^+]}{[AH^-]} \quad (\text{Eq. 2})$$

Quel que soit le pH de la solution et donc le rapport entre les différentes formes, la quantité de matière présente reste constante:

$$c_{totale} = [AH_2] + [AH^-] + [A^{2-}] \quad (\text{Eq. 3})$$

D'après la loi de Beer-Lambert et la loi d'additivité des absorbances, à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'absorbance  $A$  d'un mélange homogène dilué s'écrit :

$$A = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n (\varepsilon_{\lambda,i} \times l \times c_i) \quad (\text{Eq. 4})$$

Ainsi,

$$A = \varepsilon_a \times [AH_2] + \varepsilon_b \times [AH^-] + \varepsilon_c \times [A^{2-}] \quad (\text{Eq. 5})$$

Avec :

- $\varepsilon_a$  coefficient d'extinction molaire de la forme acide  $AH_2$ ,
- $\varepsilon_b$  coefficient d'extinction molaire de la forme  $AH^-$ ,
- $\varepsilon_c$  coefficient d'extinction molaire de la forme basique  $A^{2-}$ ,
- $l$  longueur du trajet optique (1 cm).

La superposition des spectres UV-visible du POPj mesurés à différents pH (18 valeurs, comprises entre 2,73 et 7,76) a permis de mettre en évidence deux points isobestiques (données non présentées) : à chacune de ces deux longueurs d'onde, l'absorbance ne dépend plus du pH de la solution car les formes acide et basique de la molécule étudiée présentent le même coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$ . Ceci laisse supposer l'existence d'un modèle simple dans lequel les deux déprotonations interviennent successivement et où les deux équilibres sont donc indépendants.

Il existe un point isobestique à 407 nm pour les valeurs de pH comprises entre 2,8 et 5. Dans cet intervalle, seules les espèces  $AH_2$  (POPj doublement protoné) et  $AH^-$  (forme carboxylate) sont en présence, il est donc possible de calculer la valeur de  $pKa_1$ .

$$A = \varepsilon_a \times [AH_2] + \varepsilon_b \times [AH^-] \quad (\text{Eq. 6})$$

Et  $c_{totale} = [AH_2] + [AH^-] \quad (\text{Eq. 7})$

De la même façon, dans l'intervalle de pH [5,3-7,8], seules les espèces  $AH^-$  (ion carboxylate) et  $A^{2-}$  (forme doublement déprotonée : carboxylate et phénolate) sont en présence, ce qui permet de calculer  $pKa_2$ .

$$A = \epsilon_b \times [AH^-] + \epsilon_c \times [A^{2-}] \quad (\text{Eq. 8})$$

Et  $c_{totale} = [AH^-] + [A^{2-}] \quad (\text{Eq. 9})$

Afin de déterminer une valeur de pKa, il est recommandé de choisir la longueur d'onde pour laquelle l'écart entre l'absorbance des deux formes en présence est maximal. Ainsi, considérant la fonction acide carboxylique, cet écart maximal de  $A$  entre  $AH_2$  et  $AH^-$  est observé à 384 nm pour des pH compris entre 2,8 et 5. Pour la fonction phénolique, la longueur d'onde sélectionnée, 472 nm, correspond au maximum d'absorption de la forme basique  $A^{2-}$  sur l'intervalle de pH [5,3-7,8].

Les valeurs des coefficients d'extinction molaires ont été calculées à ces longueurs d'onde :

- $\epsilon_a$  est calculé à partir de l'équation 6, à pH 2,8 pour lequel la concentration  $[AH^-]$  est nulle, d'où :

$$A = \epsilon_a \times [AH_2] = \epsilon_a \times c_{totale} \quad (\text{Eq. 10})$$

- $\epsilon_c$  est calculé à partir de l'équation 8, à pH 7,8 pour lequel la concentration  $[AH^-]$  est nulle, d'où :

$$A = \epsilon_c \times [A^{2-}] = \epsilon_c \times c_{totale} \quad (\text{Eq. 11})$$

- Les valeurs de  $\epsilon_b$  à 384 et 472 nm ne peuvent qu'être estimées car il n'existe pas de valeur de pH pour laquelle il serait possible d'affirmer que l'espèce  $AH^-$  est la seule présente. En effet, à pH 5, la forme  $AH_2$  peut encore être représentée dans la solution et à pH 5,35, la forme  $A^{2-}$  peut déjà être présente.

$$pKa = -\log_{10}(Ka) \quad (\text{Eq.12})$$

Connaissant le pH et les valeurs de  $A$ ,  $c_{totale}$ ,  $\epsilon_a$ ,  $\epsilon_b$  à  $\lambda = 384$  nm, il est possible de calculer la valeur de  $pKa_1$  (fonction carboxylique) grâce aux équations 1, 6, 7 et 12. De même, la valeur de  $pKa_2$  (fonction phénolique) peut être déterminée grâce aux équations 2, 8, 9 et 12.

Les résultats obtenus pour les constantes de dissociation et des coefficients d'extinction molaire ont été ré-affinés grâce à l'utilisation du logiciel de régression linéaire NLREG (*Nonlinear regression analysis program (NLREG)*, PH Sherrod - Nashville, TN, USA, 1995). Ceci s'est avéré particulièrement utile pour les valeurs de  $\epsilon_b$  qui ne pouvaient être déterminées avec exactitude par le calcul.

#### **IV. 2. 2. 4. Prédiction des spectres UV-visibles des formes neutres et chargées du POPj par TD-DFT, une méthode computationnelle de chimie quantique**

Les calculs d'optimisation de géométries, d'analyse de fréquence et de TD-DFT ont été réalisés en utilisant le programme Gaussian09 (Frisch et al., 2009). L'influence des effets de polarisation du solvant ont été pris en compte de manière implicite en appliquant la méthode IEF-PCM (Integral Equation Formalism – Polarizable Continuum Model). Les formes neutres et déprotonées du POPj ont donc été étudiées dans une cavité entourée par un continuum diélectrique dont la constante de permittivité était de 78.3 pour l'eau. Le choix de la fonctionnelle utilisée en DFT s'avère déterminant pour assurer une bonne précision des calculs. La fonctionnelle hybride B3P86 s'est déjà révélée efficace pour décrire les propriétés optiques de polyphénols de taille intermédiaire (300 à 600 Da) tout en évitant des temps de calculs trop longs (Anouar et al., 2012). Après une première optimisation de géométries pour la structure du POPj au niveau de théorie B3P86/6-31g(d), les différents conformères envisageables ont été construits en faisant varier les angles de torsion pour les parties sucre et acide propionique. L'analyse de fréquence et les calculs de TD-DFT ont été réalisés uniquement sur les conformères les plus stables, c'est-à-dire ceux présentant les énergies les plus faibles, en utilisant une base plus complexe 6-31+g(d,p) incluant une fonction diffuse en plus des fonctions de polarisation. Les analyses de TD-DFT permettent de décrire les états excités en termes d'énergies de transition verticale ( $E_{\text{max}}$ ), de longueurs d'onde d'absorption ( $\lambda_{\text{max}}$ ) et de force d'oscillateur (f). Les résultats obtenus étant très similaires, seules les données concernant le conformère le plus stable seront présentées dans ce manuscrit. Les spectres théoriques obtenus ont été comparés aux spectres expérimentaux acquis à différents pH.

IV. 2. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

**IV. 2. 3. 1. Evolution des paramètres colorimétriques du POPj et de la DTEC en fonction du pH**

La sensibilité du POPj et de la DTEC\_864 vis-à-vis du pH a été étudiée sur une gamme variant de 2,5 à 8, par pas de 0,5 unité pH. Le Tableau 13 présente les valeurs des différents paramètres colorimétriques obtenues pour les deux molécules.

**Tableau 13 - Evolution des paramètres colorimétriques du POPj et de la DTEC\_864 en fonction du pH**

| Composés                   |      | POPj |       |      |      |       | DTEC |      |      |      |       |
|----------------------------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|------|------|-------|
| Paramètres colorimétriques |      | L    | a*    | b*   | C*   | h     | L    | a*   | b*   | C*   | h     |
| pH                         | 2.5  | 99.1 | -15.6 | 51.3 | 53.6 | 106.9 | 99.2 | -5.8 | 15.5 | 16.6 | 110.6 |
|                            | 3    | 98.6 | -15.4 | 51.3 | 53.6 | 106.7 | 99.4 | -5.8 | 15.5 | 16.5 | 110.4 |
|                            | 3.5  | 97.4 | -15.5 | 53.8 | 55.9 | 106.1 | 99.2 | -5.6 | 15.1 | 16.1 | 110.4 |
|                            | 4    | 97.5 | -14.9 | 56.8 | 58.7 | 104.7 | 99.4 | -5.9 | 16.0 | 17.1 | 110.2 |
|                            | 4.5  | 96.7 | -12.6 | 59.4 | 60.7 | 102.0 | 99.1 | -6.0 | 16.7 | 17.8 | 109.8 |
|                            | 5    | 95.4 | -7.6  | 65.5 | 66.0 | 96.6  | 98.8 | -6.0 | 18.3 | 19.3 | 108.0 |
|                            | 5.5  | 91.6 | 2.6   | 78.0 | 78.0 | 88.1  | 98.4 | -5.7 | 21.6 | 22.3 | 104.9 |
|                            | 6    | 88.0 | 13.7  | 87.9 | 89.0 | 81.1  | 97.3 | -5.5 | 30.0 | 30.5 | 100.3 |
|                            | 6.5  | 85.7 | 20.9  | 92.5 | 94.8 | 77.3  | 95.2 | -4.4 | 41.9 | 42.1 | 96.0  |
|                            | 7    | 84.5 | 24.6  | 92.8 | 96.0 | 75.2  | 92.9 | -0.9 | 60.9 | 60.9 | 90.8  |
| 7.5                        | 84.0 | 25.4 | 90.9  | 94.4 | 74.4 | 89.9  | 3.4  | 74.0 | 74.1 | 87.4 |       |
| 8                          | 83.8 | 26.2 | 91.7  | 95.4 | 74.1 | 88.0  | 6.1  | 79.9 | 80.1 | 85.6 |       |

D'une façon générale, l'évolution des paramètres de couleur s'oriente de la même façon pour les deux composés : lorsque le pH augmente, la valeur de C\* augmente, l'angle de teinte h diminue et la

luminance L diminue également. Cela traduit une augmentation de l'intensité colorante perçue et une modification de la teinte qui vire à l'orange. Bien que les évolutions soient similaires, les modulations de la couleur n'apparaissent pas au même pH pour la dihydrochalcone et pour le flavanol.

En effet, un changement significatif de couleur du POPj est perceptible entre pH 4,5 et 5 ; puis le basculement d'un jaune soutenu vers une teinte véritablement orange s'opère entre pH 5 et 6, la valeur de l'angle de teinte h variant alors de 96,6 à 81,1 et celle de C\* de 66,0 à 89,0.

Concernant la DTEC, un changement de couleur notable est observé entre pH 5,5 et 6 et le basculement progressif vers une teinte orange apparaît entre pH 6 et 6,5 (h varie alors de 100,3 à 96,0 et C\* de 30,5 à 42,1). Contrairement au POPj pour lequel les paramètres colorimétriques varient peu à partir de pH 6,5 (valeurs de h comprises entre 74 et 77 ; valeurs de C\* comprises entre 74 et 77 ; valeurs de L comprises entre 84 et 86), la couleur de la DTEC continue à être significativement modulée pour des valeurs de pH supérieures à 6,5 (entre pH 6,5 et pH 8, h évolue de 96 à 86 et C\* de 42 à 80). La DTEC\_864, qui apparaît plus stable que le POPj vis-à-vis du pH entre pH 2,5 et 6, se révèle donc finalement moins stable que la dihydrochalcone aux pH supérieurs.

Notons enfin que l'évolution du paramètre C\* sur la gamme de pH étudiée est beaucoup plus importante pour la DTEC\_864 (C\* variant de 17 à 80) que pour le POPj (C\* variant de 54 à 95), bien que ce dernier présente toujours une intensité colorante plus élevée que celle du trimère. En définitive, une variation de pH provoque un net changement des composantes quantitatives et qualitatives de la couleur des deux molécules étudiées. Ces variations sont illustrées sur les photographies en Figure 81.

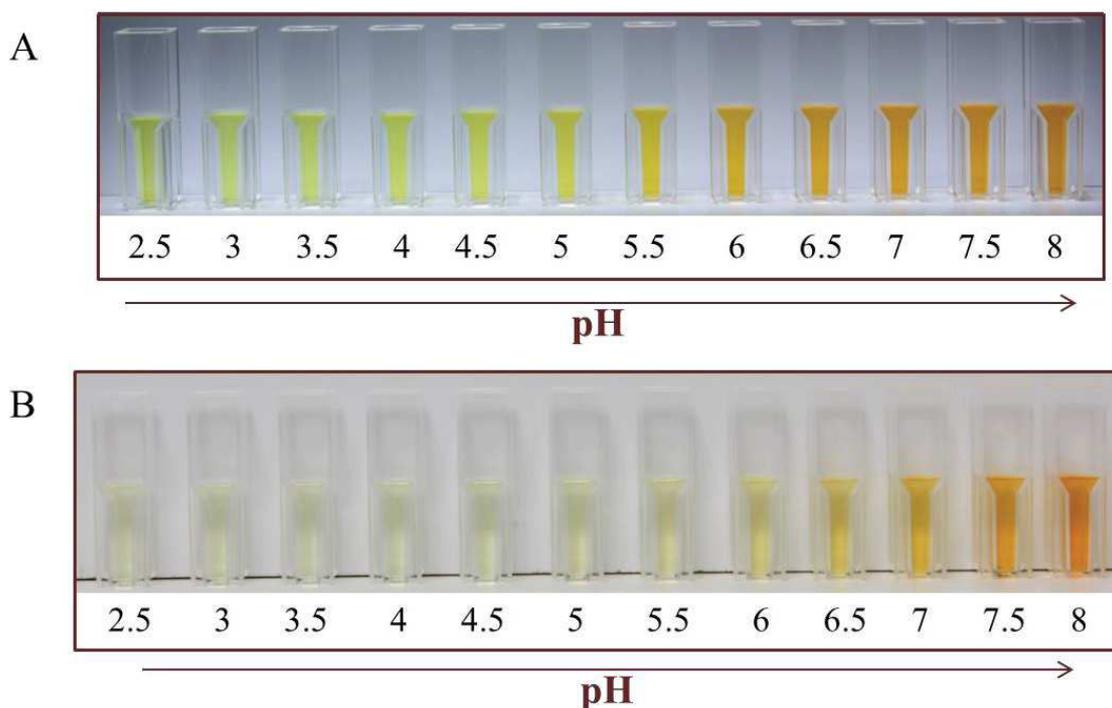


Figure 81 - Photographie illustrant l'évolution de la couleur d'une solution de (A) POPj à 50 µM et (B) DTEC\_864 à 50 µM en fonction du pH.

pour les deux composés (107-102 pour le POPj; 110<sup>~</sup> pour la DTEC\_864), en particulier pour les pH

les plus acides (3 et 3,5). Cela traduit des teintes similaires dans les deux cas. Toutefois, pour une même concentration molaire et une même valeur de pH, le paramètre  $C^*$  présente des valeurs très éloignées pour les deux molécules. Par exemple à pH 3,5, valeur proche du pH moyen d'un cidre français, la couleur de la solution de POPj apparaît 3,5 fois plus « saturée », plus intense que celle de la DTEC (respectivement,  $C^* = 56$  et 16) : le POPj présente donc une capacité colorante plus importante que le trimère. Enfin, aux pH des cidres, la DTEC\_864 ne montre pas de modifications particulières de ses valeurs de  $C^*$  et  $h$  (entre pH 3 et 4,5,  $C^*$  varie de 16,5 à 17,8 et  $h$  de 110,4° à 109,8°) tandis qu'une évolution est déjà notable pour le POPj ( $C^* : 53,6$  à 60,7 et  $h : 106,7^\circ$  à 102°). Ainsi, selon le pH du jus de pomme considéré, la couleur exprimée par les composés de type POPj et de PXGOPj est susceptible de varier.

#### **IV. 2. 3. 2. Modification des spectres UV-visibles des deux composés en fonction du pH**

Les paramètres colorimétriques étant calculés à partir des données d'absorbance, les changements de couleur observés selon le pH de la solution sont à mettre en lien avec des modifications au niveau des spectres UV-visibles. Les changements observés sont similaires pour les deux composés : une augmentation du pH entraîne à la fois un déplacement bathochromique (vers les plus fortes longueurs d'onde) et hyperchromique (augmentation de l'intensité d'absorption) de la bande d'absorption dans le visible. Comme attendu, les modifications spectrales commencent à apparaître aux mêmes pH que les changements identifiés pour les paramètres colorimétriques.

A pH acide (2,5 à 4,5), le spectre UV-visible du POPj (Figure 82) comprend une bande d'absorption très large dans le visible, avec un  $\lambda_{MAX}$  compris entre **389 et 421 nm**. Elle semble présenter un épaulement : entre pH 2,5 et 3, l'intensité d'absorbance est légèrement plus forte vers 389 nm tandis qu'entre pH 3 et 4,5, elle est plus forte vers 421 nm. Le déplacement bathochromique de la bande d'absorption s'observe à partir de pH 5. A pH 6, l'absorption à 389-421 nm disparaît presque totalement au profit de la nouvelle bande dont le  $\lambda_{MAX}$  est de **472 nm**. Pour des valeurs de pH supérieures à 6, la seule modification spectrale observée consiste en l'augmentation de l'intensité de la bande à 472 nm (déplacement hyperchromique). Notons qu'en parallèle apparaît également une nouvelle bande d'absorption avec un  $\lambda_{MAX}$  de 311 nm.

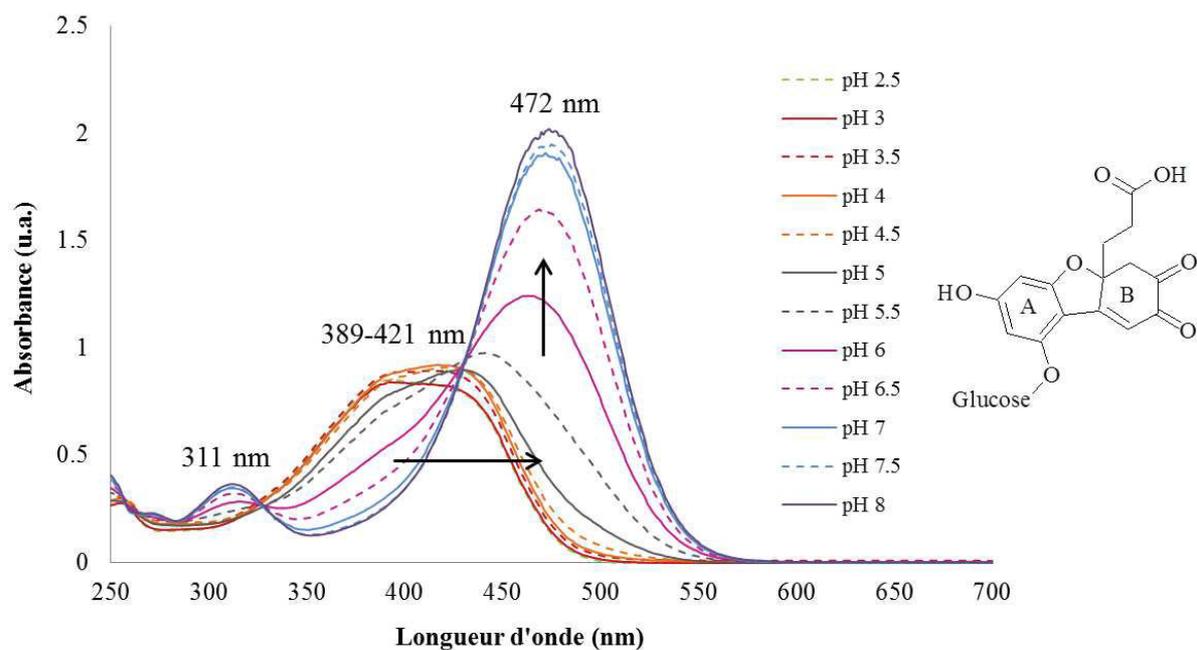


Figure 82 - Evolution du spectre UV-visible de la solution de POPj à 50 μM en fonction du pH.

Le spectre UV-visible de la DTEC\_864 (Figure 83) présente une bande d'absorption faiblement intense avec un  $\lambda_{MAX}$  de 280 nm quel que soit le pH. Pour des pH acides, compris entre 2,5 et 5,5, une bande d'absorption apparaît dans la région visible du spectre avec un  $\lambda_{MAX}$  de 385 nm. Entre pH 6 et 7, l'intensité de cette bande diminue progressivement jusqu'à disparaître tandis qu'une autre bande, dont le  $\lambda_{MAX}$  est décalé vers les plus fortes longueurs d'onde (436 nm), apparaît. Elle présente un net épaulement vers 500 nm. Une nouvelle augmentation du pH entraîne simplement une augmentation de l'intensité de cette dernière bande.

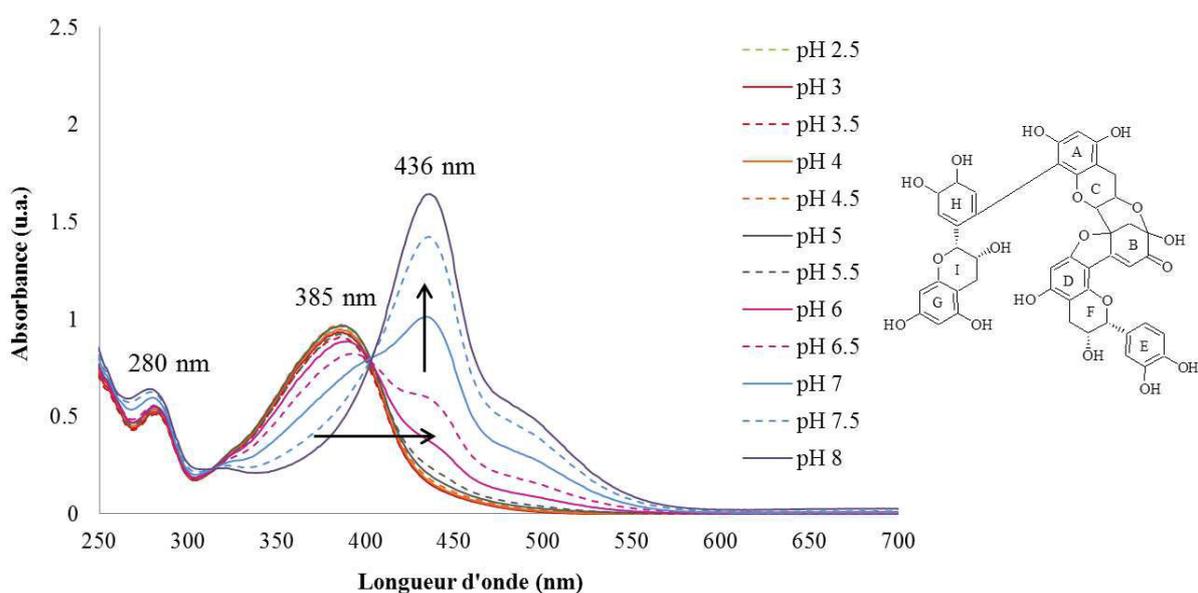


Figure 83 - Evolution du spectre UV-visible de la solution de DTEC\_864 à 50 μM en fonction du pH.

