

Quelques observations sur les composés phénoliques des pommes : Recherches préliminaires à une étude particulière de l'acide chlorogénique

par **J. J. MACHEIX**

Laboratoire de Biologie végétale du C. N. R. S. ()
et Laboratoire de Physiologie végétale appliquée, Sorbonne (**)*

QUELQUES OBSERVATIONS
SUR LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES POMMES :
RECHERCHES PRÉLIMINAIRES
A UNE ÉTUDE PARTICULIÈRE
DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE

par J. J. MACHEIX (C. N. R. S. — Sorbonne).

Fruits, vol. 23, n° 1, janv. 1968, p. 13 à 20.

RÉSUMÉ. — Après extraction par l'éthanol à 80 p. cent, les composés phénoliques des pommes sont séparés par chromatographie sur papier. Parmi les nombreux polyphénols présents, l'acide chlorogénique est particulièrement abondant. Une méthode de dosage des « phénols totaux » est analysée et on montre l'insuffisance des résultats qu'elle apporte.

Depuis quelques années, la présence de divers composés phénoliques a été mise en évidence chez de nombreux fruits charnus et tout particulièrement chez celui de *Pirus Malus* (WILLIAMS (41) ; MONTIES (23)).

L'intérêt qu'on accorde aux polyphénols dans les fruits est lié au rôle que certains peuvent jouer dans des domaines très divers :

- pigmentation : anthocyanes (SWAIN, 30, 31) et flavonols (SIEGELMAN (29) ; WALKER (35) ; FISCHER (9)).
- astringence : tanins (JOSLYN et GOLDSTEIN, 18).
- brunissement des fruits coupés ou des jus de fruits : catéchines, acide chlorogénique... (WEURMAN et SWAIN (37, 38) ; WALKER (34) ; HAREL et al. (11)).
- résistance à l'infection fongique : acides phénoliques (FLOOD et KIRKHAM (10) ; HULME et EDNEY (14)).
- intervention dans les phénomènes de croissance : flavonoïdes des jus de tomate (NITSCH et NITSCH, 25) et autres composés phénoliques (NITSCH et NITSCH, 26).

Parmi ces divers corps, dont le métabolisme est souvent mal connu, l'acide chlorogénique semble particulièrement intéressant. Découvert dans les pommes par BRADFIELD et al. (4) puis extrait et isolé de ce matériel par HULME (12), il semble être un des principaux substrats de la polyphénoloxydase (WEURMAN et SWAIN (37) ; SIEGELMAN (28)).

Pour étudier ce composé nous avons été amené à identifier, dans notre matériel, les divers composés phénoliques présents et à les séparer par chromatographie. D'autre part, nous avons suivi, pendant la vie des fruits, l'évolution de la teneur en composés phénoliques totaux, tout en notant combien les méthodes utilisables sont sujettes à critiques.

C'est l'ensemble de ce travail qui est présenté ci-dessous.

(*) C. N. R. S., 4^{ter}, route des Gardes, Meudon (Hauts-de-Seine).

(**) Sorbonne, 1, rue Victor-Cousin, Paris (5^e).

I. EXTRACTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES POMMES

A. LE MATÉRIEL.

Les fruits utilisés sont des pommes de la variété 'Calville Blanc' provenant de l'École d'Horticulture de Versailles. La grande variabilité de ce matériel (MACHEIX, 20) entraîne la nécessité de respecter plusieurs conditions et, en particulier :

— de choisir, en vue d'un prélèvement, un nombre suffisant de fruits aussi semblables que possible (taille, forme, couleur...); chacun des lots étudiés se compose de dix fruits.

— de tenir compte de l'orientation des fruits sur les arbres. En effet, la durée d'ensoleillement du fruit pendant sa croissance influe nettement sur la pigmentation de l'épiderme (soit, pour la variété étudiée, sur la quantité de flavonols); il est possible qu'elle joue aussi sur la teneur en d'autres phénols comme les acides phénoliques; la disposition du verger nous a conduit à utiliser des fruits exposés au sud.

B. TECHNIQUES D'EXTRACTION.

La partie du fruit étudiée se compose de l'épiderme et du parenchyme, à l'exclusion de l'endocarpe et des graines,

1° Extraction utilisée.

Les tranches de fruits coupées sont immédiatement plongées dans de l'éthanol à 96° porté à basse température par immersion dans un bain d'alcool et de glace carbonique (le volume d'éthanol est calculé par rapport au poids de fruits, de telle manière que l'extrait après broyage, contienne 20 % d'eau). Les fruits sont ensuite broyés pendant cinq minutes à 10 000 tr/mn, le bol du broyeur restant constamment immergé dans un mélange d'alcool et de glace carbonique. A la fin du broyage, la température à l'intérieur du bol est toujours inférieure à — 30° C.

