

# BIOSYNTHESE DES PRODUITS VOLATILS DE LA POMME: FORMATION DES ALCOOLS ET DES ESTERS A PARTIR DES ACIDES GRAS

NICOLE M. M. PAILLARD

Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée, Université P. et M. Curie, Tour 53, 1er étage, 4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05, France

(Revisé reçu le 19 décembre 1978)

**Key Word Index**—*Malus pumila*; Rosaceae; apple fruit; volatile biosynthesis; aliphatic alcohols and esters; fatty acids.

**Abstract**—The biosynthesis of apple volatiles (alcohols and esters) was studied using disks of aged tissues. After adding each substrate, the volatiles formed were analysed and estimated by GLC and their qualitative and quantitative composition compared with those of the control. Alcohols were formed from aliphatic acids having either the same number of carbon atoms, or from higher homologues through  $\beta$ -oxidation. Fatty acids with an even carbon number gave rise to butanol and hexanol, while odd carbon fatty acids generated propanol and pentanol. Esters were synthesized from the corresponding acid and alcohol and the yield was very high. Volatile profiles differed from one variety to another, yellow-skinned varieties producing chiefly acetic acid esters and the red-skinned mainly butyric acid esters. Provided the right substrates were given, all the esters were synthesized by the different tissues assayed, and the nature of the volatiles produced by each variety depends on the substrates present in the fruit. However, in Golden Delicious apples, which have a low content of butyric esters, exogenous butyrate was rapidly and completely transformed into acetate.

## INTRODUCTION

L'émission organique volatile des pommes est essentiellement formée par un mélange d'alcools et d'esters dont la plupart sont à nombre pair d'atomes de carbone. Les étapes de la biosynthèse de ces produits ont été étudiées à l'aide de disques de tissu de pommes maintenus en survie dans un milieu tamponné. Après addition de substrats à ce milieu une augmentation de la teneur en certains produits volatils peut être observée; ces constituants étant analysés par chromatographie en phase gazeuse à partir du milieu et du tissu. Les disques de tissus utilisés sont prélevés dans le parenchyme ou dans la pelure du fruit et correspondent alors à l'épiderme accompagné de quelques assises sous-épidermiques. Les essais ont été faits avec plusieurs variétés de pommes (Calville, Golden Delicious, Richared, Starking) et leurs comportements ont été comparés.

## RESULTATS

### Evolution des produits volatils pendant la survie des tissus

Les préparations ne sont jamais maintenues en survie pendant plus de 24 hr et l'aspect des tissus reste sain. L'intensité respiratoire (I.R.) après une augmentation pendant les trois premières heures, due à l'effet de blessure, redescend et reste constant ( $10\text{--}15\ \mu\text{l d'O}_2$  consommé/g/hr par du parenchyme de pomme Calville) tandis que le quotient respiratoire QR se stabilise (1,5 pour des fruits proches du maximum climactérique). Les teneurs respectives en produits volatils du milieu et du tissu de préparations témoins (sans substrats) évoluent vers un équilibre qui est atteint au bout de

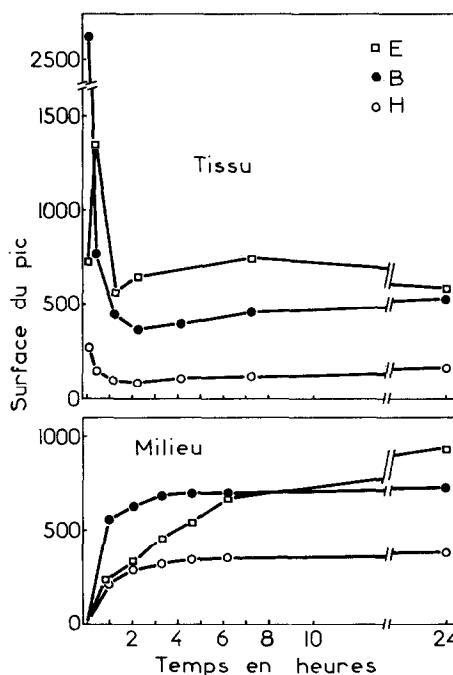


Fig. 1. Evolution de la teneur en alcools du tissu et du milieu de la préparation pendant 24 hr de survie de disques de parenchyme de pomme Calville: E, éthanol; B, butanol; H, hexanol. La teneur en alcool est exprimée par la surface du pic du chromatogramme. Le milieu est un tampon phosphate 0,32 M, pH 5,8 contenant du chloramphénicol ( $0,5 \times 10^{-4}$  g/ml); il correspond à une préparation témoin et n'a pas été additionné de substrats.

