



**HAL**  
open science

# Characterization of non-covalent interactions between cell wall and procyanidins during ripening of pears

Marwa Brahem

► **To cite this version:**

Marwa Brahem. Characterization of non-covalent interactions between cell wall and procyanidins during ripening of pears. Sciences and technics of agriculture. Université d'Avignon, 2017. English. NNT : 2017AVIG0692 . tel-01704631v2

**HAL Id: tel-01704631**

**<https://theses.hal.science/tel-01704631v2>**

Submitted on 8 Feb 2018

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

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



Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE DE VAUCLUSE

Ecole Doctorale Sciences et Agro sciences

**Thèse de doctorat**

Discipline : Sciences alimentaires

Par : **Marwa BRAHEM**

**Caractérisation des interactions non-covalentes entre les  
procyanidines et les parois :  
Impact de la maturation des poires**

M. Mohamed EL MAATAOUI	Professeur, Université d'Avignon	Examineur
Mme. Fabienne GUILLON	Directrice de recherche, INRA-Nantes	Rapporteur
Mme. Jara PÉREZ-JIMENÉZ	Professeur associée, Institut des sciences alimentaires, de la Technologie et de la nutrition, Espagne	Rapporteur
M. Thierry DOCCO	Chargé de recherche, INRA-Montpellier	Examineur
Mme. Catherine RENARD	Directrice de recherche, INRA-Avignon	Examineur
Mme. Carine LE BOURVELLEC	Chargée de recherche, INRA-Avignon	Examineur

## *Dédicaces*

*À Dieu source de toute connaissance*

*À mes chers parents pour leur amour et leur support continu*

*À mes frères et sœurs qui m'ont tout donné sans rien en retour*

*À Aymen, pour sa patience et son amour*

*À ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles*

*Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde*

*reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi*

 **MARWA...**

## *Remerciements*

Cette thèse a été effectuée au sein de l'unité mixte de recherche 'Sécurité et Qualité des produits d'Origines Végétales' (SQPOV, INRA-Avignon) dirigée par Mme Catherine Renard et financée par le Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Tunisien.

J'adresse mon profond respect, mes sincères remerciements et ma grande reconnaissance à Mme Catherine Renard, Directrice de recherche, de m'avoir donné l'occasion de réaliser ma thèse au sein de son unité, d'avoir dirigé ce travail et d'avoir partagé ses connaissances et de m'avoir soutenue jusqu'à la fin. Merci pour vos critiques constructives qui m'ont permis d'évoluer dans ma vision de recherche et dans la façon de la mener.

Je remercie également Mme Carine Le Bourvellec d'avoir encadré, suivi et corrigé ce travail. Je la remercie également pour ses discussions constructives durant cette thèse. Merci d'avoir partagé ton expérience avec moi et merci pour ta disponibilité.

Je souhaite exprimer ma gratitude à tous les membres du jury : Monsieur Mohamed El Maataoui, Madame Fabienne Guillon, Madame Jara Pèrez-Jimenèz et Monsieur Thierry Docco d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les personnels de l'UMR SQPOV. Un remerciement particulier va à l'équipe 'Qualité et procédés' y compris toutes les personnes qui m'ont aidé lors de mes manipulations, qui m'ont aidé à améliorer mes compétences, et qui ont partagé avec moi des bons moments. Je ne veux pas citer des noms particuliers car toutes les personnes qui j'ai pu rencontrer durant ces quatre années au sein de l'unité ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail. Merci à vous, toute l'équipe de l'UMR SQPOV !

J'adresse également un remerciement particulier à Isabelle Bornard pour les différentes séances de la microscopie et pour ses discussions intéressantes.

J'adresse mon profond respect et mes sincères remerciements à Monsieur Messaoud Mars, professeur à l'ISA Chott Meriem ainsi que mes collègues à l'Unité de Recherche 'Agrobiodiversité, ISA Chott Meriem, Sousse, Tunisie'.

Je remercie mes parents qui ont toujours cru en moi, merci de m'avoir toujours gâté !  
Merci Manel, Ahmed, Chaima, Adib, Mohamed, mes deux supers Amouna et Adem, Aymen,  
mes grands parents et mes beaux parents d'avoir été dans ma vie.

Un profond remerciement va à mes proches et mes chers amis. Merci d'avoir partagé  
avec moi tous les moments que j'ai passé loin de ma famille.

