

AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Université de Rennes 1, UFR  
SVE



UR 1268 BIA-INRA,  
Equipe PRP

Année universitaire : 2013 - 2014

Spécialité :

Production et Technologie du Végétal  
(ProTeV)

Spécialisation (et option éventuelle) :

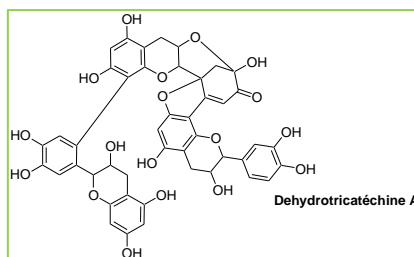
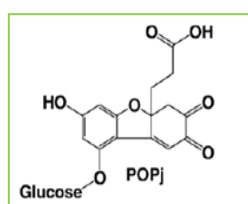
Sélection, Production et Valorisation des  
végétaux (SPVV) option Elaboration de la  
Qualité et Valorisation des Végétaux  
(EQVV)

### Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

## Modulation et stabilité de la couleur des jus de pommes et des cidres : Impact des paramètres physico-chimiques du milieu

Par : Noémie CAËL



**Soutenu à Rennes le 16 septembre 2014**

#### Devant le jury composé de :

Président : Carole DELEU

Maître de stage : Sylvain GUYOT (Chargé de  
recherche), Erell LE DEUN (Thésarde)

Enseignant référent : Antoine GRAVOT

Autres membres du jury (Nom, Qualité) : Alain  
BOUCHEREAU (examinateur)

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*

## Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

### **Confidentialité :**

Non  Oui si oui :  1 an  5 ans  10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible<sup>(1)</sup>.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage<sup>(2)</sup> :

### **Droits d'auteur :**

L'auteur<sup>(3)</sup> autorise la diffusion de son travail

Oui  Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :

### **Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :**

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui  Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

# Remerciements

Je tenais à remercier en premier lieu l'équipe pédagogique du Master Production et Technologie du Végétal (Université d'Angers, Université de Rennes 1 et les sites Agrocampus Ouest Rennes et Angers) et plus particulièrement Carole Deleu, la responsable de l'option Elaboration de la Qualité et Valorisation des Végétaux qui nous a permis de rencontrer des professionnels et des enseignants qui ont su nous faire partager leur savoir. Je remercie également Antoine Gravot mon référent de stage.

Je tiens à remercier le GIS Fruits qui a accepté le financement de ce stage. Un grand merci aussi à l'INRA du Rheu et plus précisément la station cidricole dont fait partie l'équipe BIA-PRP qui a su partager leurs connaissances mais aussi m'entourer lorsque j'ai rencontré certaines difficultés au cours de mes manipulations et de m'avoir permis de faire partie du projet CICHROM. Merci à tous les membres du laboratoire pour leurs pauses mythiques qui ont su remotiver les troupes.

Je tenais également à remercier l'équipe de l'IFPC pour leur coup de pouce et pour les différents échanges très intéressants que j'ai pu avoir avec eux, ils ont su me donner envie de continuer à découvrir le domaine du cidre et des jus de pommes.

Un grand merci à Sylvain Guyot, mon maître de stage, qui a su me faire apprécier le domaine de la chimie, merci à lui de m'avoir permis d'approfondir mes connaissances et d'avoir été aussi patient lors des innombrables explications qui m'ont été plus que nécessaires.

Merci à Jean-Michel Le Quéré grâce à qui les statistiques s'éclairent et que le travail sur excel devient (presque) un plaisir à l'aide de ces incontournables macro. Merci de partager toutes ses petites « bidouilles » pour faciliter le travail.

Et pour terminer, un très grand merci à Erell Le Deun de m'avoir encadrée tout au long de ce stage qui était une première pour elle en tant qu'encadrante. Je n'oublierais pas ces longues discussions à côté des machines à attendre pendant de longues heures (parfois pour pas grand-chose et parfois pour s'émerveiller face à la couleur). Je n'oublierais pas non plus toutes ces péripéties qui auront rythmé notre quotidien pendant ces six mois, les fous rires qui nous ont permis de tenir quand l'optimisme se faisait rare. Merci aussi de sa patient et de son encouragement de tous les jours. Merci pour tout et merci à Poupy.

Je profite pour remercier mes amis de leur soutien, merci à ma famille qui a toujours su me motiver, m'entourer et me soutenir dans les choix que j'ai réalisés. Merci à lui de toujours trouver les mots justes et de me donner un peu plus confiance en moi

*Une pensée toute particulière à lui partit trop tôt.*



# Table des illustrations

## Tables des figures :

Figure 1 : Polyphénols (ou composés phénoliques) de la pomme et de ses produits de transformation.....	face p.2
Figure 2 : Réaction de formation de POPj par oxydation enzymatique de la phloridzine.....	face p.3
Figure 3 : Structure moléculaire de la déhydrodicatéchine A.....	face p.3
Figure 4 : Modèle CIE XYZ de 1931.....	face p.4
Figure 5 : Espace couleur L*a*b* et L*C*h*.....	face p.4
Figure 6 : Evolution de la couleur de POPj selon le pH.....	face p.5
Figure 7 : Verre de cidre normal (gauche) et verre de cidre avec une casse ferrique (droite).....	face p.5
Figure 8 : Schéma explicatif pour le calcul du coefficient de partage.....	face p.10
Figure 9 : Schéma du principe de Chromatographie de Partage Centrifuge.....	face p.10
Figure 10 : Disposition en microplaque 96 puits des différents facteurs pour le plan impliquant les métaux (concentration en mg/L).....	face p.13
Figure 11 : Profils chromatographiques (420 nm) en phase inverse du milieu d'oxydation de l'épicatéchine pour différentes activités enzymatiques par analyse CLHP-DBD-SM.....	face p.14
Figure 12 : Profils chromatographiques du milieu d'oxydation enzymatique en grand volume par analyse CLHP-DBD-SM à 280 et 420 nm et leurs spectres de masse.....	face p.14
Figure 13 : Chromatogramme obtenu au cours d'une CPC et positionnement des différentes fractions récoltées pour les différents composés d'intérêts.....	face p.15
Figure 14 : Profils chromatographiques en phase inverse (280 nm) des fractions issues de la CPC comprenant l'épicatéchine par analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.15
Figure 15 : Profils à 420 nm des pools contenant T861 après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 16 : Profils à 420 nm des pools contenant T863 après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 17 : Profil à 420 nm du pool contenant D575 après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 18 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du POP pur après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 19 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du T863 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16

Figure 20 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du D575 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 21 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du T861 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.....	face p.16
Figure 22 a: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le POP et pour les trois paramètres couleur (L*C*h).....	face p.17
Figure 22 b: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le T863 et pour les trois paramètres couleur (L*C*h).....	face p.17
Figure 22 c: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le D575 et pour les trois paramètres couleur (L*C*h).....	face p.17
Figure 22 d: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le T861 et pour les trois paramètres couleur (L*C*h).....	face p.17
Figure 23 : Structure de la dehydrotricatéchine de type A (T863) en haut et du POP en bas (chromophore entouré en rouge).....	face p.20

## Table des tables :

Table 1 : Gradient d'élution pour l'analyse des polyphénols en CLHP-DBD-MS.....	face p.8
Table 2 : Systèmes de solvants utilisés pour les tests préliminaires de CPC.....	face p.8
Table 3 : Récapitulatif des différentes conditions appliquées à la préparation des échantillons pour le passage en CLHP préparative.....	face p.12
Table 4 : Gradient d'élution de CLHP semi-préparative utilisé pour les différents pigments.....	face p.12
Table 5 : Tableau récapitulatif des calculs des Kd des différents systèmes de solvants en mode ascendant (A) et en mode descendant (D).....	face p.15

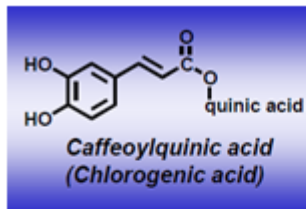
# Sommaire

## Tables des illustrations

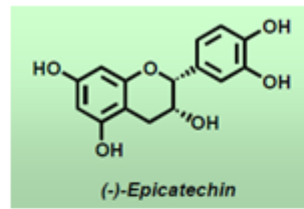
1. Introduction.....	-1-
2. Matériels et méthodes.....	-7-
a. Synthèse et purification des molécules colorées « modèles ».....	-7-
1/ Synthèse des molécules colorées.....	-7-
1.1. Optimisation de la synthèse de produits colorés issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine.....	-7-
1.2. Synthèse en grand volume (1L) des produits colorés issus de l'oxydation enzymatique de la (-)-épicatéchine.....	-8-
2/ Purification des composés colorés d'intérêt.....	-9-
b. Etude des paramètres physico-chimiques impactant la couleur.....	-12-
3. Résultats.....	-14-
a. Synthèse et purification des molécules colorées « modèles ».....	-14-
1/ Synthèse des molécules colorées.....	-14-
1.1. Optimisation de la synthèse de produits colorés issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine.....	-14-
2/ Purification des composés colorés d'intérêt.....	-15-
b. Etude des paramètres physico-chimiques impactant la couleur.....	-16-
4. Discussion.....	-19-
5. Conclusion.....	-21-
6. Références bibliographiques.....	-22-
Annexes	



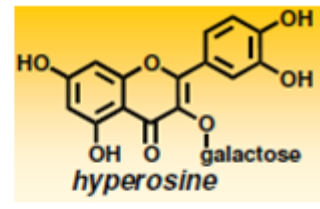




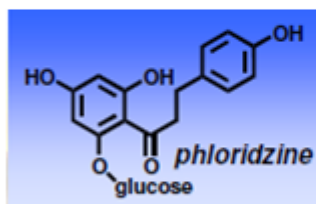
Acides phénoliques



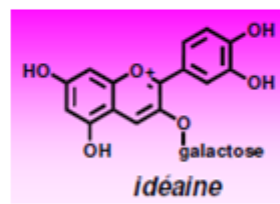
Catéchines



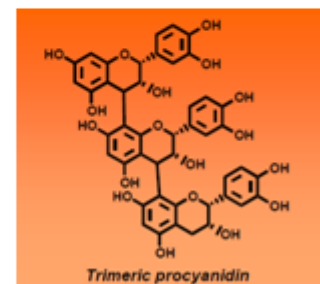
Flavonols



Dihydrochalcones



Anthocyanes



Procyanidines  
(tanins condensés)

Figure 1 : Polyphénols (ou composés phénoliques) de la pomme et de ses produits de transformation. (D'après IFPC, site internet n°3).

## **1. Introduction :**

En 1946, l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est fondé afin de répondre à une demande sociale pressante de « nourrir la France ». (INRA, site internet n°1). Aujourd'hui composé de 13 départements scientifiques et de 19 centres de recherches régionaux, l'INRA est le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième dans le monde. Etablissement public, il est placé sous la tutelle conjointe du ministère de l'Agriculture et des ministères chargés de l'Education nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Les recherches actuelles concernent trois domaines principaux avec des objectifs en lien avec les attentes de la société : l'alimentation, l'agriculture et l'environnement.

L'équipe PRP (Polyphénols, Réactivité, Procédés) est rattachée au département scientifique CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture). Bien que localisée sur le site INRA de Le Rheu, elle fait partie de l'unité de recherche 1268 BIA (Biopolymères, Interactions, Assemblages) du centre régional INRA d'Angers-Nantes. Cette équipe mène une étroite collaboration avec l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC) dans le cadre de l'Unité Mixte Technologique Novacide. En outre, les besoins analytiques sont assurés au travers du plateau P2M2 (plateforme de profilage métabolique et métabolomique) dont l'équipe PRP est co-fondatrice.

L'objectif principal de l'équipe est d'apporter à la filière cidricole des bases scientifiques en vue de maîtriser les procédés de transformation des pommes à cidre. Pour cela, les recherches menées visent à comprendre et connaître le rôle et les implications des composés phénoliques lors de l'élaboration d'aliments liquides, fermentés (cidre) ou non (jus), issus de la transformation des fruits, en relation avec les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits finis. Les recherches se focalisent sur les mécanismes d'oxydation enzymatique des polyphénols, la nature et le devenir des espèces phénoliques oxydées en intégrant la complexité de la matière première et les technologies mises en œuvre lors de la transformation des fruits. Actuellement, l'une des priorités scientifiques de l'équipe est de développer les approches mécanistiques et cinétiques de l'oxydation enzymatique des polyphénols et d'étudier les interactions entre molécules phénoliques (oxydées ou non) et macromolécules (polysaccharides et protéines) afin de conduire à un meilleur contrôle de la couleur, de la stabilité colloïdale et de l'effervescence. (INRA, site internet n°2).

Les polyphénols, ensemble de métabolites secondaires, sont responsables de caractéristiques organoleptiques majeures des jus de pommes et des cidres, comme l'amertume, l'astringence ou encore la couleur. Six classes majeures de polyphénols sont

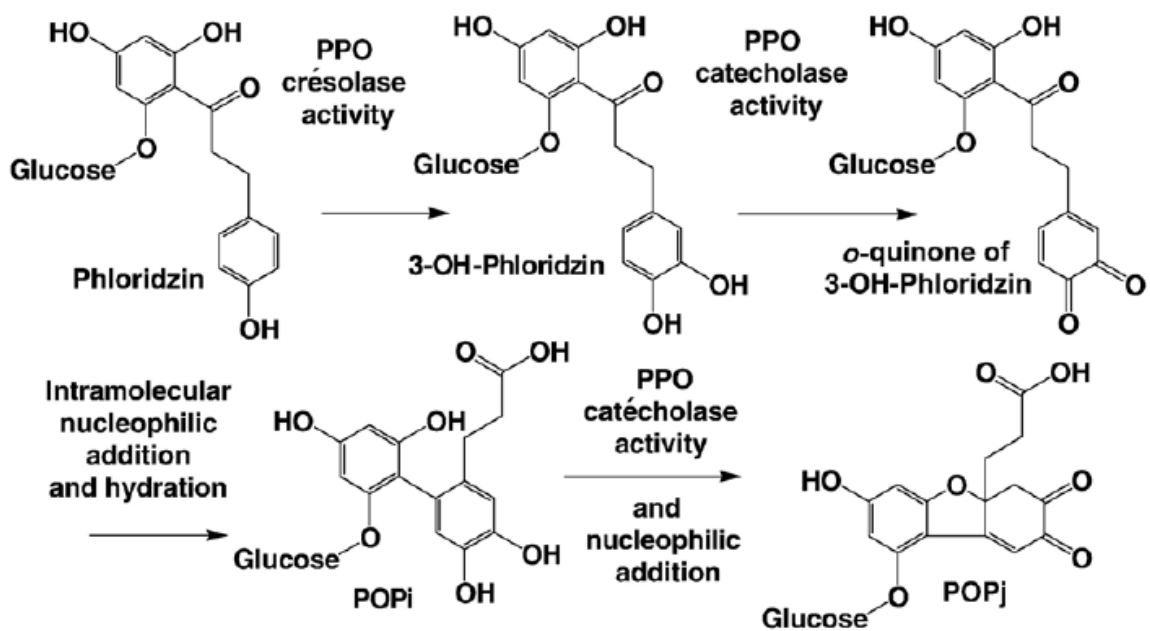


Figure 2 : Réaction de formation de POPj par oxydation enzymatique de la phloridzine (D'après Guyot, 2007).

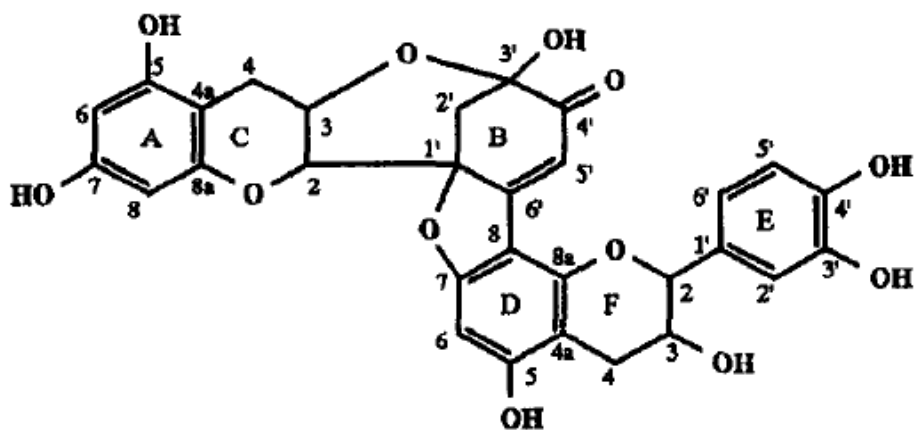


Figure 3 : Structure moléculaire de la déhydrocatéchine A (D'après Guyot, 1996).

retrouvées de manière hétérogène au sein de la pomme (Guyot et Poupard, 2010). Trois de ces classes représentent 90% de la composition de la pomme et sont présentes dans toutes les parties du fruit (figure 1) : la classe des **acides hydroxycinnamiques** représentée majoritairement par l'acide chlorogénique (ou acide 5-O-caféoylquinique), celle des **flavonols monomères** dont la (-)-épicatéchine (le plus souvent largement majoritaire dans les pommes) ainsi que la classe des **procyanidines ou tanins condensés** qui sont des oligomères et polymères de catéchines. Les **dihydrochalcones** comme la phloridzine, particulièrement concentrée dans les pépins, sont assez spécifiques des produits dérivés de la pomme (Guyot et al., 1998). Les **flavonols** ainsi que les **anthocyanes**, sont les seules classes de polyphénols natifs colorés dans la pomme, elles sont surtout présentes dans la peau et diffusent peu dans le jus lors de la transformation.

Aujourd'hui, la couleur représente un critère de segmentation des cidres ou des jus de pommes encore peu exploité dans la filière cidricole. En effet, sa maîtrise reste très difficile. Dans ce contexte, le projet de recherche interrégional CICHROM vise d'abord à mieux comprendre les mécanismes de la formation et de l'expression de la couleur des cidres et à proposer aux professionnels de la filière :

- des itinéraires techniques permettant aux producteurs d'orienter la couleur de leurs produits,
- des tests et des outils permettant de prédire la couleur et sa stabilité, mais aussi de coder les couleurs des cidres à travers un nuancier comme il en existe dans la filière viticole.