2-3 hr par dissolution dans le milieu des produits contenus et synthétisés dans le tissu (Figs. 1 et 2). Ensuite ces teneurs restent stables dans le cas des alcools (sauf celle de l'éthanol qui augmente légèrement) mais elles ont tendance à décroître dans le cas des esters particulièrement de l'acétate de butyle sans doute à la suite d'hydrolyse par les cellules mortes et les enzymes libérés par les tissus lésés.

#### Biosynthèse des alcools à partir des acides gras

La biosynthèse de chaque alcool est observée en additionnant au milieu l'acide gras à même nombre

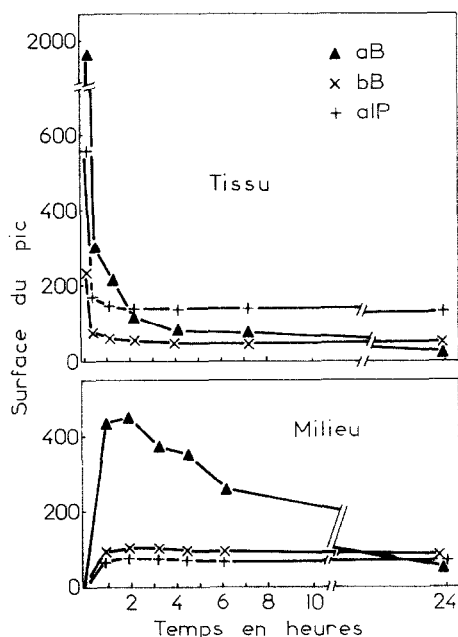


Fig. 2. Evolution de la teneur en quelques esters du tissu et du milieu de la préparation pendant 24 hr de survie de disques de parenchyme de pomme Calville. Esters: aB, acétate de butyle; bB, butyrate de butyle; aIP, acétate d'isopentyle (même préparation que la Fig. 1).

d'atomes de carbone (sous forme de sel de Na), la teneur de la préparation en cet alcool augmente alors par rapport à la préparation témoin (Tableau 1). L'augmentation est très importante dans le cas du propanol dont la teneur est très faible dans la préparation témoin. Elle est nette pour le butanol et l'hexanol à partir respectivement de butyrate et de caproate mais l'augmentation de butanol à partir de caproate témoigne de la transformation des acides gras par  $\beta$ -oxydation. Une augmentation d'éthanol peut aussi être observée à partir d'acétate mais elle est faible (parenchyme 30%, épiderme 45%) ce constituant peut avoir d'autres voies de biosynthèse et la teneur de la préparation témoin est relativement élevée.

L'utilisation comme substrats d'acides gras à nombre supérieur d'atomes de carbone est possible et l'augmentation est importante pour les chaînes moyennes  $C_8$ ,  $C_{10}$  puis diminue pour  $C_{14}$  et devient pratiquement nulle pour  $C_{18}$  (Tableau 1). Mais pour ces acides, même sous forme de sels, la solubilité dans l'eau et dans le milieu est très faible. La formation d'hexanol est encore nette avec les acides insaturés  $C_{18:1}$  et surtout  $C_{18:2}$ . La fourniture d'acides gras à nombre impair d'atomes de carbone

Tableau 1. Formation des alcools à partir des acides gras

	Propanol	Butanol	Pentanol	Hexanol
<b>Acides gras pairs</b>				
$C_4$	P 113 E 673		P — E —	
$C_6$	P 230 E 161		P 525 E 142	
$C_8$	P 126 E 93		P 461 E 56	
$C_{10}$	P 134 E 87		P 456 E 87	
$C_{12}$	P 34 E 60		P 246 E 52	
$C_{14}$	P 15 E 3		P 58 E 17	
$C_{16}$	P 8 E 8		P — E 16	
$C_{18}$	P 2 E 4		P 9 E 14	
$C_{18:1}$	P 16 E 7		P 30 E 15	
$C_{18:2}$	P 18 E 4		P 113 E 27	
<b>Acides gras impairs</b>				
$C_3$	P 1200 E 1090		P — E —	
$C_{11}$	P 320 E 230		P 205.000 E 50.600	

Augmentation de la teneur en alcool exprimée en pourcentage par rapport à la préparation témoin (le chiffre indique la moyenne des teneurs du milieu et du tissu). Préparation de tissu de pomme Calville, parenchyme P ou épiderme E, maintenue en survie pendant 24 hr dans un milieu tampon phosphate.

par ex.  $C_{11}$ , undécanoate de Na, entraîne la synthèse d'alcools à nombre impair d'atomes de carbone, propanol et pentanol. Les chiffres très élevés obtenus pour le pentanol sont dûs, outre une synthèse importante, à la très faible teneur de la préparation témoin en cet alcool (pic trop petit pour être mesuré avec précision).