**Merci à tous !**

 **MARWA...**

## *Sommaire*

<b>Introduction générale</b> .....	23
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	28
1. Poire et poirier .....	28
1.1. Production.....	28
1.2. Composition générale .....	29
2. Polyphénols .....	33
2.1. Nomenclature des polyphénols.....	33
2.1.1. Hydroquinones : Arbutine.....	34
2.1.2. Acides phénoliques et tannins hydrolysables .....	34
2.1.4. Lignines.....	36
2.1.5.1. Flavan-3-ols .....	38
2.1.5.1.1. Monomères de flavan-3-ols .....	38
2.1.5.1.2. Oligomères et polymères de flavan-3-ols .....	40
2.1.5.3. Flavonols.....	44
2.1.5.4. Anthocyanes.....	44
2.2. Polyphénols majeurs de la poire .....	45
2.3. Effet de la maturité sur la composition phénolique du fruit .....	50
3. Paroi .....	51
3.1. Définition et structure de la paroi cellulaire végétale.....	51
3.2. Composition de la paroi végétale .....	53
3.2.1. Cellulose .....	53
3.2.2. Hémicelluloses .....	54
3.2.3.1. Homogalacturonanes.....	58
3.2.3.2. Rhamnogalacturonanes .....	59
3.3. Particularités de la paroi de poire .....	62
3.4. Effet de la maturité sur la paroi .....	64
4. Interactions non covalentes entre les procyanidines et la paroi végétale .....	69
4.1. Définition des mécanismes d'interactions non covalentes .....	70
4.3. Relations structure / affinité des proanthocyanidines.....	72
4.3.1. Taille et degré de polymérisation.....	72
4.3.2. Galloylation.....	73

4.3.3. Stéréochimie .....	74
4.4. Relations structure / affinité de la paroi.....	74
4.4.1. Origine de la paroi et porosité.....	75
4.4.2. Polyosides .....	75
4.5. Conséquences technologiques .....	77
4.5.1. Jus de pomme/cidre.....	78
4.5.2. Vin.....	79
4.5.2.1. Régulation de l'extraction des tannins .....	79
4.5.2.3. Utilisation des tannins œnologiques .....	81
4.6. Conséquences nutritionnelles .....	82
4.6.1. Bioaccessibilité et biodisponibilité .....	82
4.6.2. Métabolisation colique des procyanidines .....	83
<b>Problématiques &amp; démarches .....</b>	<b>87</b>
<b>Chapitre1 : Composés phénoliques des poires (Diversité &amp; purification) .....</b>	<b>94</b>
<b>Partie 1 : Diversité des composés Phénoliques .....</b>	<b>95</b>
1. Introduction .....	96
2. Materials and methods .....	97
2.1. Chemicals compounds .....	97
2.2. Plant Material .....	97
2.3. Extraction of phenolic compounds .....	98
2.4. Identification of phenolic compounds by HPLC/ESI-MS <sup>2</sup> .....	99
2.5. Quantification of polyphenols by HPLC-DAD .....	99
3.1. Pear fruit phenolic profile from HPLC/ESI-MS <sup>2</sup> analysis .....	100
3.1.1. Phenolic acids and derivatives .....	103
3.1.2. Flavan-3-ol monomers and polymers .....	103
3.1.3. Flavonols.....	103
3.1.4. Anthocyanins .....	104
3.1.5. Others phenolic compounds.....	104
3.2. Phenolic contents in fruit flesh vs peel.....	104
3.2.1. Flavan-3-ol monomers and polymers .....	109
3.2.3. Flavonols.....	110
3.2.3. Anthocyanins .....	111
3.3. Source of variability of pear phenolic composition.....	111

3.4. Impact of pear procyanidins on fruit and perry astringency .....	115
4. Conclusions .....	116
5. Acknowledgements .....	116
<b>Partie 2 : Purification des procyanidines</b> .....	117
1. Plant material.....	117
2. Procyanidin extraction and purification: .....	117
3. Polyphenol characterization .....	118
4. Phenolic composition of perry pear flesh.....	119
5. Procyanidin characterization and evolution at the overripe stage .....	120
<b>Chapitre 2 : Préparation &amp; caractérisation des parois de poires</b> .....	124
1. Introduction .....	126
2. Materials and methods .....	127
2.1. Standards and Chemicals.....	127
2.3. Firmness.....	128
2.4. Cell wall isolation and extraction .....	128
2.5. Mid infrared spectroscopy (MIR).....	131
2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM).....	131
2.7. Analytical.....	131
2.7.1. Neutral sugar composition .....	132
2.7.2. Uronic acids content .....	132
2.7.5. Procyanidins content .....	133
2.7.6. Acetic acid content.....	133
3.1. Texture evolution during overripening.....	134
3.2. General characteristics of cell walls .....	134
3.2.1. Mid infrared spectroscopy .....	134
3.2.2. Scanning electron microscopy (SEM) .....	138
3.3. Cell walls: Yields and compositions .....	140
3.3.1. Cell wall yields .....	141
3.3.2. Cell wall compositions.....	141
3.3.2.1. Elimination of intracellular polyphenols.....	141
3.3.2.2. Polysaccharides composition .....	142
3.4. Sequential extractions: yields and characterizations .....	143
3.4.1. Composition of pectic extracts.....	151