La couleur d'un produit alimentaire est un critère organoleptique important dans la mesure où elle constitue la première image « marquant » le consommateur. Par conséquent, elle est susceptible de conditionner l'acte d'achat et d'influencer l'appréciation du produit. Avec une production annuelle de plus d'un million d'hectolitres de cidre (UNICID), il y a un réel intérêt à mieux comprendre l'origine de la couleur afin de proposer une meilleure maîtrise de ce critère lors de l'élaboration des produits cidricoles. Les molécules responsables de la couleur sont essentiellement issues de l'oxydation enzymatique des polyphénols de la pomme. Ces produits d'oxydation apparaissent lors des étapes de broyage et de pressage des pommes (Nicolas, 1993 ; Nicolas, 1994), qui provoquent une décompartmentation cellulaire. La mise en contact de la polyphénoloxidase (PPO), d'origine plastidiale, avec les polyphénols, d'origine vacuolaire, en présence d'oxygène entraîne un phénomène d'oxydation enzymatique souvent appelé brunissement enzymatique. Bien que la majorité des produits formés soient incolores, le phénomène se nomme ainsi car il induit la formation de produits oxydés colorés. La PPO, enzyme de type oxydoréductase, présente

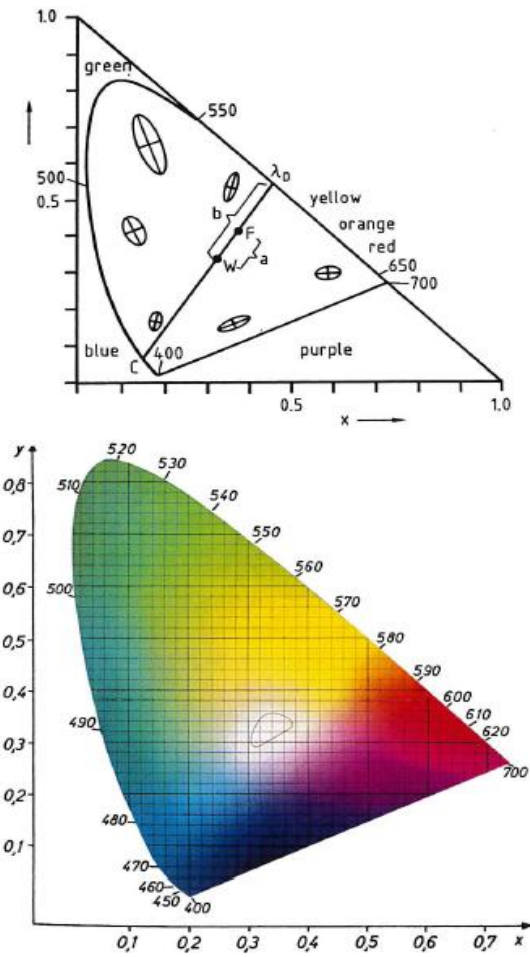


Figure 4 : Modèle CIE XYZ de 1931 (D'après Zollinger, 2003).

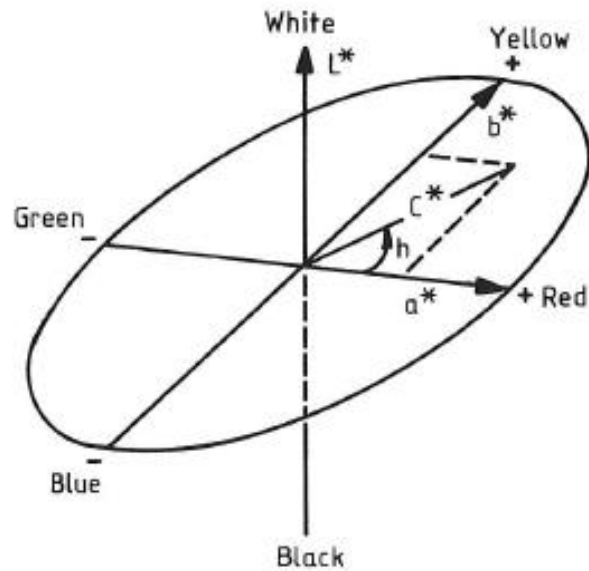


Figure 5 : Espace couleur  $L^*a^*b^*$  et  $L^*C^*h$  (D'après Zollinger, 2003).

deux types d'activités : l'activité crésolase et l'activité catécholase. Les substrats de la PPO sont oxydés en *o*-quinones (dites primaires). Dans le cas de la pomme, le substrat majeur est l'acide 5-*O*-caféoylquinique. Ces quinones, instables et très réactives, sont engagées dans des réactions ultérieures d'oxydo-réduction et d'addition par voie chimique. Ces oxydations secondaires avec d'autres polyphénols vont donner à leurs tours des formes *o*-quinoniques (*o*-quinones secondaires). Les quinones primaires et secondaires donnent aussi lieu à la formation d'espèces radicalaires (semi-quinones). Enfin, quinones et semi-quinones se trouvent impliquées dans des réactions d'addition qui génèrent un grand nombre de produits néoformés par dimérisation, polymérisation, addition inter et intramoléculaires. Bien qu'encore mal connues, ces structures comprennent *a priori* suffisamment de doubles liaisons carbone-carbone et de fonctions carbonyles conjuguées pour générer des chromophores, ce qui explique la coloration jaune-orange des jus.

Quelques études ont été menées sur l'oxydation des polyphénols natifs du jus de pomme. Elles ont permis de caractériser plusieurs produits d'oxydation néoformés et de décrire les différents mécanismes moléculaires impliqués (Poupard, 2008 ; Bernillon et al., 2004 ; Guyot et al., 2008). Les mécanismes de polymérisation des quinones, souvent décrits dans la littérature, semblent finalement minoritaires par rapport aux voies réactionnelles de dimérisations suivies de réoxydations et de ré-arrangements intra-moléculaires. Néanmoins, ces produits et ces mécanismes restent à ce jour très peu connus.

Quelques molécules de couleur jaune-orange ont été caractérisées. C'est le cas du POPj (Produit d'Oxydation de la Phloridzine jaune) obtenu par oxydation enzymatique de la phloridzine (figure 2) ; (Guyot et al., 2007). Toutefois, il faut noter que le POPj, même s'il est retrouvé dans les jus, n'est pas la structure majoritairement responsable de leur couleur.

D'autres produits colorants ont été obtenus en milieu modèle par l'oxydation enzymatique de la (+)-catéchine ou de la (-)-épicatéchine, comme par exemple la déhydrodicatéchine A (figure 3) ; (Guyot, 1996).

En général, le mécanisme qui conduit à la couleur est composé de plusieurs réactions d'oxydation successives.

Il existe différentes méthodes pour mesurer et décrire une couleur. La Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) a développé différents modèles de représentation en trois dimensions qui permettent d'exprimer une couleur en tenant compte de sa perception par l'œil humain. Chez l'homme, la perception des couleurs résulte d'une combinaison des informations captées par trois types de cellules photosensibles en forme de cônes situées dans la zone centrale de la rétine. Les spectres de lumière sont ainsi traduits en trois

signaux : les composantes rouges, vertes et bleues. Ces réponses aux stimuli lumineux sont envoyées par influx nerveux au cerveau pour être interprétées comme une couleur.

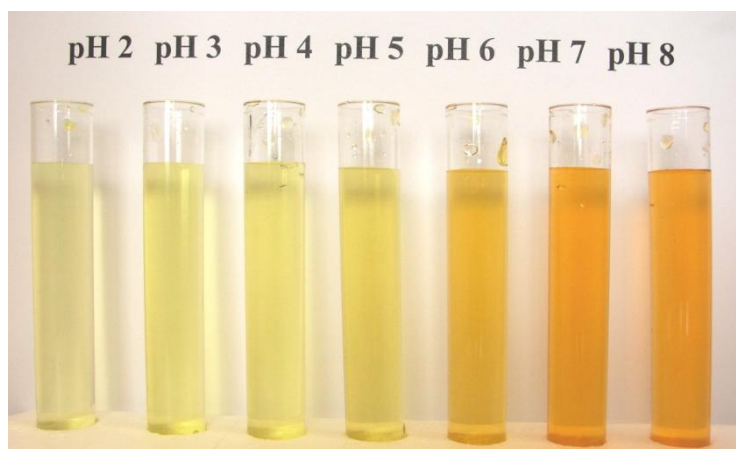


Figure 6 : Evolution de la couleur de POPj selon le pH (D'après Guyot, 2007).



Figure 7 : Verre de cidre normal (gauche) et verre de cidre avec une casse ferrique (droite). (D'après Bauduin, 2006).

En 1931, le premier modèle colorimétrique CIE XYZ est défini par la CIE. Prenant en compte les fonctions de mélanges reliant les trois perceptions de l'œil humain à la longueur d'onde, ce système sert de référence pour définir d'autres modèles. Les trois composantes X, Y et Z représentent respectivement la teinte, la luminance (intensité lumineuse pondérée par la sensibilité spectrale de l'œil) et la saturation (figure 4). Ces valeurs, dites tristimulus, sont fonctions du triplet lumière – objet – observateurs, elles sont obtenues en intégrant sur le spectre visible le produit de la réflectance de l'objet éclairé par un illuminant perçu par la sensibilité spectrale de l'œil (Chrisment, 2011; Zollinger, 2003).

Les valeurs tristimulus XYZ sont à la base des espaces couleurs les plus utilisés actuellement : les espaces  $L^*a^*b^*$  et  $L^*C^*h$ .

Défini en 1976, l'espace couleur  $L^*a^*b^*$  ou CIELab est l'espace le plus utilisé dans de nombreux domaines. Il est particulièrement utilisé pour exprimer la couleur des produits alimentaires. Les différentes coordonnées qui le composent sont la clarté ( $L^*$ ), et les valeurs de chromaticité  $a^*$  et  $b^*$  calculées à partir des valeurs XYZ. Dans le diagramme (figure 5), les valeurs  $a^*$  et  $b^*$  décrivent la couleur : les fortes valeurs positives de  $a^*$  tendent vers le rouge, les fortes valeurs négatives vers le vert, alors que les fortes valeurs positives de  $b^*$  tendent vers le jaune et les fortes valeurs négatives vers le bleu. Le centre du diagramme est achromatique, c'est-à-dire sans teinte. En incluant une dimension représentant la luminosité  $L^*$ , la sphère des couleurs est obtenue (figure 5). Sur ce solide, le centre est achromatique et la saturation augmente avec la distance au centre (du blanc au noir).

Le système  $L^*C^*h$  est obtenu en exprimant les paramètres de couleur du système CIELab, en coordonnées polaires plutôt que cartésiennes. Le  $L^*$  définit toujours la clarté, le  $C^*$  définit la saturation qui correspond à la distance par rapport au centre et l'angle  $h$  définit la teinte (figure 5). Ce dernier correspond à l'angle formé entre le vecteur  $a^*$  et le vecteur de la couleur à définir, ce qui signifie qu'un angle de  $0^\circ$  correspond au rouge,  $90^\circ$  au jaune,  $180^\circ$  au vert et donc  $270^\circ$  au bleu.

De nombreuses études se sont focalisées sur les molécules colorées présentes dans des modèles de boissons fermentées telles que le vin, la bière, le thé... D'après la littérature, il apparaît que certains paramètres physico-chimiques du milieu environnant (type jus ou boisson fermenté), peuvent avoir un impact sur l'expression de la couleur. En effet, un changement de pH ou encore la présence de cations métalliques dans le milieu sont susceptibles d'influencer significativement la couleur (Clark et al., 2002 ; Danilewicz, 2011).

Le pH est un paramètre ayant une influence considérable sur la structure des composés phénoliques (Friedman et Jürgens, 2000). Des études ont permis de mettre en évidence, à partir d'une solution aqueuse d'anthocyanes, la forte réactivité de la fraction aglycone avec le pH (Mazza, 1990 ; Brouillard, 1988). A pH faible (pH = 1), le cation flavylium est l'espèce



prédominante et contribue à la coloration rouge et violette. Pour des valeurs de pH comprises entre 2 et 4, les formes quinoïdales de couleur bleue sont prédominantes. Pour des pH compris entre 5 et 6, seules des formes incolores sont présentes (Castañeda-Ovando et al., 2009). Dans une publication, Torskangerpoll (2004) qui s'intéressait à la stabilité de la couleur des anthocyanes, a une nouvelle fois mis en évidence l'importance du pH dans l'expression de la couleur. En 2007, Guyot a mis en évidence un effet significatif du pH sur le POPj qui présente une coloration jaune intense à pH 3 à 5, virant vers l'orange pour des pH plus élevés (figure 6).

La complexation métallique des polyphénols est connue pour jouer un rôle important dans l'expression des couleurs naturelles (fleurs, vins rouges,...). Par exemple, les métaux peuvent stabiliser les formes basiques quinoïdales bleues des anthocyanes au sein d'un complexe (Dangles et al, 1994). Dans ce cas, les ions métalliques peuvent être considérés comme des co-pigments. Par ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées à l'implication de certains métaux, en particulier le fer et le cuivre, dans les phénomènes généraux d'oxydation des polyphénols retrouvés dans des systèmes « modèle vin » (Danilewicz, 2007 ; Danilewicz, 2011 ; Clark et al., 2002 ; Nkhili et al., 2014) . Il apparaît que l'oxydation du fer de l'état ferreux ( $Fe^{2+}$ ) à l'état ferrique ( $Fe^{3+}$ ) est une étape importante dans la catalyse de l'oxydation des polyphénols présents. L'action du fer serait renforcée de façon significative par la présence de cuivre. Certains travaux ont relié plus directement l'effet de la présence de ces métaux sur le brunissement des solutions (Es-Safi et al, 2003). Il faut néanmoins noter que la présence de sulfite accélère la vitesse de consommation de l'oxygène en présence de métaux et de composés phénoliques (Danilewicz, 2011). Ces voies réactionnelles complexes ne sont pas encore complètement élucidées.

D'après le décret n°53-978 du 30 septembre 1953 relatif à l'orientation de la production cidricole et à la commercialisation des cidres, la teneur maximale en fer autorisée est de 10 mg/L. Les teneurs en cuivre sont généralement comprises entre 0 et 1 mg/L. Les produits cidricoles peuvent parfois présenter une instabilité de la couleur liée à une présence excessive de fer, ce qui constitue une grosse altération du produit. Ce phénomène est appelé « casse ferrique » et correspond à l'oxydation du fer qui passe de l'état ferreux ( $Fe^{2+}$ ) à l'état ferrique ( $Fe^{3+}$ ). Dans cet état, le fer se combine avec les tanins du cidre pour former des complexes de couleur noire (figure 7). Au cours de son stage, Emilie Weber (2011) a montré un impact du fer sur les caractéristiques de couleur du POPj, tandis que le cuivre se révélait sans effet significatif. Il sera intéressant d'explorer de manière plus approfondie l'implication de ces métaux et leur interaction éventuelle dans la modulation de la couleur jaune-orange des jus de pomme.

Dans le cadre du projet CICHROM, les études menées au cours de ce stage ont pour objectif d'identifier, de hiérarchiser **les paramètres physico-chimiques ayant un impact sur la modulation et la stabilité de la couleur des cidres et des jus de pommes** afin de comprendre et connaître les mécanismes moléculaires responsables de l'expression de la couleur.

Suite à l'analyse bibliographique, les travaux réalisés dans ce stage correspondent à une étude en solution des propriétés colorantes de molécules modèles représentatives de la couleur des jus de pommes et des cidres en se concentrant sur les deux paramètres principaux évoqués précédemment, à savoir le pH et la présence de cations métalliques.

Pour ce faire et afin d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les changements de couleur, il était important de travailler sur des molécules « modèles » colorées pertinentes par rapport au modèle jus/cidre, aussi pures que possible, et non disponibles commercialement. Par conséquent, il a été nécessaire de réaliser au préalable des travaux de synthèse enzymatique et de purification de ces composés colorés. Des méthodes de CLHP semi-préparative, CLHP préparative et CPC (Chromatographie de Partage Centrifuge) ont été utilisées. Ce travail à l'échelle préparative a permis d'obtenir des quantités suffisantes de produits colorés pour mettre en œuvre les plans d'expérimentation. Deux types de chromophores sont utilisés : le POPj, déjà identifié dans les jus de pomme, et des dimères et trimères issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine (nommées déhydrocatéchines) en milieu modèle, non identifiés à ce jour dans les jus mais présentant une structure probablement proche des chromophores des milieux réels. Des tests préliminaires ont permis de fixer les différentes gammes de variation de chaque facteur à appliquer dans les plans expérimentaux. Un suivi colorimétrique (système CIELab) et des analyses en CLHP-DBD-SM (Chromatographie Liquide Haute Performance – Détecteur à Barrettes de Diodes – Spectrométrie de Masse ou CLHP-UV/Visible-SM) sont réalisés pour chaque test.

Ensuite, la démarche scientifique destinée à étudier l'impact des paramètres pH et cations métalliques sur l'expression et la stabilité de la couleur exprimée par ces molécules modèles a été réalisée par une approche statistique s'appuyant sur la mise en œuvre de plans d'expériences.

---

Temps (min)	ACN + HCOOH 0.1%	HCOOH 0.1%
0	3	97
5	9	91
15	16	84
45	50	50
48	90	10
51	90	10
55	3	97
75	3	97

---

Table 1 : Gradient d'élution pour l'analyse des polyphénols en CLHP-DBD-MS.

## **2. Matériels et méthodes :**

### **a. Synthèse et purification des molécules colorées « modèles » :**

#### **1/ Synthèse des molécules colorées :**

##### ***1.1. Optimisation de la synthèse de produits colorés issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine :***

**Objectif :** Définir les paramètres d'incubation enzymatique permettant d'optimiser le rendement en produits colorés lors de l'oxydation enzymatique de l'épicatéchine.

La première voie de synthèse de composés colorés dans les jus de pommes est la catalyse enzymatique de l'oxydation des polyphénols par la PPO (polyphénoloxidase). Une étude menée lors d'un stage précédent (Weber, 2011) a permis d'optimiser les conditions de synthèse de produits d'oxydation colorés en milieu modèle lors de l'incubation d'(-)-épicatéchine en présence de PPO. D'après cette étude, l'enzyme présente un maximum d'activité entre pH 5 et 6. De plus, le meilleur rendement en molécules colorées est obtenu après incubation d'une solution épicatéchine à 5mM en présence de PPO à 18 nkatal/mL.