Pour chaque acide il existe une concentration optimale de substrats au-delà de laquelle la biosynthèse d'alcool diminue, et des concentrations encore plus élevées produisent des altérations dans la préparation, brunissement des tissus et formation d'acétaldéhyde. Cette concentration optimale de substrat est variable pour chaque acide et diminue lorsque la chaîne carbonée de l'acide s'allonge: d'un ordre de grandeur de  $10^{-5}$  M pour le butyrate  $C_4$ , elle passe à  $10^{-6}$  M pour le caproate  $C_6$ , puis à  $3 \times 10^{-7}$  M ou  $2 \times 10^{-7}$  M pour les termes supérieurs.

La cinétique de la formation de butanol et d'hexanol à partir des différents acides gras a été suivie en mesurant l'évolution de la teneur en alcools du milieu. Chaque courbe observée est la résultante des phénomènes de dissolution de l'alcool contenu à l'origine dans le tissu et des phénomènes de biosynthèse. A titre d'exemple ces courbes sont données dans le cas de caproate ( $C_6$ ) comme substrat (Fig. 3). Une estimation de l'évolution de la biosynthèse seule est faite par le calcul de la

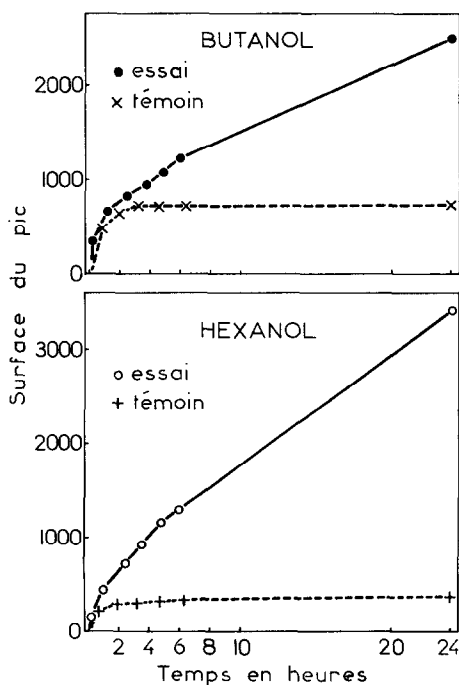


Fig. 3. Cinétique de la formation de butanol et d'hexanol à partir de caproate ( $C_6$ ). Evolution de la teneur en alcools du milieu exprimée par la surface du pic du chromatogramme et comparée à celle d'une préparation témoin. Même milieu que pour la Fig. 1 additionné de caproate de Na ( $10^{-6}$  M) comme substrat.

différence entre la courbe obtenue en présence de substrat et la courbe témoin. Ces nouvelles courbes, tracées pour les premiers acides de la série, sont sensiblement linéaires (Fig. 4). Les premiers points (3 premières hr) sont fortement entachés d'erreur tandis que le dernier (24 hr de survie) peut éventuellement accuser une baisse de l'activité de la préparation. La pente de ces droites diminue lorsque la chaîne de l'acide gras s'allonge et la différence entre la formation de butanol et celle d'hexanol s'atténue puis s'annule.

#### Biosynthèse des esters

Une synthèse importante de chaque ester est observée en ajoutant au milieu de la préparation l'acide (sous forme de sel de Na) et l'alcool correspondant; plusieurs esters ont été ainsi synthétisés et tous les essais ont été positifs (Tableau 2). Les augmentations de teneur enregistrées sont toujours importantes et d'autant plus élevées que la teneur de la préparation témoin et celle du fruit sont plus faibles; elles varient aussi en fonction du stade de maturité du fruit. Elles dépendent encore de la concentration en substrats en particulier d'une concentration molaire égale de l'acide et de l'alcool. On peut aussi remarquer que les nombres observés, très élevés, traduisant une biosynthèse importante, sont peut-être dus à une déviation du métabolisme provoquée par un excès de substrat.