3.4.2. Size exclusion chromatography of pectic extract .....	153
3.4.3. Composition of hemicellulosic extracts .....	155
3.4.4. Composition of residue .....	155
4. Conclusion.....	156
5. Acknowledgements .....	157
<b>Chapitre 3 : Interactions parois-procyanidines.....</b>	<b>159</b>
1. Introduction .....	161
2. Materials and methods .....	162
2.2. Plant material .....	163
2.3. Procyanidin purification and characterization .....	163
2.4. Cell wall extraction and characterization .....	163
2.5. Procyanidin-cell wall interactions .....	164
2.5.1. Binding isotherm methodology.....	164
2.5.3. Isothermal titration microcalorimetry (ITC) .....	165
2.6. Statistical analysis.....	166
3. Results .....	166
3.1. Composition of the fractions .....	166
3.1.2. Cell walls .....	166
3.2. Quantification of binding level.....	167
3.2.2. Infrared spectroscopy (MIR).....	173
3.3.3. Isothermal titration calorimetry (ITC) .....	176
5. Conclusion.....	181
6. Acknowledgments .....	181
<b>Chapitre 4 : Validation des résultats sur un modèle réel (jus de poire).....</b>	<b>183</b>
1. Introduction .....	185
2. Materials and methods .....	186
2.1. Chemicals and standards .....	186
2.2. Plant material .....	186
2.3. Preparation of samples.....	187
2.4. Analysis of phenolic compounds.....	187
2.5. Cell walls preparation and characterization.....	187
2.6. Statistics.....	188
3. Results and discussion.....	188

3.1. Phenolic composition of perry pears, juice and pomace .....	188
3.2. Composition of alcohol insoluble solids (AIS) .....	191
3.3. Impact of cell walls on procyanidins transfer on juice .....	194
4. Conclusion.....	194
5. Acknowledgements .....	194
<b>Chapitre 5 : Localisation des procyanidines <i>in situ</i> dans les poires à poiré à deux stades de maturité</b> .....	196
2. Materials and methods .....	199
2.1. Solvents and reagents .....	199
2.2. Plant Materials .....	199
2.3. DMACA preparation .....	199
2.4. Transmission electron microscopy (TEM) .....	200
3. Results and discussions .....	200
3.1. Procyanidins localization by light microscopy coupled to DMACA staining .....	200
3.2. Procyanidins localization by transmission electron microscopy .....	202
4. Conclusion.....	205
5. Acknowledgments .....	206
<b>Conclusions &amp; perspectives</b> .....	208
<b>Références bibliographiques</b> .....	215

