

EVOLUTION DES PIGMENTS PENDANT LA CROISSANCE ET LA MATURATION DU FRUIT DE *PRUNUS PERSICA*

DANIELLE LESSERTOIS* et RENÉ MONÉGER

Laboratoire de Régulations Métaboliques et Différenciation des Plastides, Institut de Biologie Végétale, Université Paris VI, Tour 53, 4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05, France

(Reçu 5 Octobre 1977)

Key Word Index—*Prunus persica*; Rosaceae; peach; caroténoïdes; chlorophylles; fruits; maturation; metabolism.

Abstract—During growth and maturation of *Prunus persica* fruit (cv yellow Earliglo), the pigments of the mesocarp are of the foliar type, i.e. chlorophylls *a* and *b*, β -carotene, lutein, epoxylutein, violaxanthin and neoxanthin. The transformation of the ovary into the green adult fruit is accompanied by a decline in the content of chlorophylls; total carotenoids decrease to level as low as 55% of the initial content, and subsequently transiently accumulate. In mature fruits, 42% of the carotenoids are oxidized and all carotenoids are of the β -configuration: β -carotene, cryptoxanthin and its epoxides, zeaxanthin, antheraxanthin, auroxanthin and trollichrome. At maturation, the carotenoids disappear but the chlorophylls remain in traces.

INTRODUCTION

La connaissance détaillée des modifications qui affectent la pigmentation des fruits pendant leur maturation, et qui sont concomitantes de celles de la consistance et des qualités organoleptiques (fruit vert, puis consommable, puis blet), est susceptible de servir de base à l'élaboration d'un critère de maturation précis. Ces modifications, qui marquent la transformation du chloroplaste en chromoplaste, comportent toujours un appauvrissement en chlorophylles; mais, alors que les tissus de la tomate, par exemple, s'enrichissent globalement en caroténoïdes [1], c'est le phénomène inverse qui se déroule chez la poire [2].

En ce qui concerne la pêche, les travaux réalisés jusqu'ici sur les caroténoïdes [3-5] montrent qu'il existe des différences importantes entre les cultivars. Cependant, les quelques études concernant l'évolution pigmentaire de ce fruit au cours de la maturation ne fournissent que des indications très partielles sur les modifications subies par les divers groupes de pigments. Ainsi, en 1961, Sidwell *et al.* [6a] dosent seulement les chlorophylles de la variété Elberta. En 1971, Katayama et son équipe [3] montrent que, chez cv Halford, β -carotène, lutéine et violaxanthine, abondants dans le fruit au début de la maturation, subissent ensuite la même régression. Dès que la teneur en lutéine commence à diminuer, la zéaxanthine apparaît en faible quantité. L'incorporation d'acide mévalonique $2\text{-}^{14}\text{C}$ montre qu'une biosynthèse encore active affecte les caroténoïdes en fin de maturation, contrairement à ce que pourrait suggérer la chute des teneurs. Ce métabolisme concerne essentiellement le β -carotène. Celui-ci est activement synthétisé. Il est transformé en β -cryptoxanthine, et, à un rythme plus lent, en dérivés oxygénés de cette dernière.

La pêche n'a donc pas fait l'objet jusqu'ici d'une étude complète analysant sur un seul cultivar l'évolution

de tous les pigments présents du début de la croissance au terme de la maturation. Une telle étude se heurte avec ce fruit, comme d'ailleurs avec la poire [2, 6b] et la cerise [7], à des difficultés techniques tenant notamment à la diversité des pigments présents et à l'estérification des xanthophylles dans le fruit mûrissant [8]. L'étude présente a pour but de suivre sur une même variété de pêche l'évolution qualitative et quantitative des chlorophylles et des caroténoïdes depuis un stade très précoce (ovaires) jusqu'en fin de maturation.