La seule fourniture d'acide gras comme substrat provoque, outre la synthèse d'alcools, celle d'esters par combinaison des nouveaux acides provenant des  $\beta$ -oxydations, des alcools formés et de l'éthanol toujours présent dans la préparation. Les valeurs sont alors

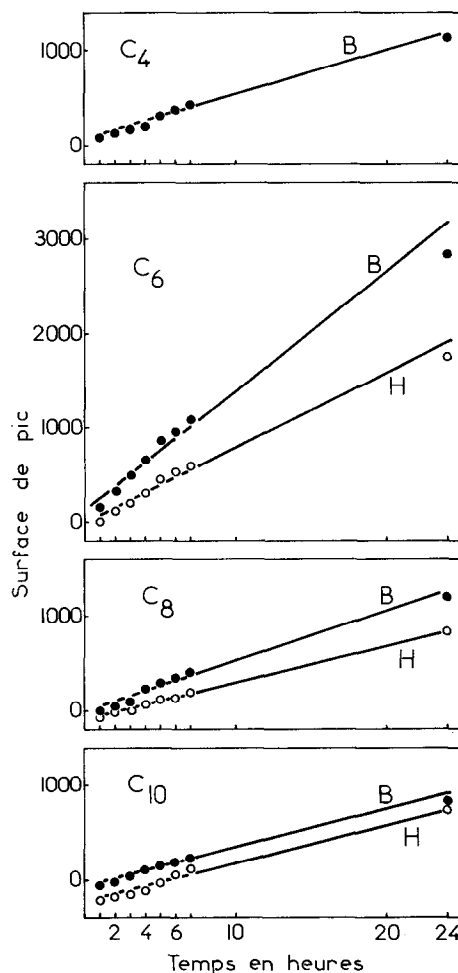


Fig. 4. Cinétique de la biosynthèse de butanol B et d'hexanol H à partir d'acides gras ( $C_4$ ,  $C_6$ ,  $C_8$ ,  $C_{10}$ ). Courbes obtenues par différence entre les courbes observées avec chaque acide et la courbe témoin (différence des ordonnées).

moins élevées et montrent que la synthèse des esters est limitée par celle des substrats (alcools et nouveaux acides).

La cinétique de la synthèse d'un ester par du parenchyme de pomme à partir de ses substrats a été suivie en mesurant l'évolution de la teneur en ester du milieu.

Tableau 2. Formation de quelques esters par du parenchyme de pomme Calville

Substrats acide	Acétate	Butyrate
Alcools		
Ethanol	Acétate d'éthyle 3940	Butyrate d'éthyle 6966
Butanol	Acétate de butyle 5646	Butyrate de butyle 3207
Hexanol	Acétate d'hexyle 4852	
Isopentanol	Acétate d'isopentyle 2630	

Augmentation de la teneur en ester exprimée en pourcentage par rapport à la préparation témoin après 24 hr de survie. Le chiffre indique la moyenne des teneurs du milieu et du tissu de plusieurs essais.

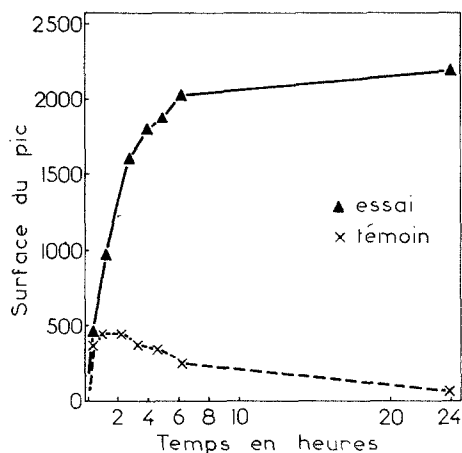


Fig. 5. Cinétique de la formation d'acétate de butyle par des disques de parenchyme de pomme Calville en survie, à partir de butanol ( $1 \times 10^{-4}$  M) et d'acétate de Na ( $5 \times 10^{-3}$  M) en solution dans le milieu tampon phosphate. Evolution de la teneur en ester du milieu exprimée par la surface du pic sur le chromatogramme et comparée à celle d'une préparation témoin.

La courbe observée (Fig. 5), qui marque un fléchissement très sensible au bout de 24 hr, est la résultante de plusieurs phénomènes: la dissolution dans le milieu de l'ester contenu dans le tissu, la biosynthèse de l'ester et l'hydrolyse de l'ester par les débris cellulaires et les cellules mortes contenues dans la préparation. Ce phénomène d'hydrolyse peut être démontré par l'addition dans le milieu de tissu broyé. La synthèse d'ester qui est rapide et intense en présence de cellules entières et de tissus sains se transforme en hydrolyse rapide par des cellules lésées ou des extraits enzymatiques plus ou moins purifiés (Fig. 6).