## *Liste des abréviations*

### **A**

AB: Abate

Ac.A: acetic acid

AC : Arbi Chiheb

Ara: Arabinose

A. aspartique : Acide aspartique

A.citrique: Acide citrique

AF : Arbi Bouficha

AIS : Alcohol insoluble solids

A. glutamique : Acide glutamique

A.malique: Acide malique

AUA: Anhydrous uronic acids

AS: Arbi Sidi Bou Ali

### **B**

BET : Brunauer-Emmett-Teller

### **C**

Ca : Calcium

CaCl<sub>2</sub>: Chlorure de calcium

CAT: (+)-Catechin

CAT<sub>t</sub>: (+)-Catechin as terminal unit

CF: Conference

CO: Comice

CQA: 5'-caffeoylquinic acid

CR: Passe Crassane

CTDA : Acide DiaminoCyclohexane Tétracétique

CTIFL: Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes

CW : Cell walls

CWM: Cell Wall Materials

## **D**

DM: Degree of methylation

DM: Dry matter

DMACA : Dimethylaminocinnamaldehyde

DP<sub>n</sub>: Average degree of polymerization of procyanidins

## **E**

EC: (-)-Epicatechin

EC<sub>t</sub>: (-)-Epicatechin as terminal unit

EC<sub>ext</sub>: (-)-Epicatechin as extension unit

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

## **F**

FA: Fausset

FAD: Factorial Discriminant Analysis

FL: Cell walls isolated from the whole flesh

Fru: Fructose

Fuc: Fucose

FW: Fresh weight

## **G**

Gal: Galactose

GC-FID: Gas Chromatography – Flame Ionization Detector

GC–MS: Gas chromatography–mass spectrometry

GIFruits : Groupement Interprofessionnel des Fruits

Glc: Glucose

GPC: Gel Permeation Chromatography

## **H**

HCl: Acide chlorhydrique

HPLC-DAD : High-performance liquid chromatography-diode array detection

HPSEC: High pressure size exclusion chromatography

## **I**

IFPC: Institut Français des Productions Cidricoles

Ih3H: isorhamnetin-3-*O*-hexoside,

Ih3aH: isorhamnetin-3-*O*-acetyl hexoside

Ih3R: isorhamnetin-3-*O*-rutinoside

ITC: Isothermal titration calorimetry

## **J**

JR: Jrani

## **K**

K: potassium

K<sub>a</sub>: affinity

KCl: Chlorure de potassium

K<sub>L</sub>: apparent affinity constant

## **L**

LB: Louise Bonne

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Lig: Lignin

## **M**

MA : Meski Arteb

Man: Mannose

MeOH: Methanol

MF : Matière fraîche

Mg: Magnésium

MG : Matière grasse

MgCl<sub>2</sub>: Chlorure de magnésium

MIR: Mid infrared spectroscopy

## **N**

n: stoichiometry

N<sub>max</sub>: apparent saturation level

NaBH<sub>4</sub> : sodium borohydride

NaOH : Hydroxyde de sodium

## **O**

Os O<sub>4</sub>: osmium tetroxide

## **P**

PB: Plant De Blanc

PC: Cell walls isolated from parenchyma cells,

PCA: Principal component analysis

PCA: Procyanidins

PCA-O: Purified procyanidins from overripe flesh

PCA-R: Purified procyanidins from ripe flesh

Pooled SD: Pooled standard deviation

## **Q**

Q3Gal: Quercetin-3-*O*-galactoside,

Q3Glu: Quercetin-3-*O*-glucoside

## **R**

RC: Rochas

RD: Radsı

Rha: Rhamnose

## **S**

Sacch : Saccharose

SEM: Scanning Electron Microscopy

SK: Cell walls isolated from skin.

SK: Soukri

Sor : Sorbitol

ST: Cell walls isolated from stone cells

## **T**

TEM: Transmission electron microscopy

TR: Tourki

## **W**

WR: William rouge

WV: William vert

## **X**

Xyl: xylose

$\Delta H$ : Enthalpy,

$\Delta G$ : Free enthalpy

$\Delta S$ : Entropy

## *Liste des figures*

<b>Figure 1 :</b> Coupes transversales de poires de deux variétés asiatiques ‘Jingaisu’ ( <i>Pyrus bretschneideri</i> ) (A et C) et ‘Kousui’ ( <i>Pyrus pyrifolia</i> ) (B et D). .....	32
<b>Figure 2 :</b> Différentes classes de polyphénols.....	33
<b>Figure 3 :</b> Transformation de l’hydroquinone en arbutine .....	34
<b>Figure 4 :</b> Structure des principaux acides hydroxycinnamiques.....	35
<b>Figure 5 :</b> Structure de l’acide 5’-caféoylquinique .....	35
<b>Figure 6 :</b> Principales unités impliquées dans la structure de la lignine .....	36
<b>Figure 7 :</b> Structure générale des flavonoïdes .....	38
<b>Figure 8 :</b> Structures des différents monomères de flavan-3-ols.....	39
<b>Figure 9 :</b> Structure de base des procyanidines .....	41
<b>Figure 10 :</b> Structure et nomenclature des dimères de procyanidines de type B .....	42
<b>Figure 11 :</b> Schéma réactionnel de la réaction de thioacidolyse appliqué aux procyanidines	43
<b>Figure 12 :</b> Structure chimique des principaux flavonols .....	44
<b>Figure 13 :</b> Structure chimique des principales anthocyanidines.....	45
<b>Figure 14 :</b> Structure générale d’une cellule végétale .....	52
<b>Figure 15 :</b> A) Organisation de la paroi végétale en lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire. B) Schéma structurel de la paroi primaire.....	52
<b>Figure 16 :</b> Structure générale de la cellulose .....	54
<b>Figure 17 :</b> Structure schématique d’une molécule de xyloglucane.....	55
<b>Figure 18 :</b> Structure schématique des différents domaines pectiques dans la paroi primaire. .....	57