Pour épuiser le matériel végétal en composés phénoliques on suit alors le processus expérimental suivant :

— Centrifugation du broyat à 2 500 tr/mn, pendant dix minutes, à — 8° C; on isole le surnageant Sa;

— Reprise du culot par de l'éthanol à 80 %, pendant 30 mn, à 0° C, sous une atmosphère d'azote; un brassage énergique est assuré à l'aide d'un agitateur électromagnétique;

— Nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions que la précédente; on obtient le surnageant Sb;

— Le culot est remis en suspension dans de l'éthanol à 80 % puis centrifugé de nouveau; le surnageant Sc est alors réuni à Sb et Sa.

En général, on ajuste la somme Sa + Sb + Sc à 250 ml, sous une atmosphère d'azote. *Dans ce volume on retrouve donc tous les composés phénoliques solubles dans l'alcool à 80 %, contenus dans la masse initiale de fruits.* Le pH de cet extrait est nettement acide, en raison de la présence des acides organiques des pommes.

Ce type d'extraction appelle plusieurs remarques :

a) Il est important de noter que la température, pendant les diverses phases de l'extraction, reste toujours inférieure ou égale à 0° C; en particulier, au moment de la fixation, le blocage des systèmes enzymatiques est instantané. Ceci permet, en adjonction avec l'utilisation d'une atmosphère d'azote, d'éviter toute oxydation (enzymatique ou non) des composés phénoliques et tout particulièrement de l'acide chlorogénique (WEURMAN et SWAIN, 37). On peut d'ailleurs vérifier qu'il n'apparaît aucun brunissement pendant l'extraction.

b) Si on complète l'extraction décrite par un nouvel épuisement avec l'éthanol à 80 % on n'obtient qu'une très faible quantité supplémentaire de composés phénoliques (de l'ordre de 1‰). Donc, les trois épuisements successifs sont suffisants pour obtenir une extraction quasi-totale.

c) Comme l'ont noté divers auteurs (9, 13, 31) la teneur en alcool du solvant est importante pour assurer une bonne extraction des composés phénoliques. La grande solubilité de l'acide chlorogénique et des autres polyphénols simples dans l'éthanol à 80 % rend ce mélange très intéressant; il permet aussi d'extraire (en partie vraisemblablement) les tanins.

2° Comparaison avec une autre technique d'extraction.

L'utilisation d'éthanol bouillant pour la fixation puis l'épuisement du matériel broyé par de l'éthanol à 80 % chaud a conduit à des résultats identiques qualitativement et quantitativement (au moins pour l'acide chlorogénique). Nous avons préféré la première méthode car elle nous semble mieux respecter le matériel.

II. TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT OBTENU

1° Concentration de l'extrait.

Le solvant est évaporé en totalité, sous vide partiel, à 30° C, puis le résidu est repris par de l'éthanol à 80 %, sous une atmosphère d'azote ; en général nos extraits ont été concentrés 10 fois en vue de la chromatographie.

2° Préparation des chromatogrammes.

On utilise la technique de chromatographie descendante sur papier, uni ou bi-dimensionnelle. La faible concentration des composés phénoliques dans l'extrait entraîne la nécessité :

— d'utiliser le papier Whatman n° 3, à migration rapide, en raison de son épaisseur donc de sa capacité d'absorption au moment du dépôt.

— de déposer (en chromatographie uni-dimensionnelle) l'extrait sur une bande de 15 cm de large, ceci en vue d'un éventuel dosage des composés après séparation par chromatographie.

Le dépôt de l'extrait est réalisé à l'aide d'une microseringue ; il est accéléré dans un courant d'air ou d'azote à la température du laboratoire. Avec les extraits concentrés, la quantité maximale d'extrait déposable sous ces conditions est de 1 ml.

3° Solvants utilisés pour le développement.

Nous avons employé, pour nos extraits végétaux, quelques-uns des nombreux solvants utilisables pour séparer les composés phénoliques (SEIKEL, 27) ; les meilleurs résultats ont été obtenus avec les mélanges suivants :

— en chromatographie uni-dimensionnelle : le mélange butanol-acide acétique-eau (4/1/2 v/v) (en abrégé : B. A. E.) ou l'eau distillée.

— en chromatographie bi-dimensionnelle :

1^{re} dimension : le mélange butanol-acide acétique-eau (4/1/2 v/v) ;

2^e dimension : l'acide acétique à 2 % ou l'eau distillée.

4° Développement et séchage.

Le développement des chromatogrammes s'effectue dans des cuves en verre étanches, à une température

voisine de 20° C. Au préalable, le papier est mis en présence des vapeurs du solvant pendant plusieurs heures, pour assurer la saturation.

Après migration du solvant sur une distance voisine de 20 cm (ce qui correspond à un temps de quatre heures pour le mélange B. A. E. et d'une heure pour l'acide acétique à 2 %) le chromatogramme est séché à 20° C dans une enceinte ventilée.

5° Révélation des chromatogrammes.