RESULTATS

Les chromatogrammes sont obtenus par séparation sur poudre de cellulose, les fractions sont référées par le stade de maturation et par le rang d'éluion. Ainsi, pour 3 stades près comme exemples et différant par les dates de prélèvement (*J* = ovaire jeune, *A* = fruit adulte vert, *M* = fruit mûr), on obtient 6 fractions (*J*₁ à *J*₆) pour le stade *J*, 8 fractions (*A*₁ à *A*₈) pour le stade *A*, et 12 fractions (*M*₁ à *M*₁₂) pour le stade *M*. Les caractéristiques chromatographiques et spectrophotométriques de ces fractions, ainsi que leur identité, sont données au Tableau 1.

Cette caractérisation conduit aux observations suivantes: (1) Les carotènes appartiennent à 2 groupes principaux: celui du lycopène (phytofluène = hexahydrolycopène); celui du β -carotène. (2) Les xanthophylles appartiennent à 5 groupes: celui des monols, représenté par des xanthophylles monohydroxylées de structure β , avec la cryptoxanthine et ses formes plus ou moins hydroxylées (cryptoxanthine-5,6-monoépoxyde, cryptoxanthine-5',6'-monoépoxyde, cryptoxanthine-5,8-monoépoxyde, cryptoxanthine-5,6-5',6'-diépoxyde, cryptoxanthine-5,6-5,8 diépoxyde, cryptoxanthine-5,8-5',8' diépoxyde; celui des diols, représenté par des xanthophylles dihydroxylées de structure α (lutéine) ou de structure β (zéaxanthine); celui des diols monoépoxydés, représenté par des xanthophylles dihydroxylées et monoépoxydées de structure α (époxylutéine et son isomère la flavoxanthine)

* Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie Analytique, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris, Cedex 05, France.

Tableau 1. Caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques des fractions étudiées

Chromatographie		Spectrophotométrie			Identités
% Me ₂ CO/ Pétrole	Caractéristiques	Solvant	Maximums d'absorption (nm)	Action de Cl ₃ Al déplacement (nm) coloration	
0	jaune-orangé pas d' α -carotène	Pétrole	~425-449-476	—	β -carotène
1	jaune pâle	EtOH	~424-450-478	—	β -cryptoxanthine
3	jaune		422-445-475	—	lutéine
4	jaune pâle		424-446-473	20	époxy-lutéine
4	jaune pâle		400-423-450	—	flavoxanthine
10	jaune très pâle		417-438-467	20	néoxanthine
1			401-426-449	—	cryptoxanthine-5,8-mono- époxyde
7	jaune lumineux		419-443-473	40	violaxanthine
7			396-420-445	20	lutéoxanthine
10			422-444-472	20	trolloxanthine
0	séparé du β -carotène sur Ca(OH) ₂ , fluorescence gris vert en UV	Pétrole	331-348-367	—	phytofluène
1		EtOH	~420-446-472	20	cryptoxanthine-5,6-mono- époxyde
1	traces		~424-449-475	20	cryptoxanthine-5',6'-mono- époxyde
1			~416-440-468	40	cryptoxanthine-5,6-5',6'- diépoxyde
1	traces		~396-418-443	20	cryptoxanthine-5,6-5',8'- diépoxyde
1			~378-399-424	—	cryptoxanthine-5,8-5',8'- diépoxyde
3	jaune rosé		452-479	—	zéaxanthine
4			~422-446-473	20	anthéroxanthine
7			381-402-428	—	auroxanthine
10			400-422-449	—	trollichrome

ou de structure β (anthéroxanthine): celui des diols diépoxydés, représenté par des xanthophylles dihydroxylées et diépoxydées de structure β (violaxanthine et ses isomères lutéoxanthine et auroxanthine); et celui des polyols, représenté par des xanthophylles trihydroxylées et monoépoxydées de structure α (trolloxanthine et son isomère le trollichrome) ou de structure β (néoxanthine).

Le Tableau 2 montre l'évolution du contenu en caroténoïdes pendant la croissance et la maturation des fruits, ainsi que la répartition des xanthophylles en monols, diols, diols monoépoxydés, diols diépoxydés et polyols. La fig. 1 montre les variations des teneurs en chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, chlorophylles totales, carotène et caroténoïdes totaux, ainsi que celles du rapport chlorophylle *a/b*.