En se basant sur ces différents résultats, de nouvelles expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer l'activité enzymatique de l'extrait brut de PPO disponible. Cet extrait brut a été préparé à partir d'un jus de pommes variété Douce Coët. Une solution d'épicatéchine à 5 mM tamponnée à pH5.6 a été utilisée comme substrat de l'enzyme. La concentration en oxygène dissous dans le milieu réactionnel au cours du temps a été mesurée à l'aide d'un oxygraphe (annexe A), ainsi il a été possible de calculer l'activité enzymatique de l'extrait de PPO utilisé.

Cinq conditions d'activités enzymatiques différentes ont été testées au cours d'incubations en petits volumes (5 mL). Ces différentes activités ont été choisies sur la base des résultats obtenus au cours du stage d'Emilie Weber (2011). Les milieux ont été incubés à 26.6°C sous agitation continue pendant 40 minutes, le substrat a été fixé à une concentration de 5 mM à pH 5.6. Afin de stopper la réaction au bout du temps requis les solutions ont été filtrées avec un filtre PVDF de 0.45 µm. La PPO étant particulaire elle se trouve ainsi éliminée du milieu réactionnel.

Les différentes solutions ont été analysées en CLHP-UV/Visible-SM afin d'identifier les composés colorés formés, de sélectionner ceux pouvant faire l'objet d'un travail de purification à l'échelle préparative, d'estimer approximativement leurs quantités et de

sélectionner le niveau d'activité enzymatique à utiliser pour permettre un rendement optimal de leur synthèse.

Le système de CLHP-DBD-SM est composé d'une pompe binaire à haute pression (HP séries 1100), d'un système automatique d'injection des échantillons (Thermo Finnigan Autosamples Surveyor), d'une colonne (Agilent XDB-C18 3.5 $\mu$ m ; 2.1 x 150 mm) munie d'une pré-colonne (Agilent XDB-C18 3.5 $\mu$ m ; 2.1 x 12.5 mm) thermostatées à 30°C et d'un détecteur à barrette de diodes (Thermo Finnigan Spectra System UV6000LP). L'ensemble est couplé à un spectromètre de masse (Finnigan LCQ-DECA) muni d'une source d'électronébulisation (electrospray ou ESI) et d'un analyseur à piégeage d'ions (Ion Trap). Pour l'analyse de polyphénols, un gradient d'acétonitrile (ACN) acidifié à l'acide formique (HCOOH) à 0.1% et d'eau ultra-pure acidifiée (HCOOH à 0.1%) a été utilisé en CLHP (table 1). La source ESI est utilisée en mode négatif. La détection en SM a été effectuée avec les paramètres suivants : acquisition des spectres SM en mode d'ionisation négatif en « full scan », détection balayant une gamme de m/z de 50 à 2000 pour obtenir les signaux correspondant aux ions moléculaires déprotonés [M-H]<sup>-</sup>. Les données ont été traitées sous le logiciel Xcalibur. L'analyse des chromatogrammes est faite à 420 nm afin d'évaluer le rendement en synthèse de produits colorés.

## **1.2. Synthèse en grand volume (1L) des produits colorés issus de l'oxydation enzymatique de la (-)-épicatéchine :**

**Objectif :** Obtenir une quantité suffisante de molécules colorées pour réaliser les plans d'expérience et travailler dans des conditions optimales.

L'oxydation enzymatique en grand volume (un litre) a été réalisée en utilisant une solution d'épicatéchine à 5 mM diluée dans un tampon citrate phosphate de pH 5.65. Les tests préliminaires ont mis en évidence qu'une activité enzymatique de 36 nkatal permettait un rendement optimal de la synthèse de produits colorés. La PPO a donc été introduite à une concentration permettant d'atteindre ce niveau d'activité enzymatique dans le milieu réactionnel. L'incubation a duré 40 minutes, à 25°C sous agitation continue. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution de fluorure de sodium (NaF) à 20 g/L, composé connu pour être un puissant inhibiteur de la PPO (Janovitz-Klapp et al., 1990). Le flacon est placé dans de la glace afin d'accélérer l'arrêt de la réaction.

La solution de produits d'oxydation a été centrifugée et le surnageant a été filtré sur nylon 5 $\mu$ m. Un prélèvement de l'échantillon ainsi obtenu est injecté en CLHP-DBD-SM pour

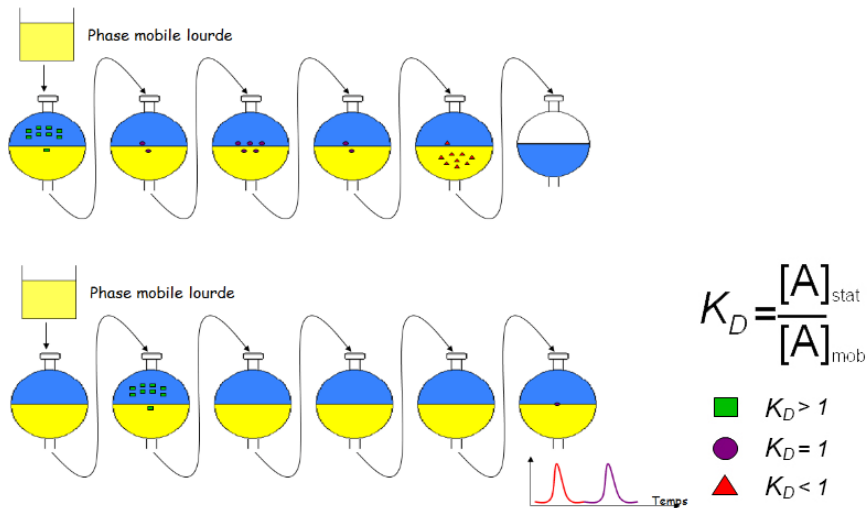


Figure 8 : Schéma explicatif pour le calcul du coefficient de partage (D'après Kromaton).

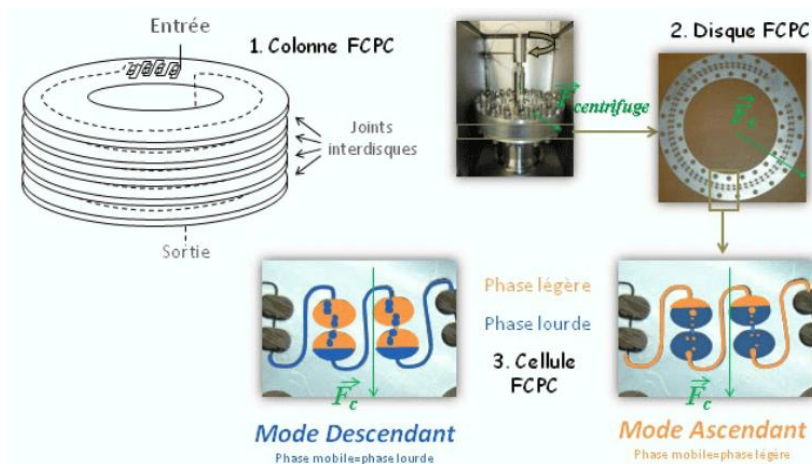


Figure 9 : Schéma du principe de Chromatographie de Partage Centrifuge (D'après Kromaton).

Modalités	Volume solvants (%)					Volume final (mL)
	Hexane	Acétate d'éthyle		Butanol	Ethanol	
8	18.75	31.25	0	18.75	31.25	6
10	8.33	41.67	0	8.33	41.67	6
12	0	40	10	0	50	6
13	0	30	20	0	50	6
Test_1 (Erell)	0	45	5	8.33	41.67	6
Lukasz_NoX	5.5	44.5	0	11.17	38.83	6
Delaunay_test	26.67	33.33	0	20	20	6
Lu_test	30	20	0	25	20	6

Table 2 : Systèmes de solvants utilisés pour les tests préliminaires de CPC.

vérifier que le profil polyphénolique correspond bien à celui attendu. L'échantillon est mis sous neige carbonique et conservé au froid à 4°C à l'abri de la lumière.

## **2/ Purification des composés colorés d'intérêt :**

**Objectif :** Obtenir des molécules « modèles » pures à mettre en œuvre dans les plans d'expérience afin de faciliter l'interprétation des résultats et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués.

Le matériel initial utilisé pour cette étape de purification comprenait :

- Le POPj (produit d'oxydation de la phloridzine jaune) partiellement purifié
- Le mélange de produits d'oxydation colorés et incolores issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine (décrite dans les étapes précédentes)

Une étape de pré-purification des oligomères d'épicatéchine colorés a été nécessaire. Pour cela, différentes méthodes ont été employées. Dans un premier temps, une CLHP à l'échelle préparative a permis l'obtention de l'extrait phénolique (milieu d'oxydation de l'épicatéchine) débarrassé du tampon citrate phosphate. Le système CLHP préparatif est composé de deux pompes haute pression A et B (Dynamax SD 300 Rainin), d'une colonne 50 x 200 mm de silice greffée en C18 Lichrospher 100 RP 12 µm (Merck), d'un détecteur UV-visible mono-longueur d'onde (Dynamax Uv-1 Rainin) couplé au logiciel d'acquisition EZ Chrom. Les solvants utilisés sont : acide formique (HCOOH) à 1%; acétonitrile (ACN). L'élution est réalisée en 40 minutes à 50 % d'acétonitrile. L'échantillon a été traité en 2 runs pour ne pas saturer la colonne dont la capacité maximale de rétention de polyphénols est de 1 g/L. La détection a été réalisée à 280 nm car les composés phénoliques comme l'épicatéchine absorbent à cette longueur d'onde. Le débit des solvants a été fixé à 25 mL/min. Les échantillons obtenus ont ensuite été concentrés à l'évaporateur rotatif, redilués dans de l'eau légèrement acidifiée (HCOOH 0.5%), congelés puis lyophilisés.

Afin d'éliminer l'épicatéchine excédentaire présente dans les échantillons, une chromatographie de partage centrifuge (ou CPC) a été réalisée. En plus d'éliminer l'excès d'épicatéchine, cette technique a permis de fractionner de manière distincte les différents composés colorés d'intérêt.

La chromatographie de partage centrifuge est une technique de chromatographie liquide-liquide fondée sur la différence de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un système biphasique, une phase stationnaire et une phase mobile. La CPC est

une technique de Chromatographie à Contre Courant (CCC) hydrostatique car le mouvement de rotation de la colonne se fait autour d'un seul axe.

La phase stationnaire est la première phase à être introduite dans la colonne par pompage. Elle est maintenue dans la colonne grâce à la force centrifuge. Puis, la phase mobile est à son tour pompée à travers la phase stationnaire, c'est à ce stade que les molécules d'un échantillon injecté peuvent se répartir entre les deux phases selon leurs coefficients de partage ( $K_d$ ). Dans un second temps, la phase mobile décanter en sortie de cellule puis passe dans la cellule suivante. Chaque cellule correspond à un étage d'extraction individuel discret dans lequel les deux phases se mélangent puis se séparent, ce qui correspond, approximativement, à une série d'ampoules à décanter.

Le calcul du coefficient de partage 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 de ce composé. Il est exprimé ainsi :

$$K_d = \frac{[\text{soluté } A]_{\text{stationnaire}}}{[\text{soluté } A]_{\text{mobile}}}$$

Un  $K_d$  proche de 1 correspond à une bonne séparation du composé en sortie de colonne (figure 8). En mode ascendant, la phase mobile correspond à la phase légère alors qu'en mode descendant la phase mobile correspond à la phase lourde.

La CPC utilisée dans cette étape de purification est composée d'une pompe (Pump 307 Gilson), d'un rotor de 200 mL (CPC 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 9).

Des tests préliminaires ont été effectués en tubes à essais pour sélectionner un système de solvants adapté à la séparation des composés d'intérêt. Les tests se sont portés sur 8 systèmes de solvants décrits dans la table 2. Le choix des systèmes de solvants s'est basé sur la bibliographie (Delaunay, 2002 ; Foucault, 1998 ; Lu, 2009) et les résultats de tests effectués lors de stages précédents (Lukasz Zakazewski, 2014).

Les phases supérieure et inférieure de chaque modalité ont été injectées en CLHP-DBD-SM pour estimer approximativement la quantité des composés d'intérêt dans chacune de ces phases et calculer ainsi leur  $K_d$ , ce qui a permis de choisir le système de solvants le plus adapté pour leur séparation en CPC.



Composés	Dimère			Trimère 1				Trimère 2			
	Test	Run 1	Run 2	Test	Run 1 pool 1	Run 2 pool 1	Run 1 pool 2	Test	Run 1 pool 1	Run 1 pool 2	Run 2 pool 2
Run correspondant											
Masse injectée (mg)	1.96	26.14	33.34	2.02	49.67	54.55	43.41	2.04	99.52	50.22	104.03
Mélange utilisé pour dissoudre	650 µL HCOOH 0.1% + 100 µL ACN	3 mL HCOOH 0.1% + 500 µL ACN		650 µL HCOOH 0.1% + 100 µL ACN	3 mL HCOOH 0.1% + 500 µL ACN			650 µL HCOOH 0.1% + 100 µL ACN	3 mL HCOOH 0.1% + 500 µL ACN		

Table 3 : Récapitulatif des différentes conditions appliquées à la préparation des échantillons pour le passage en CLHP préparative.

Composés	POPj		Dimère		Trimère 1		Trimère 2	
	Durée (min)	% d'ACN	Durée (min)	% d'ACN	Durée (min)	% d'ACN	Durée (min)	% d'ACN
Gradient d'élution	0	3	0	3	0	3	0	3
	3	3	5	9	5	9	5	9
	8	9	15	16	15	16	15	16
	18	16	35	38.7	26	28.46	22	23.9
	22	16	37	90	28	90	24	90
	26	90	40	90	31	90	27	90
	30	90	42	3	33	3	29	3
	35	3	60	3	41	3	37	3

Table 4 : Gradient d'élution de CLHP semi - préparative utilisé pour les différents pigments.

Au vu des résultats, le système de solvants de la modalité 10, Hexane-Acétate d'éthyle-Ethanol-Eau acidifié (1:5:1:5) en mode descendant a été sélectionné pour réaliser la CPC. La détection lors de la manipulation s'est faite à 280 nm afin de détecter les composés incolores notamment l'épicatéchine. Le débit de solvant pendant la CPC était de 10 mL/min, la rotation a été démarrée 200 tours/min puis augmentée progressivement pour atteindre 1000 tours/min avant que l'échantillon ne soit injecté en mode « sandwich ». Le mode « sandwich » consiste à injecter l'échantillon avant l'équilibrage, lorsque la colonne n'est remplie que de phase stationnaire. Ce mode permet l'équilibrage de la colonne en présence de l'échantillon. Pour cette étude, deux injections de 250 mg de poudre dissous dans 4 mL de phase supérieure et 4 mL de phase inférieure ont été réalisés.

En mode descendant, la phase supérieure correspond à la phase stationnaire légère. La phase mobile lourde est pompée au travers de la phase stationnaire ce qui permet l'élution des composés suivant leur affinité pour les deux phases. Au bout d'un certain temps, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a plus de composés sur le chromatogramme et après un volume de colonne passé, la phase stationnaire est à nouveau pompée dans la colonne. La phase mobile est alors éjectée progressivement de la colonne. La phase stationnaire « fraîche » pousse ensuite ce qui reste en dehors de la colonne : tous les composés introduits dans le système et non élués jusqu'alors sont récupérés, c'est l'élution-extrusion.

Une partie (200 µL) des fractions colorées obtenues a été injectée en CLHP-DBD-SM, après dilution au 1/5<sup>ème</sup> par le méthanol : eau 50 :50 (v/v) acidifié à l'acide formique 0.1%, afin d'identifier et d'éliminer les fractions contenant l'épicatéchine résiduelle. Sur la base des profils chromatographiques à 420 nm, certaines fractions contenant les composés colorés d'intérêt ont été regroupées. Obtenues par concentration à l'évaporateur rotatif, congélation puis lyophilisation, les poudres ont été utilisées pour la dernière étape de purification.

La dernière étape de purification concerne toutes les molécules colorées « modèles », c'est-à-dire le POPj partiellement purifié et les molécules colorées obtenues par oxydation enzymatique d'épicatéchine, pré-purifiées en CPC. Une CLHP à l'échelle semi-préparative a été réalisée. Le système est composé d'une colonne 25 x 100 mm de silice greffée en C18 Lichrospher 100 RP 12 µm (Merck). Les solvants sont identiques à ceux utilisés en CLHP préparative, c'est-à-dire l'acide formique (HCOOH) à 0.1% et de l'acétonitrile (ACN). Les différentes fractions de poudre colorées sont dissoutes avec un mélange d'acide formique à 0.1% et de l'acétonitrile. Le volume final est inférieur à 4 mL afin d'être injecté en une seule fois dans la boucle d'injection de 5 mL. Le suivi est réalisé à 420 nm, en effet contrairement à la purification à l'échelle préparative, ce qui nous intéresse ici est de récupérer les molécules jaunes-oranges d'intérêt qui absorbent à 420 nm.

pH												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
B	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
C	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
D	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
E	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
F	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
G	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc
H	Blanc	Blanc	3.1	3.5	3.9	4.3	3.1	3.5	3.9	4.3	Blanc	Blanc

Fer												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	0	0	0	0	7	7	7	7	Blanc	Blanc
B	Blanc	Blanc	0	0	0	0	7	7	7	7	Blanc	Blanc
C	Blanc	Blanc	0	0	0	0	7	7	7	7	Blanc	Blanc
D	Blanc	Blanc	0	0	0	0	7	7	7	7	Blanc	Blanc
E	Blanc	Blanc	3.5	3.5	3.5	3.5	10.5	10.5	10.5	10.5	Blanc	Blanc
F	Blanc	Blanc	3.5	3.5	3.5	3.5	10.5	10.5	10.5	10.5	Blanc	Blanc
G	Blanc	Blanc	3.5	3.5	3.5	3.5	10.5	10.5	10.5	10.5	Blanc	Blanc
H	Blanc	Blanc	3.5	3.5	3.5	3.5	10.5	10.5	10.5	10.5	Blanc	Blanc

Cuivre												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	0	0	0	0	0	0	0	0	Blanc	Blanc
B	Blanc	Blanc	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	Blanc	Blanc
C	Blanc	Blanc	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	Blanc	Blanc
D	Blanc	Blanc	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	Blanc	Blanc
E	Blanc	Blanc	0	0	0	0	0	0	0	0	Blanc	Blanc
F	Blanc	Blanc	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	Blanc	Blanc
G	Blanc	Blanc	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	Blanc	Blanc
H	Blanc	Blanc	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	Blanc	Blanc

Figure 10 : Disposition en microplaque 96 puits des différents facteurs pour le plan impliquant les métaux (concentration en mg/L).