Les révélateurs des composés phénoliques sont très nombreux (SEIKEL, 27) ; nous avons utilisé :

— très couramment la lumière ultra violette (254 ou 350 m μ) qui permet de repérer de nombreux composés phénoliques par leur fluorescence ; la couleur de fluorescence ainsi obtenue fournit un premier critère d'identification d'un corps qui peut être complété en observant le changement de couleur en présence d'ammoniac (par exemple, l'acide chlorogénique, bleu en lumière U. V., devient jaune-vert en présence de vapeurs d'ammoniac).

— le nitrate d'argent ammoniacal à 3 % : la réaction est très sensible mais peu spécifique (interférence avec les sucres et d'autres composés organiques).

— le réactif d'HOEPFNER (15) utilisé comme suit : on pulvérise sur le chromatogramme un mélange de nitrite de sodium à 5 % et d'acide acétique à 5 % et quelques instants après, une solution concentrée de soude ; la réaction, valable pour de nombreux phénols (BATE-SMITH, 3) est assez sensible.

— les sels de diazonium préparés selon MARTIN (22) ; la réaction semble spécifique des composés phénoliques mais elle est assez peu sensible.

— l'acide chlorhydrique concentré ; après pulvérisation de l'acide, le chromatogramme est placé quelques minutes à 100° C ; les leucoanthocyanes donnent une coloration rouge (formation d'anthocyanes) alors que la (+) catéchine et les substances de ce type donnent une coloration marron jaune (BATE-SMITH et SWAIN, 1).

— la vanilline chlorhydrique (solution de vanilline à 3% dans l'acide chlorhydrique concentré) qui permet de révéler en rouge les substances de type catéchine et les leucoanthocyanes. En comparant ces résultats avec ceux fournis par utilisation du réactif précédent (acide chlorhydrique puis chauffage à 100° C) on peut localiser sur le chromatogramme les sub-

stances de type catéchine : (+) catéchine, (—) épicatechine.

— le réactif de l'acide quinique décrit par CARTWRIGHT et ROBERTS (5) ; il consiste à pulvériser sur le chromatogramme une solution saturée de métaperiodate de sodium et, vingt minutes plus tard, une solution de nitroprussiate de sodium et de pipérazine dans l'éthanol aqueux ; après quelques minutes de chauffage à 100° C, l'acide quinique donne une coloration jaune orange.

6° Identification des composés phénoliques.

Après avoir repéré, sur le chromatogramme, les taches qui correspondent aux composés phénoliques, il est indispensable de les identifier. Plusieurs critères ont été utilisés simultanément :

a) Utilisation de la couleur de fluorescence en lumière U. V. et des diverses colorations obtenues après utilisation de révélateurs.

b) Utilisation du rF obtenu dans les divers solvants ; en fait, ce rF peut varier légèrement d'une expérience à l'autre, et une confirmation supplémentaire doit être apportée par chromatographie simultanée de témoins (produits FLUKA ou NBC).

c) Lorsqu'on pense avoir identifié un composé, celui-ci est chromatographié (en utilisant divers types de solvants) en mélange avec le produit témoin supposé identique ; après chromatographie, la présence d'une seule tache permet de conclure à l'identité des deux corps.

d) Étude du spectre d'absorption de la lumière ultra-violette par le composé, après élution avec de l'éthanol à 80 % à partir du chromatogramme. Il est alors intéressant de comparer le spectre du composé élué avec le spectre de l'extrait initial (fig. 1) ; ce dernier, semblable à celui donné par JOHNSON (17) pour diverses variétés de pommes, montre pour nos extraits un maximum d'absorption vers 280 m μ (zone d'absorption des flavanols) et une ondulation vers 325 m μ (zone d'absorption de nombreux acides phénoliques dont l'acide chlorogénique). La comparaison peut apporter une première idée de l'importance quantitative du produit élué dans l'extrait initial.

e) Ces divers procédés ayant en général permis de préciser la nature d'un composé, sa structure est définitivement confirmée par hydrolyse ; plusieurs types d'hydrolyse ont été utilisés :

— *hydrolyse acide* : par ébullition en présence d'acide chlorhydrique 12 N pendant 1 heure (technique utilisée pour hydrolyser les acides phénoliques).

— *hydrolyse basique* : en présence de potasse à 26 %

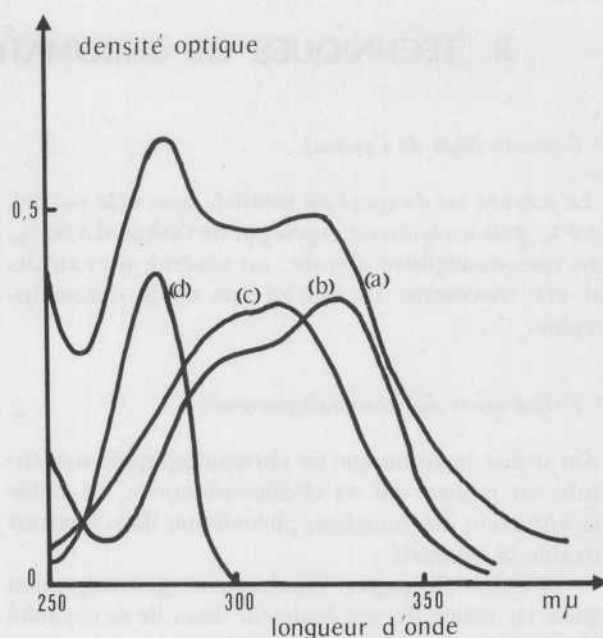


FIG. 1. — Comparaison du spectre total d'un extrait de pommes (a) et du spectre de trois composés phénoliques bien représentés dans cet extrait : acide chlorogénique (b), acide p-coumaroyl-quinique (c) et (+) catéchine (d) (afin de rendre le graphique plus lisible, les concentrations respectives de ces trois composés dans l'extrait n'ont pas été respectées).