Une variation de pH influence l'état de protonation et/ou déprotonation des molécules. La DTEC\_864 présente 12 sites pouvant potentiellement subir une déprotonation. Il paraîtrait vraisemblable d'envisager que le site impliqué dans le changement de couleur suite à une variation de pH corresponde à l'un des deux groupements hydroxyles –ou les deux- substituant les cycles B et D de la molécule (pour rappel, la structure est présentée en Figure 83) puisqu'ils sont directement impliqués dans la structure du chromophore. Notons ici qu'à pH élevé, les noyaux catéchols présents dans la molécule pourraient également subir des phénomènes d'autoxydation résultant en de nouveaux produits responsables du changement de couleur.

Le POPj présente quant à lui seulement deux sites potentiellement cibles d'une déprotonation sur les fonctions acide carboxylique et phénolique. *A priori*, la déprotonation sur le phénol semblerait impliquée dans les modifications spectrales observées puisque cette fonction est impliquée dans la conjugaison responsable de l'absorption dans le visible. Afin de confirmer cette hypothèse et de mieux comprendre le changement de propriétés spectrales du POPj soumis à différents états de protonation, une étude théorique par TD-DFT a été menée sur des formes protonées et déprotonées de la molécule.

#### IV. 2. 3. 3. Exploration de l'effet du pH sur le POPj par TD-DFT

##### EXPLORATION D'UN EVENTUEL EQUILIBRE CETO-ENOLIQUE DU POPJ EN SOLUTION

L'analyse du POPj en RMN a permis de proposer une structure di-cétonique pour ce composé (Le Guernevé et al., 2004). Néanmoins, la présence du POPj en solution aqueuse sous cette forme di-cétonique n'a pas été clairement établie et l'existence d'un équilibre ceto-énolique est envisageable (Figure 84).

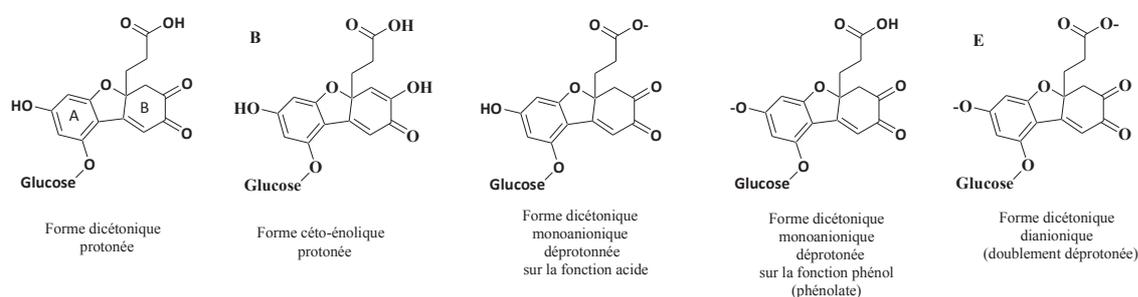


Figure 84 - Structure du POPj (d'après le Guernevé et al., 2004) et de ses différentes formes céto-énolique et déprotonnées.

Dans ce contexte, l'approche théorique semblait intéressante pour apporter des éléments d'information permettant de répondre à cette question. Le conformère neutre le plus stable a donc servi de base pour construire une forme énolique du POPj dont la géométrie a été ré-optimisée, avant analyse de

fréquence. En définitive, les énergies obtenues pour les deux formes neutres du conformère le plus stable sont indiquées dans le Tableau 14.

**Tableau 14 – Energies relatives calculées par analyse de fréquence au niveau de théorie B3P86/6-31g(d,p) pour le conformère le plus stable du POPj.**

(A) Formes neutres présentant des structures différentes sur le noyau A ; (B) Formes chargées négativement.

**A**

| Structure du POPj  | Energies libres (kcal.mol <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---|
| Forme di-cétonique | -1079496.2                                |
| Forme énolique     | -1079492.8                                |

**B**

| Déprotonation du POPj | Energies libres (kcal.mol <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------|---|
| Ion carboxylate       | -1079212.9                                |
| Ion énolate           | -1079215.4                                |

La forme énolique du POPj se révèle moins stable de **3.3 kcal.mol<sup>-1</sup>** que la forme di-cétonique. Ainsi, cette dernière serait l'espèce prédominante en solution. La suite de l'étude sur les formes déprotonées du POPj a donc été réalisée en s'appuyant uniquement sur la géométrie optimisée pour le POPj sous forme cétonique.

#### Fiabilité de la méthode de calcul pour les espèces chargées

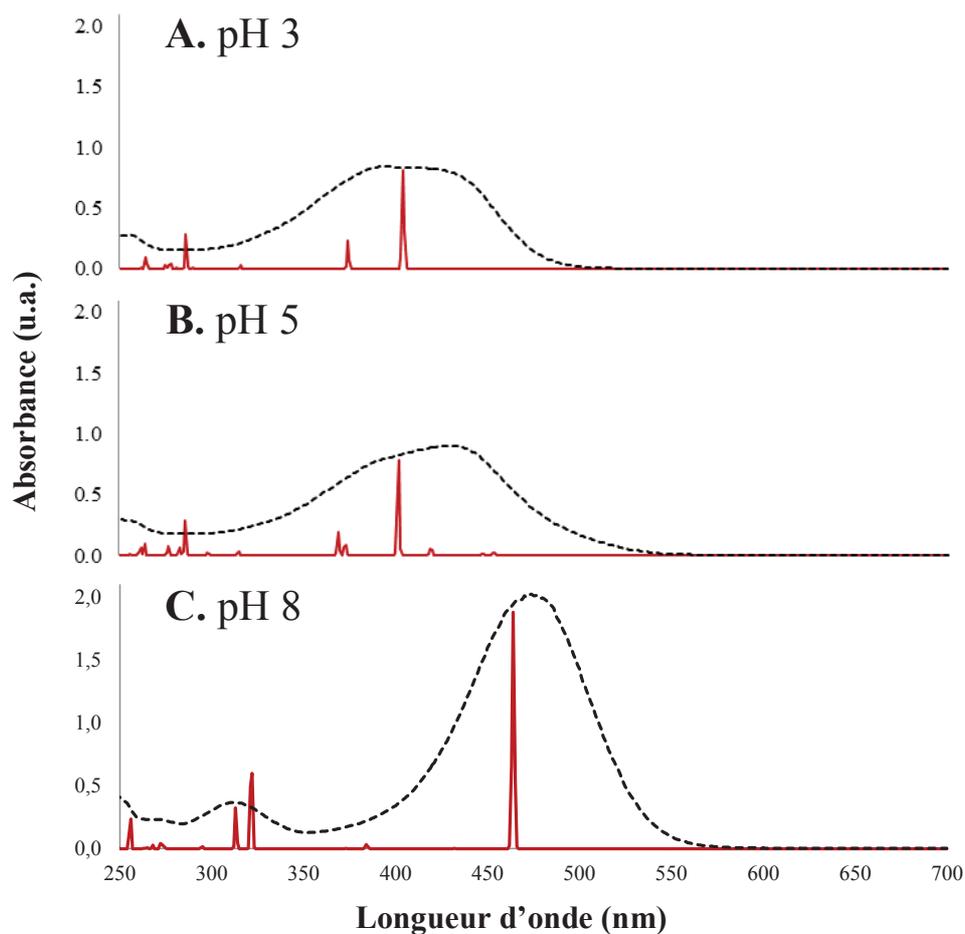
Les calculs d'énergies révèlent que la forme du POPj déprotonée au niveau de la fonction phénolique est plus stable de **2.5 kcal.mol<sup>-1</sup>** que celle déprotonée au niveau de la fonction acide carboxylique (Tableau 14 B), ce qui suppose que le composé coloré se déprotone plus facilement en –OH. Ce n'est, à première vue, pas cohérent avec les connaissances de « chimie élémentaire ». Ces calculs étant en général assez fiables, les valeurs de pKa ont tout de même été mesurées expérimentalement par spectrophotométrie UV-visible.

Le pKa de l'acide carboxylique a été difficile à déterminer en raison de la faible influence de ce groupement sur l'absorbance. Les résultats n'ont pas pu être ré-affinés à l'aide du logiciel de régression linéaire donc la valeur de pKa obtenue est finalement comprise dans un intervalle assez large (**entre 4,10 et 4,68**). Ces valeurs sont cohérentes avec celle attendue pour un acide carboxylique. Le pKa de la fonction phénolique dans le cas du POPj est de **6,10**. Cette valeur est bien inférieure à celle obtenue classiquement pour un phénol (pKa<sub>PHENOL</sub> = 9.95). Ce résultat est cohérent avec l'essai préliminaire réalisé en potentiométrie qui suggérait l'existence de deux pKa relativement proches (en effet, un seul saut de pH avait été observé). Une telle acidité de la fonction phénolique pourrait s'expliquer par une stabilisation du phénolate par résonance.

Ainsi, même si les deux valeurs de pKa mesurées pour le POPj sont relativement proches, les données expérimentales montrent clairement que la déprotonation se fait plus facilement au niveau de l'acide

carboxylique. Le calcul DFT des formes chargées fournit ici une information erronée. Dans cette étude, les effets de solvant ont été considérés en utilisant un modèle de solvant implicite (IEF-PCM) dans lequel la molécule de POPj se trouve placée dans une cavité entourée par un continuum diélectrique. Ce type de modèles s'est révélé suffisamment précis pour l'étude des propriétés optiques de polyphénols (Anouar et al., 2012; Millot et al., 2012). Il n'est pourtant pas idéal lorsque l'étude est réalisée dans l'eau puisqu'il ne prend pas en compte les interactions spécifiques entre le composé d'intérêt et les molécules de solvant, en particulier les liaisons hydrogène. Il est possible que de telles interactions soient importantes dans le cas de la stabilisation des charges du POPj. Il aurait donc fallu envisager une étude en solvant explicite mais ces méthodes nécessitent des temps de calcul beaucoup plus importants pour des systèmes tels que celui du POPj. Néanmoins, même si le calcul est un peu erroné sur les formes chargées, la comparaison des spectres expérimentaux et des spectres théoriques obtenus par TD-DFT (Figure 85) suggère que la méthode utilisée ici est suffisante pour décrire les propriétés spectrales de la molécule avec une précision acceptable.

Comparaison des spectres théoriques et expérimentaux : exploration de l'effet du pH sur les propriétés optiques du POPj par une approche de TD-DFT



**Figure 85 – Superposition des spectres expérimentaux et théoriques obtenus pour différents états de protonation du POPj.**

- (A) Acquisition du spectre expérimental à pH 3, calcul sur le conformère doublement protoné ;  
 (B) Acquisition du spectre expérimental à pH 5, calcul sur le conformère déprotoné sur l'acide carboxylique ;  
 (C) Acquisition du spectre expérimental à pH 8, calcul sur le conformère déprotoné sur la fonction phénolique.

Tableau 15 - Propriétés optiques (Energies verticales de transition,  $\lambda_{MAX}$ , force d'oscillateur, transitions électroniques) calculées au niveau de théorie B3P86/6-31g(d,p) pour le conformère neutre du POPj et les deux formes déprotonées.

| Composé                     | Etat excité | Energie verticale de transition (eV) | Longueur d'onde (nm) | Force d'oscillateur (u.a.) | Description des orbitales moléculaires |                  |
|-----------------------------|-------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------------|--|------------------|
|                             |             |                                      |                      |                            | Transitions électroniques              | Contribution (%) |
| POPj<br>(forme neutre)      | ES1         | 2.74                                 | 453.3                | 0.001                      |  |                  |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-2 → L                                | 64%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-2 → L+1                              | 10%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-1 → L                                | 26%              |
|                             | ES2         | 3.07                                 | 404.2                | 0.40                       |  |                  |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-2 → L                                | 13%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-1 → L                                | -11%             |
|                             |             |                                      |                      |                            | H → L                                  | 68%              |
|                             | ES3         | 3.31                                 | 374.2                | 0.11                       |  |                  |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-2 → L                                | -24%             |
|                             |             |                                      |                      | H-1 → L                    | 64%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H → L                      | 15%                                    |                  |
| ES4                         | 3.93        | 315.9                                | 0.02                 |                            |  |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-9 → L                    | 46%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-9 → L+1                  | 12%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-7 → L                    | 33%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-6 → L                    | 24%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-5 → L                    | 14%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-2 → L+1                  | -21%                                   |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-2 → L+1                  | -11%                                   |                  |
| ES6                         | 4.33        | 286.0                                | 0.13                 |                            |  |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-2 → L+1                  | -10%                                   |                  |
| POPj<br>(forme carboxylate) | ES1         | 2.73                                 | 453.5                | 0.01                       |  |                  |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-5 → L                                | -43%             |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-4 → L                                | -20%             |
|                             |             |                                      |                      |                            | H → L                                  | 51%              |
|                             | ES2         | 2.77                                 | 447.4                | 0.004                      |  |                  |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-5 → L                                | 46%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-4 → L                                | 19%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H-1 → L                                | 11%              |
|                             |             |                                      |                      |                            | H → L                                  | 48%              |
|                             | ES3         | 2.96                                 | 419.3                | 0.03                       |  |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-2 → L                    | 59%                                    |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-1 → L                    | -37%                                   |                  |
| ES4                         | 3.09        | 401.6                                | 0.38                 |                            |  |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-5 → L                    | -13%                                   |                  |
|                             |             |                                      |                      | H-2 → L                    | 37%                                    |                  |

|   |            |      |              |             |           |      |
|---|------------|------|--------------|-------------|-----------|------|
|   |            |      |              |             | H-1 → L   | 57%  |
|   | <b>ES5</b> | 3.33 | 372.6        | 0.04        |           |      |
|   |            |      |              |             | H-5 → L   | 16%  |
|   |            |      |              |             | H-4 → L   | -34% |
|   |            |      |              |             | H-3 → L   | 59%  |
|   | <b>ES6</b> | 3.36 | 369.1        | 0.07        |           |      |
|   |            |      |              |             | H-5 → L   | -20% |
|   |            |      |              |             | H-4 → L   | 54%  |
|   |            |      |              |             | H-3 → L   | 38%  |
|   |            |      |              |             | H-1 → L   | -11% |
|   | <b>ES1</b> | 2.67 | <b>464.0</b> | <b>0.53</b> |           |      |
|   |            |      |              |             | H → L     | 70%  |
|   |            |      |              |             | H → L+1   | 11%  |
|   | <b>ES2</b> | 2.87 | 432.2        | 0.0002      |           |      |
|   |            |      |              |             | H → L     | 65%  |
|   |            |      |              |             | H → L+1   | -23% |
|   | <b>ES3</b> | 3.23 | 384.3        | 0.0106      |           |      |
|   |            |      |              |             | H-3 → L   | 22%  |
|   |            |      |              |             | H-1 → L   | 67%  |
|   | <b>ES4</b> | 3.32 | 372.9        | 0.0002      |           |      |
|   |            |      |              |             | H-2 → L   | 68%  |
|   |            |      |              |             | H-2 → L+1 | -13% |
|   | <b>ES5</b> | 3.86 | 321.5        | 0.2794      |           |      |
|   |            |      |              |             | H-7 → L   | 16%  |
|   |            |      |              |             | H-4 → L   | 30%  |
|   |            |      |              |             | H → L+1   | 60%  |
|   | <b>ES6</b> | 3.96 | 313.1        | 0.0937      |           |      |
|   |            |      |              |             | H-8 → L   | -14% |
|   |            |      |              |             | H-7 → L   | 47%  |
|   |            |      |              |             | H-7 → L+1 | 11%  |
|   |            |      |              |             | H-4 → L   | 31%  |
|   |            |      |              |             | H-3 → L+1 | -14% |
|   |            |      |              |             | H → L+1   | -31% |
| <b>POP<sub>j</sub></b><br>(forme phénolate) |            |      |              |             |           |      |

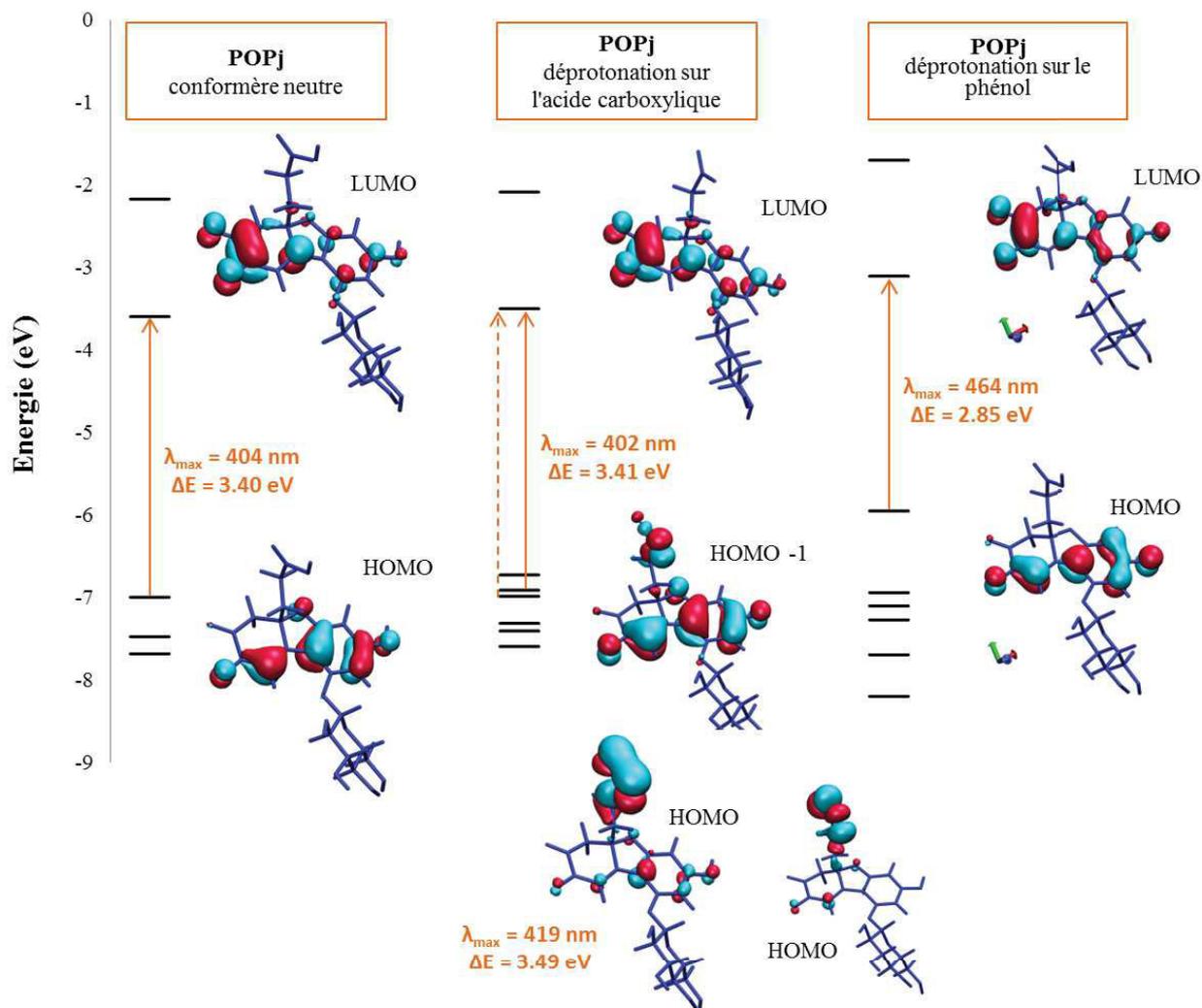


Figure 86 – Schéma des énergies associées aux orbitales moléculaires impliquées dans les transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  pour les formes neutre et déprotonées du POPj.

Si l'on s'intéresse au conformère neutre du POPj pour lequel les fonctions carboxylique et phénolique sont protonées, on constate que le spectre UV-visible obtenu par calcul au niveau de théorie B3P86/6-31+G(d,p) se superpose relativement bien avec le spectre expérimental enregistré à pH 3. La bande d'absorption dans la région visible du spectre est assez large ( $\lambda_{\text{MAX}} = 389\text{-}421$  nm) et présente un épaulement. Ceci est assez bien décrit par les états excités (ES) 2 et 3, bien qu'ils présentent des  $\lambda_{\text{MAX}}$  légèrement décalés vers les longueurs d'onde plus faibles (respectivement, 404.2 et 374.2 nm).

Le deuxième état excité (ES2,  $\lambda_{\text{MAX}} = 404,2$  nm) est celui présentant la force d'oscillateur la plus importante ( $f = 0,40$ ). Il est fortement décrit par la transition entre les orbitales moléculaires HOMO  $\rightarrow$  LUMO (68%). La HOMO présente une conjugaison étendue sur les cycles phénoliques de la molécule, plus particulièrement sur le noyau B et l'hétérocycle. Sur la LUMO, la délocalisation électronique est déplacée vers le noyau A portant la structure di-cétonique mais la conjugaison est globalement étendue sur la même zone que pour la HOMO. La transition HOMO  $\rightarrow$  LUMO peut donc se réaliser assez facilement, avec un très léger caractère à transfert de charge. Le troisième état excité

(**ES3**,  $\lambda_{\text{MAX}} = 374,2 \text{ nm}$  ;  $f = 0,11$ ) est décrit à 64 % par la transition HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO. Même si la conjugaison est toujours présente sur la HOMO-1, les électrons sont principalement délocalisés au niveau du noyau B et de la liaison avec le sucre. Cette orbitale moléculaire est donc assez différente de la LUMO, la transition a pourtant lieu avec un caractère à transfert de charge plus prononcé que pour **ES2**, et avec une très légère implication du sucre dans l'absorption dans le visible.

Pour le POPj déprotoné au niveau de l'acide carboxylique (**Figure 85 B**), la première bande d'absorption de forte intensité correspond en réalité au quatrième état excité (**ES4**,  $\lambda_{\text{MAX}} = 401,6 \text{ nm}$ ;  $f = 0,38$ ). Ce dernier est fortement décrit par la transition HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO (57%) et, dans une moindre mesure, par la transition HOMO-2  $\rightarrow$  LUMO (37%). La transition majoritairement responsable de cet état excité n'est donc pas la même que pour la forme neutre (**ES2**,  $\lambda_{\text{max}} = 404,2 \text{ nm}$  ;  $f = 0,40$  ; HOMO  $\rightarrow$  LUMO, 68%), malgré des spectres UV-visibles expérimentaux (pH 3 et 5) et théoriques plutôt similaires. Si l'on considère l'orbitale moléculaire HOMO pour la forme carboxylate, on constate que sa distribution est presque totalement délocalisée sur la partie propionique de la molécule tandis que la LUMO reste proche de celle de la forme neutre, avec une délocalisation plutôt sur la partie conjuguée de la molécule et plus spécifiquement sur le noyau A. Ainsi dans ce cas, la transition HOMO  $\rightarrow$  LUMO ne peut plus avoir lieu, on dit qu'elle est « éteinte ». En revanche, la HOMO-1 de l'ion carboxylate correspond globalement à la HOMO de la forme neutre, avec une délocalisation électronique légèrement plus étendue jusqu'à la fonction carboxylate. Le recouvrement avec la LUMO autorise dès lors la transition HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO. Au final, cette transition correspond à la transition HOMO  $\rightarrow$  LUMO impliquée dans l'état excité **ES2** de la forme neutre. Enfin, la HOMO-2 présente une forte distribution au niveau de la partie propionique mais une certaine conjugaison est maintenue au niveau des cycles phénoliques, en particulier sur le noyau B, ce qui autorise la transition HOMO-2  $\rightarrow$  LUMO (37%). Ainsi, cette structure propionique est impliquée dans l'absorbance observée vers 400 nm.