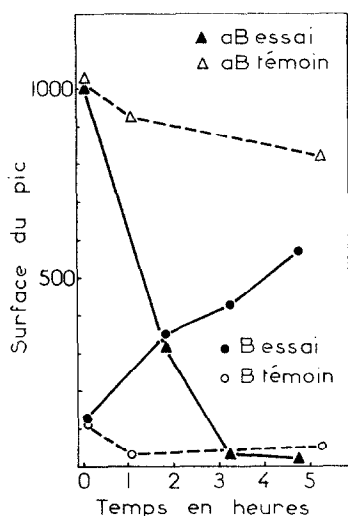


Fig. 6. Cinétique de l'hydrolyse d'acétate de butyle en solution par une préparation enzymatique de pomme Calville, comparaison avec celle d'une préparation témoin d'enzyme bouilli. Teneur en acétate de butyle (aB) et en butanol (B) exprimée par la surface du pic sur le chromatogramme. Préparation enzymatique obtenue après extraction de tissu lyophilisé par un milieu tampon phosphate pH 6,6, centrifugation, précipitation des protéines du surnageant par le sulfate d'ammonium et reprise dans le tampon pH 6,6.

La synthèse d'un ester à partir de ses substrats est accompagnée de celle d'autres esters par combinaison de l'acide fourni, de nouveaux acides provenant de  $\beta$ -oxydations éventuelles et des alcools formés à partir des acides. Parallèlement à ces synthèses une diminution de la teneur d'autres esters peut être observée. Par exemple la synthèse de butyrate d'éthyle (à partir de butyrate et d'éthanol) est accompagnée de celle de butanol, de butyrate de butyle, d'acétate d'éthyle, mais la teneur en acétate de butyle de l'essai diminue par rapport à une préparation témoin. Une synthèse simultanée de deux esters (Tableau 3), acétate de butyle et butyrate d'éthyle, par du parenchyme de pomme Calville à partir de tous les substrats (acétate, butyrate, éthanol, butanol) montre que dans ce cas la formation de butyrate d'éthyle est aussi importante, tandis que celle d'acétate de butyle est fortement diminuée par rapport à la synthèse séparée de chaque ester. Un certain antagonisme entre ces synthèses semble donc accompagner une formation préférentielle de butyrate d'éthyle en présence de ses substrats.

#### Différence de biosynthèse des esters suivant les variétés

Dans l'émission volatile de pomme les proportions d'esters sont différentes suivant les variétés [1] en particulier celle de la variété Calville blanc est formée essentiellement d'esters acétiques (en particulier acétate de butyle) tandis que celle des variétés rouges Richared et Starking est plus riche en esters butyriques et butyrate

Tableau 3. Comparaison de la formation séparée ou simultanée d'acétate de butyle et de butyrate d'éthyle par deux variétés. Biosynthèse parallèle d'acétate d'éthyle et de butyrate de butyle

Substrats	Formation séparée		Formation simultanée
	Ethanol Butyrate	Butanol Acétate	Ethanol, Butanol Acétate, Butyrate
Calville	Butyrate d'éthyle 8270	Acétate de butyle 2911	Butyrate d'éthyle 7883
	Acétate d'éthyle 3940		Acétate de butyle 680
			Acétate d'éthyle 5055
Richared	Butyrate d'éthyle 6278	Acétate de butyle 2850	Butyrate de butyle 1223
	Acétate d'éthyle 538		Butyrate d'éthyle 9561
			Acétate de butyle 1087
			Acétate d'éthyle 902
			Butyrate de butyle 235

Augmentation de la teneur en ester exprimée en pourcentage par rapport à la préparation témoin après 24 hr de survie. Le chiffre indique la moyenne des teneurs du milieu et du tissu de plusieurs essais.

d'éthyle. L'apport de substrats permet à chaque variété de synthétiser en forte quantité l'ester qu'elle produit naturellement en faible proportion (butyrate d'éthyle pour la Calville et acétate de butyle pour la Richared (Tableau 3). La synthèse simultanée des deux esters, acétate de butyle et butyrate d'éthyle, en présence des quatre substrats montre le même phénomène avec les deux variétés, une diminution de la formation d'acétate de butyle. Parallèlement la synthèse de butyrate de butyle est observée ainsi que celle d'acétate d'éthyle. Lors de la formation de butyrate d'éthyle à partir de butyrate et d'éthanol celle de butanol est aussi observée sensiblement égale chez les deux variétés, ainsi qu'une synthèse d'acétate d'éthyle, très forte avec du parenchyme de Calville blanc et moindre avec du parenchyme de Richared. La transformation du butyrate en acétate semble donc plus rapide avec la première variété.