(p/v) pendant 30 mn à 20° C, sous une atmosphère d'azote ; l'expérience est arrêtée par neutralisation à l'acide chlorhydrique.

— *hydrolyse par une pectinase* selon la technique décrite par LÉVY et ZUCKER (19). Cette méthode est particulièrement intéressante pour hydrolyser les esters de l'acide quinique (dont l'acide chlorogénique) ; en effet, si l'on applique à ces composés les techniques d'hydrolyse acide ou basique, l'acide quinique obtenu donne naissance à plusieurs spots par chromatographie dans les solvants acides [ces spots correspondent vraisemblablement (CARTWRIGHT et ROBERTS, 5) à des lactones formées à partir de l'acide quinique]. Cette hydrolyse particulière permet d'éviter ce phénomène.

Après hydrolyse selon l'une de ces trois techniques, l'hydrolysât est épuisé six fois par un volume égal d'éther éthylique, ce qui permet d'extraire totalement tous les composés de type aromatique (par exemple l'acide caféique dans le cas de l'hydrolyse de l'acide chlorogénique).

Dans le cas particulier des leucoanthocyanes, la transformation en anthocyanidines est effectuée (selon BATE-SMITH, 2) par chauffage au bain-marie bouillant, pendant vingt minutes, en présence d'acide chlorhydrique 2 N.

III. RÉSULTATS DE LA CHROMATOGRAPHIE

L'examen d'un chromatogramme d'extrait de pommes (fig. 2) montre la présence de plusieurs composés phénoliques ; ces résultats sont bien en accord avec de nombreux travaux ou mises au point précédents (dont ceux de HULME (13), WILLIAMS (41), MONTIES (23)).

Appliquées aux extraits de pommes Calville, les diverses techniques d'identification ont permis de retrouver les corps suivants (dont on rappelle les principales caractéristiques dans le tableau I) :

— l'acide chlorogénique (dont la structure vient d'être définitivement fixée comme celle de l'acide 3-4 caféyl-quinique par WAISS, 33). Avec l'acide acétique à 2 %, la tache d'acide chlorogénique se dédouble pour donner deux spots de rF 0,58 et 0,76 (fig. 2). Ce résultat, commun à tous les dérivés de l'acide cinnamique, s'explique selon WILLIAMS (39), par la sépa-

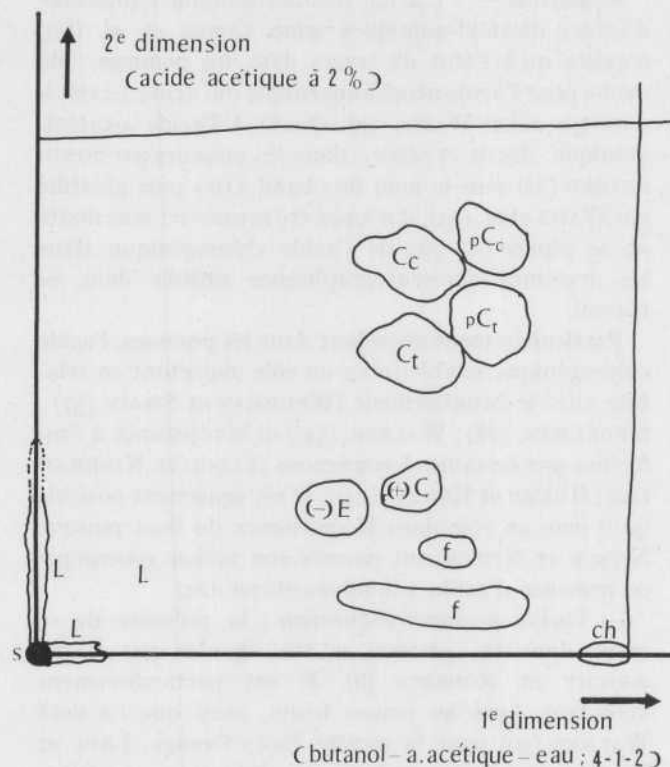


Fig. 2. — Chromatogramme bidimensionnel d'un extrait de pommes. C_t : acide chlorogénique (forme trans) ; C_c : acide chlorogénique (forme cis) ; pC_t et pC_c (acide paracoumaryl-quinique, formes trans et cis) ; (+) C : (+) catéchine ; (-) E : épicatechine ; f : flavonols ; L : leucoanthocyanes ; ch : pigments chlorophylliens ; S : spot de départ.