Comme mentionné au § IV. 2. 3. 2. , le spectre expérimental obtenu à pH 8 se révèle très différent des spectres obtenus à pH 3 et 5. Les deux bandes d'absorption observées présentent respectivement des maxima d'absorption à 311nm et 472 nm. La bande dans le visible, dont la largeur est nettement moins importante qu'aux pH précédents, connaît un déplacement bathochrome et un déplacement hyperchrome. On constate à nouveau que le spectre théorique obtenu pour la forme phénolate se superpose bien avec le spectre expérimental, l'état excité avec la force d'oscillateur la plus forte (**ES1**) présentant un  $\lambda_{\text{MAX}}$  très légèrement décalé vers les longueurs d'onde inférieures (**ES1**,  $\lambda_{\text{MAX}} = 464 \text{ nm}$  ;  $f = 0,53$ ). Notons que la bande d'absorption à 311 nm semble assez bien décrite par les états excités 5 et 6 (respectivement,  $\lambda_{\text{MAX}} = 321,5$  et  $313,1 \text{ nm}$  ;  $f = 0,30$  et  $0,09$ ). Cependant, la suite de la discussion restera focalisée sur la bande d'absorption dans le visible, responsable de la teinte orangée du POPj à pH basique. **ES1** est décrit à 70 % par la transition HOMO  $\rightarrow$  LUMO. Si l'on considère les énergies des orbitales moléculaires (Figure 86), la HOMO apparaît ici fortement déstabilisée par rapport à celle

du conformère neutre et à la HOMO-1 de la forme carboxylate. La conjugaison est moins importante que sur la HOMO du neutre. En comparaison, la LUMO apparaît moins déstabilisée. L'écart énergétique  $\Delta E$  (2,85 eV) lors de la transition HOMO  $\rightarrow$  LUMO se trouve donc réduit par rapport à celui des transitions électroniques majoritairement responsables de l'absorption dans le visible pour le POPj neutre ( $\Delta E = 3,40$  eV) et le POPj déprotoné sur l'acide carboxylique ( $\Delta E = 3,41$  eV). D'après l'équation de Einstein-Bohr,  $\Delta E = h\nu$ , soit  $\Delta E = hc/\lambda$ . Une réduction de  $\Delta E$  implique donc une augmentation de  $\lambda$ , d'où le déplacement bathochrome observé au niveau du spectre UV-visible.

A pH 8, le POPj est principalement sous forme doublement déprotonée en solution (déprotonations au niveau de la fonction acide carboxylique et de la fonction phénolique). Les calculs devront donc être réalisés sur une forme à la fois carboxylate et phénolate, afin d'être plus cohérent avec les données expérimentales présentées. Néanmoins, ces premiers éléments de modélisation moléculaire mettent clairement en évidence que la modification du spectre, et donc le changement de couleur du POPj observé à partir de pH 5,5, sont clairement expliqués par la déprotonation au niveau de la fonction phénolique, l'acide carboxylique n'ayant que peu d'influence sur l'absorption dans le visible.

Précisons enfin que la largeur des bandes d'absorption observées expérimentalement peut s'expliquer par des effets de solvant, par les transitions entre les états vibrationnels et par des variations liées à l'existence de plusieurs conformations en solution. Les résultats présentés dans le cadre de cette étude ne tiennent compte que du conformère le plus stable obtenu suite aux optimisations de géométries. La molécule de POPj ne présente pas beaucoup de flexibilité, le nombre de conformères à envisager reste limité, donc ils ont tous été analysés pour ce travail. Les calculs DFT ont mis en évidence six conformères suffisamment stables pour coexister en solution. Il faudrait donc moyenniser l'ensemble des données obtenues pour ces six géométries afin d'obtenir un spectre théorique plus précis et plus conforme à ce qui est observé expérimentalement. Néanmoins, même en ne considérant qu'un seul conformère, la TD-DFT s'est révélée être une méthode assez efficace pour décrire à l'échelle atomique les propriétés spectrales du POPj. L'exploration théorique de l'effet du pH sur le spectre UV-visible de la molécule a apporté des éléments pour expliquer les deux teintes très différentes présentées par le POPj suivant le pH de la solution.

Il serait intéressant à présent d'utiliser cette approche sur d'autres composés colorés modèles des jus de pomme, notamment sur des composés dérivant de la classe des flavanols comme les déhydrodiépicatéchines (DDEC) de type A et les déhydrotriépicatéchines (DTEC) de 864 Da et de 862 Da présentées au chapitre III. Cela permettrait (i) d'évaluer l'effet d'un niveau de polymérisation supplémentaire sur l'expression des chromophores, et (ii) de comparer le comportement de ces molécules soumises à des variations de pH. Peut-être sera-t-il possible d'expliquer la plus grande stabilité de la DTEC à 864 Da vis-à-vis du pH (par rapport au POPj) (§ IV. 2. 3. 2. ). Dans le cas du trimère à 862 Da totalement cyclisé, la construction en 3D de la molécule pourrait en outre permettre

d'envisager ou d'écarter l'hypothèse d'un possible phénomène de copigmentation intra-moléculaire. Enfin, le composé coloré XPL-EC/OX, dont la structure est proposée au chapitre III, pourrait également faire l'objet d'une étude TD-DFT. En effet, la caractérisation des propriétés optiques de ce composé nouvellement identifié serait intéressante dans la mesure où il s'agit d'un produit dérivant d'un couplage oxydatif entre des polyphénols issus des deux classes évoquées précédemment, à savoir entre une dihydrochalcone et un flavanol.

### IV. 3. EVALUATION DE L'EFFET DU POTENTIEL REDOX SUR LE POPJ ET LA DTEC\_864 DE TYPE A, DEUX CHROMOPHORES PHENOLIQUES CHOISIS COMME PIGMENTS MODELES DES JUS DE POMME

#### IV. 3. 1. ELEMENTS THEORIQUES SUR LES METHODES ELECTROCHIMIQUES A TROIS ELECTRODES EN REGIME DE DIFFUSION PURE

Une réaction électrochimique se définit par un transfert d'électron hétérogène entre une électrode et une espèce en solution. L'électrode de travail va jouer le rôle d'un oxydant si l'espèce en solution est un réducteur. Elle est alors désignée par le terme d'anode et elle est traversée par un courant d'oxydation positif. Dans le cas inverse, l'électrode de travail est désignée par le terme de cathode, elle joue alors le rôle d'un réducteur vis-à-vis de l'espèce en solution.

Les réactions de transfert d'électrons peuvent être étudiées par les techniques à 3 électrodes (BEDIOUI, 1999; Trémillon, 1993; Bard and Faulker, 2001). Le montage expérimental est constitué d'une cellule à électrolyse dans laquelle sont insérées les électrodes (électrode de travail ou indicatrice, électrode de référence, électrode auxiliaire) (Figure 87). Celles-ci sont connectées à un potentiostat-galvanostat qui permet le contrôle du potentiel (dans le circuit « travail-référence ») et la mesure du courant (dans le circuit « travail-auxiliaire »).

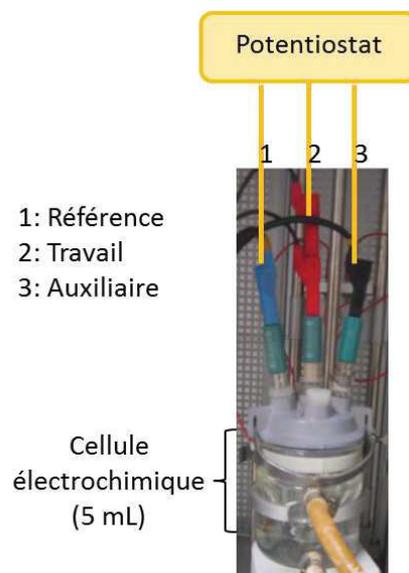


Figure 87 : Photographie d'une cellule électrochimique à trois électrodes

Un tel montage permet d'accéder notamment à des tracés de voltammétrie cyclique  $I = f(E)$  et de chronoampérométrie  $I = f(t)$  à potentiel  $E$  fixé. Il s'agit de méthodes en régime de diffusion naturelle pure, c'est-à-dire sans agitation de la solution pendant la mesure. L'espèce oxydante ou réductrice arrive à la surface de l'électrode par diffusion au sein de l'électrolyte. La Figure 88 montre que le

transfert hétérogène s'effectue en quatre étapes : diffusion vers l'électrode, transfert de l'électron (trois phases non représentées ici), diffusion vers la solution puis réaction(s) chimique(s) éventuelle(s). Le transfert d'électron est rapide si la modification structurale est peu importante et nécessite une faible énergie d'activation (modification de la sphère de solvation ou de l'atmosphère ionique); dans ce cas, le système rédox est dit Nernstien ou réversible. La valeur de la constante de vitesse du transfert d'électron  $k^{\circ}$  est alors supérieure à  $2 \cdot 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Plus la modification structurale est importante, plus l'énergie d'activation est importante et plus le transfert d'électron est lent (système irréversible). Il sera alors nécessaire d'appliquer un surpotentiel d'électrode important  $\eta$  pour provoquer le transfert d'électron. La valeur de la constante de vitesse du transfert d'électron  $k^{\circ}$  est inférieure à  $10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ . Pour des constantes de vitesse comprises entre  $10^{-5} < k^{\circ} < 2 \cdot 10^{-2}$ , les systèmes sont dits quasi-réversibles.

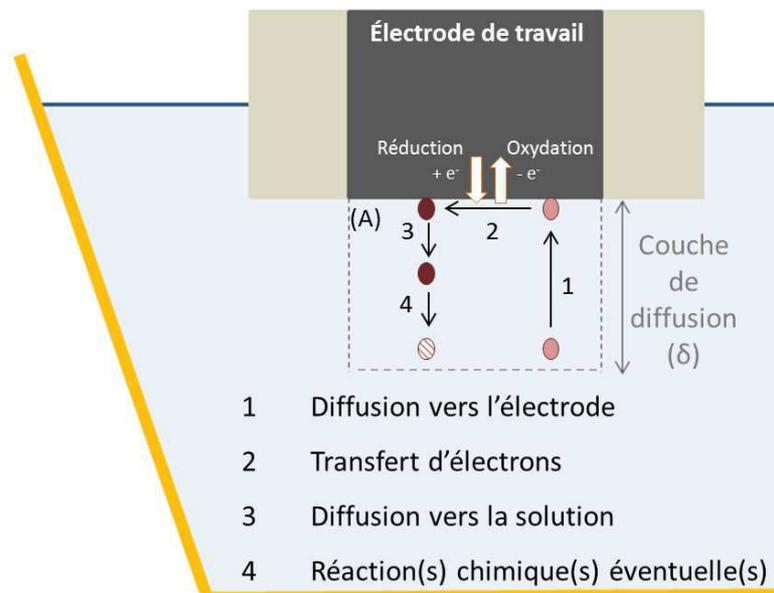


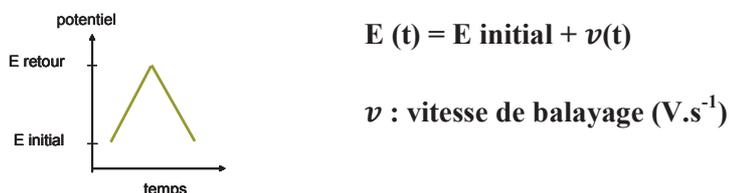
Figure 88 – Représentation du transfert électronique hétérogène à l'électrode

#### IV. 3. 1. 1. La voltammétrie cyclique

##### Principe de la méthode

La voltammétrie  $I = f(E)$  met en œuvre un balayage de potentiels en modifiant progressivement la tension de consigne contrôlée par le potentiostat et en mesurant le courant d'électrolyse correspondant. Si le balayage est aller-retour, on parle de voltammétrie cyclique (

Figure 89). Cette méthode permet d'obtenir des informations sur les mécanismes réactionnels, d'accéder à des paramètres thermodynamiques (potentiel rédox) et cinétiques (électrochimique ou chimique -s'il y a une réaction chimique couplée à la réaction électrochimique).



**Figure 89: Balayage de potentiels appliqué à l'électrode de travail en voltammétrie cyclique (par rapport à l'électrode de référence).**

L'électrolyse se produit dans la couche de diffusion, dans un petit volume  $A \cdot \delta(t)$ , et la concentration de l'espèce au cœur de la solution n'est pas modifiée (Figure 87). Dans les méthodes en régime de diffusion naturelle pure, l'épaisseur de la couche de diffusion augmente au cours du temps.

### Expressions mathématiques du courant en fonction du potentiel

Si l'on considère une espèce en solution (oxydant ou réducteur) appartenant à un système ox/red, une réaction électrochimique se produit à l'électrode lorsque celle-ci se trouve à un potentiel différent de son potentiel d'équilibre  $E_{eq}$  (surpotentiel d'électrode  $\eta = E - E_{eq}$ ). Le système oxydoréducteur évolue alors vers un nouvel état d'équilibre en modifiant les concentrations d'oxydant et/ou de réducteur (BEDIQUI, 1999). Le surpotentiel  $\eta$  apparaît donc comme un facteur de production des réactions électrochimiques. Il peut être relié au potentiel formel  $E'^0$  par la loi de Nernst (dans l'équation 1, on assimile activité à concentration). La loi de Nernst est développée en Annexe 1.

$$\eta = E - E'^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{sol Ox}}{C_{sol Red}} \quad \text{Eq. (1)}$$

La production d'une réaction électrochimique obéit à la Loi de Faraday (Equation 2) dans laquelle Q représente la charge globale exprimée en Coulomb, N le nombre de moles électrolysées, F la constante de Faraday (charge d'une mole d'électron soit 96584 C. mol<sup>-1</sup>), n le nombre d'électron(s) nécessaire(s) au changement d'état rédox.

$$N_{Ox} = N_{Red} = \frac{Q}{nF} \quad \text{Eq. (2)}$$

En voltammétrie cyclique, le courant est exprimé par les équations de Randles-Sevcik, qui dérivent de la relation de Butler-Volmer. Pour un système réversible, la cinétique de transfert d'électron est rapide

et la diffusion est le facteur limitant de la réaction électrochimique. Le courant de pic s'exprime par les équations 3 et 4.

$$I_P = 0.4463n^{3/2} FACv^{1/2}D^{1/2} \frac{F^{1/2}}{(RT)^{1/2}} \quad \text{Eq. (3)}$$

**A** aire de l'électrode (cm<sup>2</sup>)

**I** intensité du courant (A)

**C** concentration dans la solution (mol.cm<sup>-3</sup>)

**D** coefficient de diffusion (cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>)

**F** constante de Faraday (F = 96484 C.mol<sup>-1</sup>)

**v** vitesse de balayage (V.s<sup>-1</sup>)

**R** constante des gaz parfaits (R = 8.31 J.K.mol<sup>-1</sup>)

**T** température (K)

$$I_P = (2.69 \cdot 10^5)n^{3/2}AD^{1/2}Cv^{1/2} \quad \text{Eq. (4)}$$

Expression à 25°C en remplaçant les paramètres par leurs valeurs

Pour un système irréversible, la cinétique de transfert d'électron est lente et le courant est gouverné par cette cinétique. L'expression du courant de pic s'exprime alors par l'équation 5.

$$I_P = 0.4958n(\alpha n_a)^{1/2} FACv^{1/2}D^{1/2} \frac{F^{1/2}}{(RT)^{1/2}} \quad \text{Eq. (5)}$$

**n** nombre total d'électrons échangés

**n<sub>a</sub>** nombre d'électrons mis en jeu au cours de l'étape cinétiquement déterminante

**α** coefficient du transfert de charge

$$\alpha = \frac{1.857RT}{\Delta E_{p/2}Fn_a}$$

$$\Delta E_{p/2} = E_{p/2} - E_p \quad \text{avec } E_{p/2}, \text{ valeur pour } I = I_{p/2}$$

Le critère de réversibilité électrochimique s'évalue sur un voltammogramme en appréciant différents paramètres :

- $\Delta E_p = 59/n$  mV à 25°C, indépendant de  $v$  ( $\Delta E = |E_{pa} - E_{pc}|$ )
- $I_p/v^{1/2}$  indépendant de  $v$
- $I_{pa}/I_{pc} = 1$

Si tous les paramètres sont vérifiés, le système est dit réversible, cela signifie que:

- la vitesse du transfert d'électron est contrôlée par la diffusion ;
- la réversibilité chimique est observée (il n'y a pas de réactions chimiques qui suivent le transfert électronique, le produit formé à l'électrode est stable aux vitesses de balayage considérées).

#### IV. 3. 1. 2. La chronoampérométrie

La chronoampérométrie permet la mesure du courant en fonction du temps par application d'un ou plusieurs sauts de potentiel. Le potentiel de départ  $E_1$  est fixé initialement à une valeur pour laquelle aucune réaction électrochimique ne se produit à l'électrode. Le potentiel est ensuite pulsé à une valeur  $E_2$ , pour laquelle la réaction électrochimique se produit à la vitesse maximale (limitée par la diffusion des espèces à l'électrode), et  $E_2$  est maintenu pendant un temps  $\theta$ . En réponse à ce profil de potentiel appliqué à l'électrode, un chronoampérogramme représentant  $I = f(t)$  est obtenu (Figure 90). Le courant suit la loi de Cottrell (Equation 6). L'intensité du courant est proportionnelle à la concentration de l'analyte dans la solution.

$$I(t) = nFAC \left( \frac{D}{\pi t} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. (6)}$$

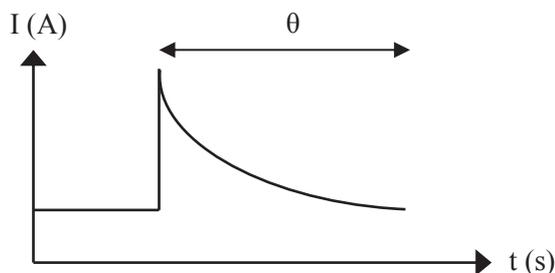


Figure 90 : Réponse du courant au saut de potentiel en fonction du temps.

### IV. 3. 1. 3. La méthode couplée spectroélectrochimie UV-Visible

Les méthodes de spectroélectrochimie en temps réel permettent de réaliser *in situ* des mesures simultanées des caractéristiques spectroscopiques pour différentes valeurs de potentiel (ou de courant). Elles sont devenues un bon outil permettant, entre autres, l'obtention d'informations sur les intermédiaires réactionnels (Kaim and Fiedler, 2009). Les techniques UV-Visible, RMN, RPE, Raman... peuvent être couplées aux techniques électrochimiques à trois électrodes (Bussy and Boujtita, 2015; Hapiot et al., 1996).

La spectroélectrochimie UV-Visible est la principale technique utilisée dans ce travail. Il s'agit d'un dispositif particulièrement bien adapté pour l'étude des propriétés rédox des polyphénols car ces molécules absorbent dans la région de l'UV-Visible. Les éventuels effets bathochromes (déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde), hypsochromes (déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde), hyperchromes (augmentation de l'intensité d'absorption) et/ou hypochromes (diminution de l'intensité d'absorption) observés peuvent être reliés à la formation d'espèces oxydées ou réduites. Le couplage de la spectroscopie UV-Visible et de la voltammétrie cyclique ou de la chronoampérométrie offre ainsi de nombreux avantages, notamment la mise en évidence d'intermédiaires réactionnels que la technique électrochimique seule ne révèle pas toujours.

Les phénomènes d'oxydation de molécules de polyphénols comme par exemple, la quercétine (Sokolová et al., 2011), l'acide caféique (Hapiot et al., 1996; Petrucci et al., 2007), la lutéoline (Ramešová et al., 2013) et l'acide benzo[tertonique] (Hu et al., 2011) ont été étudiés par spectroélectrochimie UV-Visible. Ces travaux ont permis d'accéder aux caractéristiques spectroscopiques et électrochimiques de ces molécules tout en obtenant des informations sur les produits d'oxydation formés. Cette technique couplée se révèle particulièrement intéressante lorsque les formes réduites et oxydées de la molécule étudiée présentent des spectres d'absorption différents, ce qui est attendu dans le cas de notre étude sur le passage de formes phénoliques colorées à des formes moins voire pas colorées.

## IV. 3. 2. PARTIE EXPERIMENTALE

### IV. 3. 2. 1. La voltammétrie cyclique

#### Appareillage

Les enregistrements de voltammétrie cyclique ont été réalisés à l'aide d'un potentiostat/galvanostat (PGSTAT 100, AUTOLOAB instrument, Eco Chemie B.V., Utrecht, Pays-Bas) piloté par le logiciel Nova 1.10. La cellule électrochimique thermostatée (5 mL) est constituée d'une électrode de travail de

carbone vitreux ( $\varnothing$  2 mm), d'une électrode auxiliaire électrode de platine, et d'une électrode de référence Ag/AgCl/KCl 3M. Tous les potentiels sont donnés par rapport à cette électrode de référence. La température est maintenue à  $20^{\circ}\text{C} \pm 0,02^{\circ}\text{C}$  par l'utilisation d'un thermostat à circulation MP-5 de la société Julabo (Seelbach, Allemagne).

### **Enregistrement des voltammogrammes**

Avant chaque mesure, l'électrode de travail de carbone vitreux 2 mm est polie à l'aide d'un drap de polissage MD-Nap sur lequel une suspension d'alumine  $0.3 \mu\text{m}$  a été déposée (laboPol-5 Struers, Ballerup, Danemark). L'électrode est rincée à l'eau distillée UHQ ultra pure water-Elga puis séchée.

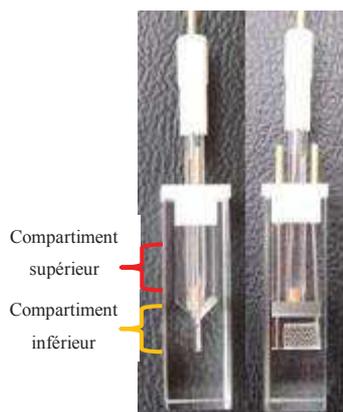
Le milieu réactionnel a été désaéré avant chaque mesure en faisant buller de l'azote pendant 15 min. La concentration en composé étudié (POPj, POPi et DTEC\_864) dans le milieu tampon phosphate 0.1 M est de 1,8 mM. Les potentiels et les intensités des pics d'oxydation et de réduction ont été déterminés.

Le potentiel du pic d'oxydation est noté  $E_{\text{pa}}$  et son intensité  $I_{\text{pa}}$ , de même en réduction, les paramètres caractéristiques sont notés  $E_{\text{pc}}$  et  $I_{\text{pc}}$ .