Afin de déterminer les temps de rétention des composés d'intérêt dans ces conditions analytiques, des tests sur de petites quantités, environ 2 mg de fractions colorées, ont été réalisés avant de démarrer les runs sur des quantités importantes de matières colorées (table 3). De plus, ces tests permettent d'adapter les gradients d'élution selon les composés (table 4).

Lorsque le pic correspondant au composé coloré d'intérêt est détecté sur le chromatogramme à 420 nm, la fraction est collectée en sortie de détecteur. Les fractions obtenues ont été concentrées à l'évaporateur rotatif et lyophilisées.

## **b. Etude des paramètres physico-chimiques impactant la couleur :**

Afin de tester l'effet de plusieurs facteurs, l'étude sur la couleur est menée sous forme de plans d'expériences. Ces plans d'expériences permettent de :

- Croiser plusieurs modalités de différents facteurs sur une même microplaque
- Déterminer et hiérarchiser les facteurs qui ont un impact sur la couleur
- Mettre en évidence de possibles interactions entre les facteurs

Les plans d'expérience mis en œuvre dans cette étude sont des plans complets. Un plan est dit complet s'il contient l'ensemble des combinaisons de facteurs étudiés, l'intérêt d'utiliser ce type de plan est de limiter l'hétérogénéité non contrôlée. L'utilisation d'un tel plan est possible dans ce cas car chaque facteur présente un nombre identique de modalités et le nombre de facteurs est faible. Avec un plan complet, il est possible d'évaluer les effets principaux des facteurs, leurs effets d'interactions mais aussi les effets quadratiques. Etant donné la faible quantité de produits colorés disponible pour cette étude, la réalisation de plans complets a été rendue possible par l'expérimentation en microplaques.

Le choix des différents paramètres à tester a été réalisé à l'aide de la littérature et de rapports de stages précédemment effectués au centre, notamment celui d'Emilie Weber en 2011 qui a réalisé une étude préliminaire en milieu modèle de la perception et de la stabilité de la couleur. Deux paramètres ont été retenus pour cette étude : le pH et les cations métalliques, en particulier le fer et le cuivre.

Afin de déterminer les gammes de variation des différents paramètres, des tests préliminaires ont été réalisés. Pour avoir une meilleure compréhension des mécanismes et de l'impact de ces paramètres sur la couleur, l'approche expérimentale s'est faite en solutions modèles.

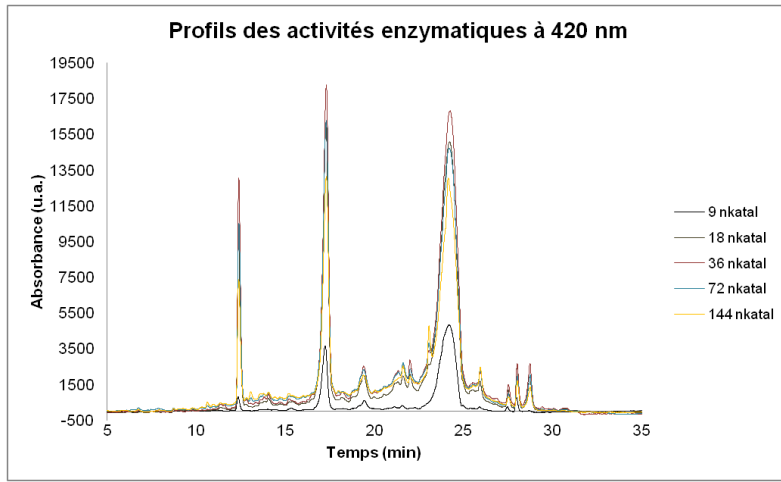


Figure 11 : Profils chromatographiques (420 nm) en phase inverse du milieu d'oxydation de la (-)-épicatéchine pour différentes activités enzymatiques par analyse CLHP-DBD-SM.

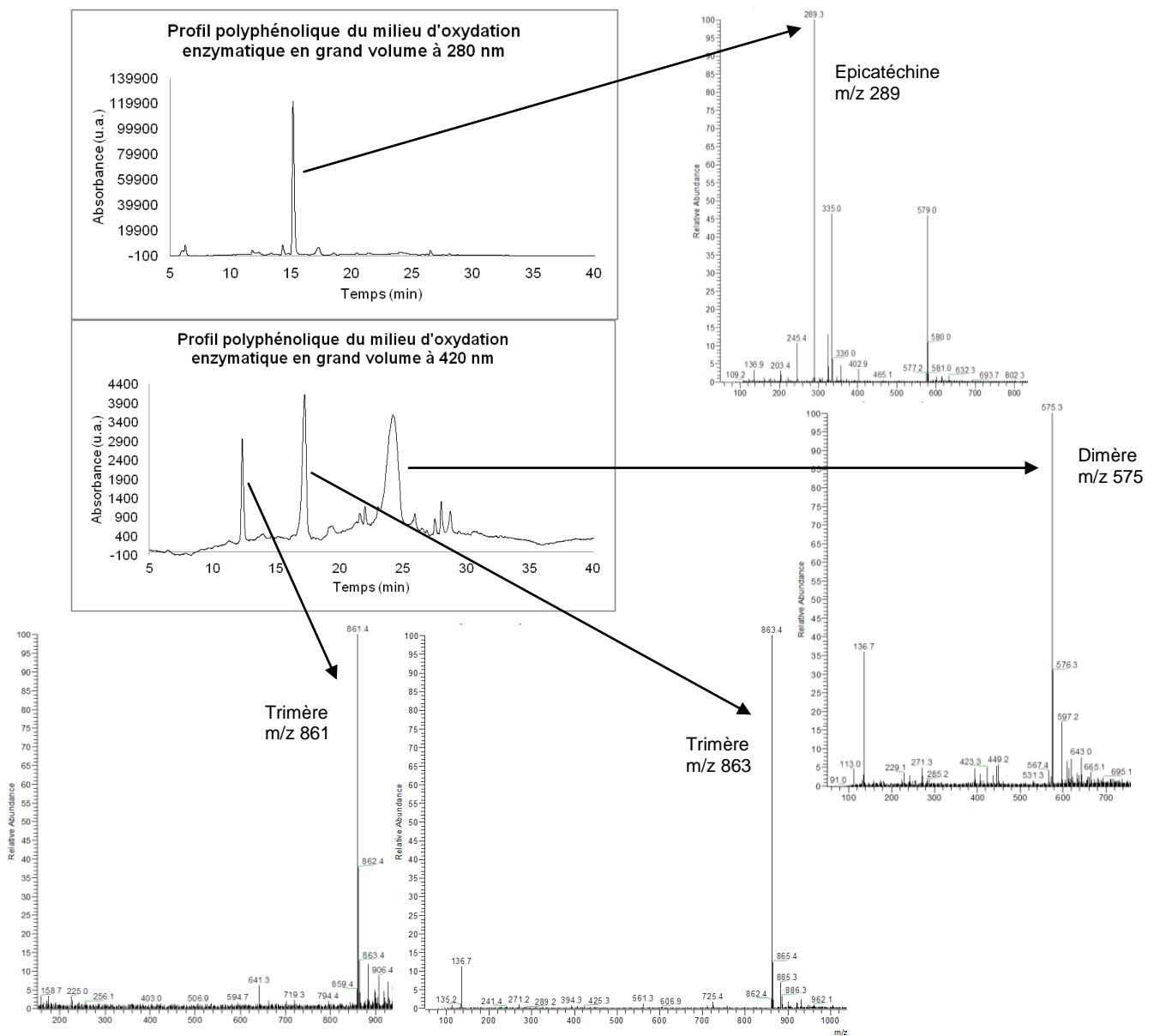


Figure 12 : Profils chromatographiques du milieu d'oxydation enzymatique en grand volume par analyse CLHP-DBD-SM à 280 et 420 nm et leurs spectres de masse.

Le plan a été mis en œuvre sur les molécules colorées purifiées obtenues grâce aux étapes de purification, c'est-à-dire le POPj et trois composés (un dimère et deux trimères) correspondant à des oligomères issus de l'oxydation enzymatique de l'épicatéchine. Ce plan se focalise sur l'impact du pH et des métaux sur ces composés colorés.

Le plan comprend trois facteurs, le pH, la concentration en  $\text{Fe}^{2+}$  et la concentration en  $\text{Cu}^{2+}$ , présentant chacun quatre niveaux (figure 10). Les valeurs de pH sélectionnées couvrent la gamme de pH des cidres. Les solutions sont préparées dans un tampon malate à 20 mM à pH 3.1, 3.5, 3.9 et 4.3. En ce qui concerne les métaux, les solutions de fer sont préparées avec du sulfate de fer ferreux heptahydraté ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) selon quatre modalités de concentrations : 0, 3.5, 7 et 10.5 mg/L. Pour limiter le risque de formation de rouille dans les solutions mères, les solutions de fer ont été légèrement tamponnées avec un tampon malate de 1 mM à pH 3.7. Les solutions de cuivre ont été préparées à partir de sulfate de cuivre pentahydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Les quatre modalités de ce facteur correspondent à des concentrations de 0, 0.16, 0.32 et 0.48 mg/L.

Un facteur supplémentaire à deux niveaux a été appliqué au plan, il s'agit de l'oxygène. Les milieux ont été traités en aérobiose et en anaérobiose. Le remplissage des microplaques a été réalisé dans une boîte à gants sous argon. Après remplissage, un film transparent a été disposé sur chaque plaque traitée en anaérobiose pour empêcher les échanges gazeux. Afin de maintenir l'anaérobiose tout au long de l'expérimentation, ces plaques ont été placées dans un dessiccateur sous argon. Après remplissage sous argon, les plaques traitées en aérobiose ont été disposées à l'air durant 20 minutes puis recouvertes d'un couvercle. L'ensemble des microplaques a été conservé dans une étuve à 25°C et à l'obscurité (plaques emballées de papier aluminium). Le suivi des traitements s'est fait sur 10 jours. Le premier jour, trois mesures ont été réalisées : à T0, T+2h et à T+4h. Par la suite, les mesures des spectres d'absorbance dans le visible ont été réalisées à T+24h, T+48h, T+72h, T+144h et T+192h.

Au niveau des analyses colorimétriques, les mesures sont d'abord réalisées par spectrophotométrie (SPECTROStar Nano BMG LABTECH). Pour chaque milieu contenu dans les puits des microplaques, le spectre d'absorbance de 400 à 700 nm a été enregistré à chaque temps de mesure. Ces données obtenues ont ensuite été converties en paramètres colorimétriques ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$  et  $h$ ) des espaces couleur CIE Lab et CIELCh (annexe B).

	8_A	8_D	10_A	10_D	12_A	12_D	13_A	13_D	Lukasz_ Test_A	Lukasz_ Test_D	Delaunay _Test_A	Delaunay _Test_D	Lu_Test _A	Lu_Test _D	Test_ 1_A	Test_ 1_D
épicatéchine	4.61	0.22	1.04	0.96	0.13	7.95	0.11	9.43	0.67	1.50	8.91	0.11	251.68	0.00	0.21	4.75
trimère m/z 863	37.38	0.03	12.49	0.08	0.12	8.37	0.08	12.13	3.92	0.26	<b>Abs. pic</b>	<b>Abs. pic</b>	1259.96	0.00	0.28	3.51
dimère	0.19	5.13	0.45	2.21	0.03	38.46	0.03	38.22	0.33	3.01	30.29	0.03	<b>Abs. pic</b>	<b>Abs. pic</b>	0.07	14.77

Table 5 : Tableau récapitulatif des calculs des Kd des différents systèmes de solvants en mode ascendant (A) et en mode descendant (D).

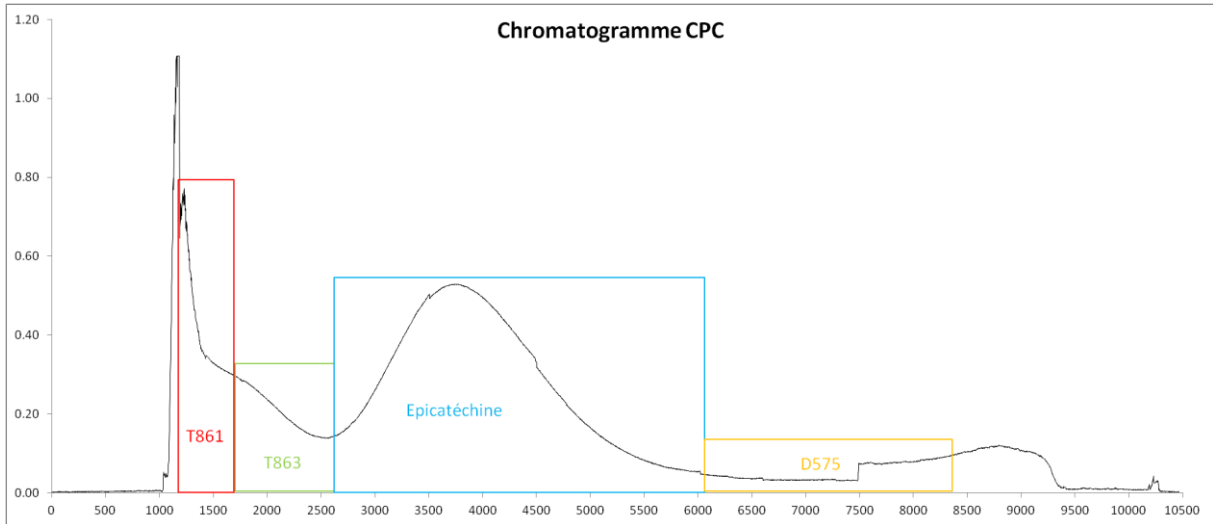


Figure 13 : Chromatogramme obtenu au cours d'une CPC et positionnement des différentes fractions récoltées pour les différents composés d'intérêts.

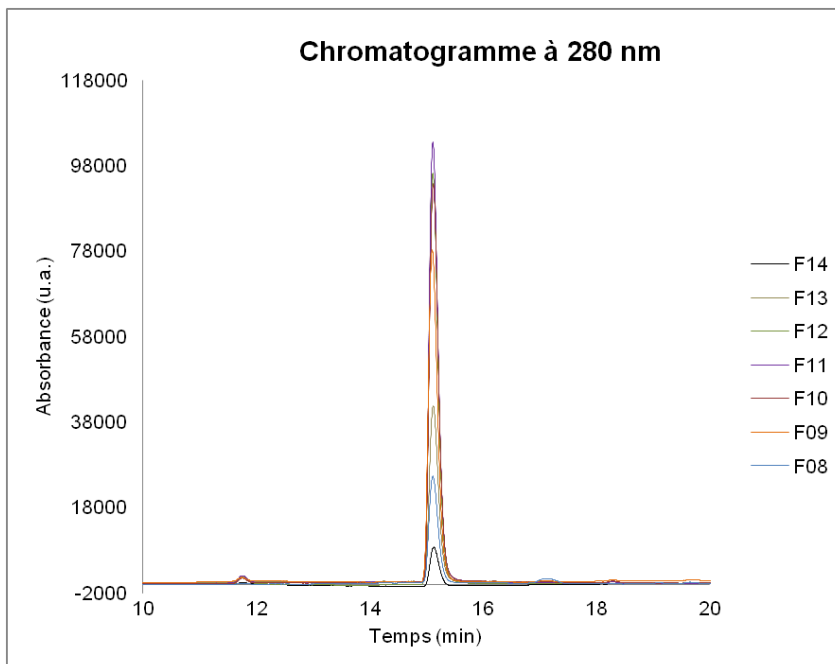


Figure 14 : Profils chromatographiques en phase inverse (280 nm) des fractions issues de la CPC contenant l'épicatéchine par analyse en CLHP-DBD-SM.

### **3. Résultats :**

#### **a. Synthèse et purification des molécules colorées « modèles » :**

##### **1/ Synthèse des molécules colorées :**

##### ***1.1. Optimisation de la synthèse de produits colorés issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine :***

Trois mesures à l'oxygraphe ont été effectuées afin de déterminer une activité enzymatique moyenne de l'extrait brut de polyphénoloxidase (PPO). Celle-ci est de 1825 nkatal/mL (écart type de 186.35). Les différentes modalités d'activités enzymatiques testées en petits volumes ont toutes été préparées en se basant sur cette moyenne. La comparaison des différents profils résultant de ces tests montre qu'une activité PPO de 36 nkatal/mL de milieu réactionnel permet, dans nos conditions expérimentales, une synthèse plus importante de composés colorés (figure 11). Ce niveau d'activité enzymatique a donc été retenu pour la synthèse en grand volume (1L de milieu réactionnel).

Le profil phénolique du milieu modèle résultant de l'oxydation de l'épicatéchine en grand volume est présenté en figure 12. A 280 nm, il apparaît clairement que l'épicatéchine résiduelle (m/z 289) est le composé largement majoritaire. A 420 nm, trois pics majeurs bien résolus sont visibles sur les chromatogrammes, ces pics correspondent à des produits d'oxydation colorés (figure 12). L'aire de ces pics a été intégrée pour une estimation approximative de la quantité de la « matière colorée » formée dans le milieu d'oxydation a été réalisée en se basant sur le coefficient de réponse à 420 nm du POPj, seul composé modèle « jus/cidre » dont le coefficient de réponse était accessible sur le système CLHP - analytique. Selon cette estimation, la proportion de matières colorées dans le milieu de synthèse serait d'environ 9%.

Sur la base des informations fournies par la spectrométrie de masse, ces composés sont identifiés dans un premier temps comme :

- Une déhydrodicatéchine de type A présentant un temps de rétention de 24.20 minutes et une masse moléculaire de 576 amu (atomic mass unit) comme l'atteste son m/z de 575. Ce produit sera codé pour la suite des manipulations en **D575**.
- Deux déhydrotricatéchines, l'une présentant un temps de rétention de 12.4 minutes et un m/z de 861, codée **T861** ; et le second présentant un temps de rétention de 17.3 minutes et un m/z de 863, codée **T863**.