TABLEAU I.

Quelques caractéristiques chromatographiques de composés phénoliques isolés à partir des extraits de pommes.

COMPOSÉ	rF		RÉVÉLATEURS			
	B. A. E.	Acide acétique 2 %	UV	UV + NH ₃	HCl vanilline	HCl + chaleur
Acide chlorogénique.....	0,65	0,58 (forme <i>trans</i>) 0,76 (forme <i>cis</i>)	bleu	vert-jaune	o	o
Acide p-coumaryl quinique..	0,78	0,65 (forme <i>trans</i>) 0,90 (forme <i>cis</i>)	o	bleu	o	o
(+) Catéchine.....	0,60	0,34	sombre, non fluorescent	sombre	rouge	jaunâtre
(-) Épicatechine.....	0,55	0,30	<i>id.</i>	sombre légèrement bleu	rouge	<i>id.</i>
Leucoanthocyanes.....	de 0 à 0,50	de 0 à 0,50	o	o	rouge	rouge
Osides de flavonols.....	voisins de 0,70	variables	sombre non fluorescent	jaune	o	o

ration dans les solvants de ce type, des isomères de position *cis* et *trans*.

Remarque — « L'acide isochlorogénique » (mélange d'acides dicaféyl-quiniques selon CORSE et *al.* (8)), n'existe qu'à l'état de traces dans les pommes ; de même pour l'acide néochlorogénique (ou acide 5-caféyl-quinique selon WAISS, 33). Quant à l'acide 4-caféyl-quinique, décrit et séparé dans les pommes par SONDEHEIMER (32) sous le nom de « band 510 » puis identifié par WAISS et *al.* (33), il n'a pas été retrouvé ; sans doute ne se sépare-t-il pas de l'acide chlorogénique, dans les systèmes chromatographiques utilisés dans ce travail.

Particulièrement abondant dans les pommes, l'acide chlorogénique semble jouer un rôle important en relation avec le brunissement (WEURMAN et SWAIN (37) ; SIEGELMAN, (28) ; WALKER, (34)) et la résistance à l'infection par certains champignons (FLOOD et KIRKHAM (10) ; HULME et EDNEY, (14)). Il est également possible qu'il joue un rôle dans la croissance du fruit puisque NITSCH et NITSCH ont montré son action synergique en présence d'acide 3-indolylacétique (24).

— l'acide *p*-coumaryl-quinique ; la présence de ce corps dans les pommes a été signalée par CARTWRIGHT et ROBERTS (6). Il est particulièrement abondant dans les jeunes fruits, ainsi que l'a noté WALKER (36) pour la variété Cox's Orange. LEVY et ZUCKER (19) lui accordent une importance particulière comme intermédiaire dans la synthèse de l'acide chlorogénique.

Il faut signaler qu'il n'a pas été trouvé d'acide coumarique libre, composé qui est signalé par FISCHER (9) dans l'épiderme des pommes.

— les flavanols comme la (+) catéchine et la (—) épicatechine, sont caractérisés par un spectre d'absorption qui montre une forte absorption vers 280 m μ et au-dessous de 240 m μ . Leur présence est connue depuis longtemps dans les pommes et comme divers auteurs

dont WILLIAMS (41) l'ont déjà noté, nous trouvons l'épicatechine en quantité plus importante que la catéchine.

— les leucoanthocyanes sont particulièrement abondantes dans les jeunes fruits ; elles constituent vraisemblablement la plus grande partie des tanins (BATE-SMITH, 1). Sur nos chromatogrammes, la séparation de ces composés est toujours peu satisfaisante, leur migration étant vraisemblablement liée à leur degré de polymérisation. La dégradation acide réalisée selon BATE-SMITH (2) conduit à révéler la cyanidine comme principale anthocyanidine résultante ainsi que l'ont déjà montré BATE-SMITH (2) et ITO et JOSLYN (16) ; ces derniers auteurs identifient de plus la pélargonidine après une attaque de ce type.

— les osides de flavonols sont bien séparés en utilisant l'eau comme solvant développant ; SIEGELMAN (29) a isolé, à partir des pommes 'Golden', six osides de la quercétine et plus récemment, FISCHER (9) en a identifié sept dans la « peau » de pommes de la variété 'Cox's Orange Pippin'. Nous en retrouvons plusieurs dont le plus important semble être, d'après le comportement chromatographique et le spectre d'absorption en U. V., l'isoquercitrine.

Cette étude nous permet donc de préciser et de confirmer sur notre matériel, la présence de nombreux composés phénoliques dans les pommes ; mais la seule connaissance de l'existence de ces corps ne peut suffire et doit être complétée par une étude quantitative correspondante. Le dosage de chacun des composants d'un mélange de polyphénols (dont un extrait de pommes est, comme nous venons de le voir, un exemple complexe) se révèle délicat, aucune technique n'étant, à notre connaissance, spécifique d'un composé déterminé. Une première idée, assez fortement erronée comme nous le montrerons, de la teneur en composés phénoliques d'un extrait de pommes peut être donnée par un dosage des « phénols totaux ».