Cette  $\beta$ -oxydation du butyrate en acétate a été suivie chez plusieurs variétés à différents stades de maturité en enregistrant en même temps la cinétique de la synthèse de butyrate d'éthyle à partir de ses substrats (butyrate et éthanol) et celle d'acétate d'éthyle qui l'accompagne. C'est au stade préclimactérique que le phénomène est le plus marquant car la production des esters est pratiquement nulle dans les préparations témoins. La fourniture des substrats (butyrate et éthanol) provoque alors la synthèse des esters (Fig. 7): celle d'acétate d'éthyle chez toutes les variétés, celle du butyrate d'éthyle qui est importante avec les variétés rouges Starking et Richared, diminue avec la Calville blanc et devient pratiquement nulle pour la Golden Delicious tandis que celle d'acétate d'éthyle est alors très forte (cette variété transforme entièrement le butyrate en acétate).

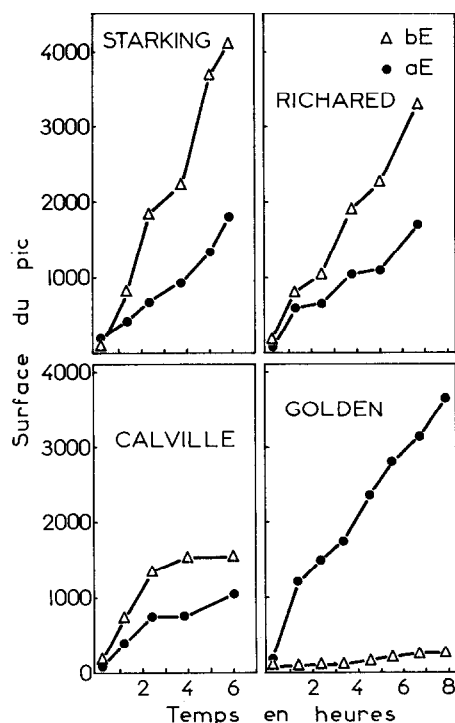


Fig. 7. Cinétique de la biosynthèse de butyrate d'éthyle (bE) et d'acétate d'éthyle (aE) à partir d'éthanol et de butyrate de Na par des disques de parenchyme de quatre variétés de pommes au stade préclimactérique.

Il semble donc que les différences de composition en esters (en particulier acétiques et butyriques) de l'émission volatile des différentes variétés dépendent de la présence des acides en tant que substrats et de la vitesse de leur transformation.

## DISCUSSION

La biosynthèse des constituants volatils de la pomme est liée au métabolisme lipidique et dépend de la présence des acides gras comme substrats. Outre la possibilité de transformation des acides à longue chaîne par  $\beta$ -oxydation, les acides à chaînes courte et moyenne sont présents dans les tissus de pomme, [2] le parenchyme [3-5] et surtout la pelure qui contient des acides en  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{14}$  à l'état libre ou estérifié [6, 7]. La présence des acides impairs seulement à l'état de traces peut expliquer la teneur en faibles proportions des alcools à nombre impair d'atomes de carbone, propanol et pentanol. La formation de produits volatils marqués a été mise en évidence chez la banane [8-10] à partir d'acides gras  $^{14}C$  mais un marquage important est alors limité aux éléments à même nombre d'atomes de carbone.

Les étapes de la biosynthèse peuvent être précisées grâce à certaines comparaisons. La réduction en alcools correspondants des acides gras à longue chaîne ( $C_{12}$  à  $C_{18}$ ) a été mise en évidence *in vivo* chez la bactérie *E. coli* avec la formation de l'aldéhyde intermédiaire, *in vitro* l'alcool a été formé à partir de cet aldéhyde avec des extraits enzymatiques en présence de NADH [11]. La réduction d'acides gras en alcools a aussi été faite avec des préparations enzymatiques d'*Euglena gracilis* étioilées en présence d'ATP, CoA et NADH avec formation des aldéhydes intermédiaires [12, 13]. Les deux systèmes enzymatiques, acyl CoA réductase et aldéhyde réductase ont été reconnus dans les jeunes feuilles de brocoli (*Brassica oleracea*). La comparaison de l'activité de l'alcool-déhydrogénase extraite de 17 tissus différents montre pour plusieurs fruits, dont la pomme, des activités importantes avec NADH et surtout NADPH comme cofacteur [15]. L'alcool déhydrogénase préparée à partir de tomate [16] admet comme substrats des alcools (éthanol à hexanol) ou des aldéhydes saturés (acétaldéhyde, *n*-butanal) et insaturés (*cis*-hexène-2-al). Bien que la formation d'aldéhyde intermédiaire semble donc certaine lors de la réduction des acides gras en alcools, les chromatogrammes des produits volatils de nos préparations ne présentent pas ces constituants. Mais il est possible qu'ils apparaissent mal dans nos conditions d'analyse ou qu'ils ne soient pas à l'état libre.