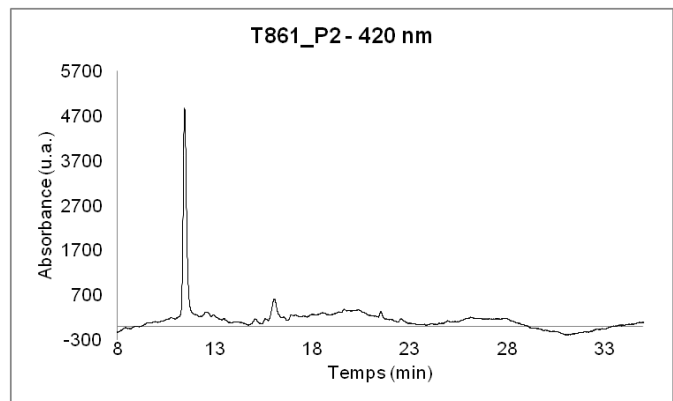
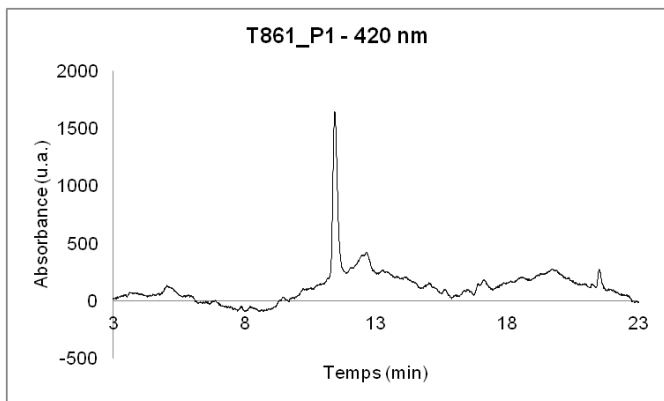


Figure 15 : Profils à 420 nm des pools P1 et P2 contenant le produit T861 après analyse en CLHP-DBD-SM.

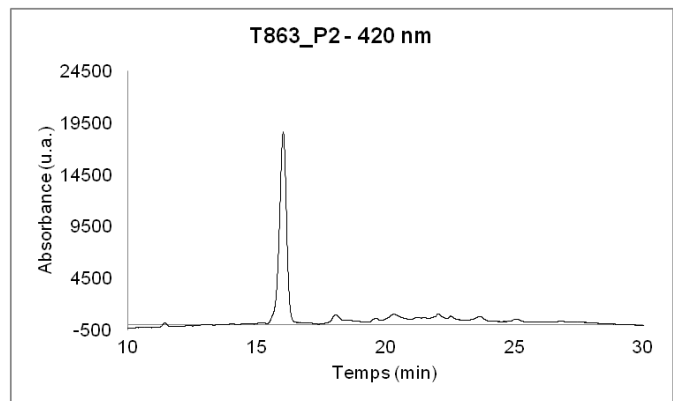
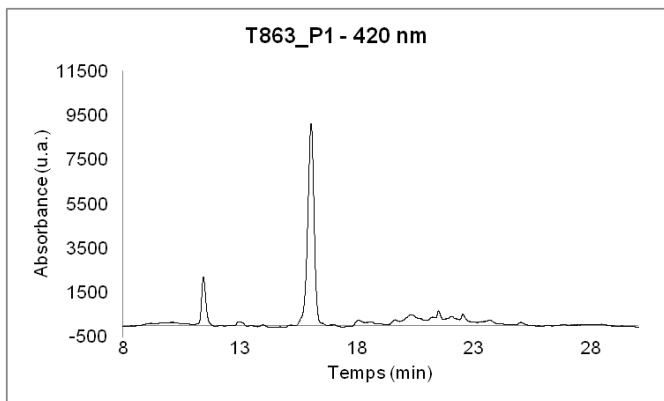


Figure 16 : Profils à 420 nm des pools P1 et P2 contenant le produit T863 après analyse en CLHP-DBD-SM.

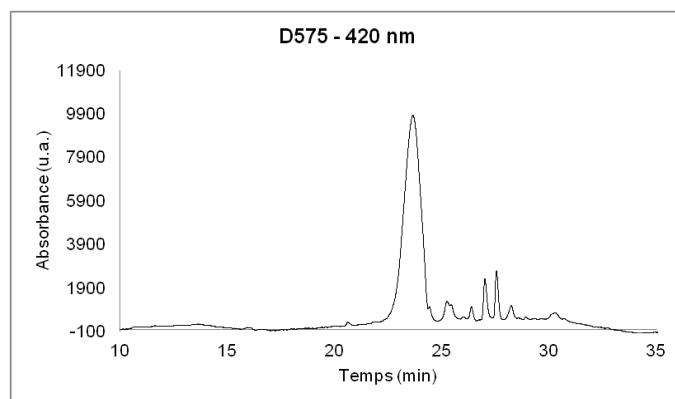


Figure 17 : Profil à 420 nm du pool contenant le produit D575 après analyse en CLHP-DBD-SM.

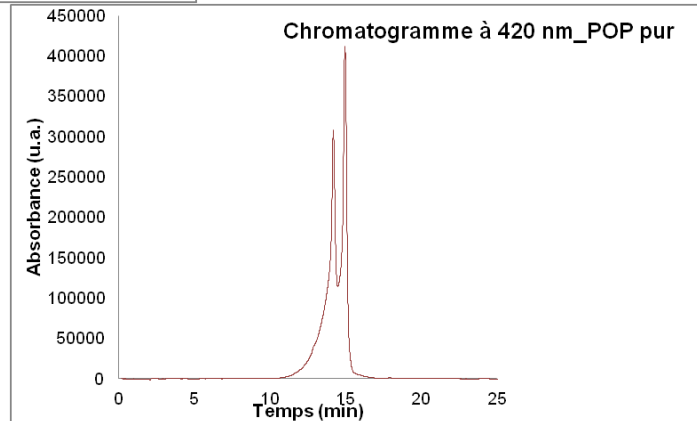
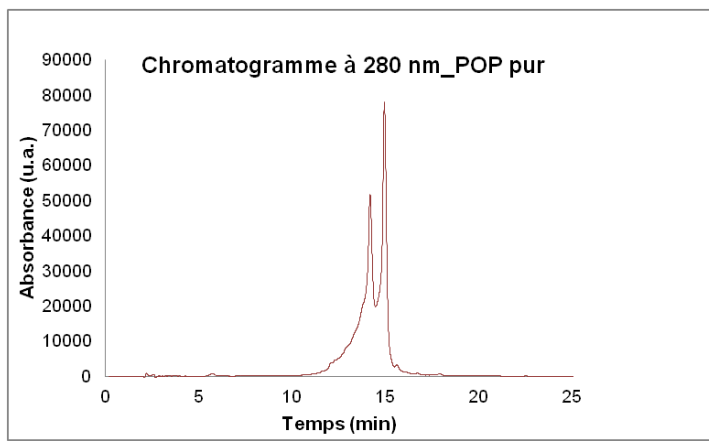


Figure 18 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du POP pur après analyse en CLHP-DBD-SM.

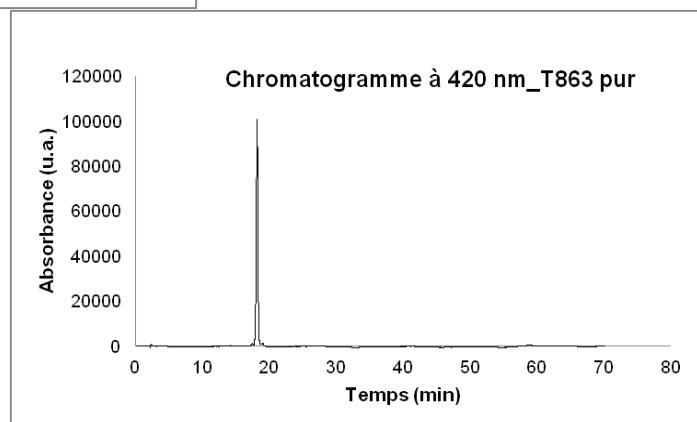
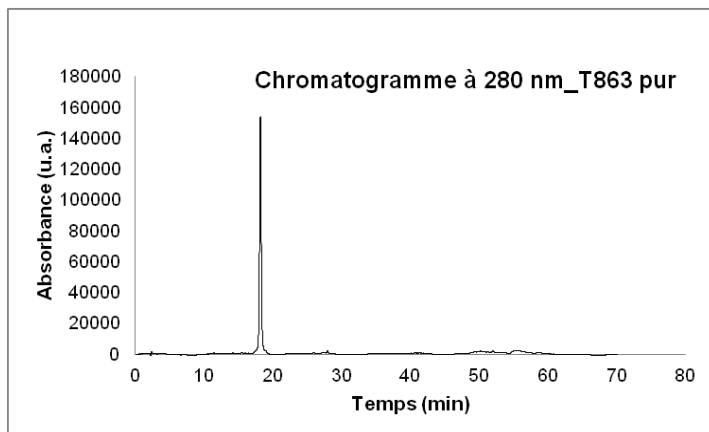


Figure 19 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du T863 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.

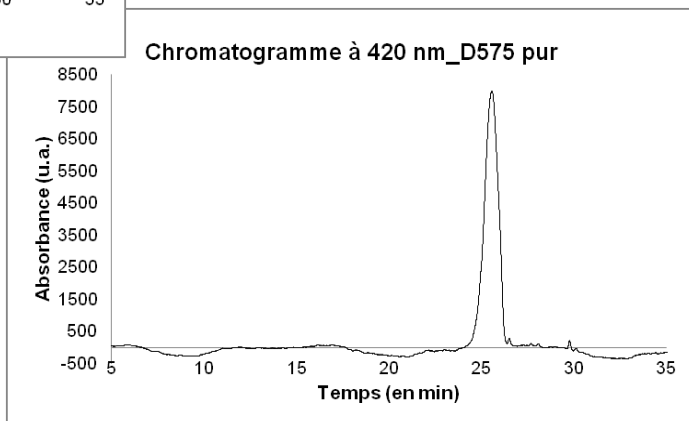
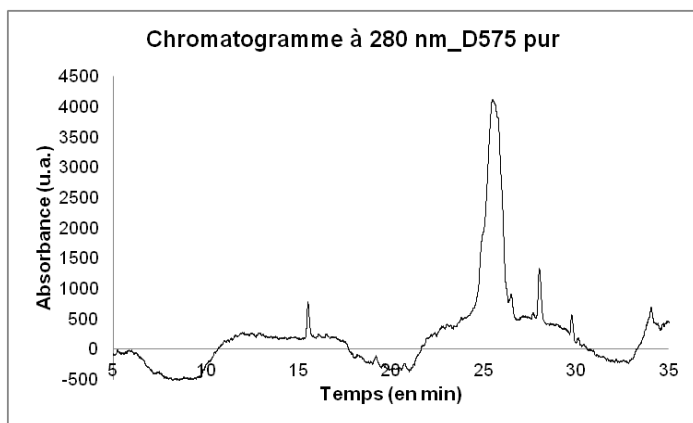


Figure 20 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du D575 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.

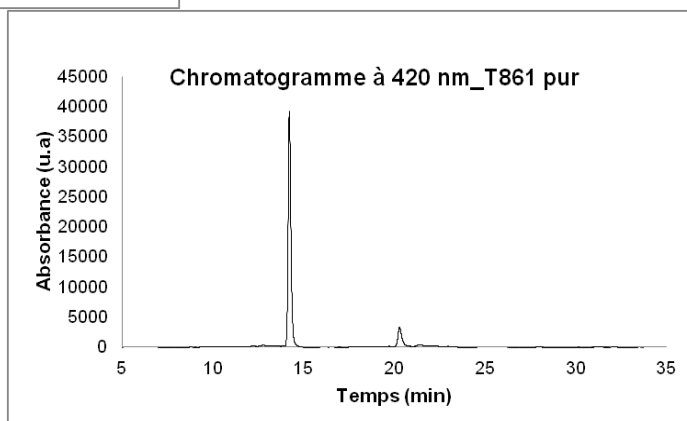
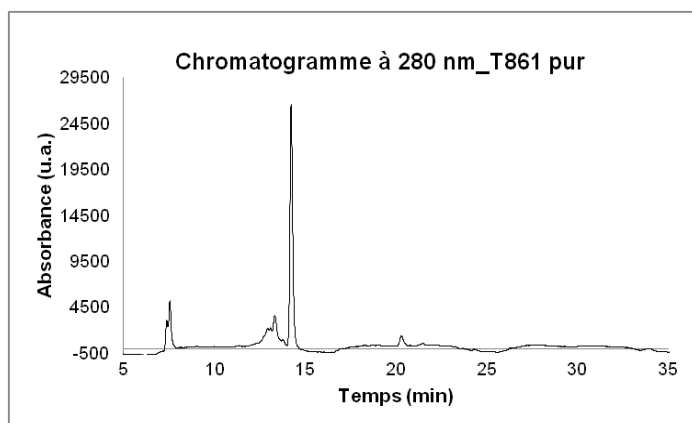


Figure 21 : Profils à 280 nm (gauche) et à 420 nm (droite) du T861 pur après analyse en CLHP-DBD-SM.

## **2/ Purification des composés colorés d'intérêt :**

A l'issue du passage du milieu d'oxydation enzymatique d'épicatéchine en CLHP préparative afin d'éliminer les composants non phénoliques du milieu d'incubation enzymatique (notamment le tampon malate), une masse d'échantillon de 1.607 g est obtenue, sachant que les composés colorés ne représentent, selon notre estimation, qu'environ 9% de cette quantité globale.

Après réalisation des tests préliminaires de systèmes de solvants et calculs des  $K_d$  en mode descendant et ascendant pour l'épicatéchine, le dimère et le trimère de  $m/z$  863, deux systèmes se révèlent intéressants dans le cadre de notre étude avec des valeurs proches de 1 (table 5). Les calculs de  $K_d$  n'ont pu être réalisés sur le trimère de  $m/z$  861 car aucun des profils polyphénoliques permettait une bonne intégration des pics de ce composé.

La modalité *Lukasz\_test*, composé d'hexane, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau acidifié (1:8:2:7), présente des valeurs de  $K_d$  intéressantes en mode descendant pour l'épicatéchine ( $K_d$  de 1.5) et pour le dimère ( $K_d$  de 3.01). En mode ascendant ce système présente également un intérêt pour l'épicatéchine ( $K_d$  de 0.67) et pour l'un des trimères ( $K_d$  de 3.9).

La seconde modalité intéressante pour la séparation des composés est la modalité du système 10, composé d'hexane, d'acétate d'éthyle, d'éthanol et d'eau acidifié (1:5:1:5). En mode ascendant, ce système présente une valeur de  $K_d$  de 1.03 pour l'épicatéchine, et ne présente pas de valeurs de  $K_d$  intéressantes pour les composés colorés. *A contrario*, ce même système en mode descendant présente des valeurs de  $K_d$  intéressantes à la fois pour l'épicatéchine et le dimère, leurs valeurs de  $K_d$  étant respectivement de 0.96 et 2.21.

Ces valeurs correspondent à une bonne séparation des composés en sortie de colonne, c'est donc le système 10 en mode descendant qui est retenu pour réaliser la CPC.

A l'issue des CPC, les différents profils polyphénoliques des fractions obtenus (figure 13) sont analysés afin de regrouper celles contenant un même composé coloré d'intérêt (figure 14). Au final, cinq groupes de fractions ont été lyophilisées :

- Deux pools contenant T861 (figure 15) : T861\_P1 de masse 102.54 mg et T861\_P2 de masse 155.31 mg
- Deux pools contenant T863 (figure 16) : T863\_P1 de masse 107.2 mg et T863\_P2 de masse 44.48 mg
- Un pool contenant D575 (figure 17) : D575\_P1 de masse 62.5 mg

Cependant, ces fractions sont encore assez complexes et contiennent notamment un nombre élevé de composés incolores. Elles nécessitent donc un passage en CLHP semi-préparative pour parfaire la purification des molécules colorées.

Après la CLHP à l'échelle semi-préparative, qui correspond à la dernière étape de purification, quatre composés purs sont obtenus :

- 226.48 mg de POPj
- 37.14 mg de T863
- 6.42 mg de T861
- 3.86 mg de D575

Au vu des profils obtenus par CLHP-DBD-SM, la fraction de POPj et la fraction T863 (figure 18 et 19) présentent des chromatogrammes qui témoignent d'un haut niveau de pureté. Certes, le chromatogramme du produit POPj (figure 18) présente deux pics mais ceux-ci correspondent en fait aux deux formes diastéréoisomères de la molécule. Pour les composés D575 et T861 (figure 20 et 21), malgré la présence des composés colorés à 420 nm, des pics incolores sont présents en assez grandes quantités à 280 nm. Pour ces deux composés, une pollution de la fraction assez importante est observée, la purification n'est pas aussi bonne qu'avec le POPj et le T863.

#### **b. Etude des paramètres physico-chimiques impactant la couleur :**

Afin d'atteindre une valeur d'absorbance suffisante, situé entre 1 et 1.5 pour observer des évolutions éventuelles, il était nécessaire de déterminer la concentration en pigment à utiliser dans les plaques. D'après les résultats, une solution de 45 mg/L pour le POP et T863 sont nécessaires, pour T861 et D575, les concentrations à utiliser pour la mise en œuvre des plans sont de 1g/L.

Pour les tests de métaux, une oxydation induisant l'apparition de rouille a été observées dans les solutions de fer. Afin de limiter le phénomène, les solutions de fer ont été tamponnées avec une solution d'acide malique de 1 mM fixée à pH 3.7.

De plus, lors des tests, il a été constaté que la présence des films sur les microplaques en condition aérobie entraînait la formation de condensation qui risquait d'entraîner des changements dans le milieu par des phénomènes non souhaités. Pour remédier à ce problème, toutes les microplaques en condition aérobie ont été équipées de couvercle de stockage. Pour les microplaques en condition anaérobie, la présence du film anaérobie n'avait aucun effet négatif. Toutes les microplaques en condition anaérobie ont pu être filmées.