L'évolution pigmentaire qui accompagne le développement du fruit comprend 3 périodes. La première période correspond à la croissance de l'ovaire (2 semaines). Elle est marquée par la synthèse importante et rapide des chlorophylles *a* et *b*, et par la diminution des teneurs en caroténoïdes totaux. Elle se caractérise par la stabilité des concentrations en carotènes et par une composition pigmentaire analogue à celle des feuilles.

La seconde période est assez longue (7 semaines environ). Elle correspond à la régression des pigments de type foliaire. Les tissus s'appauvrissent considérablement en chlorophylle *b*, puis en chlorophylle *a*. La concentration en caroténoïdes totaux subit une diminution de 55%, puis une nouvelle augmentation avant la chute

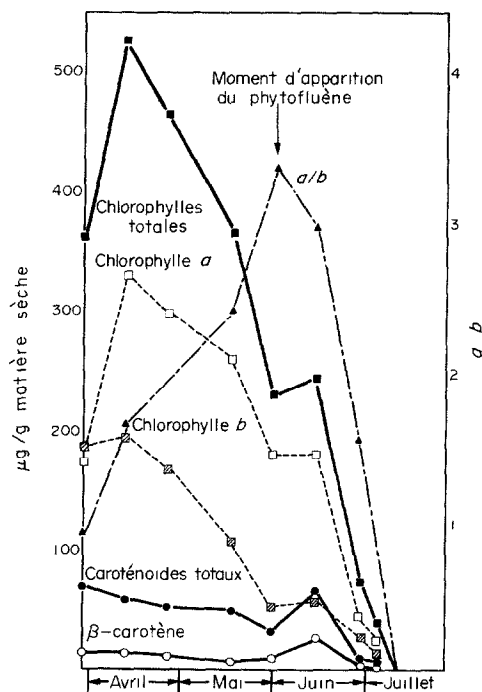


Fig. 1. Variations des teneurs en pigments et du rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b*, dans le mésocarpe de la pêche au cours de sa croissance et de sa maturation.

Tableau 2. Evolution des caroténoïdes de la pêche pendant la croissance et la maturation

Dates de cueillette (1972)	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet					
	29	12	26	17	31	14	28	4	11	18
Caroténoïdes totaux (µg/g matière sèche)	71	58	52	49	32	64	10	10	tr	tr
β-carotène (%caroténoïdes totaux)	21	27	14	19	26	41	34	38	43	59
Monols (% caroténoïdes totaux)	3	—	3	—	tr	tr	tr	31	33	19
β-Cryptoxanthine	+	—	+	—	tr	tr	tr	—	tr	—
Cryptoxanthine-5,6-monoépoxyde	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
Cryptoxanthine-5',6'-monoépoxyde	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Cryptoxanthine-5,8-monoépoxyde	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—
Cryptoxanthine-5,6-5',6'-diépoxyde	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Cryptoxanthine-5,6-5,8-diépoxyde	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+
Cryptoxanthine-5,8-5',8'-diépoxyde	—	—	+	—	—	—	—	—	+	+
Diols (% caroténoïdes totaux)	34	35	29	17	23	9	—	—	—	15
Lutéine	+	+	+	+	+	tr	—	—	—	—
Zéaxanthine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Diols monoépoxydés (% caroténoïdes totaux)	31	17	6	23	34	28	56	22	6	4
Inconnu	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—
Epoxylutéine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Flavoxanthine	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Anthéroxanthine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Diols diépoxydés (% caroténoïdes totaux)	3	11	28	29	2	6	5	1	5	2
Violaxanthine	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—
Lutéoxanthine	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—
Auroxanthine	—	—	+	+	+	—	+	—	—	+
Polyols (% caroténoïdes totaux)	8	10	20	12	15	16	5	8	13	1
Néoxanthine	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—
Trollixanthine	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+
Trollichrome	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+
Stades de maturation	ovaire			fruit adulte vert				fruit mûr		

finale. En même temps, il y a appauvrissement en xanthophylles de structure α oxydées (époxyylutéine), et apparition de phytofluène.