IV. DOSAGE DES PHÉNOLS TOTAUX : CRITIQUE DE LA MÉTHODE

Parmi les propriétés communes aux composés phénoliques, les propriétés réductrices sont celles qui ont été le plus utilisées pour doser l'ensemble de ces corps.

A. MÉTHODE UTILISÉE.

Elle est décrite en détail par SWAIN et HILLIS (31) ; les composés phénoliques, en présence de réactif de

FOLIN et DENIS, puis de carbonate de sodium, donnent un complexe coloré dont on mesure l'absorption à 734 m μ , au photolorimètre Lumétron. De la densité optique correspondante, on déduit la concentration en phénols dans la prise d'essai en se référant à une courbe d'étalonnage relative à l'acide chlorogénique (fig. 3). Les résultats sont donc exprimés en mg d'acide chlorogénique.

Remarque : la coloration n'étant pas stable, toutes les mesures ont été faites une heure après l'introduction des réactifs. D'autre part, nous avons vérifié qu'il n'est pas rigoureusement indispensable de respecter le temps préconisé de 3 mn entre l'introduction des deux réactifs (réactif de FOLIN et DENIS et carbonate de sodium).

B. RÉSULTATS OBTENUS (fig. 4).

Comme l'ont déjà noté divers auteurs (WEURMAN et SWAIN (38); HULME (13); HAREL et al. (11)) la teneur en « phénols totaux » décroît rapidement pendant les premières semaines de la vie des fruits, puis beaucoup plus lentement pendant la maturation et la conservation à 4° C. Ce fait est certainement à mettre en rapport, durant la vie du fruit, avec d'une part la *perte d'astringence* (due essentiellement aux tanins, JOSLYN et GOLDSTEIN, 18) et d'autre part la *diminution de la potentialité de brunissement* lorsque le fruit est coupé (WEURMAN et SWAIN (38); WALKER (34) HAREL et al. (11)).

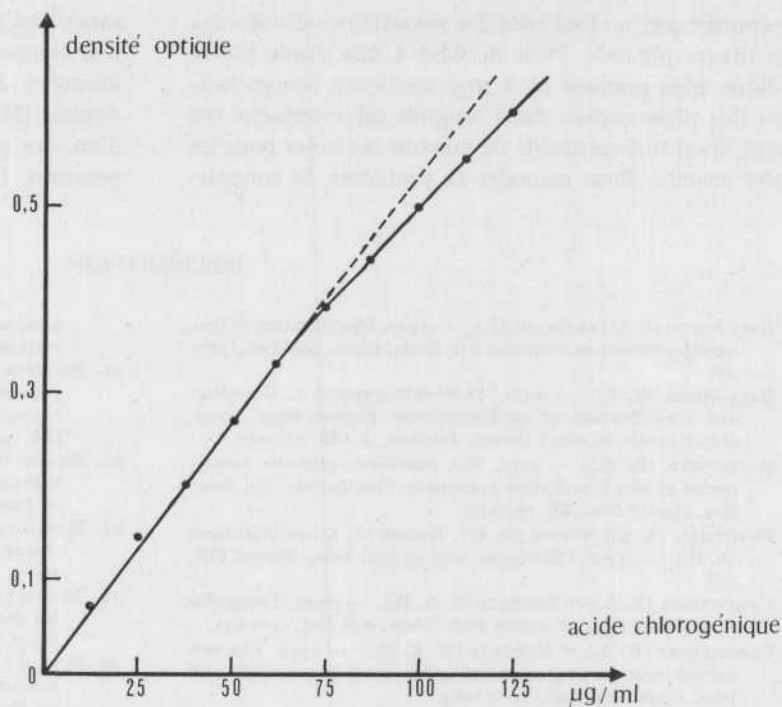
C. CRITIQUES DE LA MÉTHODE.

Cette méthode, comme toutes les méthodes du même type, est sujette à des critiques importantes :

1° *Courbe d'étalonnage* : l'abondance de l'acide chlorogénique dans nos extraits impose l'utilisation de ce corps comme référence ; mais ainsi que COME l'a montré (7), les divers composés phénoliques ne donnent pas la même absorption de la lumière pour une concentration identique. L'expression des résultats ne peut donc être qu'approchée.

2° *Spécificité* : comme l'indiquent JOSLYN et GOLDSTEIN (18), l'apparition du complexe coloré n'est pas spécifique de la présence de phénols ; par exemple, les protéines, l'acide ascorbique, certains glucides (nous l'avons vérifié pour le glucose), donnent naissance, dans les conditions utilisées, au complexe coloré.