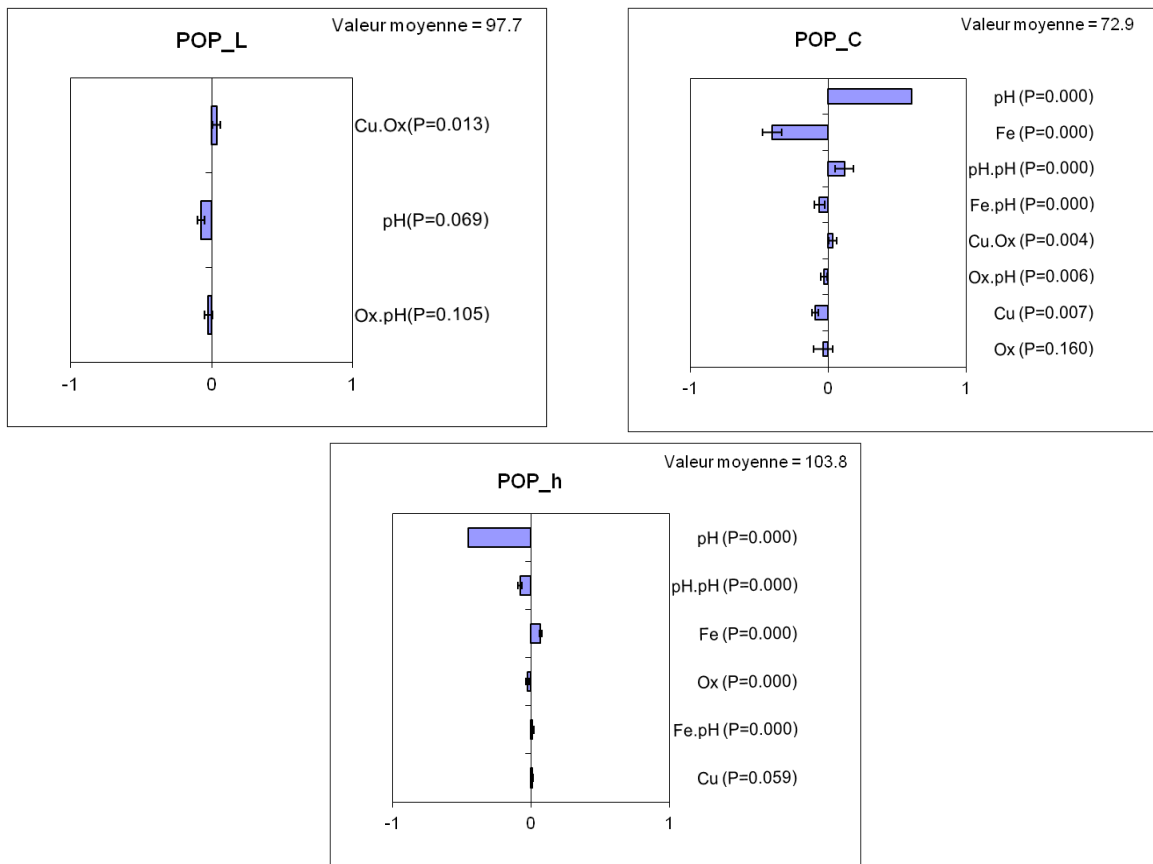


Figure 22 a: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le POP et pour les trois paramètres couleur (L\*C\*h)

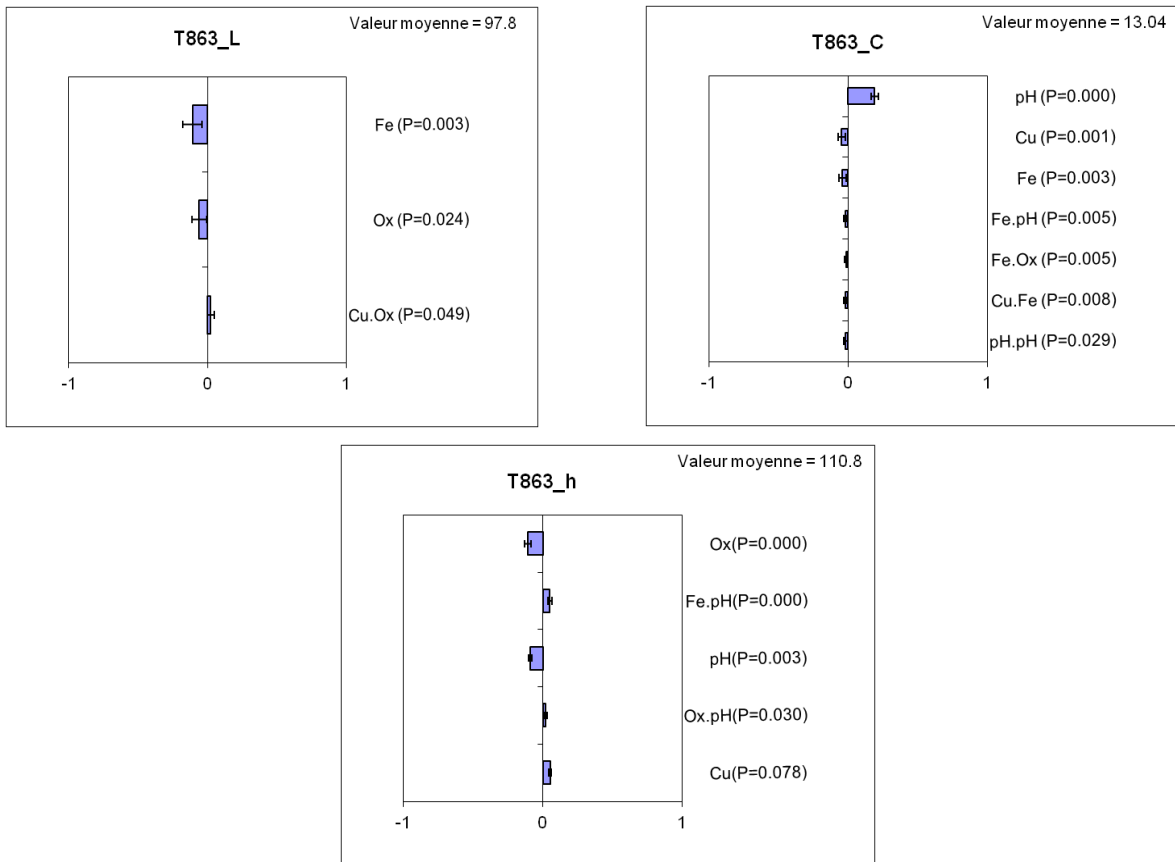


Figure 22 b: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le T863 et pour les trois paramètres couleur (L\*C\*h)

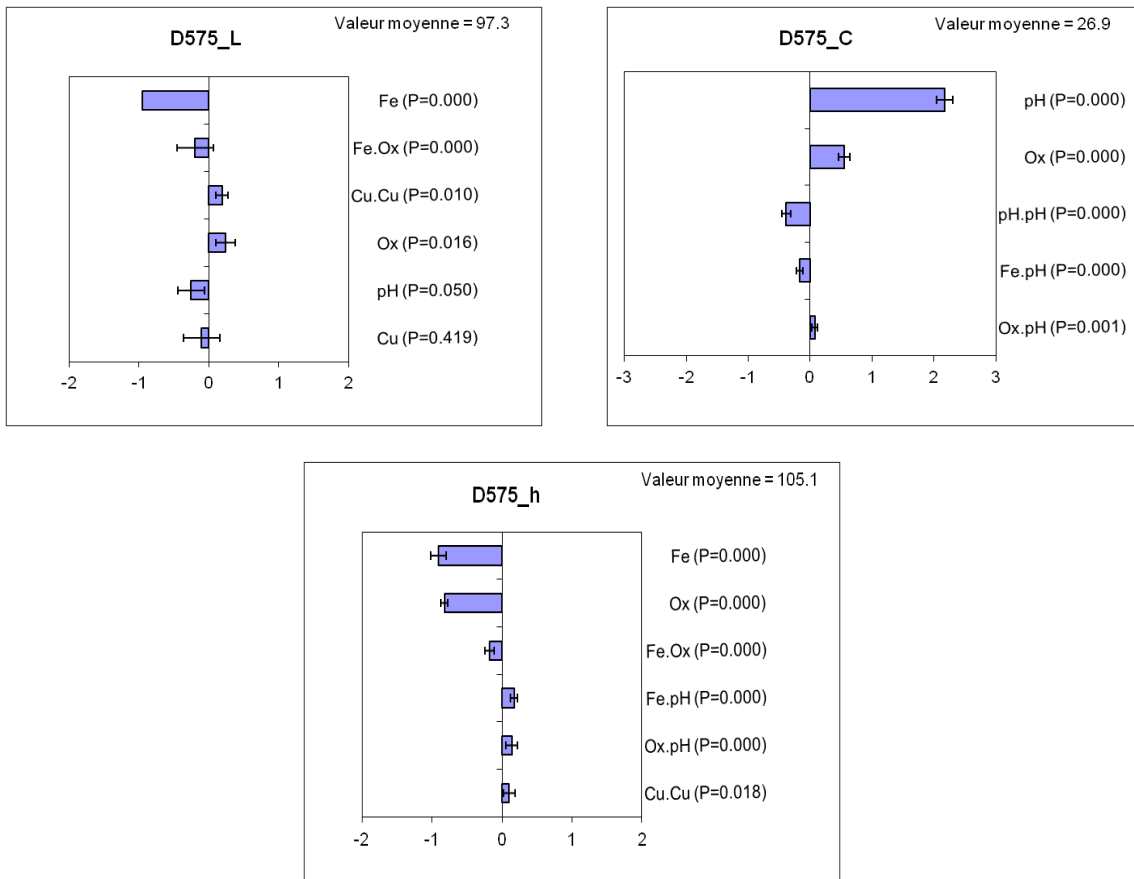


Figure 22 c: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le D575 et pour les trois paramètres couleur (L\*C\*h)

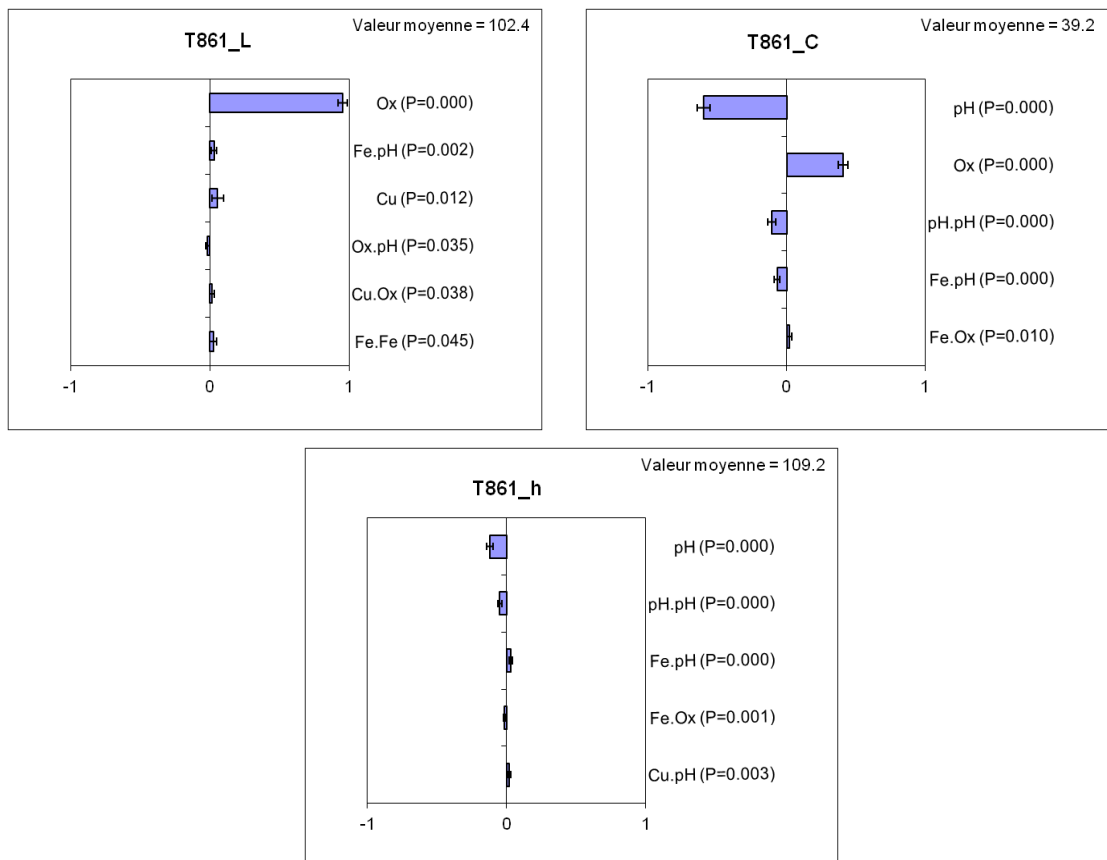


Figure 22 d: Histogrammes en barre de l'ensemble des coefficients du modèle GLM pour le T861 et pour les trois paramètres couleur (L\*C\*h)

Une analyse GLM (General Linear Model ou modèle linéaire général) a été réalisée afin de relier les variables expliquées que sont les paramètres de couleur  $L^*$ ,  $C^*$  et  $h$ , aux variables explicatives ou facteurs (pH, fer, cuivre et oxygène) à l'aide d'un modèle incluant les effets linéaires  $x$  (ex. le fer), les effets quadratiques  $x^2$  (ex. fer x fer) et les interactions (ex. fer x pH). Au final, l'analyse revient à calculer le rapport des carrés moyens factoriels sur les carrés moyens résiduels et à tester sa significativité par un test de Fischer, ce qui équivaut à une analyse multifactorielle. Après avoir testé la significativité de l'effet des facteurs et de leurs interactions sur l'expression de la couleur, cette analyse permet également d'estimer les coefficients du modèle. Ces coefficients donnent directement le sens de l'effet et son intensité sur le paramètre. Cette analyse s'utilise dans le cas où les variables explicatives sont quantitatives.

Des histogrammes en barres (figure 22 a, b, c, d) montrent l'ensemble des coefficients du modèle GLM obtenus pour les quatre composés et pour les trois paramètres de caractérisation de la couleur que sont la luminance ( $L^*$ ), la saturation ( $C^*$ ) et la teinte ( $h$ ). Ces valeurs permettent de hiérarchiser les effets selon l'importance de l'impact qu'ils ont sur les paramètres  $L^*C^*h$ .

**Pour la fraction POP (figure 22a) :**

Pour le paramètre  $L^*$ , seul 6.9% de la variance est expliqué par les différents facteurs et peu ou pas d'effets significatifs sont visibles. En revanche, les paramètres  $C^*$  et  $h$  présentent des pourcentages de variance expliquée respectivement de 80.9% et 98%. Pour la saturation ( $C^*$ ), ce sont les effets du pH, du fer, de l'effet quadratique du pH et la combinaison fer/pH qui ont le plus d'impact. Le fer induit une diminution de la saturation tandis que l'augmentation du pH en provoque l'augmentation. Pour la teinte, les facteurs expliquent la quasi-totalité de la variance (98%). L'angle de teinte augmente avec la concentration en fer, ce qui correspond sur le cercle des couleurs à une tendance vers le jaune-vert. Cependant, c'est le pH qui est le facteur le plus impactant sur la teinte : ce facteur a pour conséquence de diminuer  $h$  qui correspond à une tendance vers le orange.

**Pour la fraction T863 (figure 22b):**

Le paramètre  $L^*$  est peu modifié, seulement 10.7% de la variance est expliquée par ces effets. Avec un pourcentage de variance expliquée de 29%, les effets de l'oxygène et du pH ont un impact sur la teinte. L'oxygène et le pH entraînent une diminution de l'angle de teinte ce qui signifie que le composé tend vers une couleur orangée. Avec un pourcentage de variance expliquée de 67.2%, le paramètre  $C^*$  est le paramètre dont la variance est la plus expliquée par les différents effets. La saturation est fortement impactée par le pH qui va entraîner une augmentation de celle-ci.



**Pour la fraction D575 (figure 22c) :**

Avec un pourcentage de variance expliquée de 40.5%, la luminance est le paramètre couleur pour ce pigment le moins sensible aux effets des facteurs. Cependant, le fer est le facteur dont l'effet est le plus significatif (diminution de L\*). Le paramètre C\*, avec un pourcentage de 91.7% de variance expliquée, est en grande partie impacté par les facteurs pH et oxygène. Tous deux entraînent une augmentation de la saturation. Le paramètre h dont le pourcentage de variance expliquée est de 78.2%, est principalement influencé par l'oxygène et le fer qui provoquent une diminution de l'angle de teinte.

**Pour la fraction T861 (figure 22d) :**

A la différence des autres composés colorés, la luminance bouge beaucoup pour ce composé (variance expliquée de 96.4%). L'oxygène, qui provoque une augmentation de L\*, est le facteur le plus impactant. Avec 91% de variance expliquée, le paramètre C\* est principalement impacté par les effets du pH et de l'oxygène. Le pH induit une diminution de la saturation alors que l'oxygène en provoque l'augmentation. L'angle de teinte est le paramètre qui est le moins affecté par les effets (61% de variance expliquée). L'effet du pH induisant une diminution de h est le plus impactant dans ce cas.