## **IV. 3. 2. 2. La spectroélectrochimie UV-Visible**

### **Appareillage**

L'étude spectroélectrochimique a été réalisée à l'aide d'un potentiostat/galvanostat (PGSTAT 204, AUTOLAB instrument, Pays bas) et d'un spectrophotomètre UV-Visible Avantes AvaSpec-ULS20 48 équipé de fibres optiques et d'une source lumineuse AvaLight-DHC (Lampe à Deutérium-Halogène ; gamme de longueur d'onde de 200-2500 nm). L'ensemble est piloté par le logiciel NOVA 1.10. Le montage expérimental utilisé pour le tracé des courbes  $I = f(E)$  et  $I = f(t)$  est schématisé sur la Figure 91.



**Cellule de spectroélectrochimie UV-Visible**

(quartz, 43 mm x 12 mm x 12 mm)



**Electrode de travail**

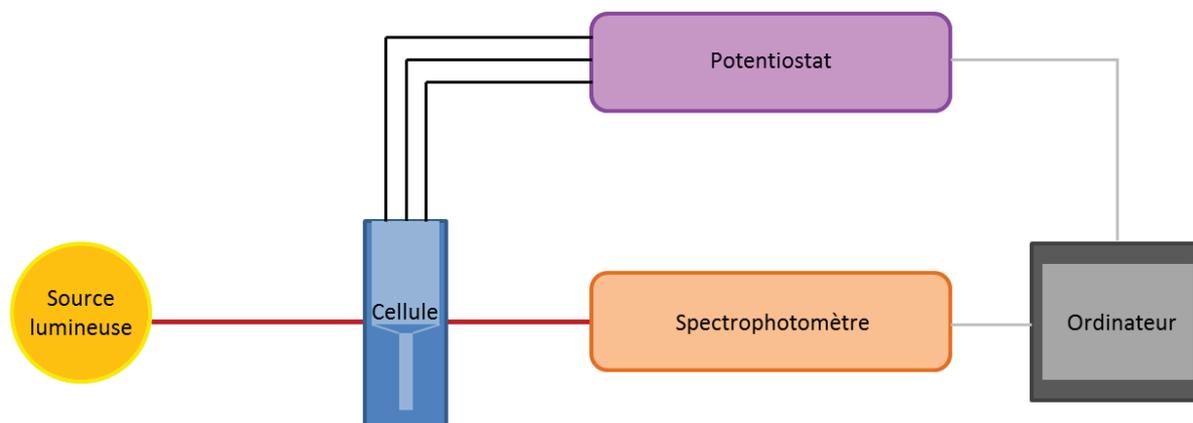
**Grille de Platine;** 7 mm x 6 mm



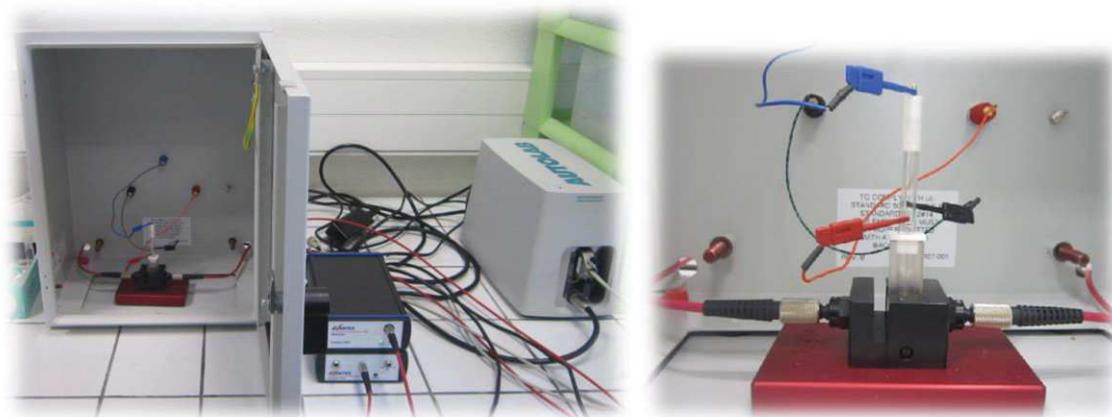
De gauche à droite :  
 électrode auxiliaire (Pt),  
 électrode de travail (Pt),  
 électrode de référence (Ag/AgCl, KCl 3M)

**Figure 91 – Photographie des électrodes.**

L'électrode de travail est une grille de platine rectangulaire (7 x 6 mm), elle est placée dans le compartiment inférieur de la cuvette en quartz pouvant contenir environ 200  $\mu$ L de solution et dont le chemin optique mesure 1 mm. L'électrode de référence est constituée d'un fil d'argent plongeant dans une solution de KCl 3M (tube pyrex, fritté). L'électrode auxiliaire est constituée d'un fil de platine. Ces deux dernières électrodes sont plongées dans le compartiment supérieur de la cellule, contenant un volume de solution d'environ 600  $\mu$ L. Le volume total de solution est donc de 800  $\mu$ L (Figure 92).



**Figure 92 : Schéma du montage expérimental pour mettre en œuvre le couplage Electrochimie/Spectroscopie UV-Visible**



**Figure 93: Photographies de l'appareillage et de la cellule de spectroélectrochimie.**

### **Enregistrements en spectroélectrochimie**

L'étude est réalisée dans un tampon phosphate 0,1M pH 3,7 à température ambiante, en l'absence d'oxygène (bullage d'azote pendant 15 minutes puis flux continu en surface durant l'expérience). La concentration en composé étudié (POPj ou POPi) est de 0.5 mM.

Le tracé  $I = f(E)$  est réalisé à une vitesse de balayage de  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$ . Les spectres UV-Visible sont enregistrés simultanément sur une gamme spectrale de 200 à 600 nm. Le couplage des deux techniques permet de sélectionner le potentiel auquel on va réaliser l'électrolyse et le temps d'électrolyse.

Le potentiel pour l'ampérométrie a été fixé à  $-0,3 \text{ V}$  pour le POPj (réduction) et à  $+1,2 \text{ V}$  pour le POPi (oxydation). L'électrolyse est suivie grâce à l'enregistrement du graphe  $I = f(t)$  et de l'évolution des spectres UV-Visible. A la fin de l'électrolyse, le volume total de la solution est analysé en CLHP-DBD-SM.

A la fin de chaque expérience, l'électrode de travail est placée pendant 5 minutes en ultrasonication dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1M, puis rincée à l'eau distillée et séchée.

### **Analyse des solutions électrolysées en CLHP-DBD-SM**

Le système d'analyse utilisé est le même que celui décrit au III. 2. 4. 3. . Les conditions d'analyse ont déjà été présentées en § III. 2. 4. 3. .

### IV. 3. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Afin d'évaluer l'impact du potentiel rédox sur la couleur exprimée par les deux chromophores modèles sélectionnés, la réduction de ces composés a été étudiée à l'électrode par spectroélectrochimie UV-visible. Contrairement aux conditions d'un moût de pomme fermenté, cette approche en solution modèle permet de s'affranchir de l'influence éventuelle d'un collage des molécules colorées sur les levures (comme mentionné en IV. 1. ). L'outil électrochimique se révèle donc particulièrement pertinent pour explorer les éventuelles évolutions des composés colorés vers des formes incolores, au cours de la fermentation, par modification de leur statut rédox. Avant de se focaliser sur leur propriété colorante, le comportement électrochimique de ces molécules a été étudié par voltammétrie cyclique.

#### IV. 3. 3. 1. Etude des propriétés rédox du POPj et du POPi par voie électrochimique

Etude par voltammétrie cyclique

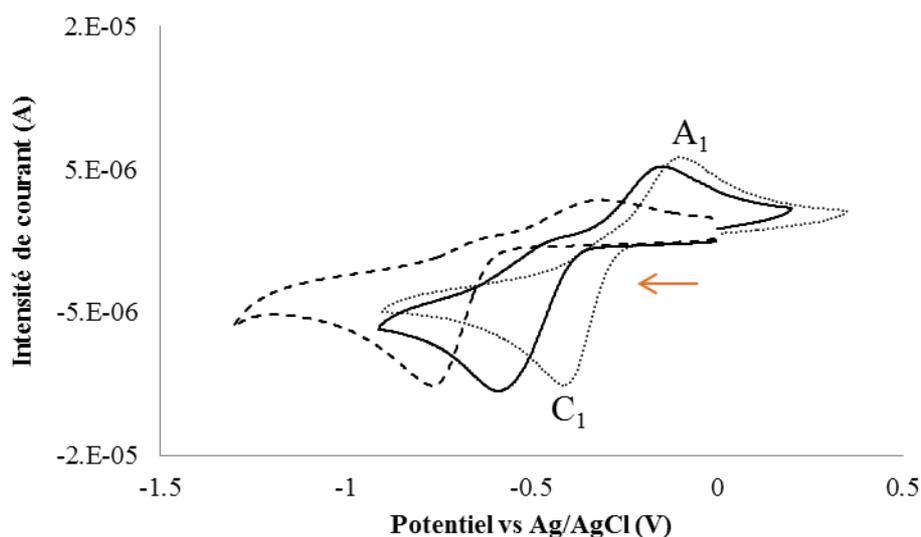


Figure 94 - Voltammogrammes cycliques du POPj à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à différents pH :

(pointillés) pH 3, (trait plein) pH 5 et (tirets) pH 8. Tracés obtenus à  $0,1V.s^{-1}$  à  $20^{\circ}C$ .

Electrode de travail de carbone vitreux ( $\varnothing 2,0$  mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.  
La flèche indique le sens du balayage, ici cathodique (étude de la réduction)

La **Figure 94** présente l'étude en balayage cathodique du POPj, en tampon phosphate à pH 3, 5 et 8. Un pic de réduction  $C_1$  dont le potentiel évolue avec le pH est observé ( $E_{pc} = -0.41$  V,  $-0.59$  V et  $-0.76$  V à pH 3, 5 et 8, respectivement). Si l'on considère la structure du POPj, deux fonctions sont réductibles : la fonction carboxylique et la fonction di-cétonique conjuguée. La réduction d'un acide carboxylique peut avoir lieu à l'électrode mais à des potentiels relativement négatifs (Lund and Baizer, 1991), elle n'a pas été observée dans nos conditions expérimentales. Ainsi, le pic cathodique est attribué à la réduction de la fonction di-cétonique. Dans la littérature, le mécanisme de réduction des

composés *o*-quinoniques est plus documenté que celui des composés di-cétoniques conjugués dont la structure est proche électroniquement ((Bailey and Ritchie, 1985), (Laviron, 1983)). Le système oxydo-réducteur *o*-quinone/*o*-diphénol a fait l'objet de nombreuses études, il est illustré en Figure 95 (Fulcrand H et al., 1994). L'objectif n'a pas été ici de mener une étude mécanistique détaillée des processus de réduction du POPj et d'oxydation du POPI. L'attention a davantage été portée sur l'identification des composés majoritaires issus des transferts d'électrons, et à leurs caractéristiques spectroscopiques.

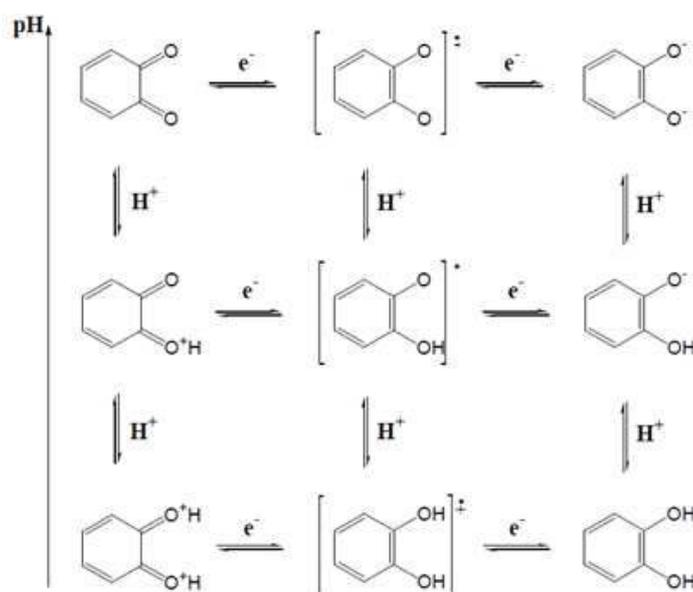


Figure 95 - Equilibres acido-basiques et oxydo-réducteurs théoriques pour le couple *o*-quinone/*o*-diphénol (reproduit de Fulcrand 1994).

Selon la valeur du pH, la molécule est plus ou moins chargée négativement, ce qui influence sa facilité à accepter des électrons à l'électrode (pour rappel, les valeurs de pKa du POPj sont respectivement de 4,4 pour l'acide carboxylique et 6,1 pour la fonction phénol). La prédominance des espèces en solution implique par exemple qu'à pH 3, la molécule de POPj est essentiellement présente sous sa forme doublement protonée sur les deux fonctions : le potentiel de réduction est donc moins négatif qu'aux autres valeurs de pH considérées (Figure 94).

Sur le balayage retour (anodique), un pic d'oxydation  $A_1$  est observé. L'espèce formée par réduction à l'électrode est oxydée à un potentiel relativement bas, soit  $-0,09$  V à pH 3. L'écart de potentiel est de 313 mV à  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , le système ne vérifie pas les critères de réversibilité électrochimique présentés au IV. 3. 1. , à savoir :  $\Delta E = (59/n)$  mV indépendant de la vitesse de balayage  $v$ , avec  $n$  nombre d'électrons échangés,  $(I_p/v^{1/2})$  indépendant de  $v$  et  $I_{pa}/I_{pc} = 1$ .

Si l'on se réfère au mécanisme de formation du POPj par voie enzymatique (Guyot et al, 2007, Figure 42), le pic d'oxydation  $A_1$  pourrait être attribué à l'oxydation du POPI formé par réduction. Afin de s'en assurer, l'oxydation du POPI a été étudiée par voltammétrie cyclique dans les mêmes conditions

expérimentales (Figure 96 A). Deux pics d'oxydation apparaissent sur le voltammogramme, A<sub>2</sub> à + 0.6 V et A<sub>3</sub> à + 1 V. Aucune de ces valeurs de potentiel ne coïncide avec celle du pic d'oxydation A<sub>1</sub>. Par conséquent, l'espèce formée par réduction du POPj à l'échelle de temps de la voltammétrie cyclique n'est pas la même que celle identifiée par voie enzymatique, c'est-à-dire le POPi.

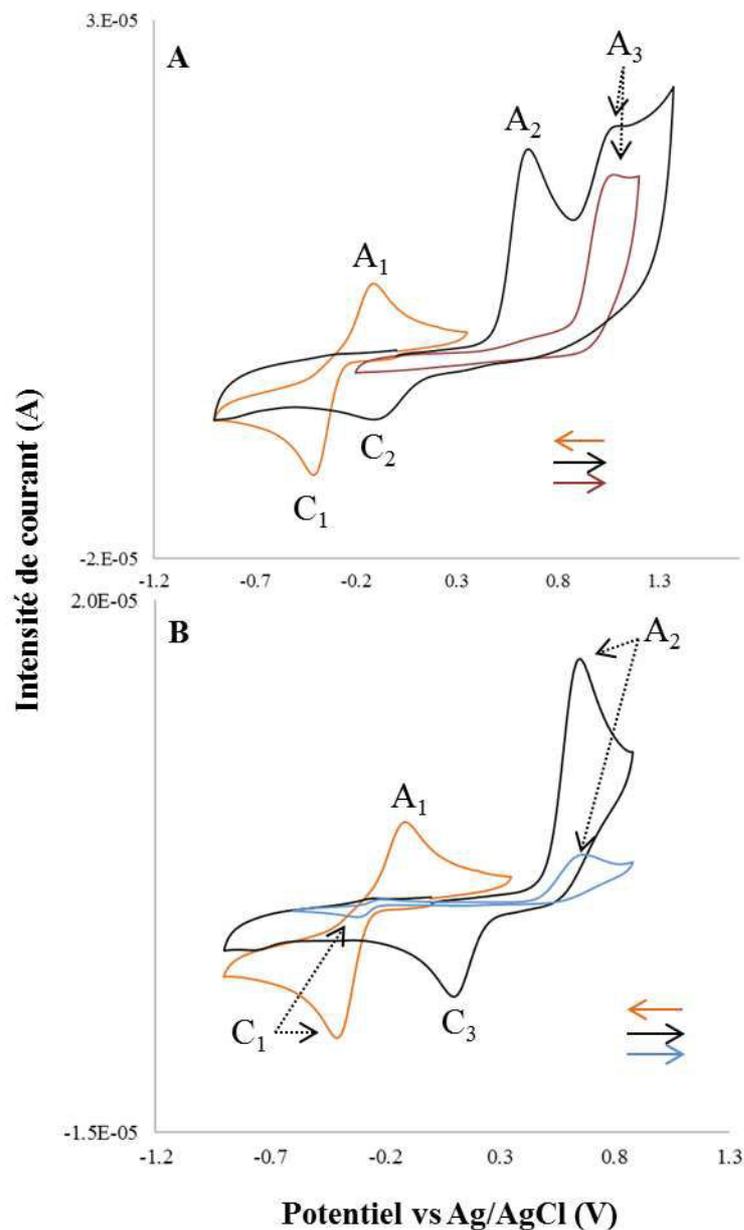


Figure 96 - Voltammogrammes cycliques du POPi et du POPj à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à pH 3. Tracés obtenus à 20°C.

- Tracé orange : réduction du POPj ( $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- Tracé noir : oxydation du POPi ( $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- Tracé rouge : oxydation du POPj ( $0,1\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- Tracé bleu : oxydation du POPi ( $0,001\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ )

Electrode de travail de carbone vitreux ( $\varnothing 2,0$  mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine. Les flèches indiquent le sens de balayage: orange (balayage cathodique: étude de la réduction) ; bleue, rouge et noire (balayage anodique : étude de l'oxydation).

L'inversion du potentiel de balayage après le premier pic d'oxydation du POPi ( $A_2$ ) permet d'obtenir les tracés présentés en **Figure 96 B**. Un pic cathodique  $C_3$  (xxx V) apparaît sur le balayage retour : il correspond à la réduction de la première espèce oxydée formée à l'électrode ( $A_2$ ).  $C_3$  n'apparaît pas au même potentiel que le pic de réduction  $C_1$  du POPj. Ainsi, la première molécule oxydée formée ne correspond pas au POPj. Pourtant, en abaissant la vitesse de balayage à  $0.001 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  (**Figure 96 B**, tracé bleu), le pic cathodique retour  $C_3$  n'apparaît plus et un nouveau pic est observé à un potentiel de  $-0,4 \text{ V}$ , ce qui correspond au potentiel de pic de réduction du POPj ( $C_1$ ). Le pic  $C_3$  est donc attribué à la réduction d'un intermédiaire réactionnel susceptible d'évoluer vers le POPj. La constante cinétique de cette réaction n'a pas été calculée dans ce travail. En conclusion, le POPi s'oxyde en POPj dans la couche de diffusion par l'intermédiaire d'une espèce transitoire.

Par ailleurs, l'oxydation à l'électrode du POPj met en évidence un pic au même potentiel que celui du second pic d'oxydation du POPi (Figure 96, pic  $A_3$ ). Ils ne peuvent être associés qu'à l'oxydation de la fonction phénolique, présente dans les deux structures.

Après avoir décrit le comportement du POPj et du POPi en voltammétrie cyclique, l'étude s'est focalisée sur l'évolution de leur couleur en fonction du potentiel rédox. Dans ce contexte, la spectroélectrochimie UV-Visible est apparue comme un outil particulièrement adapté pour relier les caractéristiques spectroscopiques d'une molécule à son état d'oxydation.

#### Etude par spectroélectrochimie UV-Visible

L'étude par spectroélectrochimie UV-Visible du POPj et du POPi a été réalisée à pH 3,7 afin d'être dans les conditions de pH de la moyenne des cidres français (source : Base de données de caractérisation de 90 cidres français disponible au laboratoire).

#### Analyse de la réduction du POPj en spectroélectrochimie UV-visible

Dans un premier temps, l'intensité du courant a été enregistrée sur une gamme de potentiels appliqués à l'électrode de travail (grille de Platine) afin de déterminer le potentiel d'électrolyse approprié. La courbe  $I = f(E)$ , enregistrée pour la réduction du POPj, n'est pas présentée car aucun pic de réduction n'est clairement identifié, quelle que soit la concentration du composé. Pourtant, la réaction électrochimique a bien lieu puisque le spectre UV-Visible de la solution, acquis en temps réel pour différentes valeurs de potentiel, évolue. Il présente une modification nette à partir de  $-0,23 \text{ V}$  tel que présenté sur la Figure 97. Par conséquent, l'électrolyse a été réalisée à un potentiel fixe de  $-0,3 \text{ V}$  imposé à la grille de platine pendant 2 heures.

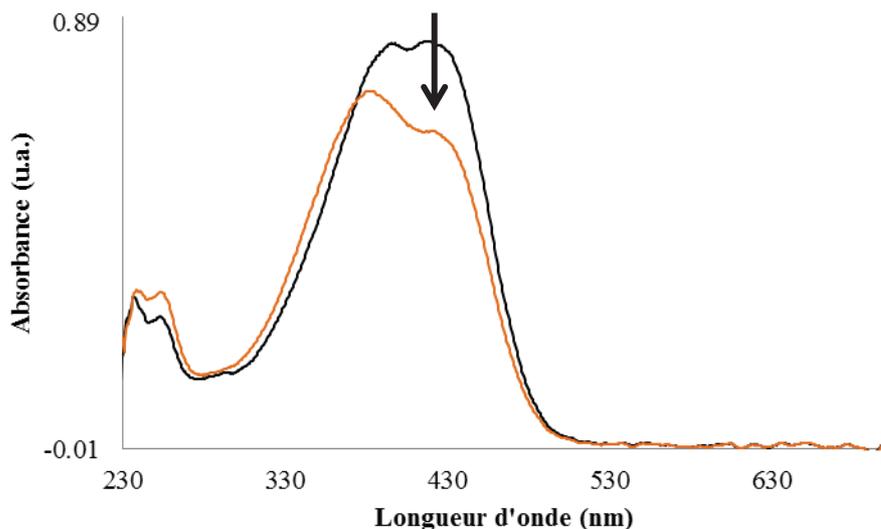


Figure 97 - Spectres UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM en tampon phosphate à pH=3,7 enregistrés à différentes valeurs de potentiel simultanément au cours du tracé  $I=f(E)$  à  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$  (électrode de travail : grille de platine).

- Tracé noir : +0,50V
- Tracé orange : - 0,23 V

Electrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

La Figure 98 montre la courbe  $I = f(t)$  enregistrée au cours de l'électrolyse. Le courant est proche de la valeur du courant résiduel au bout de 25 minutes : le nombre de moles de POPj susceptibles de migrer vers l'électrode par diffusion a subi le transfert d'électrons.