La présence de substances interférentes dans nos



« phénols totaux »
exprimés en mg d'acide chlorogénique
pour 100 g de fruits frais

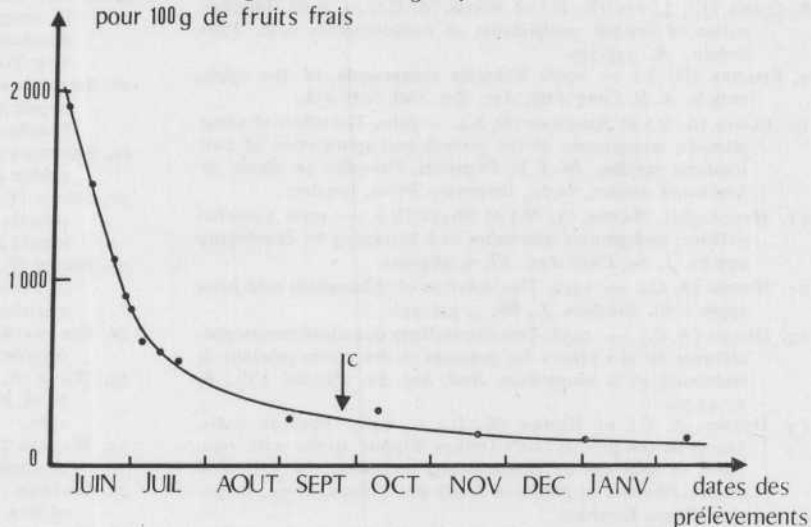


FIG. 3. — Courbe d'étalonnage servant au dosage des « phénols totaux » (ici, l'acide chlorogénique est pris comme référence) ; les mesures sont faites à 734 m μ .

FIG. 4. — Variation de la teneur en « phénols totaux » des pommes pendant la croissance, la maturation et la conservation. c : âge correspondant à la date commerciale de cueillette.

extraits est certaine ; aussi ne peut-on accorder que peu d'intérêt à un dosage de ce type. En outre, l'importance d'un tel dosage n'est pas très grande puisqu'il

ne traduit que la résultante des variations individuelles des divers phénols. Pour accéder à une étude métabolique plus poussée et à une meilleure compréhension des phénomènes dans lesquels interviennent ces corps, il est indispensable de pouvoir les isoler pour les doser ensuite. Pour résoudre ce problème, la connais-

sance des composés phénoliques de la pomme et de leur comportement chromatographique était donc une première étape qui nous permettra d'envisager le dosage (MACHEIX, 21) puis l'étude du métabolisme d'un des plus importants composés phénoliques des pommes, l'acide chlorogénique.