Pendant la troisième période, la transformation du chloroplaste en chromoplaste s'accompagne de la disparition presque totale des chlorophylles. On assiste à des phénomènes d'estérification progressive des xanthophylles, à la disparition totale des xanthophylles de structure α non oxydées et oxydées, et à l'apparition de nouveaux composés de structure β (zéaxanthine, anthéroxanthine). A la fin de la maturation, tous les caroténoïdes sont des composés de structure β . Par rapport aux caroténoïdes totaux, la zéaxanthine représente 15 % et les composés oxydés 42 %. Ces derniers se répartissent en époxydes de β -carotène (16 %), mono- et di-époxydes de cryptoxanthine (20 %), anthéroxanthine (3 %), auroxanthine (2 %) et trollichrome (1 %).

DISCUSSION

Dans la pêche, comme dans la poire [2, 6b], la teneur en caroténoïdes est faible et les variations qu'elle subit au cours de la maturation ne sont pas de forte amplitude. Leur résultante aboutit à une régression progressive de ces pigments. Dans les jeunes fruits, les quantités très élevées de chlorophylles masquent les caroténoïdes dont la teneur maximale est pourtant atteinte avant celle des chlorophylles.

L'apparition de phytofluène se produit alors que le fruit est engagé dans la phase d'appauvrissement en chlorophylles, mais elle précède la reprise transitoire de

l'accumulation des caroténoïdes. Ainsi, dans la pêche, comme chez *Pyracantha angustifolia* [9], la formation du phytofluène paraît associée à une production de polyènes colorés. La lutéine, pigment principal de l'ovaire jeune, disparaît dès la formation du fruit vert adulte, alors que son isomère 5,6-monoépoxyde persiste assez longtemps au cours de la maturation. Le cycle lutéine-lutéine mono-époxyde, mécanisme possible de prévention des dommages photooxydatifs dans les tissus végétaux, a été récemment mis en évidence dans le fruit vert adulte de tomate [10]. Nous n'avons pas trouvé de lutéine en présence de zéaxanthine Curl [5] et Kobayashi *et al.* [4] ont observé la présence simultanée de ces deux pigments, mais ils n'ont précisé ni le stade de maturation, ni la vitesse de croissance du fruit étudié.

Conformément aux résultats de Goodwin [11], nous avons mis en évidence, au moment de la transformation du chloroplaste en chromoplaste, l'existence d'une étape de formation oxydative avec apparition de nouveaux caroténoïdes appartenant à la série β . Valadon *et al.* [12] suggèrent que les fruits mûrs contiennent peu de composés de la série α -carotène, et que l'enrichissement en composés époxydés et furanoïdes traduit une altération de la régulation des synthèses de caroténoïdes. La tomate [13], comme les pêches de variétés européennes, contient des pigments de structure α tout au long de la maturation, mais la présence de lycopène est concomitante de celle de cette structure [11].

La feuille et le jeune fruit présentent la même composition pigmentaire, mais, au cours de l'évolution, la struc-

ture des caroténoïdes de la feuille n'est pas modifiée, alors que le fruit est le siège d'un métabolisme qualitativement nouveau. Dans le fruit mûrissant, les formes α disparaissent au bénéfice des formes β et l'estérification porte alors sur les xanthophylles de structure β . Les modifications quantitatives de pigmentation enregistrées au cours de la maturation sont d'une amplitude limitée, qui contraste avec la diversité et le nombre des modifications qualitatives. Un simple dosage global ne fait pas apparaître d'activité métabolique intense, mais l'incorporation de précurseurs radioactifs a révélé que, si l'activité biosynthétique totale diminue au cours du mûrissement, une synthèse active de cryptoxanthine persiste dans le fruit mûr. On peut se demander si chez la pêche, comme chez la tomate [14], les incidences de ce nouveau métabolisme peuvent se retrouver au niveau des ultrastructures. Déjà, l'étude de l'évolution des coupes réceptaculaires florales du Pêcher (*Prunus persica* à chair jaune) a montré que certains granums à membranes minces, sans doute chlorophylliennes, persistent au sein de chromoplastes totalement différenciés [15]. Y aurait-il aussi persistance de membranes chlorophylliennes dans le fruit à maturité complète?