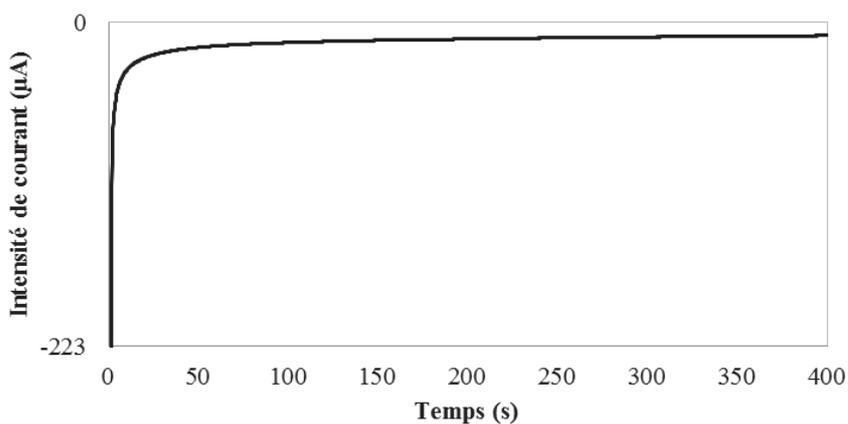


Figure 98- Chronoampérogramme  $I = f(t)$  enregistré pendant l'électrolyse du POPj à 0,5 mM, réalisée pendant 2 heures à un potentiel fixe de -0,3 V (seules les 6 premières minutes sont présentées sur cette figure).

Etude en tampon phosphate 0,1 M, pH 3,7.

Electrode de travail : grille de platine (7x6 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

Le spectre UV-Visible est modifié au cours de l'électrolyse (Figure 99) : on constate un déplacement hypsochromique de la bande d'absorption initialement située dans le visible. Le maximum d'absorption est déplacé de 368 nm à 392 nm. Ceci indique clairement une perte de coloration au niveau de la solution au contact de l'électrode, le(s) produit(s) issu(s) de la réduction du POPj est (sont) donc majoritairement incolores.

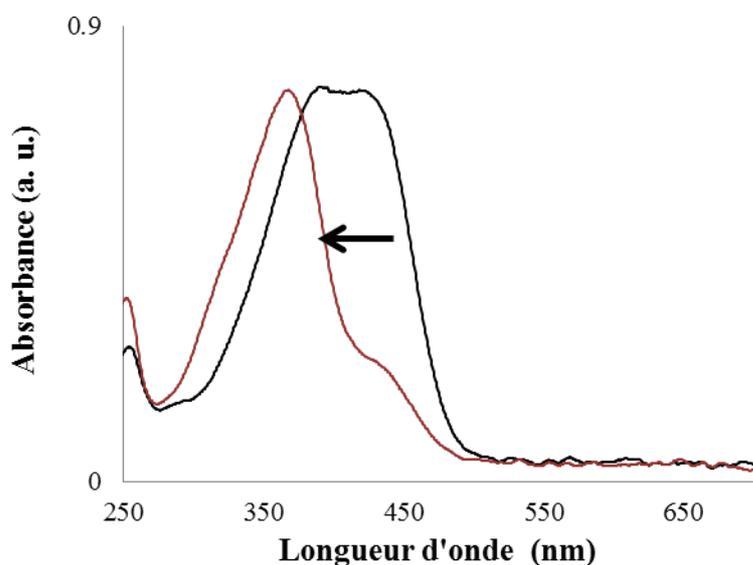


Figure 99 – Evolution du spectre UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM au cours de l'électrolyse en tampon phosphate à pH 3,7. Tracé noir : spectre initial au temps  $t = 0$  min ; tracé rouge :  $t = 2$  h.

Electrode de travail : grille de platine (7x6 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

La solution électrolysée a été analysée en CLHP-DBD-SM : les chromatogrammes à 280 et 420 nm, obtenus avant et après électrolyse, sont présentés en Figure 100. La chronoampérométrie et l'évolution du spectre UV-Visible ont montré que l'électrolyse en réduction du POPj, bien que significative, n'était pas totale, d'où la présence du double pic intense (1) correspondant au POPj sur les chromatogrammes. Par intégration de l'aire du double pic (1) à 420 nm, le rendement d'électrolyse est estimé à 25%.

La réduction à l'électrode du POPj ne génère pas de nouveaux produits colorés comme le révèle le chromatogramme à 420 nm (Figure 100 B). En revanche, plusieurs pics d'intensité plus ou moins forte sont visibles à 280 nm, attestant de la formation de produits incolores. La réduction du POPj à l'électrode s'oriente vers la formation du composé (2) dont l'ion pseudomoléculaire présente un  $m/z$  de 467 comme le POPi, mais dont le temps de rétention diffère ( $T_R = 10,8$  min). Le POPi est tout de même détecté dans le milieu d'électrolyse (pic (3) à  $T_R = 5,5$  min, **Figure 100 A**), or il n'avait pas été observé en voltammétrie cyclique car sa formation résulte probablement de réactions chimiques ayant des cinétiques lentes. Rappelons que les échelles de temps ne sont pas les mêmes pour les deux expériences.

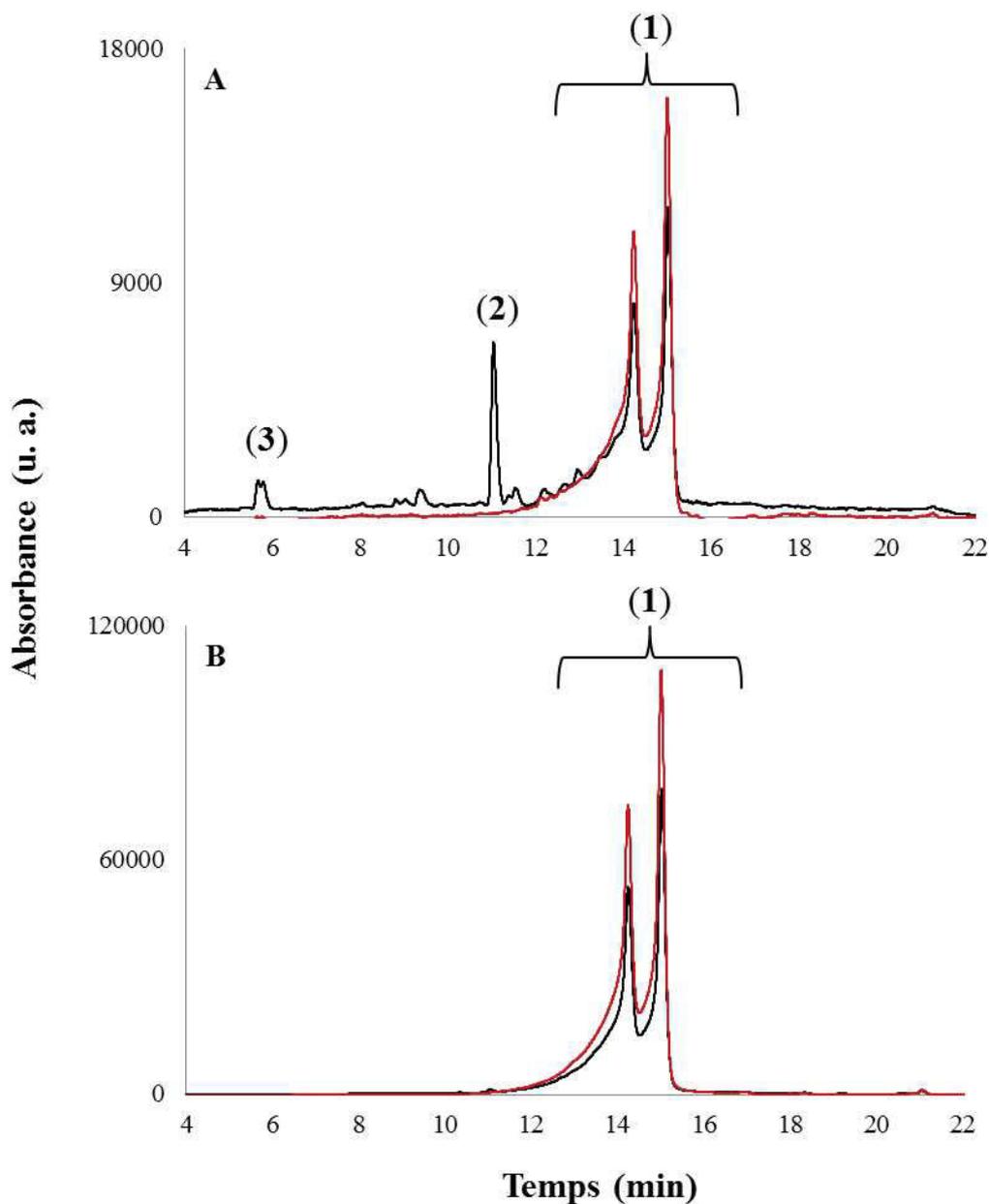


Figure 100 – Profils chromatographiques obtenus à (A) 280 nm et (B) 420 nm pour la solution de POPj à 0,5 mM : tracé rouge, avant électrolyse ; tracé noir, après réduction à l'électrode (2h à -0,3V, électrode de travail : grille de platine).

L'analyse par fragmentation en  $SM^n$  du composé (2) et du POPi (3) n'apporte pas d'éléments déterminants qui permettraient de distinguer les deux structures (données non présentées). Par conséquent, il n'est pas aisé de proposer une hypothèse structurale pour le composé (2). Il pourrait s'agir d'une structure totalement cyclisée similaire à celle du POPj, pour laquelle les deux fonctions cétoniques auraient été réduites (Figure 101 structure B). Cette molécule présenterait bien la même

masse que celle du POPi. Ce dernier pourrait se reformer dans la couche de diffusion à partir du composé (2).

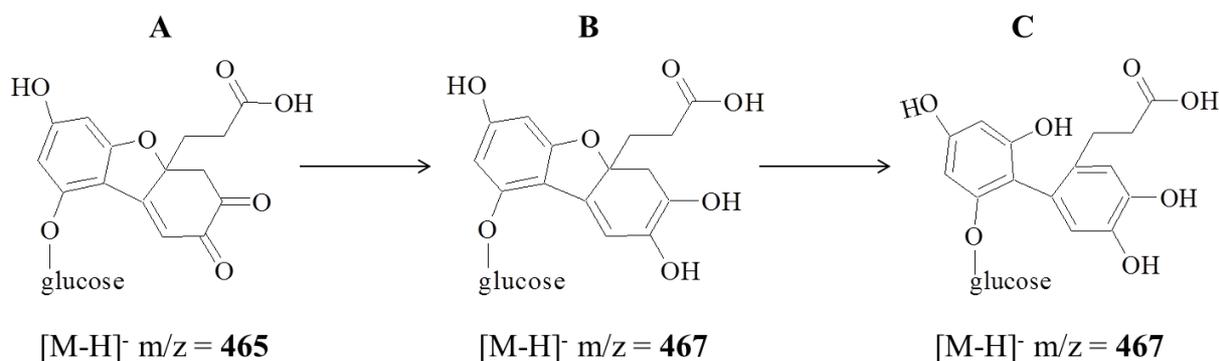


Figure 101 – Hypothèse de structure pour le composé B formé par réduction du POPj (A) à l'électrode et présentant la même masse que le POPi (C).

#### Analyse de l'oxydation du POPi en spectroélectrochimie UV-visible

Afin de déterminer le potentiel d'électrolyse approprié pour l'ampérométrie du POPi, la même démarche que celle décrite pour le POPj a été employée. L'intensité du courant a été enregistrée lors d'un balayage de potentiels appliqués à la grille de platine : la courbe  $i = f(E)$  résultante est présentée en Figure 102. Le potentiel de l'électrode de travail a été balayé de 0 à +1,5 V puis inversé pour revenir au potentiel initial de 0 V. Deux pics d'oxydation sont observés à +0,7 et à +1,1 V ainsi qu'un pic de réduction, lors du retour en balayage cathodique, à +0,3 V. Le voltammogramme présente un profil très similaire à celui observé en voltammétrie cyclique sur carbone vitreux (Figure 96), ces pics correspondent à  $A_2$ ,  $A_3$  et  $C_2$ .

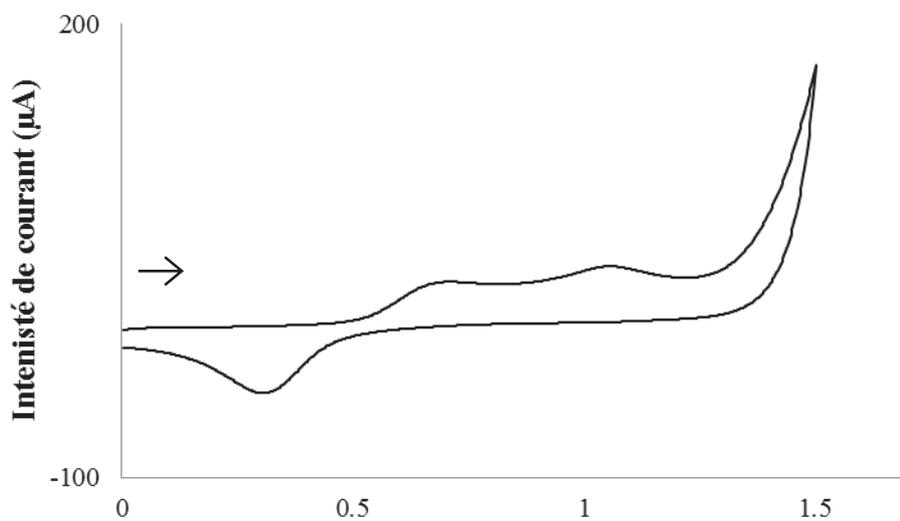


Figure 102 - Courbe  $i = f(E)$  pour le POPi à 0,5 mM, enregistrée à  $0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  en tampon phosphate 0,1 M à pH=3,7.

Electrode de travail : grille de platine (7x6 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

Le spectre UV-Visible de la solution a subi des modifications au cours du balayage de potentiels (Figure 103). Il ne présente pas de modifications lorsque les potentiels appliqués sont compris entre 0 et 0,59 V. Au-delà de 0,63V, le spectre évolue nettement jusqu'à un potentiel de 1,1 V puis il n'y a plus d'évolution marquée. En accord avec l'évolution du spectre UV-visible, l'électrolyse a été réalisée à un potentiel fixe +1,2 V imposé à la grille de platine pendant 30 min.

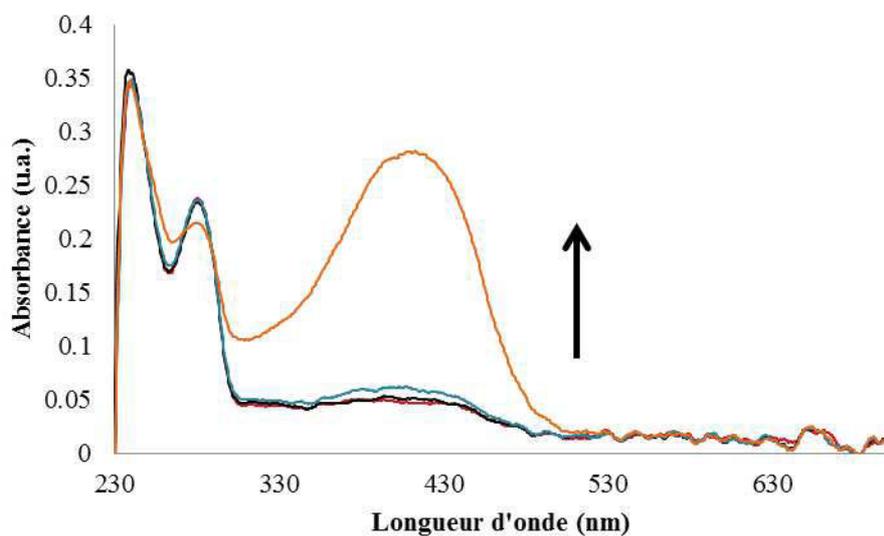


Figure 103 - Spectres UV-Visible de la solution de POPI à 0,5 mM en tampon phosphate à pH=3,7 enregistrés à différentes valeurs de potentiel imposées à l'électrode de travail (grille de platine) au cours du tracé  $I=f(E)$  à  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$ .

- Tracé rouge : + 0,01 V
- Tracé noir: + 0,59V
- Tracé bleu: + 0,63 V
- Tracé orange : + 1,12 V

Electrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

Le chronoampéromètre présenté en Figure 104 illustre le fait que la valeur du courant est proche de zéro après 1 min d'électrolyse, ce qui signifie que la concentration en POPi au voisinage de l'électrode est presque nulle.

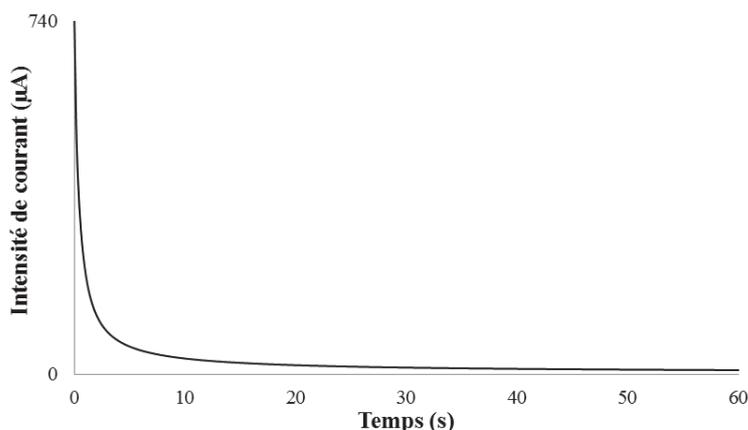


Figure 104 - Chronoampéromètre  $I = f(t)$  enregistré pendant l'électrolyse du POPi à 0,5 mM, réalisée pendant 30 min à un potentiel fixe de +1,2 V (seule la première minute est présentée sur cette figure).

Etude en tampon phosphate 0,1 M, pH 3,7.

Electrode de travail : grille de platine (7x6 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

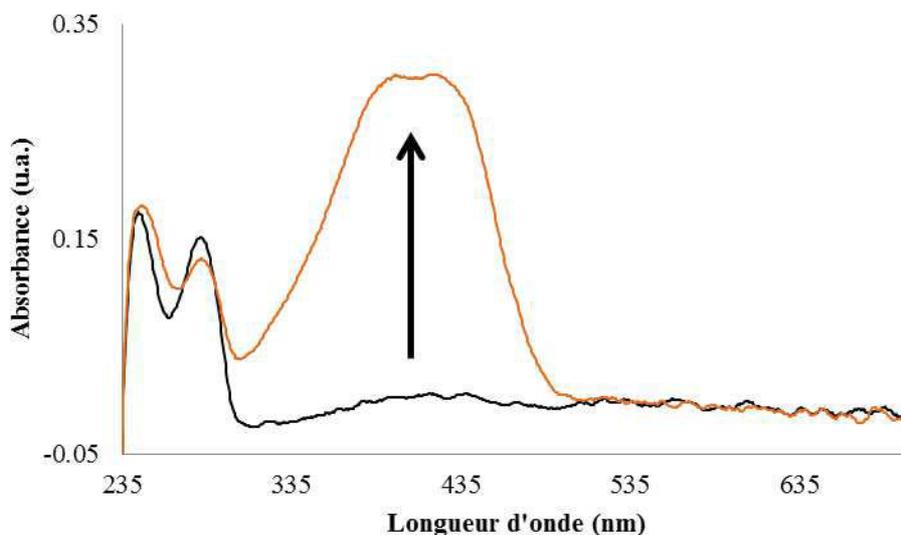


Figure 105 - Evolution du spectre UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM au cours de l'électrolyse en tampon phosphate à pH 3,7. Tracé noir : spectre initial au temps  $t = 0$  min ; tracé rouge :  $t = 2$  h.

Electrode de travail : grille de platine (7x6 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

Les profils chromatographiques obtenus à 280 et 420 nm pour la solution de POPi avant et après électrolyse sont présentés en Figure 105. L'intégration du pic (3) à 280 nm permet d'estimer que 11% de la solution ont été électrolysés.

L'oxydation à l'électrode du POPi (**3**) n'aboutit pas à la formation de plusieurs produits d'après le chromatogramme à 280 nm (Figure 106 -A), contrairement à ce qui avait été observé lors de la réduction du POPj. Le profil du milieu électrolysé est ici relativement simple : seul un double pic élué entre 14 et 14,8 min apparaît après électrolyse à 280 nm. Le même signal est observé avec une intensité plus forte sur le chromatogramme à 420 nm (**Figure 106-B**). Le composé correspondant est identifié comme étant le POPj (**1**) puisqu'il présente le même temps de rétention et le même rapport  $m/z = 465$  pour l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$  associé.

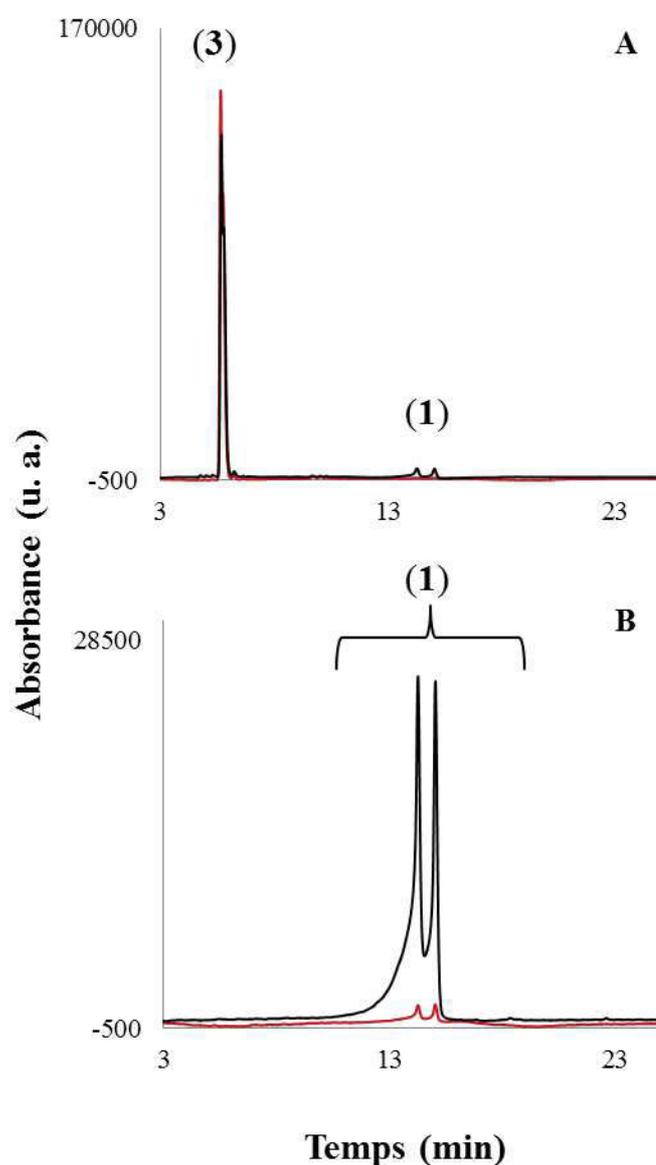


Figure 106 - Profils chromatographiques obtenus à (A) 280 nm et (B) 420 nm pour la solution de POPi à 0,5 mM : tracé rouge, avant électrolyse ; tracé noir, après oxydation à l'électrode (30 min à +1,2V, électrode de travail : grille de platine).