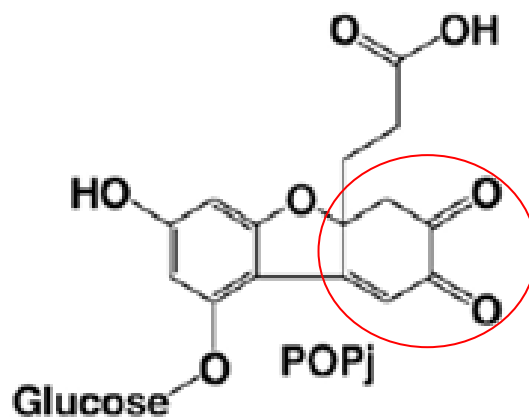
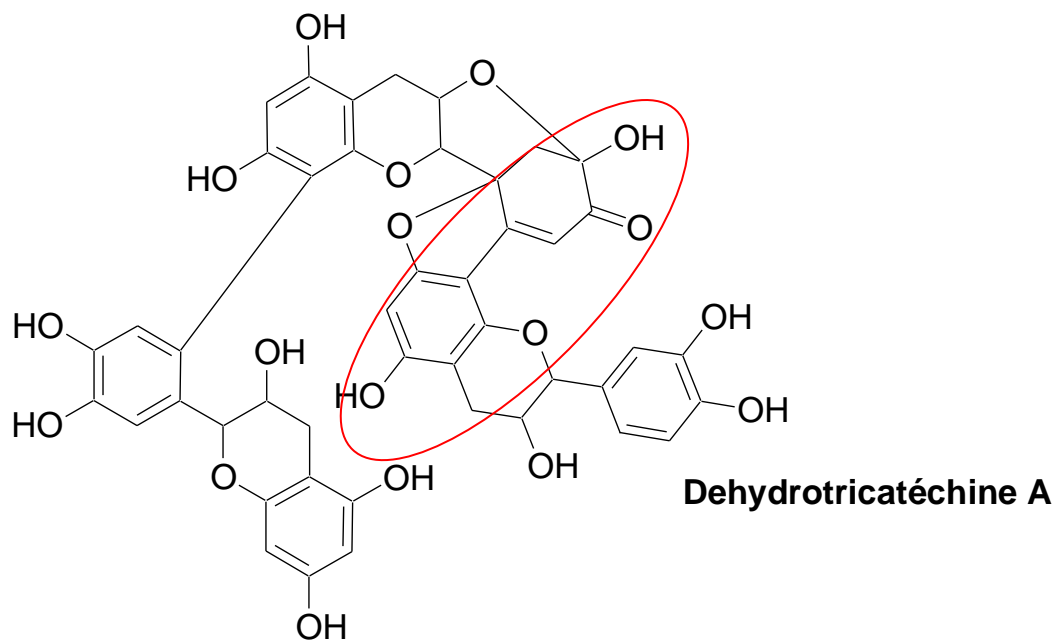


Figure 23 : Structure de la déhydrotricatéchine de type A (T863) en haut et du POP en bas (chromophore entouré en rouge).

#### **4. Discussion :**

La purification des composés à travers les différentes étapes a permis d'obtenir des fractions pures enrichies en produits colorés. De plus, les analyses en CLHP-DBD-SM nous ont permis de déterminer les fragments présents dans les fractions et donc de comprendre, de façon hypothétique, les mécanismes de formation de ces structures (annexes C et D). Le T863, déhydrotricatéchine de type A (annexe D), est le composé qui a été le plus enrichi au cours des étapes de purification (taux d'enrichissement total de 10.9). La déhydrodicatéchine de type A (D575), de structure déjà connue (annexe C), ainsi que la déhydrotricatéchine de type AA (T861), dont on connaît qu'une structure hypothétique (annexe D), présentent des taux d'enrichissement peu élevés (respectivement de 6.6 et de 1.5). Les profils chromatographiques à 280 nm de ces échantillons montrent la présence de contaminants non colorés correspondant vraisemblablement à des produits d'oxydation incolores de l'épicatéchine. Ce qui signifie que ces composés ne sont pas purs à 100%. La présence de ces produits incolores, en particulier dans l'échantillon D575, peut provoquer des changements importants dans l'expression de la couleur pour les différents facteurs étudiés. Notamment, il est possible que ces produits contaminants soient sensibles au phénomène d'oxydation induisant alors la formation de nouveaux produits colorés et donc interférant dans la mesure de la couleur due à la déhydrotricatéchine de type A (D575) ou à la déhydrotricatéchine de type AA (T861).

Malgré des taux d'enrichissement intéressant, seulement 3% de produits colorés ont été obtenus par rapport aux 9% estimés dans le milieu d'incubation initial. Ce qui met en avant la difficulté d'obtenir ces molécules colorées en grande quantité.

Les paragraphes suivants privilégient la discussion des relations structure moléculaire/propriétés colorantes des fractions POPj (Produit d'Oxydation de la Phloridzine) et T863 (Déhydrotricatéchine de type A) qui correspondent à des molécules hautement purifiées. En revanche, une telle discussion nous paraissait sujette à caution pour les deux autres fractions, D575 et T861, qui se sont avérées largement contaminées par des molécules incolores ou par des structures moins bien définies.

Pour certains critères, on constate que le POP et le T863 se comporte de façon similaire. Ainsi, peu d'effets sont constatés sur le paramètre  $L^*$  qui conserve une valeur moyenne proche de 100 dans toutes les conditions. Ce qui nous indique que ces composés restent *a priori* bien solubles et ne génèrent pas de trouble ou d'opalescence dans la limite des conditions du plan. Pour la saturation,  $C^*$ , on constate que la valeur moyenne de celle-ci est beaucoup plus importante pour le POPj (valeur moyenne de 73) que pour le T863 (valeur de 13). Cette observation est directement liée à la structure des molécules. Le chromophore est différent dans les deux molécules, de plus il représente une part beaucoup plus

importante de la molécule dans le POPj que dans le cas de la déhydrotricatéchine A (figure 23). C'est donc assez logiquement que la capacité colorante (exprimée par la valeur de  $C^*$  pour les deux fractions) est moins importante pour le T863 que pour le POP.

On constate aussi que c'est le facteur pH qui a le plus d'effet sur la saturation des deux composés, une augmentation du pH induisant une augmentation de celle-ci. On peut interpréter cela en termes d'augmentation du « pouvoir colorant » (augmentation de l'intensité de coloration pour une même concentration de molécules colorantes). On remarque que cet effet du pH est plus important pour le POPj que pour T863. Cela s'expliquerait en partie par le fait que le POPj présente dans sa structure une fonction acide carboxylique libre dont l'état de protonation/déprotonation est fortement influencé par le pH. Cet effet très marqué du pH dans le cas du POPj est également observé pour la teinte. Une nette diminution de  $h$ , correspondant à une teinte plus rouge/orangée, est observée lorsque le pH augmente. Bien que significatif, cet effet est beaucoup moins marqué pour le T863. La fonction carboxylique est probablement à nouveau impliquée dans cet effet.

Globalement, pour le facteur oxygène, on s'attend à ce qu'il y ait plus d'impact significatif sur les molécules qui peuvent s'oxyder davantage, comme c'est le cas pour le T863 qui présente un niveau d'oxydation moins élevé que celui du POPj. Lors des expériences, l'effet de l'oxygène a été notable sur l'expression de l'angle de teinte du T863 alors qu'il n'a pas été observé sur le POPj. Il est possible que la fonction catéchol présente dans la structure du T863 subisse une oxydation alors que le POPj, qui ne possède pas de fonction catéchol et qui se trouve déjà dans un niveau d'oxydation élevé, ne peut pas subir une telle oxydation.

Les métaux sont susceptibles d'influencer la couleur selon deux phénomènes différents : (i) ils peuvent catalyser l'oxydation des phénols et notamment les fonctions de type catéchol ; (ii) ils peuvent former des complexes avec ces mêmes fonctions catéchols et leurs formes oxydées (semi-quinones et quinones). De plus, l'augmentation du pH favorise ces deux phénomènes. Les structures catéchols ont un impact direct sur la formation des chromophores, or si ces structures sont impliquées dans des complexes avec les métaux, il est possible que la teinte soit impactée. La structure du T863 comprend plus de forme catéchol que celle du POPj, ce qui signifierait que le T863 a plus de chance de former des complexes avec les métaux. Ce que l'on observe au niveau des résultats pour le T863 semble aller dans le sens de ces hypothèses. De plus, l'interaction pH/fer dont on a vu l'impact sur le T863, permet d'appuyer un peu plus ces hypothèses. En effet, en augmentant le pH, on augmente la déprotonation de la molécule donc la formation de fonction catécholates en favorisant ainsi la formation de complexe métaux-phénols.

## **5. Conclusion :**

L'objectif de cette étude était de connaître et de comprendre les différents mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression de la couleur des cidres et des jus de pommes. Pour ce faire, et afin de faciliter le travail d'interprétation, les travaux ont été réalisés avec des molécules « modèles » colorées pertinentes vis-à-vis du modèle jus/cidre. Notre choix s'est porté sur deux types de chromophores : le POPj qui a déjà été identifié dans les jus de pommes et des trimères et dimères issus de l'oxydation enzymatique d'épicatéchine non identifiés dont la structure était probablement proche des chromophores présents en milieu réel. Seulement deux familles de polyphénols ont pu être testées réellement : la famille des dihydrochalcones (POPj) et celle des déhydrocatéchines (T863). Il serait donc intéressant d'étendre ces travaux à d'autres familles de polyphénols afin d'être le prêt de ce qui se passe en réalité dans les jus de pommes et les cidres. Effectivement, avec seulement deux familles testées, les effets observés restent encore très expérimentales et donc éloignés de ce qui se passe dans le produit fini. Il est envisageable, d'étendre ces tests par exemple à la famille des tanins, largement présente dans les jus de pommes et les cidres.

Les étapes de purification ont été essentielles dans ce stage. La technique de CPC a permis d'obtenir des molécules pures sur lesquelles il a été possible de réaliser les expériences afin de connaître et de comprendre un peu mieux les mécanismes d'expression de la couleur. De plus, cette méthode présente un réel avantage au niveau de la consommation de solvants par rapport à des techniques comme celle de la CLHP à l'échelle préparative qui nécessite une quantité importante à ce niveau. Par la suite, il serait intéressant d'essayer d'appliquer cette technique sur de véritables jus plutôt que sur des solutions modèles.

Au cours des différentes expériences aucun changement majeur au niveau de l'expression de la couleur des fractions purifiées n'a été observé. Cependant, certains effets ont permis de constater que le POP et le T863 avaient des comportements similaires. Le T863, déhydrotricatéchine de type A, s'est démarqué au niveau de la stabilité de la couleur vis-à-vis du pH. Si la stabilité du T863 est confirmée, grâce à de nouveaux travaux, il apparaîtra comme étant un bon candidat dans l'élaboration de nouveaux colorants alimentaires naturels.

En perspective, d'autres facteurs pourraient être analysés. De nombreux travaux ont déjà démontré l'impact sur la modulation et la stabilité de la couleur de phénomènes tels que ceux de la co-pigmentation ou encore du vieillissement accéléré.

## 6. Références bibliographiques

### Articles de Périodiques :

- Bernillon S., Guyot S., Renard C. M. G. C.,** 2004. Detection of phenolic oxidation products in cider apple juice by high-performance liquid chromatography electrospray ionisation ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 18, 939-943.
- Castaneda-ovando A., Pacheco-Hernandez M. de L., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A.,** 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, Vol. 113, 859-871.
- Clark A. C., Scollary G. R.,** 2002. Copper(II)-mediated oxidation of(+)-catechin in a model white wine system. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 8, 186-195.
- Dangles O., Elhabiri M., Brouillard R.,** 1994. Kinetic and Thermodynamic Investigation of the Aluminium-Anthocyanin Complexation in Aqueous Solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2587-2596.
- Danilewicz J. C.,** 2007. Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System : Central Role of Iron and Copper. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 58, No.1, 53-60.
- Danilewicz J. C.,** 2011. Mechanism of Autoxidation of Polyphenols and Participation of Sulfite in Wine : Key Role of Iron. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 62, No. 3, 319-328.
- Delaunay J.-C., Castagnino C., Chèze C., Vercauteren J.,** 2002. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A.*, Vol. 964, 123-128.
- Es-Safi N.-E., Cheynier V., Moutounet M.,** 2003. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 38, 153-163.
- Foucault A. P., Chevolot L.,** 1998. Counter-current chromatography : instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A.*, Vol. 808, 3-22.
- Friedman M., Jurgens H. S.,** 2000. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, 2101-2110.
- Guyot S., Vercauteren J., Cheynier V.,** 1996. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, Vol. 42, No. 5, 1279-1288.

- Guyot S., Marnet N., Laraba D., Sanoner P., 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.*, Vol. 46, 1698-1705.
- Guyot S., Serrand S., Le Queré J.-M., Sanoner P., Renard C. M.G.C.**, 2007. Enzymatic synthesis and physicochemical oxidation products (POP), a new water-soluble yellow dye deriving from apple. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 8, 443-450.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J.**, 1990. Kinetic studies on apple polyphénols oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 38, No. 7, 1437-1441.
- Lu Y. Ma W., Hu R., Berthod A., Pan Y.**, 2009. Rapid and prepartive separation of traditional Chinese medicine *Evodia rutaecarpa* employing elution-extrusion and back-extrusion counter-current chromatography : Comparative study. *Journal of Chromatography A.*, Vol. 1216, 4140-4146.
- Nicolas J., Cheynier V., Fleuriet A., Rouet-Mayer M.-A.**, 1993. Polyphenols and enzymatic browning. *Polyphenolic Phenoma*, INRA Editions Paris, 165-175.
- Nicolas J., Richard-Forget F., Goupy P., Amiot M.-J., Aubert S.**, 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol.34, No. 2, 109-157.
- Nkihili E., Loonis M., Mihai S., El Hajji H., Dangles O.**, 2014. Reactivity of food phenols with iron and copper ions : binding, dioxygen activation and oxidation mechanisms. *Food and Function*, Vol.5, 1186-1202.
- Torskangerpoll K. Andersen O. M.**, 2004. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, Vol. 89, 427-440.

### **Chapitres d'ouvrages :**

- Brouillard R.**, 1988. Flavonoids and flower color. In *The Flavonoids, Advances in Research Since 1980*. Chapman & Hall, London, UK, (J.B. Harbone, ed.), 525-538.
- Chrisment A.**, 2011. Qualité de la couleur et nouvelles applications à l'apparence colorée. *La couleur des aliments de la théorie à la pratique*, Chap. 18, 229-245.
- Guyot S., Bernillon S., Poupard P., Renard C. M.G.C.**, 2008. Multiplicity of phenolic oxidation products in apple juices and ciders, from synthetic medium to commercial products. *Recent advances in polyphenols research*, Chap. 12, 278-292.
- Guyot S., Poupard P.**, 2010. Les polyphénols de la pomme. Impact des procédés cidricoles. *Polyphénols et procédés*, Chap. 2, 103-158

**Zollinger H.**, 2003. Color Chemistry. *Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments. Third, revised edition, Chap. 2*, 15-65.

### **Rapports :**

**Bauduin R.**, 2006. Guide pratique de la fabrication du cidre. *Ouvrage du CTPC*, 71pp.

**Poupard P.**, 2008. Oxydation des procyanidines en solution modèle jus de pomme : caractérisation structural des produits et étude des propriétés tannantes. *Thèse Université Rennes 1*, 224pp.

**Weber E.**, 2011. Etude préliminaire en milieu modèle de la perception et de la stabilité de la couleur des jus de pomme et des cidres. Rapport stage master 2 INRA, 21pp.

**Zakazewski L.**, 2014. Préparation et analyse d'extraits polyphénoliques de pommes. *Cahier de laboratoire INRA*, 27pp.

### **Sites internet :**

#### **Site internet n°1 :**

INRA (Institut National des Recherches Agronomiques), 2013. Jalons historiques. [Publié : 16 janvier 2013] / <http://institut.inra.fr/Reperes/Jalons-historiques>

#### **Site internet n°2 :**

INRA équipe BIA-PRP (Biopolymères, Interactions et Assemblages – Polyphénols, Réactivités, Procédés), 2013. PRP : Polyphénols, Réactivités, Procédés. [Publié : 09 octobre 2013] / <http://www6.angers-nantes.inra.fr/bia/Equipes-de-recherche/PRP-Polyphenols-Reactivite-Procetes>

#### **Site internet n°3 :**

IFPC (Institut Français des Productions Cidricoles), non daté. Polyphénols et cidres. [Consulté : 03 juillet 2014] / [http://www.ifpc.eu/fileadmin/users/ifpc/infos\\_techniques/JF\\_polyphenols\\_S\\_GUYOT.pdf](http://www.ifpc.eu/fileadmin/users/ifpc/infos_techniques/JF_polyphenols_S_GUYOT.pdf)



## Annexe A :

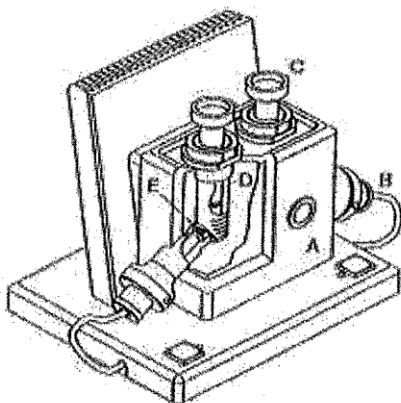
### Mesure de l'activité PPO par oxygraphe

Une étude de l'activité enzymatique de la PPO d'un extrait brut a été menée à l'aide d'un oxygraphe OROBOROS® type Oroboros-2k (PAAR). Cet appareil permet de mesurer l'évolution de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel au cours du temps.

Le milieu est placé dans une cuve cylindrique de 2 mL sous agitation continue. La cuve est fermée par un piston traversé par un capillaire permettant l'injection de l'enzyme. L'élément de mesure est une électrode de Clark composée d'une cathode en or et d'une anode en argent reliées par un électrolyte (KCl). L'ensemble est séparé de l'échantillon analysé par une membrane en téflon perméable à l'oxygène. La différence de potentiel appliquée entre les électrodes provoque une réduction de l'oxygène à la surface de la cathode. L'intensité du courant dépend du flux d'oxygène au niveau de la cathode qui est proportionnel à la concentration en oxygène dissous dans l'échantillon.

La consommation de l'oxygène est suivie au cours du temps après injection de 50µL d'enzyme (diluée 40 fois) dans 2 mL de substrat. Le substrat, solution d'épicatéchine à 5mM, est préparé dans un tampon malate de 0.1 M à pH 5.7.

#### Schéma de l'oxygraphe OROBOROS® :



- A. Bloc isolant thermo-régulé.
- B. Insertion angulaire de la sonde de mesure.
- C. Piston amovible dont le réglage définit le volume réactionnel ; il est traversé par un orifice capillaire qui permet l'injection d'inhibiteurs et l'évacuation de l'excès de liquide.
- D. Cuve en verre.
- E. Partie de la sonde en contact avec le milieu réactionnel.
- F. Joint d'étanchéité.
- G. Barreau magnétique pour agitation

## Annexe B :

### Méthodes de calculs des espaces couleurs L\*a\*b\* et L\*C\*h\*

#### Méthode de conversion des données spectrophotométriques en données colorimétriques :

Trois types de données sont nécessaires pour ces calculs. Il faut disposer pour toute la gamme des longueurs d'onde dans le visible (de 400 à 700 nm) de la valeur de l'illuminant D65 et des valeurs tristimulus XYZ et de la transmittance de l'échantillon T.