Ces informations sont susceptibles d'utilisation en recherche appliquée. Ainsi, les stades de maturation d'une population de fruits, au champ ou après cueillette, pourraient être caractérisés par des repères précis. L'augmentation des teneurs en carotènes et en xanthophylles de structure β , et la disparition des xanthophylles de structure α , jalonnent en effet la croissance et la maturation. Le début de la chute des chlorophylles marque la transformation de l'ovaire en jeune fruit. La chute du rapport chlorophylle *a/b* annonce la maturation. La reprise de synthèse rapide et transitoire des caroténoïdes précède la maturité finale. Enfin, l'apparition de zéaxanthine et d'anthéranthine est caractéristique du fruit très mûr. Associés à des qualités organoleptiques, à d'autres modifications biochimiques [16] ainsi qu'à des critères de coloration et de fermeté, ces repères métaboliques de nature pigmentaire pourraient permettre de définir avec précision les stades de maturité favorables au transport ou à la consommation des fruits.

EXPERIMENTAL

Matériel biologique. Les fruits de *Prunus persica*, cv jaune Earliglo, ont été récoltés de mars à juillet 1972 dans les vergers de la Station d'Arboriculture Fruitière de la Grande Ferrade (INRA Bordeaux). Ils ont été prélevés en cours de croissance et de maturation (10 prélèvements comprenant 2 lots par stade). Leur degré de maturité est caractérisé par leur coloration. Les pêches sont épluchées, puis découpées en quartiers. Le matériel est lyophilisé et conservé sous azote, dans des bocaux maintenus en chambre froide à l'abri de la lumière, en attendant l'analyse des pigments mésocarpiques.

Extraction et séparation. Le matériel lyophilisé est réduit en poudre par broyage en présence d'acétone refroidie contenant 1 % de butyl-hydroxytoluène. Les pigments sont extraits par l'acétone pure, puis par l'acétone aqueuse (4:1), en utilisant les techniques décrites [17]. Les xanthophylles estérifiées ont été soumises à une saponification à chaud utilisant la potasse méthanolique à 15 % et un bain-marie maintenu à 40° pendant 3 hr. Pour respecter au maximum l'intégrité des pigments, la saponification a été évitée chaque fois que les essais préliminaires n'ont pas révélé la présence de pigments estérifiés.

Identification. Elle s'appuie sur les critères suivants: séquence d'élution sur colonne de poudre de cellulose; solubilité des pig-

ments dans différents solvants; maximums d'absorption et forme des spectres d'absorption dans ces solvants; réactif de Carr et Price; réaction au trichlorure d'aluminium en solution éthanolique; fluorescence gris-vert du phytofluène en lumière UV. Les pigments des fractions M_4 et M_6 sont présents en trop faibles quantités pour être caractérisés avec certitude, mais il est très probable qu'ils correspondent respectivement aux cryptoxanthine-5',6'-monoépoxyde et cryptoxanthine-5,6,5',8'-diépoxyde. Les 3 fractions A_5 , A_6 et M_{10} , identifiées respectivement comme violaxanthine, lutéoxanthine et auroxanthine, constituent en réalité une seule et même fraction, composée essentiellement de violaxanthine plus ou moins isomérisée en lutéoxanthine. Ces deux formes s'isomérisent en auroxanthine. Nous avons assimilé les fractions J_6 et A_7 à la néoxanthine [17, 18], A_8 et M_{11} à la trollixanthine, M_{12} au trollichrome [19]. Cependant, selon des travaux récents [20], cette trollixanthine serait en fait constituée d'un mélange de néoxanthine proprement dite et de son dérivé furanoïde, le néochrome, auquel le trollichrome pourrait être lui-même assimilé. Le phytofluène, détecté dans le fruit mûr, a déjà été mis en évidence dans le fruit de *P. persica*, mais ni l'espèce, ni le stade n'ont été précisés. Curl [15] n'a pas trouvé de phytofluène, mais du phytoène, dans la variété Halford, qu'il a analysée. La cryptoxanthine, la lutéine, la zéaxanthine et l'anthéranthine ont été également mises en évidence chez plusieurs variétés [5], mais, là encore, ni le stade de maturation, ni pour la cryptoxanthine, la forme sous laquelle le pigment est présent, ne sont précisés. Nous n'avons pas trouvé de persicaxanthine (cf. [5]) ni de lycopène (cf. [21]). Ce dernier pigment n'apparaît que dans les fruits de variétés européennes ou dans la pêche abricot.