En définitive, l'électrochimie a permis d'identifier que la réduction du POPj conduit bien à des composés incolores. Deux produits ont été repérés, un produit majoritaire dont la structure n'est pas encore clairement élucidée et le POPi. L'oxydation du POPi à l'électrode conduit majoritairement à la formation du POPj. Les principaux résultats obtenus sont récapitulés en Figure 107.

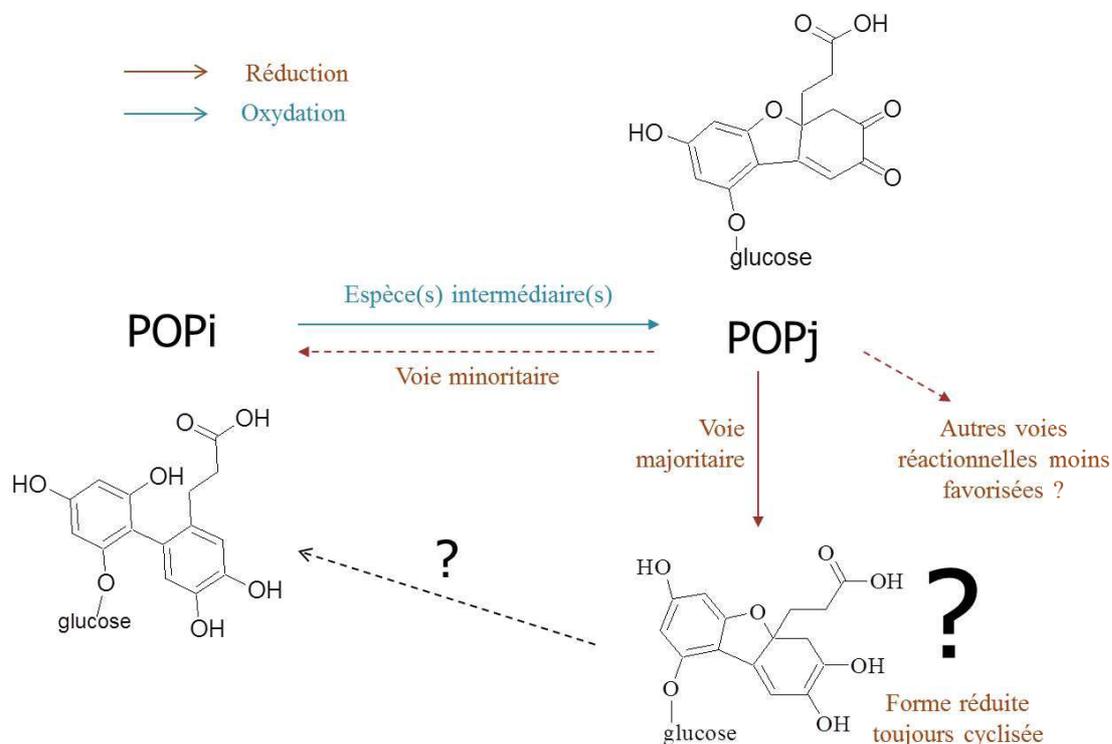


Figure 107 – Bilan de l'étude des processus rédox par voltammétrie cyclique et spectroélectrochimie UV-Visible.

#### IV. 3. 3. 2. Etude des propriétés rédox de la DTEC\_864 par voltammétrie cyclique

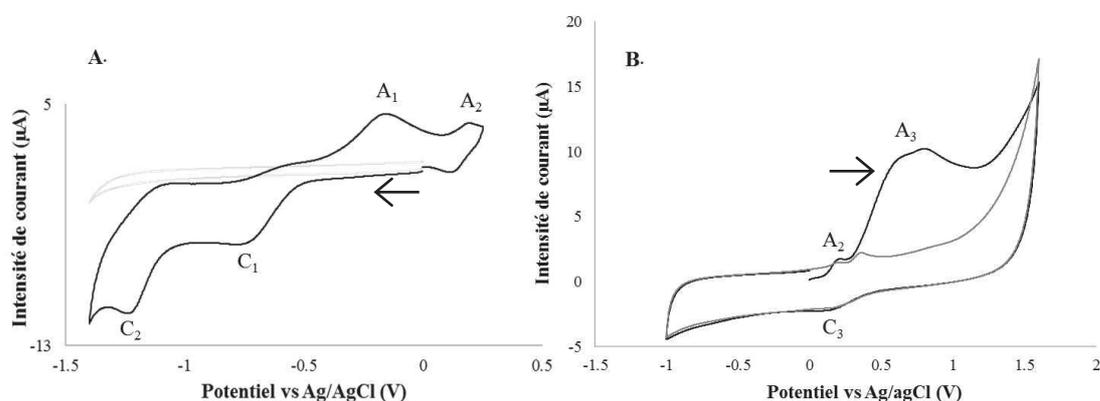


Figure 108 -- Voltammogrammes cycliques de la DTEC\_864 à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à pH 5.

(A) balayage cathodique ;

(B) balayage anodique : le tracé en gris est obtenu au second scan. :

Tracés enregistrés à 0,1V.s<sup>-1</sup> à 20°C.

Electrode de travail de carbone vitreux (Ø2,0 mm), électrode de référence Ag/AgCl, électrode auxiliaire de Platine.

La **Figure 108** présente l'étude en balayage cathodique (A) et anodique (B) de la DTEC\_864, en tampon phosphate à pH 5.

En balayage cathodique, deux pics de réduction  $C_1$  et  $C_2$  sont observés à - 0.98 V et - 1.24 V et un pic d'oxydation  $A_1$  apparaît sur le balayage retour à - 0.16 V (le pic d'oxydation  $A_2$ , visible également sur le balayage anodique, appartient probablement à une impureté dans l'échantillon, ce pic est associé au pic de réduction  $C_3$ ). En balayage anodique, un massif d'oxydation est observé dans la zone  $\{+0.6 - +0.8\}$  V. Celui-ci résulte de l'oxydation des nombreuses fonctions phénoliques présentes dans la structure DTEC\_864. Cette molécule s'adsorbe fortement à l'électrode puisque dès le deuxième scan, l'intensité du courant est proche de celle du courant résiduel. L'adsorption provoque une forte modification de la surface de l'électrode, ce qui complique l'étude des réactions. L'électrode est ici inactivée : cela a déjà été décrit dans la littérature pour les catéchines (Janeiro and Oliveira Brett, 2004). Le même phénomène a été rencontré sur la grille de platine utilisée en spectroélectrochimie UV-visible, ce qui a constitué une difficulté majeure dans l'analyse électrochimique de la DTEC\_864. Il faudrait envisager ici l'utilisation d'électrodes modifiées pour éventuellement limiter ce phénomène et explorer la capacité de ce trimère à basculer vers une forme incolore sous l'influence d'un milieu réducteur, tel qu'observé dans un moût en fermentation.

En définitive, l'environnement physico-chimique dans lequel se trouvent les molécules colorées influence directement leur structure et donc, par extension, l'expression de leur couleur. Ce travail constitue une première exploration par le biais d'approches en solutions réelles (jus fermenté) et modèles. Diverses techniques ont été utilisées dans le but d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux sur les polyphénols responsables de la couleur. D'une part, l'influence d'un procédé technologique particulier, la fermentation, a été évaluée sur les fractions phénoliques colorées complexes de jus. D'autre part, la modulation de la couleur sous l'effet du pH et du potentiel rédox a été caractérisée pour deux pigments modèles jaune-orangé. Les stratégies développées reposent sur plusieurs outils tels que des méthodes d'électrochimie et de calcul théorique. Les différentes questions abordées dans cette partie de l'étude fournissent les premiers éléments de compréhension concernant, à l'échelle du produit fini, les propriétés de composés isolés responsables de la couleur des jus. De premiers éléments concernant les phénomènes de variation de couleur à l'échelle atomique ont également été obtenus. Cependant, des investigations supplémentaires restent à mener puisque les mécanismes sous-jacents expliquant la modulation de couleur n'ont pas tous été identifiés et expliqués.

## V. CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les variétés de pommes à cidre sont particulièrement riches en polyphénols. Au cours de la transformation des fruits, ces composés subissent des réactions d'oxydation initiées par voie enzymatique. Celles-ci sont le plus souvent suivies de réactions chimiques (additions, hydratations, réarrangements intramoléculaires, ...) qui induisent des modifications structurales, or les propriétés des polyphénols (nutritionnelles, organoleptiques, ...) sont étroitement liées à leurs structures. A titre d'exemple, les tannins sont responsables de l'amertume et de l'astringence des produits cidricoles. L'étude présentée dans ce manuscrit s'est focalisée sur une autre propriété fonctionnelle résultant de l'oxydation des polyphénols, à savoir la couleur. Les cidres français traditionnels (hors cidres rosés) sont des produits généralement limpides (valeurs de  $L^*$  comprises entre 80 et 100) se définissant par une palette de colorations jaunes-orangées plutôt restreinte (angles de teinte  $h$  compris entre  $80^\circ$  et  $100^\circ$ ). Les produits se distinguent donc essentiellement par leur intensité colorante, illustrée par la variabilité considérable que peut connaître le paramètre colorimétrique  $C^*$  (valeurs de 8 à 70). Cela pourrait être mis en relation avec des teneurs variables en pigments jaunes-oranges. Ces composés colorés restent, à ce jour, largement inconnus. Des travaux antérieurs ont mis en évidence, par incubation enzymatique en solution modèle, la formation d'un produit jaune issu de l'oxydation de la phloridzine (POPj)(Guyot et al., 2007; Le Guernevé et al., 2004). D'autres études suggèrent l'implication de structures colorées telles que des déhydrodimères de catéchines (Lea, 1984). Aucune de ces structures obtenues en milieu modèle n'avait toutefois été clairement identifiée dans les jus de pommes.

Dans ce contexte, notre étude visait, en premier lieu, à obtenir une caractérisation globale de fractions phénoliques oxydées colorées dérivées de jus de pommes à cidre. Un premier profilage en CLHP-DBD-SM de quatre jus de pomme mono-variétaux a permis de distinguer deux classes distinctes de molécules colorées : des composés tannants illustrés par des massifs mal résolus sur les chromatogrammes à 420 nm et des composés peu tannants donnant des pics chromatographique bien résolus et présentant des polarités différentes. Ces composés se trouvent plus ou moins représentés en fonction des variétés de pommes utilisées.

La faible concentration de molécules colorées a constitué une difficulté majeure pour l'élucidation de leurs structures. En effet, bien que fortement colorantes, elles se retrouvent dans les jus en mélange avec une grande multiplicité de produits d'oxydation incolores néoformés. Leur séparation et leur purification par chromatographie s'est donc révélée particulièrement complexe. La fragmentation en spectrométrie de masse a constitué un outil essentiel pour accéder à des informations structurales. Elle a permis de détecter dans les jus la présence de POPj et d'un analogue structural PXGOPj substitué par un xyloglucoside de phlorétine à la place du glucose. Il a également été possible de formuler une

hypothèse de structure pour un composé coloré de 870 Da peu tannant et faiblement polaire. Les tentatives de purification à l'échelle préparative et semi-préparative n'ont malheureusement pas abouti à une fraction suffisamment pure pour permettre la caractérisation de ce composé en RMN. Le développement d'une approche en solution modèle par incubation enzymatique s'est donc avéré fort utile pour valider la formation de ce composé et confirmer le mécanisme moléculaire hypothétique proposé. Ainsi, à notre connaissance, ces travaux ont mis pour la première fois en évidence la formation d'un pigment hétérodimère EC-XPL/Ox résultant d'un couplage oxydatif entre une (-)-épicatéchine et un xyloglucoside de phlorétine. Ces deux substrats dérivent de classes de polyphénols différentes, initialement identifiées dans la littérature comme précurseurs potentiels de couleur.

Enfin, une seconde approche en solution modèle a permis de synthétiser par voie enzymatique, de purifier et de caractériser en RMN deux structures de déhydrotrimères de (-)-épicatéchine colorés susceptibles de se former dans les jus. Ces composés et les déhydrodimères proposés par (Lea, 1984) ont été recherchés dans les quatre jus de pomme étudiés : ils n'ont pas été détectés directement sous cette forme. Pourtant, leur formation en milieu réel apparaît tout à fait vraisemblable. L'environnement physico-chimique des moûts de pomme (en termes de pH, température, activité PPO, ...) pourrait ne pas spécialement favoriser les réactions aboutissant à leur formation. Ils pourraient également être formés au cours des étapes de transformation des fruits puis être rapidement impliqués dans de nouvelles voies réactionnelles. En particulier, ils pourraient être impliqués dans des réactions de couplage oxydatif avec les procyanidines ce qui irait dans le sens de la formation de tannins colorés. Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence de détection directe des ions moléculaires correspondant par LC-MS dans les jus de pomme.

En définitive, les travaux réalisés dans le premier volet de l'étude ont fourni un **premier aperçu des structures impliquées dans la teinte jaune-orangée** des jus mais cette caractérisation globale n'explique pas totalement la coloration d'un jus. Outre **l'identification de nouvelles molécules colorées** par le biais de techniques et d'approches similaires à celles utilisées dans cette étude (notamment pour les composés peu tannants), il serait particulièrement intéressant d'approfondir **l'étude des produits d'oxydation tannants colorés** mis en évidence par collage protéique. En effet, ils représentent *a priori* une fraction importante de la couleur, contribuant potentiellement à la diminution de l'angle de teinte constatée pour certains produits cidricoles (teinte plus orangée). Cette tâche nécessitera un réel développement méthodologique s'appuyant peut-être sur des stratégies de collage protéique/désorption accompagnées d'une éventuelle dépolymérisation par voie chimique pour mettre en évidence, sinon des structures complètes de tannins colorés, au moins des marqueurs colorés de l'oxydation. En parallèle, des approches alternatives en solution modèle pourraient permettre de vérifier l'hypothèse proposée d'addition et/ou couplage de tannins condensés avec des structures

colorées du type déhydro(oligo)épicatechin qui constitueraient finalement les chromophores retrouvées au sein de ces molécules tannantes.

La deuxième partie de cette étude visait à explorer l'impact de la variation de certains paramètres physico-chimiques du milieu sur l'expression de la couleur des pigments jaunes-orangés des jus de pomme.

Dans un premier temps, cet impact a été étudié sur des fractions phénoliques oxydées globales : les quatre jus de pomme produits pour la première partie de ces travaux ont été mis en fermentation et l'évolution des paramètres colorimétriques décrivant leur couleur a été suivie. Cette étape du procédé de technologie cidricole entraîne clairement une perte de coloration, le critère C\* (Chroma) étant le paramètre le plus affecté. Ceci traduit une baisse de l'intensité colorante des produits, suggérant une diminution de la concentration en pigments. Le phénomène est plus marqué pour les jus les plus colorés (*Dous Moen, Marie Ménard*) qui présentent davantage de composés tannants absorbant à 420 nm. Dans le modèle vin, des phénomènes d'adsorption de polyphénols, et notamment de tannins condensés, sur des lies de levures ont été décrits (Mazauric and Salmon, 2005). Ces aspects n'ont pas été abordés de façon approfondie dans le cadre de cette étude mais il est fort probable que ce type d'interactions soit également observé dans le modèle cidre. Au cours des fermentations, les culots de levures ont été conservés de façon à pouvoir analyser ultérieurement les éventuels composés colorés adsorbés. La faisabilité de ces analyses dépendra de développements méthodologiques probablement similaires à ceux proposés pour l'analyse des molécules tannantes colorées. En parallèle, des approches en solution modèle, mettant en présence la fraction phénolique oxydée de *Dous Moen* avec des levures mortes, devraient permettre d'évaluer le niveau de perte de couleur lié à ces phénomènes.

Par ailleurs, il convient de noter que le jus de *Guillevic* par exemple, qui se caractérise par une absence de catéchines et de tannins colorés, subit également une perte de couleur au cours de la fermentation. L'analyse de ses profils chromatographiques montrent la disparition des composés colorés peu tannants présents initialement dans les jus de pomme. La composition du milieu évolue avec le processus fermentaire, le pH diminue et le métabolisme des levures place le milieu dans des conditions plus réductrices. Cela peut de fait impacter la structure électronique des molécules présentes en solution. Les techniques de voltammétrie cyclique et de spectro-électrochimie UV-visible associée à des analyses en CLHP-SM se sont révélées tout à fait pertinentes pour étudier l'influence d'un potentiel réducteur sur l'expression de la couleur de molécules isolées. Pour ce travail, une dihydrochalcone oxydée, le POPj, et un flavanol, la déhydrotriépicatechine de type A (864 Da) ont été sélectionnés comme chromophores modèles des jus de pomme. Ce dernier composé n'a pas été clairement identifié dans les jus, il a malgré tout été considéré dans cette étude car il est susceptible de se former. De plus, ces deux molécules modèles présentent l'avantage d'être facilement synthétisables et purifiables en solution modèle. Il était donc possible d'en disposer en quantité suffisante pour ce volet de l'étude.

Les méthodes électrochimiques ont ici permis de s'affranchir des effets de collage éventuels sur les levures mentionnés précédemment. L'étude a montré qu'une simple variation du potentiel rédox était susceptible de faire évoluer le POPj coloré vers une espèce majoritaire réduite incolore qui ne correspond pas au POPi. En revanche, l'outil électrochimique a présenté un intérêt limité dans l'étude de la réduction de la déhydrotriépicatéchine, en raison d'une forte adsorption du composé à l'électrode. Afin d'évaluer l'impact de la réduction sur la couleur de ce type de composé et plus généralement sur un extrait phénolique oxydé global de jus de pomme, il faudra envisager d'utiliser des électrodes dont les modifications de surface limitent les phénomènes d'adsorption. Par ailleurs, en complément de ces approches en milieu modèle, il sera important d'évaluer conjointement l'évolution de paramètres comme le potentiel rédox et le pH au cours d'une fermentation afin d'estimer leurs bornes de variation.

Enfin, la modulation de la couleur des deux pigments modèles par une variation de pH a été étudiée en spectrophotométrie. Les évolutions de leurs spectres UV-visibles montrent les mêmes tendances : un déplacement bathochrome et hyperchrome de la bande d'absorption dans le visible avec l'augmentation du pH. Le trimère de type déhydrodicatéchine A apparaît néanmoins plus stable vis-à-vis du pH que le POPj. La modélisation moléculaire par TD-DFT s'est révélée efficace pour décrire à l'échelle atomique les propriétés spectrales du POPj. L'exploration théorique de l'effet du pH sur le spectre UV-visible de la molécule a apporté des éléments pour expliquer les deux teintes très différentes présentées par ce composé selon le pH de la solution. La capacité colorante de ce type de chromophores pourrait présenter un intérêt en termes de valorisation puisqu'ils peuvent être obtenus facilement par synthèse en milieu modèle.

Soulignons enfin que l'expression de la couleur peut être modulée par d'autres paramètres physico-chimiques que ceux présentés dans ce travail. Il serait intéressant d'étudier en solution modèle ou d'explorer par modélisation moléculaire d'éventuels phénomènes de **copigmentation** inter- et/ou intramoléculaire. Par ailleurs, un excès de fer dans le cidre peut parfois être à l'origine d'un phénomène de casse ferrique à l'ouverture d'une bouteille, cela génère une coloration noire qui altère la qualité du produit. Sans se focaliser forcément sur ce cas extrême, il serait néanmoins intéressant d'étudier les éventuels mécanismes de **complexation métallique** qui pourraient participer, dans une moindre mesure, à l'expression de la couleur des jus de pomme.

Bien que le cidre ne soit pas un produit qui se conserve sur une très longue période, il n'est pas consommé immédiatement après son élaboration et son conditionnement. Au cours du stockage, la couleur peut évoluer sous l'effet de différents facteurs (température, lumière, oxygène...). L'intérêt croissant de la filière pour la mise en avant du critère couleur implique une meilleure maîtrise de la **stabilité des molécules colorées**, notamment pour les cidres rosés ou très pâles, pour lesquels il est essentiel de limiter la formation de molécules brunes altérant la qualité du produit.