<b>Figure 19</b> : Structure primaire des homogalacturonanes.....	58
<b>Figure 20</b> : Modèle « boîte à œufs » de la dimérisation des homogalacturonanes .....	58
<b>Figure 21</b> : Structure schématique de rhamnogalacturonanes I (RG I) composé d'un squelette d'acide D-galacturonique et de L-rhamnose. ....	59
<b>Figure 22</b> : A) Structure schématique de rhamnogalacturonanes II (polyoside constitué d'un squelette d'homogalacturonane substitué par quatre chaînes latérales A, B, C, D). B). Pont d'ester-borate entre deux chaînes A du rhamnogalacturonanes II. ....	60
<b>Figure 23</b> : Chronologie des changements de la paroi cellulaire au cours du développement et de la maturation des pêches (les différents stades de maturité sont numérotés de 1 à 8).....	66
<b>Figure 24</b> : Changements de la composition de la paroi cellulaire au cours de la maturation des poires de la variété 'Bartlett'.....	67
<b>Figure 25</b> : Isothermes d'adsorption des procyanidines sur la paroi à pH = 3.8, T= 25 °C, force ionique = 0,1 mol/L. (▲): DPn 70, (×) : DPn 35, (◆) : DPn 10, and (■) : DPn 3, (—) : ajustements des courbes obtenues à partir de l'équation de Langmuir. ....	73
<b>Figure 26</b> : Dimères de (-)-épicatéchine liés en C4-C6 et en C4-C8. ....	74
<b>Figure 27</b> : Diagramme schématique représentant la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles d'une molécule de procyanidines et les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques, les groupements hydroxyle et acétyle d'un homogalacturonane. Certains des résidus d'homogalacturonane sont méthylés en position C6 et acétylés en position C2 et C3 .....	77
<b>Figure 28</b> : Schéma de la voie métabolique des flavonoïdes de cacao .....	84
<b>Figure 29</b> : Schéma récapitulatif des principales conséquences des interactions procyanidines-parois. ....	85
<b>Figure 30</b> : Chromatographic profile extracted at 280 nm of 'William rouge' peel (A) and flesh (B) extracts obtained by HPLC-MS <sup>2</sup> (Licrospher RP-18 column).....	101

<b>Figure 31:</b> Principal component analysis based on phenolic composition of fruit flesh of nineteen pear cultivars. A: Scatter plot of loadings on principal components PC1 and PC2, B: Sample map of scores on PC1 and PC2 as function of the cultivar..	113
<b>Figure 32 :</b> Principal component analysis based on phenolic composition of fruit peel of nineteen pear cultivars. A: Scatter plot of loadings on principal components PC1 and PC2, B: Sample map of scores on PC1 and PC2 as function of the cultivar..	114
<b>Figure 33 :</b> Size distribution of purified procyanidins by Gel Permeation Chromatography (GPC).	121
<b>Figure 34 :</b> Mid-infrared spectra of purified procyanidins extracted from ripe and overripe pear flesh..	122
<b>Figure 35 :</b> Scheme of the sequential polysaccharide extractions from pear flesh, parenchyma cells, stone cells and skin at two maturity stages (ripe and overripe)	130
<b>Figure 36 :</b> The mid-infrared spectra (2000-600 cm <sup>-1</sup> ) of pear cell walls. (A) The mid-infrared spectra (2000-600 cm <sup>-1</sup> ) of pear cell walls obtained from flesh, parenchyma cells, stone cells and skin regardless the maturity stage. (B) The mid-infrared spectra (2000-600 cm <sup>-1</sup> ) of pears cell walls obtained at two maturity stages, ripe and overripe regardless the tissue type..	135
<b>Figure 37 :</b> (A) Factorial discriminant analysis (FDA) based on tissue types using mid infrared spectral data between 1800 and 700 cm <sup>-1</sup> . (B) Discriminant patterns of the two first factorial scores.....	137
<b>Figure 38 :</b> Scanning Electron Microscopy showing the differences between the two cell types in Perry pears. (A) General aspect of cell walls isolated from ripe parenchyma cells (800×) ; (B) General aspect of cell walls isolated from ripe stone cells (800×); (C) Ultrastructure changes in parenchyma cells during overripening (800×); (D) Ultrastructure changes in stone cells during overripening (800×); (E) Higher magnification (2000×) detecting simple pits in stone cells. ....	139
<b>Figure 39 :</b> Principal component analysis (PCA) of sequential fractions of the CWM carbohydrates composition for ripe and overripe pears. (A) Correlation circle of variables	

loadings on PC1 (37.92 %) and PC2 (26.50 %). (B) Sample map of scores on PC1 (37.92 %) and PC2 (26.50 %) as function of extracts, tissue types and maturity stages. .... 150

**Figure 40 :** The molecular weight distribution of ammonium oxalate and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fractions of flesh, parenchyma cells, stone cells and skin CWM from ripe and overripe ‘De Cloche ‘pears by HPSEC. Arrows indicate the retention time of dextran molecular weight markers (500 and 40 kDa). .... 154