Dosage. Les chlorophylles totales sont dosées selon la méthode de Mackinney [22]. Les caroténoïdes sont dosés à l'aide du dispositif mis au point par Monéger [17]. Violaxanthine, lutéoxanthine et auroxanthine sont dosées sous forme de violaxanthine; néoxanthine, trollixanthine et trollichrome sont dosés sous forme de néoxanthine.

Remerciements.—Ce travail a été réalisé avec l'aide du CNRS (A.I. 03 1269). Les auteurs expriment leur gratitude au Professeur Eymé (Université Bordeaux I), dont les suggestions ont été à l'origine de ce travail et qui leur a fait parvenir les échantillons lyophilisés. Ils sont reconnaissants à M. Bernhard et à M. Marenaud d'avoir bien voulu faciliter la récolte du matériel dans les vergers de la Station de Recherches I.N.R.A. d'Arboriculture Fruitière de la Grande Ferrade. Ils remercient Mlle Annick Garcia et Mme Josiane Morando, qui ont contribué efficacement à la préparation du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. Laval-Martin, D., Quennemet, J. et Monéger, R. (1972) *Compt. Rend.* **274**, 2879.
2. Audigé, C. (1958) *Rev. Gén. Botan.* **65**, 581.
3. Katayama, T., Nakayama, T. O. M., Lee, T. H. et Chichester, C. O. (1971) *J. Food. Sci.* **36**, 804.
4. Kobayashi, K., Anno, T. et Akuta, S. (1969) *Bull. Fac. Agr. Yamaguti Uni.* **20**.
5. Curl, A. L. (1959) *Food Res.* **24**, 413.
6. (a) Monéger, R. (1957) *Rev. Gén. Botan.* **64**, 593.
6. (b) Sidwell, A. P., BIRTH, G. S., Ernest, J. V. et Golumbic, C. (1961) *Food Technol.* **15**, 75.
7. Okombi, G., Billot, J. et Hartmann, C. (1975) *Physiol. Vég.* **13**, 417.
8. Lessertois, D. (1972) D.E.A. Paris.
9. Zechmeister, L. et Sandoval, A. (1945) *Arch. Biochem.*, **8**, 425.
10. Rabinowitch, H. D., Budowski, P. et Kedar, N. (1975) *Planta* **122**, 91.
11. Goodwin, T. W. (1952) *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*. Vol 1, p. 23.
12. Valadon, L. R. G. et Mummary, R. S. (1969) *Ann. Bot.* **33**, 71.

13. Laval-Martin, D., Quennemet, J. et Monéger, R. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2357.
14. Laval-Martin, D., Quennemet, J. et Monéger, R. (1974) Coll. Int. CNRS n° 238. Paris.
15. Eymé, J. (1971) *Compt. Rend.* **272**, 1232.
16. Souty, M. et André, P. (1975) *Ann. Technol. Agri.* **24**, 217.
17. Monéger, R. (1968) *Physiol. Vég.* **6**, 165.
18. Costes, C. (1965) Thèse Doctorat d'Etat Sc. Nat. Orsay.
19. Costes, C. (1967) *Ann. Physiol. Vég.* **9**, 157.
20. Buchecker, R. et Liaaen-Jensen, S. (1975) *Phytochemistry* **14**, 797.
21. Thaler, H. et Schulte, K. E. (1940) *Biochem. Z.* **306**, 4.
22. MacKinney, G. (1941) *J. Biol. Chem.* **140**, 315.