## LISTE DES FIGURES

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 – « La dégustation du cidre nouveau procure l'occasion de se réunir pour une veillée en costumes traditionnels » (extrait de l'ouvrage <i>De la pomme au cidre</i> , reproduction d'une ancienne carte postale issue de la collection du Cartopole de Baud). | 12 |
| Figure 2 - Couleur des objets : absorption de la lumière incidente et composante(s) de la lumière réémise (reproduit de (Cayot, 2011))  | 18 |
| Figure 3 - Sensibilité des différents photorécepteurs de la rétine humaine (reproduit de J. Le Rohellec, 2011)  | 19 |
| Figure 4 – Exemples de distribution de puissance spectrale relative pour les illuminants A et D65 développés par la CIE   | 21 |
| Figure 5 – Diagramme de chromaticité x, y de la CIE, CIE Yxy (extrait de (Zollinger, 2003))   | 23 |
| Figure 6 -Les référentiels CIE L*a*b* et CIE L*C*h (extrait de (Zollinger, 2003))   | 25 |
| Figure 7 – Structure du noyau phénolique et exemples de motifs phénoliques  | 27 |
| Figure 8– Structures des deux principaux acides hydroxycinnamiques de la pomme : l'acide 5-O-caféoylquinique et l'acide 4-p-coumaroylquinique   | 28 |
| Figure 9 – Noyau 2-phénylchromane à la base de la structure des flavonoïdes   | 29 |
| Figure 10 – Structure de la (-)-épicatechine et de la (+)-catéchine   | 30 |
| Figure 11 – Structure générale des procyanidines polymères de la pomme  | 32 |
| Figure 12 – Exemple de dimères de Procyanidines de type B <i>versus</i> ProcyanidineS de type A   | 33 |
| Figure 13 – Structure des principales procyanidines oligomères de la pomme  | 34 |
| Figure 14 – Structure des principales dihydrochalcones de la pomme  | 35 |
| Figure 15 - Différentes formes moléculaires de l'idéaine (cyanidine galactoside) en équilibre, en solution acide à moyennement acide (adapté de Limon et al., 2013)   | 36 |
| Figure 16 – Structure des principaux flavonols de la pomme  | 37 |
| Figure 17 –Formation du radical aryloxy suite à l'oxydation du phénol (A) et stabilisation de ce radical par ses formes mésomères (B)   | 38 |
| Figure 18 – Exemple de stabilisation d'une ERO (ici, un radical peroxy) par un phénol   | 38 |
| Figure 19 - Formation des semiquinones et des o-quinones par oxydations monoélectroniques successives (A) ou par dismutation (B)  | 39 |
| Figure 20 – Autoxydation de la catéchine par catalyse métallique (reproduit de Danilewicz, 2003)  | 39 |
| Figure 21 – Réaction de Fenton  | 39 |
| Figure 22 – Formes mésomères du phénol  | 40 |
| Figure 23 – Sites nucléophiles sur les noyaux résorcinol et phloroglucinol et extrapolation sur la molécule de catéchine  | 40 |
| Figure 24 – Formes mésomères d'une o-quinone  | 40 |
| Figure 25 – Equilibres acide-base entre phénols et phénolates   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 26 – Addition nucléophile de type Michael  | 41 |
| Figure 27 – Formation d’une structure de type biaryle par couplage oxydatif issu de l’addition de Michael entre une <i>o</i> -quinone et un noyau phloroglucinol  | 41 |
| Figure 28 – Formation d’une liaison biaryléther par addition radicalaire dans le cas de la synthèse d’une déhydrodicatéchine de type B (d’après Guyot et al., 1996)   | 42 |
| Figure 29 – Illustration du phénomène de copigmentation intermoléculaire (A) entre une anthocyane et un flavonol et intramoléculaire (B) dans le cas d’une anthocyane glycosylée doublement acylée par l’acide <i>p</i> -coumarique.(reproduit de (Trouillas et al., 2016) )  | 43 |
| Figure 30 – Complexation métallique des flavonoïdes (reproduit de Dangles, 2006)  | 44 |
| Figure 31 - Positionnement des cidres français sur le cercle des couleurs du système CIE L*a*b*   | 47 |
| Figure 32 - Distribution des données colorimétriques pour les différents groupes de cidres français (classiques, pâles et rosés)  | 48 |
| Figure 33 - Activités crésolase et catécholase des polyphénoloxydases végétales (Catécholoxydases)  | 51 |
| Figure 34 - Domaines Cu A et Cu B décrivant le site actif de la polyphénoloxydase de pomme (d’après Murata et al., 1995)  | 51 |
| Figure 35 - Mécanisme catalytique par les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase (extrait de (Lerch, 1994))  | 52 |
| Figure 36 – Activité catécholase de la PPO mesurée par polarographie pour plusieurs variétés de pomme à cidre sur 2 années de récolte (Extrait de Rapport scientifique du projet Interrégional CIMAITRI, octobre 2010).   | 53 |
| Figure 37 – Principaux composés phénoliques de la pomme substrats de la PPO de pomme.   | 54 |
| Figure 38– Exemples de produits d’oxydation colorés retrouvés dans les modèles de boissons fermentées de type vin rouge (A, pyranoanthocyanes), thé noir (B, Théaflavine) et rooibos (C)  | 55 |
| Figure 39 – Structure de la déhydrodicatéchine A (Weinges and Mattauch, 1971)   | 57 |
| Figure 40 – Déhydrodicatéchine présentant une structure de type méthylène quinone (Guyot et al., 1996)  | 57 |
| Figure 41 – Oxydation de la procyanidine B2 et réarrangements par voies d’addition intramoléculaires d’après (Poupard et al., 2011)   | 58 |
| Figure 42 – Mécanisme de formation du colorant POPj par oxydation enzymatique à partir de la phloridzine d’après (Le Guernevé et al., 2004)   | 59 |
| Figure 43 – Principe de l’hydropresse (de Bauduin, 2006)  | 62 |
| Figure 44 - Photographie de la presse à paquets utilisée pour produire les jus de <i>Dous Moen</i> en grand volume  | 63 |
| Figure 45 – Photographie des différents jus oxydés chargés sur les cartouches de silice greffée en C18 pour l’extraction des polyphénols (De gauche à droite : jus de <i>Dous Moen</i> produit en grand volume, jus de <i>Dous Moen</i> produit en petit volume, jus de <i>Marie Ménard</i> , jus de <i>Guillevic</i> et jus de <i>Petit Jaune</i> .) | 64 |

|   |    |
|---|----|
| Figure 46 – Fractionnement à l'échelle préparative des polyphénols du jus oxydé de <i>Dous Moen</i> sur résine Amberlite™ FPX66 pour la production de la fraction DMOX (A : dépôt du jus, B : rinçage à l'eau acidifiée, C & D: début et fin d'élution de la fraction phénolique par l'alcool à 96°, E : Fraction de polyphénols récupérée) | 66 |
| Figure 47 – Mécanisme réactionnel hypothétique expliquant la dépolymérisation des procyanidines en milieu organique acide (Kennedy and Jones 2001) ; NuH : composé nucléophile en excès dans le milieu réactionnel, par exemple ici le phloroglucinol   | 69 |
| Figure 48 - Schéma du principe de Chromatographie de Partage Centrifuge (illustration provenant du site du fournisseur Kromaton)  | 71 |
| Figure 49 - Schéma explicatif pour le calcul du coefficient de partage (illustration provenant du site internet du fournisseur Kromaton)  | 72 |
| Figure 50 – Photographie des jus obtenus pour les quatre variétés de pomme à cidre utilisées (DM : <i>Dous Moen</i> , MM : <i>Marie Ménard</i> , PJ : <i>Petit Jaune</i> , GU : <i>Guillevic</i> ) ; A, favorisation de l'oxydation ; B, protection contre l'oxydation au cours du procédé de transformation.                               | 77 |
| Figure 51 – Chrommatogrammes à 420 nm des extraits polyphénoliques obtenus à partir des moûts oxydés des variétés <i>Guillevic</i> (A), <i>Dous Moen</i> (B), <i>Petit Jaune</i> (C) et <i>Marie Ménard</i> (D).  | 80 |
| Figure 52 - Chromatogramme à 420 nm de l'extrait phénolique issu du jus de <i>Dous Moen</i> oxydé (trait plein) et du surnageant obtenu après collage à la gélatine de ce même extrait (pointillés)   | 83 |
| Figure 53 – Teneurs en composés phénoliques natifs dans les jus non oxydés (barres blanches) et oxydés (barres noires) obtenus à partir des quatre variétés de pommes à cidre. Le chiffre en % correspond à la différence relative entre les deux modalités d'oxydation.  | 85 |
| Figure 54 – Structure et schéma de fragmentation proposé pour le PXGOP <sub>j</sub> (MS <sup>2</sup> )  | 90 |
| Figure 55 – Mécanisme de formation de la molécule PXGOP <sub>j</sub> (adapté de Le Guernevé et al., 2004)   | 91 |
| Figure 56 – Comparaison des spectres UV-visible des molécules POP <sub>j</sub> (pointillés) et PXGOP <sub>j</sub> (trait plein)   | 91 |
| Figure 57 – Chromatogramme à 420 nm (A) et à 280 nm (B) d'un extrait de polyphénols de jus oxydé de la variété <i>Dous Moen</i> – Focalisation sur le produit (6).  | 92 |
| Figure 58 – Chromatogramme à 420 nm (A) et à 280 nm (B) de la fraction 11 collectée en CPC et enrichie en produit (6)   | 93 |
| Figure 59 – Analyse chromatographique du produit (6) à l'issue de la purification par CLHP à l'échelle semi-préparative   | 94 |
| Figure 60 – Chromatogramme « Pic de base » en « Full MS » (A) et chromatogramme d'ion extrait à m/z 869 (B) de la fraction purifiée du produit (6)  | 94 |
| Figure 61 – Spectre UV-Visible (A) et Spectre de Masse « Full MS » (B) du produit (6)   | 94 |
| Figure 62 – Hypothèse structurale et schéma de fragmentation en SM <sup>2</sup> et SM <sup>3</sup> du produit (6) (la partie chromophore de la molécule est surlignée en jaune)   | 96 |
| Figure 63 – Mécanisme hypothétique de formation du produit 6 (XPL-EC/Ox)  | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 64 - Chromatogrammes à 280 nm de l'extrait phénolique issu du jus de <i>Dous Moen</i> protégé de l'oxydation (A) et de la fraction obtenue après purification à l'échelle semi-préparative du xyloglucoside de phlorétine (B)                           | 98  |
| Figure 65 - Chromatogrammes à 420 nm montrant les produits d'oxydation colorés obtenus après (A) 10 min et (B) 4 h d'incubation de XPL et EC en présence de PPO de pomme   | 99  |
| Figure 66 – Suivi de la cinétique de disparition des substrats (A) et de formation des produits colorés (B1 et B2) au cours de l'incubation enzymatique en présence de PPO de pomme.   | 100 |
| Figure 67 - Chromatogrammes d'ions extraits (A) à $m/z = 583$ pour le 3-hydroxy-xyloglucoside de phlorétine et (B) à $m/z = 599$ pour le produit d'oxydation incolore du xyloglucoside de phlorétine (PXGOP <sub>1</sub> ), à différents temps d'incubation    | 104 |
| Figure 68 - Profils chromatographiques à 280 nm (A) et à 420 nm (B) des produits d'oxydation obtenus après incubation de l'épicatéchine à pH 5,6 en présence de PPO de pomme   | 106 |
| Figure 69 – Spectre UV-visible de la (-)-épicatéchine obtenu dans les conditions d'analyse en CLHP-DBD du milieu d'incubation enzymatique  | 108 |
| Figure 70 – Spectres UV-visible des dimères D-576-1 et D-576-2 et des deux trimères T-862 et T-864 obtenus dans les conditions d'analyse chromatographique du milieu d'incubation enzymatique de la (-)-épicatéchine en présence d'un extrait de PPO de pomme. | 109 |
| Figure 71 – Chromatogrammes CLHP à 280 nm (A1, B1) et à 420 nm (A2, B2) des fractions purifiées contenant les deux trimères T-864 (A) et T-862 (B)   | 111 |
| Figure 72 - Structure proposée pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 864 Da.   | 112 |
| Figure 73 - Structure proposée pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 862 Da.   | 115 |
| Figure 74 – Chromatogramme à 420 nm de la fraction purifiée obtenue pour la déhydrotri(épi)catéchine de type A de 862 Da   | 118 |
| Figure 75 – Mécanisme de formation des dehydrotriépicatéchines de type A, priorité au réarrangement intramoléculaire après la dimérisation   | 119 |
| Figure 76 – Mécanisme de formation des dehydrotriépicatéchines de type A, priorité à l'addition intermoléculaire après la dimérisation   | 122 |
| Figure 77 – Evolution des paramètres colorimétriques C* (Chroma) et h (angle de teinte) au cours de la fermentation des quatre jus de pomme oxydés   | 126 |
| Figure 78 - Photographie illustrant l'évolution de la couleur des jus de pomme avant (1) et après (2) 3 mois de fermentation.  | 127 |
| Figure 79 – Profils chromatographiques à 420 nm des extraits polyphénoliques issus des jus de pomme avant fermentation (tracé noir) et après 3 mois de fermentation (tracé rouge).   | 128 |
| Figure 80 - Purification sur résine amberlite Amberlite™ FPX66 de la fraction colorée résultant de l'oxydation enzymatique de la phloridzine ( <i>Photo T. Dugé de Bernonville</i> (Dugé de Bernonville et al., 2011))   | 133 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 81 - Photographie illustrant l'évolution de la couleur d'une solution de (A) POPj à 50 $\mu$ M et (B) DTEC_864 à 50 $\mu$ M en fonction du pH.   | 139 |
| Figure 82 - Evolution du spectre UV-visible de la solution de POPj à 50 $\mu$ M en fonction du pH.  | 141 |
| Figure 83 - Evolution du spectre UV-visible de la solution de DTEC_864 à 50 $\mu$ M en fonction du pH.  | 141 |
| Figure 84 - Structure du POPj (d'après le Guernevé et al., 2004) et de ses différentes formes céto-enolique et déprotonnées.  | 142 |
| Figure 85 – Superposition des spectres expérimentaux et théoriques obtenus pour différents états de protonation du POPj.  | 196 |
| Figure 86 – Schéma des énergies associées aux orbitales moléculaires impliquées dans les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ pour les formes neutre et déprotonnées du POPj.  | 148 |
| Figure 87 : Photographie d'une cellule électrochimique à trois électrodes   | 203 |
| Figure 88 – Représentation du transfert électronique hétérogène à l'électrode   | 153 |
| Figure 89: Balayage de potentiels appliqué à l'électrode de travail en voltammétrie cyclique (par rapport à l'électrode de référence).  | 154 |
| Figure 90 : Réponse du courant au saut de potentiel en fonction du temps.   | 208 |
| Figure 91 – Photographie des électrodes.  | 211 |
| Figure 92 : Schéma du montage expérimental pour mettre en œuvre le couplage Electrochimie/Spectroscopie UV-Visible  | 211 |
| Figure 93: Photographies de l'appareillage et de la cellule de spectroélectrochimie.  | 212 |
| Figure 94 - Voltamogrammes cycliques du POPj à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à différents pH :  | 214 |
| Figure 95 - Equilibres acido-basiques et oxydo-réducteurs théoriques pour le couple <i>o</i> -quinone/ <i>o</i> -diphénol (reproduit de Fulcrand 1994).   | 162 |
| Figure 96 - Voltamogrammes cycliques du POPi et du POPj à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à pH 3. Tracés obtenus à 20°C.  | 217 |
| Figure 97 - Spectres UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM en tampon phosphate à pH=3,7 enregistrés à différentes valeurs de potentiel simultanément au cours du tracé $I=f(E)$ à 0,005 $V \cdot s^{-1}$ (électrode de travail : grille de platine). | 219 |
| Figure 98- Chronoampérogramme $I = f(t)$ enregistré pendant l'électrolyse du POPj à 0,5 mM, réalisée pendant 2 heures à un potentiel fixe de -0,3 V (seules les 6 premières minutes sont présentées sur cette figure).                                    | 219 |
| Figure 99 – Evolution du spectre UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM au cours de l'électrolyse en tampon phosphate à pH 3,7. Tracé noir : spectre initial au temps $t = 0$ min ; tracé rouge : $t = 2$ h.  | 166 |

- Figure 100 – Profils chromatographiques obtenus à (A) 280 nm et (B) 420 nm pour la solution de POPj à 0,5 mM : tracé rouge, avant électrolyse ; tracé noir, après réduction à l'électrode (2h à -0,3V, électrode de travail : grille de platine). 167
- Figure 101 – Hypothèse de structure pour le composé B formé par réduction du POPj (A) à l'électrode et présentant la même masse que le POPi (C). 168
- Figure 102 - Courbe  $I = f(E)$  pour le POPi à 0,5 mM, enregistrée à  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$  en tampon phosphate 0,1 M à pH=3,7. 223
- Figure 103 - Spectres UV-Visible de la solution de POPi à 0,5 mM en tampon phosphate à pH=3,7 enregistrés à différentes valeurs de potentiel imposées à l'électrode de travail (grille de platine) au cours du tracé  $I = f(E)$  à  $0,005 \text{ V.s}^{-1}$ . 169
- Figure 104 - Chronoampérogramme  $I = f(t)$  enregistré pendant l'électrolyse du POPi à 0,5 mM, réalisée pendant 30 min à un potentiel fixe de + 1,2 V (seule la première minute est présentée sur cette figure). 225
- Figure 105 - Evolution du spectre UV-Visible de la solution de POPj à 0,5 mM au cours de l'électrolyse en tampon phosphate à pH 3,7. Tracé noir : spectre initial au temps  $t = 0 \text{ min}$  ; tracé rouge :  $t = 2 \text{ h}$ . 225
- Figure 106 - Profils chromatographiques obtenus à (A) 280 nm et (B) 420 nm pour la solution de POPi à 0,5 mM : tracé rouge, avant électrolyse ; tracé noir, après oxydation à l'électrode (30 min à +1,2V, électrode de travail : grille de platine). 227
- Figure 107 – Bilan de l'étude des processus rédox par voltammétrie cyclique et spectroélectrochimie UV-Visible. 228
- Figure 108 -- Voltamogrammes cycliques de la DTEC\_864 à 1,8 mM en tampon phosphate 0,1 M, enregistrés à pH 5. 228
- Figure 109 - Diagramme Potentiel-pH de l'acide caféique (reproduit de Hotta et al., 2002 ) 253

## LISTE DES TABLEAUX

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1 - Classification française des pommes à cidre (Tavernier et Jacquin, 1959) .....   | 12  |
| Tableau 2 - Paramètres colorimétriques CIE L*, a*, b*, C* et h correspondant aux différents jus de pomme produits en absence et en présence d'oxygène .....  | 78  |
| Tableau 3 - Absorbance maximale dans la région visible (400-700 nm) des composés jaunes donnant des pics bien résolus sur les chromatogrammes à 420 nm .....   | 81  |
| Tableau 4 - Profils en polyphénols natifs des différents jus de pomme à cidre étudiés .....  | 86  |
| Tableau 5 - Paramètres qualitatifs de caractérisation du profil polyphénolique des moûts .....   | 87  |
| Tableau 6 - Caractéristiques en CLHP-UV-visible-SM du pic n° 1 correspondant à la molécule PXGOPj .....  | 89  |
| Tableau 7 - Teneurs des deux dihydrochalcones (en µM) dans les jus faiblement oxydés .....   | 91  |
| Tableau 8 - Principaux ions fils en SM <sup>2</sup> de l'ion moléculaire du produit (6), [M-H]- à m/z 869 .....  | 95  |
| Tableau 9 - Principaux ions « petit-fils » en SM <sup>3</sup> de l'ion 869→575 .....   | 95  |
| Tableau 10 - Attributions <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de la déhydrotri(épi)catéchine de type A de masse molaire 864 Da .....   | 113 |
| Tableau 11 - Attributions <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C de la déhydrotri(épi)catéchine de type A de masse molaire 862 Da .....   | 116 |
| Tableau 12 - Ecart de couleur ΔE et évolution des paramètres colorimétriques après 3 mois de fermentation .....  | 126 |
| Tableau 13 - Evolution des paramètres colorimétriques du POPj et de la DTEC_864 en fonction du pH .....  | 138 |
| Tableau 14 - Energies relatives calculées par analyse de fréquence au niveau de théorie B3P86/6-31g(d,p) pour le conformère le plus stable du POPj .....   | 143 |
| Tableau 15 - Propriétés optiques (Energies verticales de transition, λ <sub>MAX</sub> , force d'oscillateur, transitions électroniques) calculées au niveau de théorie B3P86/6-31g(d,p) pour le conformère neutre du POPj et les deux formes déprotonées. .... | 197 |

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akin, H. (2008). Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique. de Toulouse.
- Amiot, M.J., Aubert, S., Nicolas, J., Goupy, P., and Aparicio, P. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple and pear cultivars at maturity. *Cr Jiep 9R Lisb. 16*, 48–51.
- Anouar, E.H., Gierschner, J., Duroux, J.-L., and Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chem. 131*, 79–89.
- Bailey, S.I., and Ritchie, I.M. (1985). A cyclic voltammetric study of the aqueous electrochemistry of some quinones. *Electrochimica Acta 30*, 3–12.
- Bailey, S.I., Ritchie, I.M., and Hewgill, F.R. (1983). The construction and use of potential–pH diagrams in organic oxidation–reduction reactions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 645–652.
- Baron, A., Le Quéré, J.M., Gilles, Y., Pages, J., Guichard, H., Prost, C., and Coarer, M. (2011). Maitrise des Procédés Cidricoles, Rapport Interne du programme Interrégional CIMAITRI 2006-2010, Bretagne, Basse-Normandie & Pays de la Loire (Le Rheu: INRA).
- Bate-Smith, and Swain (1962). Flavonoid compounds. In *Comparative Biochemistry. III*, F. M., and M.H. S., eds. (New York: Academic Press.), pp. 75–809.
- BEDIOUI, F. (1999). Voltampérométrie. Théorie et mise en œuvre expérimentale. *Tech. Ing. Anal. Caractér. 3*, P2126–1.
- Beveridge, T. (1997). Haze and cloud in apple juices. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37*, 75–91.
- Brat, P., George, S., Bellamy, A., Du Chaffaut, L., Scalbert, A., Mennen, L., Arnault, N., and Amiot, M.J. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J. Nutr. 136*, 2368–2373.
- Bussy, U., and Boujtita, M. (2015). Review of advances in coupling electrochemistry and liquid state NMR. *Talanta 136*, 155–160.
- Callemien, D., and Collin, S. (2007). Involvement of Flavonoids in Beer Color Instability during Storage. *J. Agric. Food Chem. 55*, 9066–9073.
- Cayot, P. (2011). Pigments et colorants, naturels et artificiels. In *La Couleur Des Aliments, de La Théorie à La Pratique*, Lavoisier, ed. p. 13.
- Christie, R.M. (2001). *Colour chemistry* (Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry).
- Clifford, M.N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric. 79*, 362–372.
- Clydesdale, F.M. (1991). Color Perception and Food Quality1. *J. Food Qual. 14*, 61–74.
- Clydesdale, F.M. (1993). Color as a factor in food choice. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 33*, 83–101.
- Dangles, O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols. In *Les Polyphénols En Agroalimentaire*, P. Sarni-Manchado, and V. Cheynier, eds. (Paris: Lavoisier), pp. 29–54.
- Darchen, A. (2011). Potentiels standards d'oxydoréduction Déterminations et applications.

- Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Chèze, C., and Vercauteren, J. (2002). Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* *964*, 123–128.
- Di Meo, F., Sancho Garcia, J.C., Dangles, O., and Trouillas, P. (2012). Highlights on Anthocyanin Pigmentation and Copigmentation: A Matter of Flavonoid  $\pi$ -Stacking Complexation To Be Described by DFT-D. *J. Chem. Theory Comput.* *8*, 2034–2043.
- Dugé de Bernonville, Le Quere, J.M., Baron, A., and Guyot, S. (2011). New Optimisation Pathway for the Production of the POP Colorant, Derived from Apple Phloridzin (Quimper, France).
- Ehrenkranz, J.R.L., Lewis, N.G., Ronald Kahn, C., and Roth, J. (2005). Phlorizin: a review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *21*, 31–38.
- Escribano-Bailón, M.T., and Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Curr. Org. Chem.* *16*, 715–723.
- Falguera, V., Gatus, F., Ibarz, A., and Barbosa-Canovas, G.V. (2012). Changes on colour parameters caused by high-pressure processing of apple juice made from six different varieties. *Int. J. Food Sci. Technol.* *47*, 2158–2164.
- Forget-Richard, F. (1992). Recherche sur le brunissement enzymatique. Etudes sur l'oxydation de phenols et sur l'inhibition de la polyphenoloxydase isolée de la pomme (*malus sylvestris*, var. Red delicious). Université de Paris 7.
- Foucault, A.P., and Chevolot, L. (1998). Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J. Chromatogr. A* *808*, 3–22.
- de Freitas, V., and Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* *401*, 1463–1473.
- Fromm, M., Loos, H.M., Bayha, S., Carle, R., and Kammerer, D.R. (2013). Recovery and characterisation of coloured phenolic preparations from apple seeds. *Food Chem.* *136*, 1277–1287.
- Fulcrand H, Cheminat A., Brouillard R., and V., C. (1994). Characterization Of Compounds Obtained By Chemical Oxidation Of Caffeic Acid In Acidic Conditions. *Phytochemistry* *35*, 499–505.
- Gancel, H., and Treignier, J.C. (2007). De la Pomme au cidre (Bancaud H.).
- Gosch, C., Halbwirth, H., and Stich, K. (2010). Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* *71*, 838–843.
- Goupy, P., Amiot, M.J., Richard-Forget, F., Duprat, F., Aubert, S., and Nicolas, J. (1995). Enzymatic browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* *60*, 497–505.
- Gunata, Y.Z., Sapis, J.C., and Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenoloxydases. *Phytochemistry* *26*, 1573–1575.
- Guyot, S., Cheynier, V., Souquet, J.-M., and Moutounet, M. (1995). Influence of pH on the Enzymic Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* *43*, 2458–2462.
- Guyot, S., Vercauteren, J., and Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* *42*, 1279–1288.

- Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., and Drilleau, J.-F. (1998). Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.* *46*, 1698–1705.
- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., and Drilleau, J.F. (2002). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Leb. Wiss Technol* *35*, 289–291.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., and Drilleau, J.-F. (2003). Variability of the Polyphenolic Composition of Cider Apple (*Malus domestica*) Fruits and Juices. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 6240–6247.
- Guyot, S., Serrand, S., Le Quéré, J.M., Sanoner, P., and Renard, C.M.G.C. (2007). Enzymatic synthesis and physicochemical characterisation of phloridzin oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* *8*, 443–450.
- Hapiot, P., Neudeck, A., Pinson, J., Fulcrand, H., Neta, P., and Rolando, C. (1996). Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *J. Electroanal. Chem.* *405*, 169–176.
- He, F., Pan, Q.-H., Shi, Y., Zhang, X.-T., and Duan, C.-Q. (2009). Identification of autoxidation oligomers of flavan-3-ols in model solutions by HPLC-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* *44*, 633–640.
- Heinrich, T., Willenberg, I., and Glomb, M.A. (2012). Chemistry of Color Formation during Rooibos Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* *60*, 5221–5228.
- Hilt, P., Schieber, A., Yildirim, C., Arnold, G., Klaiber, I., Conrad, J., Beifuss, U., and Carle, R. (2003). Detection of Phloridzin in Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* *51*, 2896–2899.
- Hotta, H., Ueda, M., Nagano, S., Tsujino, Y., Koyama, J., and Osakai, T. (2002). Mechanistic Study of the Oxidation of Caffeic Acid by Digital Simulation of Cyclic Voltammograms. *Anal. Biochem.* *303*, 66–72.
- Hu, X.-R., He, J.-B., Wang, Y., Zhu, Y.-W., and Tian, J.-J. (2011). Oxidative spectroelectrochemistry of two representative coumarins. *Electrochimica Acta* *56*, 2919–2925.
- HUTCHINGS, J.B. (1977). THE IMPORTANCE OF VISUAL APPEARANCE OF FOODS TO THE FOOD PROCESSOR AND THE CONSUMER<sup>1</sup>. *J. Food Qual.* *1*, 267–278.
- Imram, N. (1999). The role of visual cues in consumer perception and acceptance of a food product. *Nutr. Food Sci.* *99*, 224–230.
- Janeiro, P., and Oliveira Brett, A.M. (2004). Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Anal. Chim. Acta* *518*, 109–115.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M., and Nicolas, J.J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* *38*, 926–931.
- Kaim, W., and Fiedler, J. (2009). Spectroelectrochemistry: the best of two worlds. *Chem. Soc. Rev.* *38*, 3373.
- Kennedy, J.A., and Jones, G.P. (2001). Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 1740–1746.

Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H., and Goto, T. (1992). STRUCTURAL BASIS OF BLUE-COLOR DEVELOPMENT IN FLOWER PETALS FROM COMMELINA-COMMUNIS. *Nature* 358, 515–518.

Kuehni, R.G. (2015). How many object colors can we distinguish? *Color Res. Appl.* n/a-n/a.

Laviron, E. (1983). ELECTROCHEMICAL REACTIONS WITH PROTONATIONS AT EQUILIBRIUM PART VIII. THE  $2 e, 2 H +$  REACTION (NINE-MEMBER SQUARE SCHEME) FOR A SURFACE OR FOR A HETEROGENEOUS REACTION IN THE ABSENCE OF DISPROPORTIONATION AND DIMERIZATION REACTIONS. *J Electroanal Chem* 146, 15–36.

Le Bourvellec, C., and Renard, C. (2012). Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 213–248.

Le Bourvellec, C., Le Quéré, J.-M., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., and Guyot, S. (2004). Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Procyanidins and Polyphenol Oxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* 52, 122–130.

Le Guernevé, C., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., and Guyot, S. (2004). New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.* 45, 6673–6677.

Le Rohellec, J. (2011). Couleur et neurosciences. In *La Couleur Des Aliments, de La Théorie à La Pratique*, Lavoisier, ed. p. 145.

Lea, A.G.H. (1984). Farb- und gerbstoffe in englischen mostapfeln. *Flüss. Obst* 8, 356–361.

Lea, A.G.H. (1995). Cidermaking. In *Fermented Beverage Production*, A.G.H. Lea, and J.R. Piggott, eds. pp. 66–96.

Lea, A.G., and Arnold, G.M. (1978). The phenolics of ciders : bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* 29, 478–483.

Lea, A.H., and Drilleau, J.-F. (2003). Cidermaking. In *Fermented Beverage Production*, A.H. Lea, and J. Piggott, eds. (Springer US), pp. 59–87.

Lee, S.-M., Lee, K.-T., Lee, S.-H., and Song, J.-K. (2013). Origin of human colour preference for food. *J. Food Eng.* 119, 508–515.

Lerch, K. (1994). Tyrosinase : molecular and active-site structure. pp. 64–80.

Lieberman, L.S. (2006). Evolutionary and anthropological perspectives on optimal foraging in obesogenic environments. *Appetite* 47, 3–9.

Lopez-Serrano, M., and Barcelo, A.R. (2002). Comparative study of the products of the peroxidase-catalyzed and the polyphenoloxidase-catalyzed (+)-catechin oxidation. Their possible implications in strawberry (*Fragaria x ananassa*) browning reactions. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1218–1224.

Lopez-Toledano, A., Villaño-Valencia, D., Mayen, M., Merida, J., and Medina, M. (2004). Interaction of Yeasts with the Products Resulting from the Condensation Reaction between (+)-Catechin and Acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2376–2381.

Lozano, J.E. Kinetics of non enzymatic browning in model systems simulating clarified apple juice. *Lebensm. - Wiss. Technol.* 24, 355–360.

- Lu, Y., Ma, W., Hu, R., Berthod, A., and Pan, Y. (2009). Rapid and preparative separation of traditional Chinese medicine *Evodia rutaecarpa* employing elution-extrusion and back-extrusion counter-current chromatography: Comparative study. *J. Chromatogr. A* *1216*, 4140–4146.
- Lund, H., and Baizer, M. (1991). Organic Electrochemistry, An Introduction and a Guide, Third edition. In *Organic Electrochemistry, An Introduction and a Guide, Third Edition*, (Dekker, M.), p. 484.
- Malec, M., Le Quere, J.M., Sotin, H., Kolodziejczyk, K., Bauduin, R., and Guyot, S. (2014). Polyphenol Profiling of a Red-Fleshed Apple Cultivar and Evaluation of the Color Extractability and Stability in the Juice. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 6944–6954.
- Mazauric, J.-P., and Salmon, J.-M. (2005). Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J. Agric. Food Chem.* *53*, 5647–5653.
- McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* *49*, 183–186.
- Mekoue Nguela, J., Sieczkowski, N., Roi, S., and Vernhet, A. (2015). Sorption of Grape Proanthocyanidins and Wine Polyphenols by Yeasts, Inactivated Yeasts, and Yeast Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.* *63*, 660–670.
- Millot, M., Di Meo, F., Tomasi, S., Boustie, J., and Trouillas, P. (2012). Photoprotective capacities of lichen metabolites: A joint theoretical and experimental study. *J. Photochem. Photobiol. B* *111*, 17–26.
- Morata, A., Loira, I., Heras, J.M., Callejo, M.J., Tesfaye, W., González, C., and Suárez-Lepe, J.A. (2016). Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chem.* *197*, 686–691.
- Murata, M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S., and Kaneko, K. (1995). Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* *43*, 1115–1121.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., and Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *34*, 109–157.
- Oka, F., Oka, H., and Ito, Y. (1991). Systematic search for suitable two-phase solvent systems for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* *538*, 99–108.
- Oleszek, W., Lee, C.Y., and Price, K.R. (1989). Apple phenolics and their contribution to enzymatic browning reactions. *Acta Soc. Bot. Pol.* *58*, 273–283.
- Oszmianski, J., and Lee, C.Y. (1990). Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *J. Agric. Food Chem.* *38*, 1202–1204.
- Oszmianski, J., and Lee, C.Y. (1991). Enzymatic oxidation of phloretin glucoside in model system. *J. Agric. Food Chem.* *39*, 1050–1052.
- Oszmianski, J., Wolniak, M., Wojdylo, A., and Wawer, I. (2007). Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *J. Sci. Food Agric.* *87*, 573–579.
- Pathare, P.B., Opara, U.L., and Al-Said, F.A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* *6*, 36–60.

- Petrucci, R., Astolfi, P., Greci, L., Firuzi, O., Saso, L., and Marrosu, G. (2007). A spectroelectrochemical and chemical study on oxidation of hydroxycinnamic acids in aprotic medium. *Electrochimica Acta* 52, 2461–2470.
- Pina, F., Melo, M.J., Laia, C.A.T., Parola, A.J., and Lima, J.C. (2012). Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chem. Soc. Rev.* 41, 869.
- Poupard, P., Guyot, S., Bernillon, S., and Renard, C.M.G.C. (2008). Characterisation by liquid chromatography coupled to electrospray ionisation ion trap mass spectrometry of phloroglucinol and 4-methylcatechol oxidation products to study the reactivity of epicatechin in an apple juice model system. *J. Chromatogr. A* 1179, 168–181.
- Poupard, P., Sanoner, P., Baron, A., Renard, C.M.G.C., and Guyot, S. (2011). Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry: LC-ESI-MS/MS of procyanidin B2 oxidation products. *J. Mass Spectrom.* 46, 1186–1197.
- Ramešová, Š., Sokolová, R., Tarábek, J., and Degano, I. (2013). The oxidation of luteolin, the natural flavonoid dye. *Electrochimica Acta* 110, 646–654.
- Reijenga, van Hoof, A., van Loon, A., and Reijenga (2013). Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal. Chem. Insights* 53.
- Rocha, A.M., and Morais, A.M. (2001). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from “Jonagored” apple. *Food Control* 12, 85–90.
- Rustioni, L., Di Meo, F., Guillaume, M., Failla, O., and Trouillas, P. (2013). Tuning color variation in grape anthocyanins at the molecular scale. *Food Chem.* 141, 4349–4357.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., and Drilleau, J.F. (1999). Polyphenol Profiles of French Cider Apple Varieties ( *Malus domestica* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 47, 4847–4853.
- Shankar, M.U., Levitan, C.A., and Spence, C. (2010). Grape expectations: The role of cognitive influences in color–flavor interactions. *Conscious. Cogn.* 19, 380–390.
- Sokolová, R., Degano, I., Ramešová, Š., Bulíčková, J., Hromadová, M., Gál, M., Fiedler, J., and Valášek, M. (2011). The oxidation mechanism of the antioxidant quercetin in nonaqueous media. *Electrochimica Acta* 56, 7421–7427.
- Spence, C., Levitan, C., Shankar, M.U., and Zampini, M. (2010). Does food color influence taste and flavor perception in humans? *Chemosens. Percept.* 3, 68–84.
- Sun, W., and Miller, J.M. (2003). Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodiccatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (?)-epicatechin. *J. Mass Spectrom.* 38, 438–446.
- Symoneaux, R., Chollet, S., Patron, C., Bauduin, R., Le Quere, J.M., and Baron, A. (2015). Prediction of sensory characteristics of cider according to their biochemical composition: Use of a central composite design and external validation by cider professionals. *Lwt-Food Sci. Technol.* 61, 63–69.
- Tanaka, T., Matsuo, Y., and Kouno, I. (2010). Chemistry of Secondary Polyphenols Produced during Processing of Tea and Selected Foods. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 14–40.
- Tavernier, J., and Jacquin, P. (1959). *Etude technologique de variétés de pommes à cidre.* (Paris).

Tomas-Barberén, F.A., and Clifford, M.N. (2000). Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* *80*, 1073–1080.

Trejo-Gonzalez, A., and Soto-Valdez, H. (1991). Partial characterization of polyphenoloxidase extracted from “Anna” apple. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* *116*, 672–675.

Trouillas, P., Di Meo, F., Gierschner, J., Linares, M., Sancho-García, J.C., and Otyepka, M. (2015). Optical properties of wine pigments: theoretical guidelines with new methodological perspectives. *Tetrahedron* *71*, 3079–3088.

Trouillas, P., Sancho-García, J.C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., and Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* *116*, 4937–4982.

Uchida, K., Ogawa, K., and Yanase, E. (2016). Structure Determination of Novel Oxidation Products from Epicatechin: Thearubigin-Like Molecules. *Molecules* *21*, 273.

Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., and Waters, E.J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* *83*, 564–573.

Weinges, K., and Huthwelker, D. (1970). Oxidative kupplung von phenolen. III, 1. Isolierung und konstitutionsbeweis eines 8.6'-verknüpften dehydro-dicatechins (B4). *Liebigs Ann Chem* *731*, 161–170.

Weinges, K., and Mattauch, H. (1971). Der chemische konstitutionsbeweis des dehydro-dicatechins A. *Chem Zeit* *95*, 155–156.

Weinges, K., Mattauch, H., Wilkins, C., and Frost, D. (1972). Oxydative Kupplung von Phenolen, V. Spektroskopische und chemische Konstitutionsaufklärung des Dehydro-dicatechins A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* *754*, 124–136.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., and Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 6520–6530.

Young, D.A., Young, E., Roux, D.G., Brandt, E.V., and Ferreira, D. (1987). Synthesis of condensed tannins. Part 19. Phenol oxidative coupling of (+)-catechin and (+)-mesquitol. Conformation of bis-(+)-catechins. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]* 2345–2351.

Zhang, B., Huang, W., Li, J., Zhao, C., Fan, S., Wu, J., and Liu, C. (2014). Principles, developments and applications of computer vision for external quality inspection of fruits and vegetables: A review. *Food Res. Int.* *62*, 326–343.

Zollinger, H. (2003). *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments.*

(2004). *Pomme-Poire, De la récolte au conditionnement: Outils pratiques* (Paris: CTIFL).

EP1685120B1 (brevet POP).pdf.

## ANNEXE 1

### Relation de Nernst

Pour un système rédox rapide (**Equation 7**), la relation de Nernst est donnée par les expressions 2 et 3 (**Darchen, 2011**). Elle représente le potentiel pris par une électrode en équilibre avec les espèces du couple rédox. Elle fait apparaître le potentiel standard du système rédox considéré  $E^{\circ}$  (exprimé en volt) qui est établi dans les conditions standards, c'est-à-dire à  $\text{pH} = 0$  et avec  $a_{\text{ox}} = a_{\text{red}} = 1$ . Par convention, c'est l'électrode standard à hydrogène ESH qui est utilisée comme électrode de référence (la valeur de  $E^{\circ}_{\text{H}^+/\text{H}_2}$  est fixée égale à zéro par convention).



$n$  nombre d'électron(s) impliqué(s) dans le système électrochimique

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \quad \text{Eq. (8)}$$

$$E = E^{\circ} + \frac{0.059}{n} \log \frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}} \quad \text{Eq. (9)}$$

Expression à 25 °C (298 °K),  $\ln = 2,303 \times \log_{10}$

**C** concentration dans la solution ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ )

**F** constante de Faraday ( $F = 96484 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

**R** constante des gaz parfaits ( $R = 8.31 \text{ J}\cdot\text{K}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

**T** température (K)

La détermination des potentiels intervient rarement dans les conditions standards. La relation de Nernst écrite sous la forme de l'**équation 10** fait apparaître le potentiel standard apparent ou formel  $E^{\circ}$ , potentiel d'équilibre lorsque les concentrations des deux espèces sont égales. Intrinsèquement, cette valeur de  $E^{\circ}$  tient compte de la force ionique, du pH, des phénomènes de complexation et de précipitation éventuels impliquant toutes les espèces figurant dans l'équation de Nernst. Si l'on considère une demi-équation rédox (**Equation 11**) faisant intervenir  $n$  électrons et  $p$  protons pour la réduction de l'oxydant, la relation de Nernst peut s'écrire sous la forme présentée en Equation X si on assimile activité à concentration et que l'on considère que l'eau est dans son état standard ( $a_{\text{H}_2\text{O}} = 1$ ). Notons que les valeurs des potentiels standards et formels permettent de prévoir les possibilités des réactions d'oxydoréduction permises par la thermodynamique. La cinétique de la réaction doit naturellement être prise en considération.

$$E = E'^0 + \frac{0.059}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{Eq.(10)}$$



$$E = E^0 - \frac{0.059p}{n} pH + \frac{0.059}{n} \log \frac{[Ox]}{[Red]} \quad \text{Eq. (12)}$$

$$E'^0 = E^0 - \frac{0.059p}{n} pH \quad \text{Eq. (13)}$$

Il apparaît que le potentiel de réduction diminue quand le pH augmente, c'est-à-dire que la réduction devient plus difficile. La pente est égale à 0,059 fois le rapport  $p/n$  en V/unité de pH à 25°C. Si le système rédox échange le même nombre de protons et d'électron, la pente sera de 0,059V. L'équation 6 est utilisée pour calculer les potentiels d'équilibre qui sont reportés dans les diagrammes de Pourbaix ou diagrammes potentiel-pH (Pourbaix M, 1963). Ces diagrammes permettent de visualiser les domaines de stabilité des espèces en tenant compte des équilibres acido-basique et des phénomènes de complexation et de précipitation éventuels. En guise d'illustration, la **Figure 109** présente un exemple d'oxydation de l'acide caféique en milieu aqueux (Hotta et al., 2002). Le diagramme potentiel-pH pour le système quinone/hydroquinone a été étudié par Bailey et al., 1983. Il est possible de déterminer des valeurs de pKa par la mesure des potentiels rédox en fonction du pH, mais ce n'est pas la méthode la plus aisée et il existe d'autres protocoles qui sont exposés dans le paragraphe IV. 2. 3. 2.

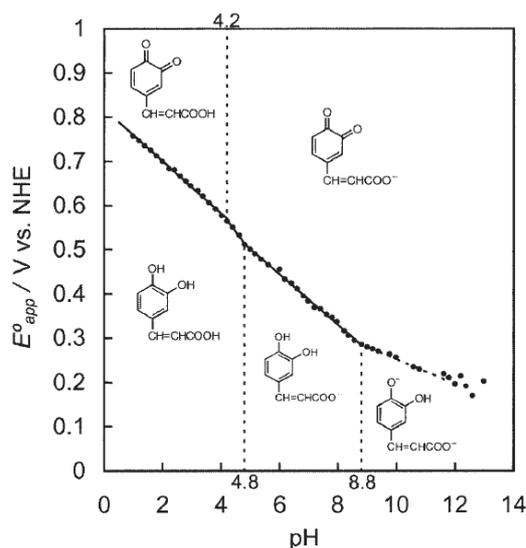


Figure 109 - Diagramme Potentiel-pH de l'acide caféique (reproduit de Hotta et al., 2002 )

Les valeurs de  $E^{\circ}_{app}$  ont été déterminées à partir des voltammogrammes cycliques de l'acide caféique à 1,0 mM enregistrés en milieu aqueux sur électrode de carbone vitreux.

## Résumé

Erell Le Deun –

### **Couleur des jus de pomme et des cidres : analyse structurale et impact de plusieurs paramètres physico-chimiques.**

---

Les composés phénoliques sont impliqués dans les propriétés organoleptiques majeures des aliments dérivant d'une matrice végétale. Ils sont notamment responsables de l'amertume, de l'astringence et de la couleur des produits cidricoles. Le brunissement observé lors de la transformation des fruits est lié à la formation de pigments jaunes-orangés. Il est initié par l'activité d'une enzyme plastidiale, la polyphénol oxydase, qui catalyse l'oxydation des polyphénols en présence d'oxygène. Cela aboutit à la formation de quinones, espèces chimiques très réactives qui sont rapidement impliquées dans des voies réactionnelles ultérieures. Certains produits néoformés sont colorés.

Un profilage des molécules colorées présentes dans quatre jus de pomme monovariétaux aux couleurs contrastées a été réalisé en CLHP-DBD-SM. Il a mis en évidence l'existence de tannins oxydés colorés et de composés jaunes-orangés non tannants. Parmi ces derniers, des produits d'oxydation de la phloridzine, dérivant de la classe des dihydrochalcones, ont été clairement identifiés (POPj, PXGOPj). Des approches couplées en milieu réel et solution modèle ont en outre permis d'identifier une nouvelle structure colorée dérivant d'un couplage oxydatif entre une dihydrochalcone et un flavanol monomère. Enfin, des déhydrotrimères d'épicatéchine ont pu être caractérisés en solution synthétique mais n'ont pas été détectés directement dans les jus.

Par ailleurs, la couleur exprimée par les pigments formés peut subir des modulations en fonction de l'environnement physico-chimique. A titre d'exemple, la fermentation cidricole génère classiquement une décoloration des moûts ; or la composition du milieu fermentaire évolue sous l'influence de différents paramètres tels que le pH ou le potentiel redox. L'impact d'un milieu réducteur sur la couleur du POPj et d'une déhydrotriépicatechine de type A, sélectionnés comme pigments modèles des jus de pomme, a été exploré par voltammétrie cyclique et spectroélectrochimie UV-visible. En outre, les changements de propriétés spectrales du POPj liés à son état de protonation ont été rationalisés par des approches de TD-DFT.

---

**Mots clefs** : jus de pomme, polyphénols, oxydation, brunissement enzymatique, polyphénol oxydase, cidre, fermentation, potentiel redox, pH, chromatographie HPLC, spectrométrie de masse, spectroélectrochimie UV-visible, modélisation moléculaire

## Summary

Erell Le Deun –

### **The color of apple juices and ciders: structural analysis and impact of several physical-chemical parameters.**

---

The phenolic compounds are involved in the main organoleptic properties of plant-derived foods. They are especially responsible for the bitterness, the astringency and the color of apple cider products. The browning observed during fruit processing is related to the formation of yellow-orange pigments. By its catalytic activities, the polyphenol oxidase, a plastidial enzyme, initiates the oxidation of polyphenols in the presence of oxygen. It leads to the formation of quinones, very reactive species which are quickly involved in further chemical reactions. Some of the neoformed products are colored.

Four apple juices, showing contrasted colors, were analyzed by reversed-phase HPLC-DAD-MS in order to obtain their profiles in colored compounds. The presence of yellow-orange oxidized tanning and non-tanning compounds was highlighted. Within the latter compounds, some phloridzin oxidation products, deriving from dihydrochalcones, were clearly identified (POPj, PXGOPj). In parallel, coupled approaches in real media and model solutions led to the identification of a new colored structure deriving from an oxidative coupling between a dihydrochalcone and a flavanol monomer. Finally, catechin trimers were also characterized in synthetic medium but they were not detected directly in apple juices.

Moreover, the color expressed by the yellow-orange pigments can suffer some variations as a function of the physical-chemical environment. For instance, the cider fermentation results generally in a loss of color in apple juices; but the composition of the fermentative medium evolves under the influence of several parameters, such as pH and redox potential. The impact of reducing conditions on the color of POPj and A-type dehydrotriepicatechin, both selected as model pigments of apple juices, was explored by cyclic voltammetry and UV-visible spectroelectrochemistry. Besides, the changes in spectral properties of POPj, related to its protonation state, were rationalized by TD-DFT calculations.

---

**Keywords:** apple juice, polyphenols, oxidation, enzymic browning, polyphenol oxidase, apple cider, fermentation, redox potential, pH, HPLC, mass spectrometry, UV-visible spectroelectrochemistry, molecular modelling