**Figure 41:** Binding isotherms for pear cell wall materials and procyanidins at pH 3.8, ionic strength 0.1 mol/L, 25°C. (▲): experimental curve for the whole flesh at ripe stage, (Δ): experimental curve for the whole flesh at overripe stage. (■): experimental curve for parenchyma cells at ripe stage, (□): experimental curve for parenchyma cells at overripe stage, (◆): experimental curve for stone cells at ripe stage, (◇) :experimental curve for stone cells at overripe stage. (●): experimental curve for stone cells at ripe stage, (○): experimental curve for stone cells at overripe stage. .... 168

**Figure 42 :** Molecular mass distribution of free procyanidins after cell walls binding determined by gel permeation chromatography (GPC). .... 172

**Figure 43 :** A) Principal component analysis (PCA) of the first derivative of infrared spectra of cell wall materials-procyanidins in the range of 1800-700 cm<sup>-1</sup>. B) Loading profile of component PC1 and PC2..... 175

**Figure 44 :** Isothermal titration calorimetry of the interaction of procyanidins with cell wall extracted from pear flesh (A) and from parenchyma cells (B) at ripe and overripe stage .... 177

**Figure 45 :** Specific localization of procyanidins in perry pear flesh with DMACA. A) Longitudinal section of pear flesh before (on the left) and after DMACA staining (on the right) at ripe stage. B) Longitudinal section of pear flesh before (on the left) and after DMACA staining (on the right) at overripe stage. .... 201

**Figure 46 :** Procyanidins localization with DMACA staining. Light micrographs of ripe (A) and overripe (B) perry pears..... 202

**Figure 47 :** Light micrographs of semi thin sections contrasted with toluidine blue from ripe (A, C) and overripe pear flesh (B, D) use to locate procyanidins before transmission electron microscopy.. .... 203

**Figure 48 :** Transmission electron micrographs from ripe (A, B, C) and overripe pear flesh (D ,E, F) observed at different magnification. ST: stone cells, PC: parenchyma cells, PCA: procyanidins, CW: cell walls. .... 205

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Composition nutritionnelle de quelques variétés des poires asiatiques et européennes.....	31
<b>Tableau 2 :</b> Sources alimentaires majeures de différents flavonoïdes .....	37
<b>Tableau 3 :</b> Les différents types de proanthocyanidines .....	40
<b>Tableau 4 :</b> Composition phénolique des poires (mg/kg MF) et des jus (mg/L) de quelques variétés européennes ( <i>Pyrus communis</i> L.).....	48
<b>Tableau 5 :</b> Composition osidique de la paroi végétale de quelques variétés de poires européennes.....	63
<b>Tableau 6 :</b> Composition osidique des fractions obtenues par des extractions séquentielles de la paroi de la poire (mol %)......	64
<b>Tableau 7 :</b> Composition osidique de la paroi (µg/g MF) et de ses différentes fractions d'extraction séquentielle (mol %) à deux stades de maturité des poires de la variété 'Blanquille'.....	68
<b>Tableau 8 :</b> Synthèse des principaux phénomènes susceptibles de se dérouler au cours de la maturation des fruits .....	69
<b>Table 9 :</b> Geographic origins, different uses, and astringency characteristic of studied pear cultivars. ....	98
<b>Table 10 :</b> Phenolic compounds detected by HPLC/ESI MS <sup>2</sup> in nineteen pear cultivars .....	102
<b>Table 11:</b> Major polyphenol concentrations (mg/kg of fresh weight (FW)) in the flesh of studied pears.....	106
<b>Table 12 :</b> Major polyphenol concentrations (mg/kg of fresh weight (FW)) in the peel of studied pears.....	107
<b>Table 13 :</b> Composition of pear flesh and purified acetonic fraction (mg/g DM) from ripe and overripe 'De Cloche' perry pears .....	120

<b>Table 14 :</b> Yields (mg/g fresh weight) and composition (mg/g CWM) of cell wall isolated from ripe and overripe pears by the phenol buffer method.....	140
<b>Table 15 :</b> Yields (mg/g CWM), carbohydrates and lignin composition (mg/g of polysaccharide fraction) and statistical results (Pooled SD, two way ANOVA) of sequential extracts of flesh, parenchyma cells, stone cells and skin from ripe and overripe pears.....	144
<b>Table 16 :</b> Characteristic sugar ratios in the different polysaccharide fractions from the cell walls of different pear tissues at two maturity stages (ripe and overripe fruit).....	148
<b>Table 17 :</b> Specific surface area (BET) and apparent Langmuir parameters for binding isotherms of different pear cell walls at varying concentrations of procyanidins.....	169
<b>Table 18 :</b> Quantification and characterization of binding reaction of purified procyanidin fractions (1 g/L) with pear cell wall material (5 g/L).....	171
<b>Table 19 :</b> Thermodynamic parameters of interactions between pear cell walls and procyanidins .....	179
<b>Table 20 :</b> Sugar and acid composition of perry pear cultivars at ripe and overripe stage ...	187
<b>Table 21 :</b> Polyphenol compositions and concentrations in the fruits, pomaces (mg/kg of fresh weight FW) and in the juices (mg/L of fresh weight FW) of two perry pear cultivars.	190
<b>Table 22 :</b> Yields (mg/g fresh weight) and carbohydrate compositions (mg/g dry weight) of alcohol soluble solids from fruits and pomaces for ‘Plant De Blanc’ and ‘De Cloche’ at two maturity stages.....	193