BIBLIOGRAPHIE

1. BATE-SMITH (E. C.) et SWAIN (T.). — 1953. Identification of leucoanthocyanins as « tannins » in foods. *Chem. and Ind.*, 377-378.
2. BATE-SMITH (E. C.). — 1954. Leucoanthocyanins I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.*, **58**, 122-125.
3. BATE-SMITH (E. C.). — 1956. The commoner phenolic constituents of plants and their systematic distribution. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **27**, 165-176.
4. BRADFIELD (A. E.), FLOOD (A. E.), HULME (A. C.) et WILLIAMS (A. H.). — 1952. Chlorogenic acid in fruit trees. *Nature*, **170**, 168.
5. CARTWRIGHT (R. A.) et ROBERTS (E. A. H.). — 1955. Theogallin as a galloyl ester of quinic acid. *Chem. and Ind.*, 230-231.
6. CARTWRIGHT (R. A.) et ROBERTS (E. A. H.). — 1955. The suspected presence of p-coumaryl-quinic acids in tea, apple and pear. *Chem. and Ind.*, 1063-1064.
7. CÔME (D.). — 1967. L'inhibition de germination des graines de pommier (*Pirus Malus* L.) non dormantes. Rôle possible des phénols tégumentaires. *Thèse de Doctorat*, 123 p., Paris.
8. CORSE (J.), LUDIN (R. E.) et WAISS (A. C.). — 1965. Identification of several components of isochlorogenic acid. *Phytochem.*, **4**, 527-529.
9. FISCHER (D. J.). — 1966. Phenolic compounds of the apple cuticle. *A. R. Long Asht. Agr. Res. Stat.*, 255-258.
10. FLOOD (A. E.) et KIRKHAM (D. S.). — 1960. The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two *Venturia* species. In J. B. PRIDHAM, *Phenolics in plants in health and disease*, 81-85, Pergamon Press, Londres.
11. HAREL (E.), MAYER (A. M.) et SHAIN (Y.). — 1966. Catechol oxidase, endogenous substrates and browning in developing apples. *J. Sc. Food Agr.*, **17**, 9, 389-392.
12. HULME (A. C.). — 1953. The isolation of chlorogenic acid from apple fruit. *Biochem. J.*, **53**, 3, 337-340.
13. HULME (A. C.). — 1958. Transformations des constituants phénoliques de la « peau » des pommes et des poires pendant la croissance et la sénescence. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, **4**, 1, 43-50.
14. HULME (A. C.) et EDNEY (K. L.). — 1960. Phenolic substances in the peel of Cox's Orange Pippin apples with reference to infection by *Gloeosporium perennans*. In J. B. PRIDHAM, *Phenolics in plants in health and disease*, 87-94, Pergamon Press, Londres.
15. HOFFNER (W.). — 1932. Zwei neue Reaktionen für Caffeensäure und Chlorogensäure. *Chem. Zeit.*, **56**, 991.
16. ITO (S.) et JOSLYN (M. A.). — 1965. Apple leucoanthocyanidins. *J. Food Sc.*, **30**, 1, 44-52.
17. JOHNSON (G.), FOREMAN (E. M.) et MAYER (M. M.). — 1950. The ultra-violet absorption of polyphenolic substances from various fruits. *Food Technol.*, **4**, 237-241.
18. JOSLYN (M. A.) et GOLDSTEIN (J. L.). — 1964. Astringency of fruit products in relation to phenolic content. *Adv. Food Res.*, **13**, 179-217.
19. LEVY (C.) et ZUCKER (M.). — 1960. Cinnamyl and p-coumaryl esters as intermediates in the biosynthesis of chlorogenic acid. *J. Biol. Chem.*, **235**, 8, 2418-2425.
20. MACHEIX (J.-J.). — 1963. — Variations de l'acidité des pommes placées à 0° C, 4° C ou 7° C. Étude critique d'une méthode de mesure. *D. E. S.*, 64 p., Paris.
21. MACHEIX (J. J.). — 1967. Sur l'acide chlorogénique des pommes : méthode de dosage et variations au cours de la croissance, de la maturation et de la conservation. *C. R. Acad. Sci.*, **264**, 3010-3013.
22. MARTIN (C.). — 1958. Étude de quelques déviations du métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus. *Thèse de Doctorat*, 73 p., Paris.
23. MONTIES (B.). — 1966. Nature et propriétés chimiques des principaux polyphénols de la pomme. *Ann. Physiol. Vég.*, **8**, 1, 49-73.
24. NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1959. Synergie d'action entre les dérivés de l'acide chlorogénique et l'acide 3-indolylacétique. *Bull. Soc. Bot. France*, **106**, 414-417.
25. NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1959. Growth factors in the tomato fruit. In : *Plant Growth regulation* (Proc. 4th Int. Conf. on Plant Growth Regulation, Yonkers, New York).
26. NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1962. Composés phénoliques et croissance végétale. *Ann. Phys. Vég.*, **4**, 3, 211-225.
27. SEIKEL (M. K.). — 1964. Isolation and identification of phenolic compounds in biological materials. In J. B. Harborne, *Biochemistry of phenolic compounds*, 33-76, Academic Press, New York.
28. SIEGELMAN (H. W.). — 1955. — Detection and identification of polyphenol-oxidase in apple and pear skins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **56**, 1, 97-102.
29. SIEGELMAN (H. W.). — 1955. Quercetin glycosides of grimes golden apple. *J. Biol. Chem.*, **213**, 647-654.
30. SWAIN (T.). — 1962. Economic importance of flavonoid compounds : foodstuffs. In T. A. GEISSMAN, *The chemistry of flavonoid compounds*, 513-552, Pergamon Press, Londres.
31. SWAIN (T.) et HILLIS (W. E.). — 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica* L. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sc. Food Agr.*, **10**, 63-68.
32. SONDEHEIMER (E.). — 1964. The chlorogenic acid and related depsides. *Bot. Rev.*, **30**, 667-712.
33. WAISS (A. C.), LUNDIN (R. E.) et CORSE (J. W.). — 1964. The N. M. R. spectra of chlorogenic acids. *Chem. and Ind.*, 1984-1985.
34. WALKER (J. R. L.). — 1962. Studies on the enzymic browning of apple fruit. *N. Z. J. Sc.*, **5**, 316-324.
35. WALKER (J. R. L.). — 1964. Flavonoid pigments in the skins of New Zealand apples. *N. Z. J. Sc.*, **7**, 585-588.
36. WALKER (J. R. L.). — 1963. A note on the polyphenol content of ripening apples. *N. Z. J. Sc.*, **6**, 492-494.
37. WEURMAN (C.) et SWAIN (T.). — 1953. Chlorogenic acid and the enzymic browning of apples and pears. *Nature*, **172**, 678.
38. WEURMAN (C.) et SWAIN (T.). — 1955. Changes in the enzymic browning of Bramley's Seedlings apples during their development. *J. Sc. Food Agr.*, **6**, 186-192.
39. WILLIAMS (A. H.). — 1955. Paper chromatography of cinnamic acid derivatives. *Chem. and Ind.*, 120-121.
40. WILLIAMS (A. H.). — 1958. p-coumaryl-quinic acid from apple fruit. *Chem. and Ind.*, 1200.
41. WILLIAMS (A. H.). — 1960. The distribution of phenolic compounds in apple and pear trees. In J. B. PRIDHAM, *Phenolics in plant in health and disease*, 3-7, Pergamon Press, Londres.