La formation d'esters a été observée lors de la fourniture de produits marqués à des tranches de banane: à partir d'acides gras  $^{14}C$  tel que l'acide caproïque  $^{14}C$ , la formation d'acétate et de caproate d'hexyle suit celle d'hexanol [17], la synthèse d'alcool isoamylique à partir d'acides aminés (leucine  $^{14}C$ ) est accompagnée de celle d'acétate d'isoamyle en proportions moindres [18]. Au cours des expériences de réduction en alcools des acides gras à longue chaîne (l'acide myristique  $^{14}C$  par exemple) Kolattukudy [12, 13] a observé l'estérification de l'alcool formé par l'acide fourni et avec des préparations enzymatiques d'*Euglena gracilis* la réaction se fait en présence d'ATP et de CoA indiquant qu'elle nécessite l'acide gras activé. Des estérases peuvent être impliquées dans cette réaction d'estérification et leur

présence a été reconnue chez plusieurs fruits: le concombre (les hydrolases des esters acétiques et butyriques) [19], la banane [20].

Pendant la maturation de la pomme, le maximum d'émission des alcools et des esters lourds (butanol, acétate de butyle et d'hexyle, butyrate de butyle) [22] peut être associé à l'accroissement des substrats disponibles. L'augmentation de l'activité respiratoire est accompagnée par une accumulation des acides gras libres ou estérifiés [23] tandis que l'activité des lipases passe par un maximum [24]. Les acides gras provenant du catabolisme des phospholipides rejoignent le pool métabolique et peuvent être ainsi repris pour des synthèses [25]. En même temps une augmentation de l'activité de certains systèmes enzymatiques peut intervenir. Par exemple l'activité de l'alcool-déhydrogénase est multipliée par plus de vingt pendant la maturation de la banane en liaison avec une synthèse de la protéine enzymatique [20, 26].

D'après nos expériences, chez la pomme les différents systèmes enzymatiques en jeu semblent peu spécifiques et la présence des substrats conditionne la biosynthèse des esters. Les différences variétales de composition de l'émission volatile, qui portent essentiellement sur les proportions des esters acétiques et butyriques [1], dépendent directement de la dernière étape de la chaîne de  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la rapidité de transformation du butyrate en acétate par certaines variétés en particulier Golden Delicious.

## PARTIE EXPERIMENTALE

**Fruits.** Différentes variétés de pommes cultivées dans l'île de France: Calville blanc provenant de l'Ecole nationale d'Horticulture de Versailles, Golden Delicious, Richard, Starking provenant de la coopérative 'Les Fruits du Valois' à Villers-Cotterets. Ces fruits ont été conservés depuis la récolte jusqu'au prélèvement, à 4° pour la variété Calville et à 0° pour les autres.

**Survie des disques de tissus de pomme.** Les disques d'épiderme sont découpés à l'emporte pièce dans la pelure, ceux de parenchyme dans une carotte prélevée dans le fruit ils ont un diamètre de 12 mm et une épaisseur de 2,5 mm. Ils sont rincés dans de l'eau distillée froide puis triés. 50 disques soit 12 g (à 3% près) sont mis dans un flacon (type fiole d'attaque de 500 ml) contenant 50 ml de milieu et fermé par un tampon de coton hydrophile. Composition du milieu: tampon phosphate 0,8 M pH 5,8 (20 ml); solution de chloramphénicol à  $2,5 \times 10^{-4}$  g/ml (10 ml); substrats éventuels; complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Ces préparations sont maintenues pendant 24 hr à 25° sur un agitateur rotatif (60 tours/min).

**Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits volatils contenus dans la préparation.** Les produits volatils du milieu et du tissu sont analysés séparément par chromatographie en phase gazeuse à partir de 'headspaces' concentrés par relargage avec du sulfate d'ammonium [28]. 10 ml de milieu sont introduits dans un erlenmeyer de 50 ml et additionnés de 10 g de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . L'erlenmeyer fermé par un tampon de coton est placé dans un bain-marie à 30° sur un agitateur magnétique. Après 5 min d'homogénéisation un volume de 5-10 ml du 'headspace' est prélevé avec une seringue étanche aux gaz et injecté dans le chromatographe. Les disques de tissus (12 g) rapidement essorés sont plongés dans l'azote liquide puis broyés pendant 2 minutes avec un broyeur Dangoumeau dont le bol et la bille ont été préalablement refroidis par de l'azote liquide. La poudre obtenue (qui est encore à une température

de -40° à -50°) est transférée dans un erlenmeyer de 50 ml et additionnée d'un poids égal de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . L'erlenmeyer fermé par un tampon de coton hydrophile est placé dans un bain-marie à 30° sur un agitateur magnétique. Après décongélation de la poudre froide, le mélange est homogénéisé pendant 5 min puis le headspace est prélevé avec une seringue étanche aux gaz et injecté dans le chromatographe. Conditions d'analyse: Chromatographe Perkin-Elmer 900, double détecteur à ionisation de flamme, doubles colonnes, longueur 4 m, phase stationnaire Carbowax 1500, température programmée à 0,5°/min de 80° à 110°.