## *Introducción general*



## Introduction générale

Les polyphénols sont des composés ubiquitaires dans le règne végétal, essentiellement localisés au sein de la vacuole. Ils sont couramment consommés sous forme de boissons telles que le thé, le vin et les jus ou bien sous forme de fruits et légumes. Ces composés suscitent beaucoup d'intérêt dans différents domaines tels que la nutrition de par leur caractère préventif vis-à-vis de diverses maladies, la cosmétique pour leurs effets antioxydants ainsi que l'industrie agroalimentaire par leur implication dans la saveur des aliments. Les polyphénols font l'objet d'études avancées sur leur biodisponibilité et leur bioaccessibilité. Ces propriétés sont fortement liées aux mécanismes d'interactions des polyphénols avec d'autres composés de leur environnement, dont les polysides pariétaux, notamment lors des procédés de transformation.

La paroi cellulaire végétale est l'une des particularités de la cellule végétale. C'est une structure hétérogène constituée de cellulose sous forme de microfibrilles enrobées d'une matrice de pectines, d'hémicelluloses et de glycoprotéines. Elle offre un soutien structurel et une protection à la cellule végétale. De plus, elle participe à la régulation des relations intercellulaires et extracellulaires et, de manière passive, au transport, à l'absorption, et à la sécrétion de multiples substances. Par ailleurs, ses polysides constitutifs interviennent dans les processus de transformation des fruits et des légumes.

L'association entre les polyphénols et les polysides de la paroi végétale joue un rôle important dans la régulation du pool phénolique de certaines boissons comme le jus de pomme, le cidre et le vin (Bindon *et al.*, 2010a; Renard *et al.*, 2001). Cette régulation est due à la capacité des parois cellulaires végétales d'adsorber sélectivement les proanthocyanidines, également nommées tannins condensés. Parmi les proanthocyanidines, les procyanidines sont des oligomères et polymères constitués d'unités de flavan-3-ols c'est-à-dire de la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine. Des études préliminaires réalisées sur des variétés de poire à poiré, caractérisées par de fortes teneurs en procyanidines, montrent que l'extraction de ces composés dans le jus est limitée du fait de leurs interactions avec les parois végétales (Guyot *et al.*, 2002b).

Les producteurs de poiré, boisson fermentée moins connue que le cidre et faisant partie de la culture traditionnelle des West Midlands (Royaume Uni), de la Bretagne et de la



Normandie (France), pressent de façon empirique les fruits à des stades de maturité très avancés (fruits surmatures). Ainsi, des jus à forte concentration en procyanidines sont obtenus à partir de poires mûres alors que les jus obtenus à partir de fruits surmatures sont dépourvus de procyanidines (Guyot *et al.*, 2002b), bien que ces dernières soient toujours présentes en forte concentration dans le parenchyme. Des adduits non covalents entre les procyanidines et la paroi végétale se forment spontanément lors du broyage et du pressage des fruits lorsque ces deux structures, initialement localisées dans deux compartiments séparés, entrent en contact.

La surmaturation des fruits pourrait favoriser la mise en contact des procyanidines et de la paroi végétale suite à la perte de l'intégrité cellulaire ou en raison d'une évolution de leur structure et/ou de leurs compositions dans le fruit avant toute déstructuration.

Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur la composition phénolique des poires, entre autres les poires à poiré, et de leurs jus alors que certains composés phénoliques, en particulier les procyanidines, sont impliqués dans les caractéristiques sensorielles et la stabilité colloïdale du poiré. Par ailleurs, les interactions procyanidines-polyosides sont moins étudiées que les interactions protéines-polyphénols mais elles prennent de plus en plus d'ampleur ces dernières années.

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur l'étude de la composition et de l'évolution de la structure à la fois de la paroi végétale et des procyanidines chez le modèle poire, à deux stades de maturité (poires mûres et poires surmatures), et sur l'identification et la quantification de leurs interactions par différentes méthodes physicochimiques.