Pour disposer de la relation  $D65(\lambda)$ , nous avons établi un tableau de l'énergie de  $D65(\lambda)$  et des valeurs de  $X(\lambda)$ ,  $Y(\lambda)$ ,  $Z(\lambda)$  en fonction de la longueur d'onde dans lequel la macro va rechercher les valeurs correspondantes à la longueur d'onde en cours de calcul. Au vu du spectre de l'illuminant (figure 1), une fonction n'a pu être établit, c'est pourquoi il est nécessaire de travailler point par point. Le même principe a été appliqué aux courbes des 3 courbes tristimulus (figure 2).

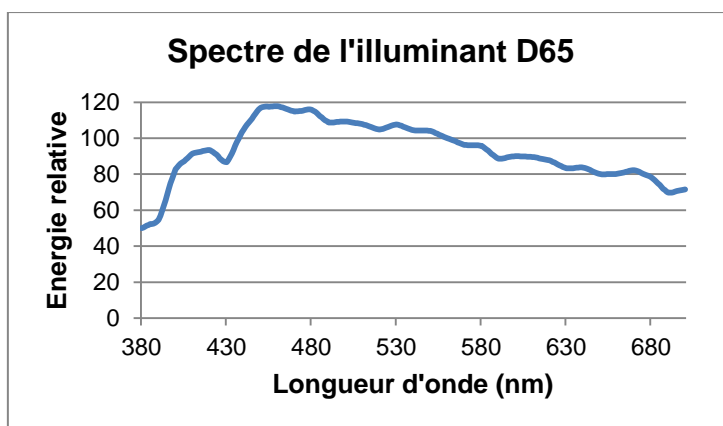


Figure 1 : Spectre de l'illuminant D65

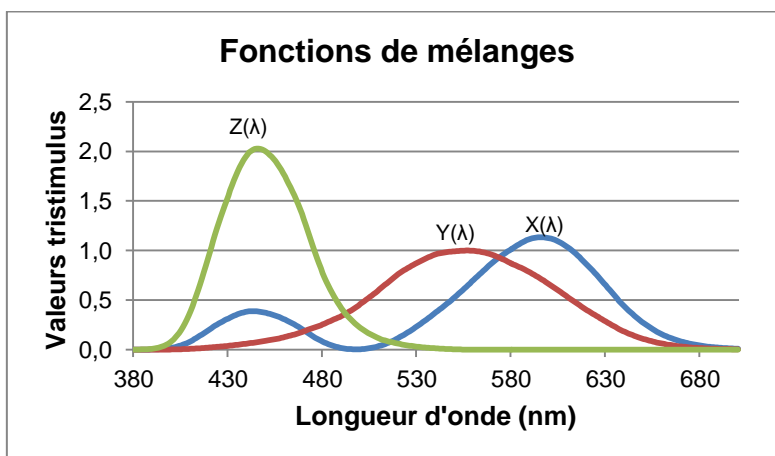


Figure 2 : Fonctions de mélanges  $X(\lambda)$ ,  $Y(\lambda)$  et  $Z(\lambda)$

Pour nos solutions colorées, la mesure du spectre de DO en microplaque permet d'avoir accès au spectre de transmittance de l'échantillon qui correspond au pourcentage d'énergie transmise pour chaque longueur d'onde. En multipliant cette donnée par le spectre de l'illuminant D65, on

détermine le spectre de la lumière perçue au travers de l'échantillon étudié. En multipliant par les valeurs des courbes tristimulus  $X(\lambda)$ ,  $Y(\lambda)$  et  $Z(\lambda)$ , nous obtenons les trois réponses en fonction des longueurs d'onde. On détermine également  $P_y$ , qui correspond au produit de l'illuminant D65 et de la courbe  $Y(\lambda)$ , et qui est donc indépendant de notre échantillon.

Enfin, les intégrales de chacune de ces réponses normalisées par  $P_y$  nous donnent les valeurs XYZ qui correspondent aux réponses rouges, vertes et bleues de notre échantillon. Ces données peuvent être facilement transformées dans les différents espaces couleurs présentés précédemment à l'aide de formules de calculs, ce qui permet d'obtenir des données  $L^*a^*b^*$  et  $L^*C^*h^*$  attendues pour notre étude.

**Formules de calculs :**

**CIE 1964 (Observateur 10°) :**

$$X_{10^\circ} = K \int_{280}^{700} S(\lambda) X(\lambda) R(\lambda) d\lambda$$

$$Y_{10^\circ} = K \int_{280}^{700} S(\lambda) Y(\lambda) R(\lambda) d\lambda$$

$$Z_{10^\circ} = K \int_{280}^{700} S(\lambda) Z(\lambda) R(\lambda) d\lambda$$

$$K = \frac{100}{\int_{280}^{700} S(\lambda) Y(\lambda) d\lambda}$$

Où :

$S(\lambda)$  : Distribution relative spectrale d'énergie de l'illuminant

$X(\lambda)$ ,  $Y(\lambda)$ ,  $Z(\lambda)$  : Fonctions de mélanges des couleurs pour l'observateur standard 10° (CIE 1964)

$R(\lambda)$  : Réflectance spectrale de l'échantillon

Dans notre cas  $R(\lambda)$  est remplacé par  $T(\lambda)$  qui représente le spectre de transmittance :

$$T(\lambda) = 100 \times 10^{-DO(\lambda)}$$

### **Formules XYZ vers L\*a\*b\* :**

Variable de clarté L\* :

$$L^* = 116 \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16$$

Coordonnées de chromaticité a\* et b\* :

$$a^* = 500 \left[ \left( \frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right]$$

$$b^* = 200 \left[ \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right]$$

Où :

X, Y, Z : Valeurs tristimulus XYZ (pour l'observateur standard de 2°) ou X<sub>10</sub>, Y<sub>10</sub>, Z<sub>10</sub> (pour l'observateur supplémentaire de 10°) pour l'échantillon

X<sub>n</sub>, Y<sub>n</sub>, Z<sub>n</sub> : Valeurs tristimulus XYZ (pour l'observateur standard de 2°) ou X<sub>10</sub>, Y<sub>10</sub>, Z<sub>10</sub> (pour l'observateur supplémentaire de 10°) pour le diffuseur par réflexion idéale

Si les rapports  $\frac{X}{X_n}$ ,  $\frac{Y}{Y_n}$  ou  $\frac{Z}{Z_n}$  sont inférieurs à 0.008856, les équations ci-dessus sont corrigées comme suit :

$$\left( \frac{X}{X_n} \right)^{1/3} \text{ est remplacé par } 7.787 \left( \frac{X}{X_n} \right)^{1/3} + \frac{16}{116}$$

$$\left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \text{ est remplacé par } 7.787 \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} + \frac{16}{116}$$

$$\left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \text{ est remplacé par } 7.787 \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} + \frac{16}{116}$$

### **Formules L\*a\*b\* vers L\*C\*h\* :**

Saturation métrique C\* :

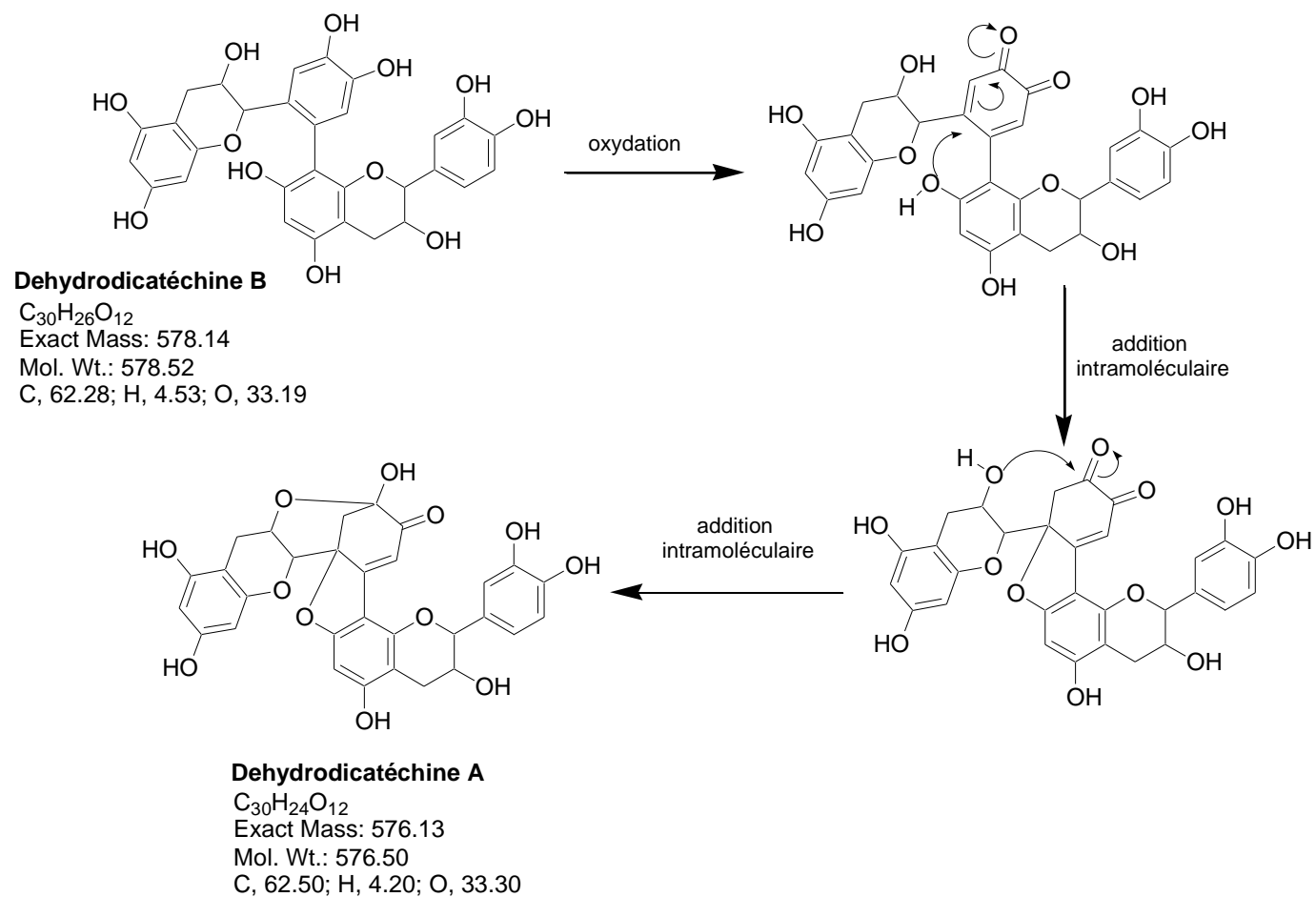
$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Angle de teinte métrique h\* :

$$h^* = \text{tg}^{-1} \left( \frac{b^*}{a^*} \right) [\text{degrés}]$$

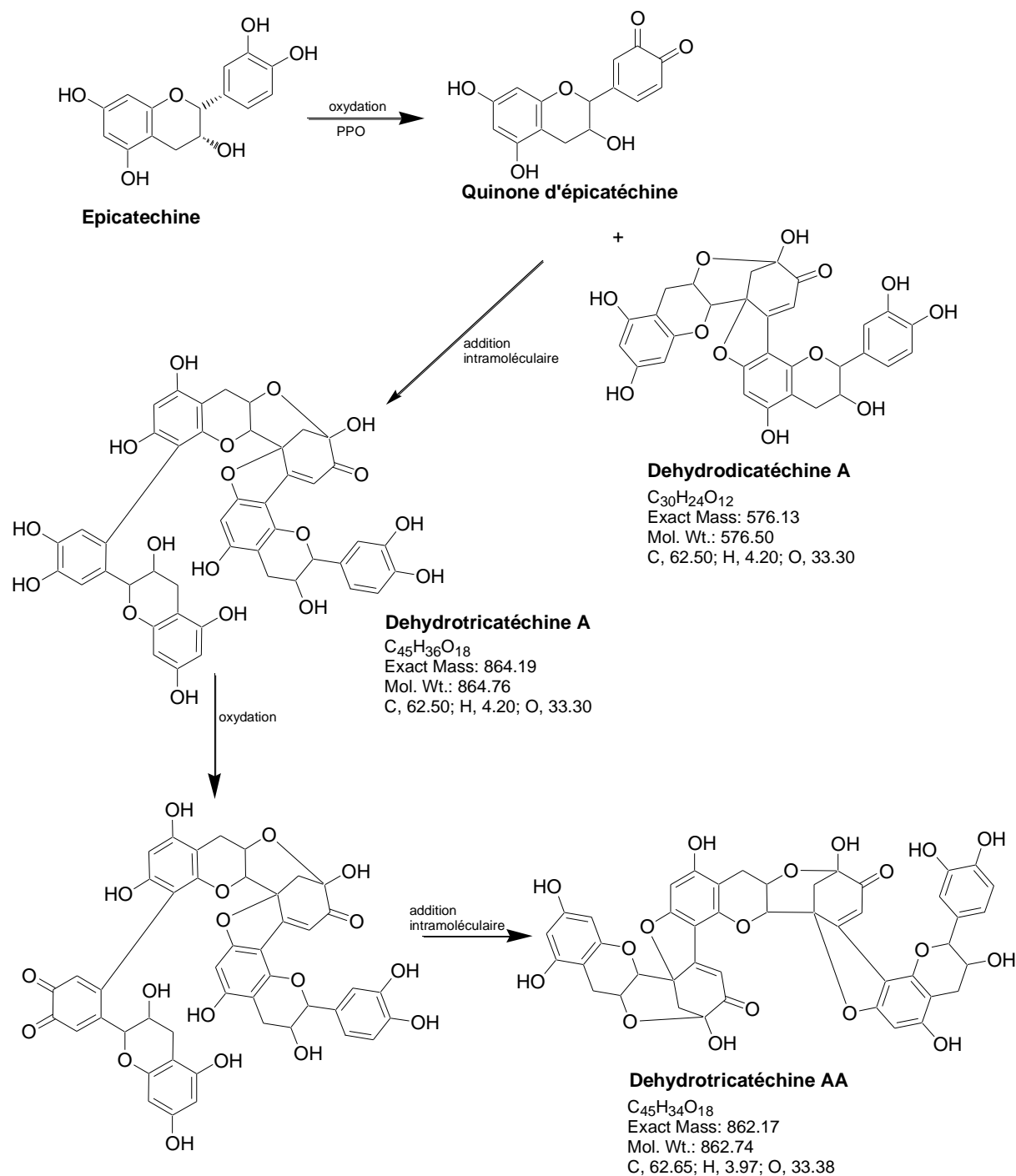
## Annexe C :


### Mécanisme de formation de la Dehydrodicatéchine A



## Annexe D :

### Mécanisme hypothétique de formation de la Dehydrotricatéchine A et AA



	<p><b>Diplôme / Mention</b> : Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie Agronomie Santé</p> <p><b>Spécialité</b> : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)</p> <p><b>Parcours</b> : II. Sélection, Production et Valorisation des Végétaux</p> <p><b>Option</b> : Elaboration de la Qualité et Valorisation des Végétaux</p> <p><b>Responsable d'option</b> : Carole DELEU</p>
<p><b>Auteur(s)</b> : CAËL Noémie</p>	<p><b>Organisme d'accueil</b> : UR 1268 BIA-INRA, Equipe PRP</p>
<p><b>Date de naissance</b> : 26/12/1989</p>	<p><b>Adresse</b> : Domaine de la motte, BP 35327 – 35653 Le Rheu Cedex</p>
<p><b>Nb pages</b> : 21 pages      <b>Annexe(s)</b> : 6 pages</p>	<p><b>Maître de stage</b> : Sylvain GUYOT (encadrant) ; Erell LE DEUN (co-encadrante)</p>
<p><b>Année de soutenance</b> : 2014</p>	
<p><b>Titre français</b> : Modulation et stabilité de la couleur des jus de pommes et des cidres : Impact des paramètres physico-chimiques du milieu.</p>	
<p><b>Titre anglais</b> : Modulation and stability of the color of apple juice and cider : Impact of physicochemical parameters of the medium.</p>	
<p><b>Résumé (1600 caractères maximum) :</b></p> <p>La couleur est l'un des critères organoleptiques majeurs des jus de pommes et des cidres mais reste un critère de segmentation de la filière cidricole peu maîtrisé. Les molécules responsables de cette couleur sont issues de l'oxydation des polyphénols de la pomme et correspondent à des structures présentes en faible concentration dans le milieu. Des travaux se sont déjà intéressés à la purification et aux structures de ces molécules encore mal connues aujourd'hui.</p> <p>La perception de la couleur peut être influencée par divers paramètres environnementaux comme le pH ou encore la présence de cations métalliques tels que le fer et le cuivre.</p> <p>Dans le cadre du projet CICHROM, ce stage a pour objectif d'identifier et de hiérarchiser les paramètres physico-chimiques ayant un impact sur la modulation et la stabilité de la couleur des cidres et des jus de pommes afin de comprendre et connaître les mécanismes moléculaires responsables de l'expression de la couleur. Pour ce faire, il était nécessaire de travailler sur des molécules « modèles » colorées pures pertinentes par rapport au modèle jus/cidre.</p>	
<p><b>Abstract (1600 caractères maximum) :</b></p> <p>Color is one of the major organoleptic criteria of apple juice and cider but remains one uncontrolled segmentation criterion for the cider industry. The molecules in charge of the color are derived from the oxidation of apple polyphenols and correspond to structures present in low concentration in the medium. Some studies have been made on the purification and on the structures of these molecules, which are still unclear today.</p> <p>The color perception can be influenced by various environmental parameters such as pH or the presence of metal cations as iron and copper.</p> <p>Under the CICHROM project, this internship aims to identify and prioritize physicochemical parameters affecting modulation and stability of the color of ciders and apple juices to understand and to know the molecular mechanisms responsible for the expression of the color. To do this, it was necessary to work on pure colored "model" molecules relevant to the juice/cider model.</p>	
<p><b>Mots-clés</b> : Cidre; Jus de pommes; Couleur; Polyphénols; Paramètres physico-chimiques; pH; Cuivre; Fer; Solutions modèles.</p>	
<p><b>Key Words</b> :Cider; Apple juice; Color; Polyphenols; Physicochemical parameters; pH; Copper; Iron; Model solutions.</p>	