**Interprétation des chromatogrammes et expression des résultats.** L'identification des pics du chromatogramme faite au cours de travaux précédents [27] a été confirmée à l'aide de produits volatils témoins. La teneur du milieu ou du tissu en un produit volatil étant proportionnelle à la surface du pic [28, 29] une augmentation de teneur en présence de substrat est évaluée en comparant la surface du pic à celle de la préparation témoin et peut être exprimée en pourcentage. Dans le cas de constituants présents dans la préparation témoin sous forme de traces et représentés par des pics trop petits pour être mesurés, ce pourcentage ne peut être calculé et prend une valeur tendant vers l'infini. Dans ce cas la surface du pic du témoin a été arbitrairement chiffrée par 1 ce qui permet d'avoir pour le pourcentage une valeur souvent très élevée mais finie qui rend mieux compte des phénomènes. Après quelques heures d'équilibration les augmentations de teneur étant sensiblement les mêmes dans le milieu et dans le tissu, les résultats sont exprimés par leur moyenne.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Paillard, N. (1967) *Fruits* **22**, 141.
2. Drawert, F., Heimann, W., Emberger, R. et Tressl, R. (1968) *Phytochemistry* **7**, 881.
3. Mazliak, P. (1965) *Fruits* **20**, 559.
4. Mazliak, P. (1965) *Fruits* **20**, 605.
5. Ben Abdelkader, A. et Mazliak, P. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris* **264**, 1162.
6. Meigh, D. F. et Hulme, A. C. (1965) *Phytochemistry* **4**, 863.
7. Mazliak, P. et Justin, A. M. (1976) *Fruits* **22**, 413.
8. Tressl, R. et Drawert, F. (1971) *Z. Naturforsch. Teil B* **26**, 774.
9. Tressl, R. et Drawert, F. (1973) *J. Agric. Food Chem.* **21**, 560.
10. Drawert, F., Emberger, R., Tressl, R. et Prenzel, V. (1972) *Chromatographia* **5**, 319.
11. Naccarato, W. F., Gilbertson, J. R. et Gelman, R. A. (1974) *Lipids* **9**, 419.
12. Kolattukudy, P. E. (1970) *Lipids* **5**, 259.
13. Kolattukudy, P. E. (1970) *Biochemistry* **9**, 1095.
14. Kolattukudy, P. E. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 701.
15. Rhodes, M. J. C. (1973) *Phytochemistry* **12**, 307.
16. Nicolas, M. et Crouzet, J. (1976) *C.R. Acad. Sci. Paris* **283**, 559.
17. Tressl, R. et Drawert, F. (1973) *J. Agric. Food Chem.* **21**, 560.
18. Myers, M. J., Issenberg, P. et Wick, E. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1693.
19. Jooste, J., Vander, W. et Moreland, D. E. (1963) *Phytochemistry* **2**, 263.
20. Skakoun, A. et Daussant, J. (1973) *I.I.F., I.I.R., Commission C<sub>2</sub>, Jerusalem* **3**, 99.
21. Schwartz, H. M., Beidron, S. I., Von Holdt, M. M. et Rehm, S. (1964) *Phytochemistry* **3**, 189.

22. Paillard, N. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris* **264**, 3006.
23. Meigh, D. F. (1967) *J. Sci. Food Agric.* **18**, 307.
24. Rhodes, M. J. C. et Woollorton, L. S. C. (1967) *Phytochemistry* **6**, 1.
25. Mazliak, P. (1967) *Phytochemistry* **6**, 957.
26. Skakoun, A. et Daussant, J. (1974) *Facteurs et Régulation de la Maturation des Fruits*, p. 281. Colloques Internationaux du CNRS, Paris.
27. Paillard, N. (1967) *Physiol. Vég.* **5**, 95.
28. Paillard, N. (1974) *Rev. Gén. Froid* **8**, 809.
29. Paillard, N. (1976) *Rev. Gén. Froid* **12**, 845.