Le présent travail est structuré en 5 parties principales :

**\*Introduction générale**

**\*Travaux antérieurs :** c'est une synthèse bibliographique divisée en 4 parties :

- Une première partie décrit la poire, ses caractéristiques et ses valeurs nutritionnelles ;
- Une deuxième partie décrit les polyphénols, notamment les polyphénols de la poire ; les différentes classes, leur impact nutritionnel et leurs évolutions au cours de la maturation ;
- Une troisième partie décrit la paroi cellulaire végétale et son évolution au cours de la maturation, et en particulier la paroi de poire ;

-Une quatrième partie traite des mécanismes d'interactions procyanidines-paroi cellulaire végétale et leurs conséquences à l'échelle industrielle et nutritionnelle.

**\*Problématiques et démarches :** c'est une description de la démarche appliquée au cours de cette thèse avec une présentation des différents chapitres de la partie résultats et discussions.

**\*Résultats et discussions :**

- 🍏 **Chapitre 1 :** Composés phénoliques des poires (diversité et purification)
- 🍏 **Chapitre 2 :** Préparation et caractérisation des parois des poires
- 🍏 **Chapitre 3 :** Interactions parois-procyanidines
- 🍏 **Chapitre 4 :** Validation des résultats sur un modèle réel (jus des poires)
- 🍏 **Chapitre 5 :** Localisation des procyanidines *in situ* dans les poires à poiré à deux états de maturité

**\*Conclusions et perspectives**

## *Valorisation des travaux*

Le travail réalisé au cours de cette thèse a déjà fait l'objet de :

### *3 articles acceptés :*

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Eder S., Loonis M., Ouni R., Mars M., Le Bourvellec C. Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Research International* 95 (2017) 125-133

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Gouble B., Bureau S., Le Bourvellec C. Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit. *Carbohydrates Polymers* 156 (2017) 152-164.

**Brahem M.**, Eder S., Renard C.M.G.C., Loonis M., Le Bourvellec C. Effect of maturity on the phenolic compositions of pear juice and cell wall effects on procyanidins transfer. *LWT-Food Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.009> (2016).

### *et 4 communications par poster à des congrès internationaux :*

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Eder., S., Watrelot A.A, Le Bourvellec C. Interactions between procyanidins and pear cell walls: effect of ripeness and tissue type. International Conference on Polyphenols, July 11-15, 2016, Vienna, Autrich.

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Eder., S., Le Bourvellec C. Effect of maturity on the phenolic composition of pear juice. 2<sup>nd</sup> Euro-Mediterranean Symposium on Fruit and Vegetable processing, April 4-6, 2016, Avignon, France.

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Le Bourvellec C. Characterization of dietary fiber in stone cells and parenchyma cells in pear. International Dietary Fiber Conference, June 1-3, 2015, Paris, France.

**Brahem M.**, Renard C.M.G.C., Le Bourvellec C. Impact of fruit maturation on polysaccharide-tannin interactions. 13<sup>th</sup> Summer Course Glycosciences. April 13-17, 2014, Wageningen, The Netherlands.



## *Synthèse bibliographique*



## Synthèse bibliographique

### 1. Poire et poirier

Le poirier (*Pyrus* spp.) est un arbre originaire des régions tempérées d'Europe et d'Asie, appartenant à la famille des Rosacées. La poire, fruit du poirier, est l'un des fruits les plus consommés dans le monde. C'est un fruit climactérique dont la maturation dépend de la synthèse d'éthylène. Plusieurs espèces existent distinguant les espèces occidentales et orientales. Les principales espèces orientales sont *Pyrus bretschneideri*, *Pyrus ussuriensis*, *Pyrus pyrifolia* et *Pyrus sinkian*. Elles sont cultivées principalement en Asie y compris la Chine, la Corée et le Japon (Cui *et al.*, 2005). Les poires occidentales (ou Européennes) sont généralement représentées par l'espèce *Pyrus communis* L.. Elles sont cultivées dans 5 grandes régions : l'Europe, l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud, l'Afrique et l'Océanie (Silva *et al.*, 2014)

La poire est typiquement consommée comme fruit frais mais elle est aussi utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la fabrication de jus, de poiré, de compotes, de fruits au sirop et de confitures (Jackson, 2003). La poire a également été utilisée depuis l'antiquité en Chine comme un remède naturel en raison de ses vertus anti-inflammatoires et diurétiques (Li *et al.*, 2014).

#### 1.1. Production

La production mondiale de poires destinées au marché du frais et à la transformation a connu une progression régulière pour atteindre 25 millions de tonnes en 2013 (FAOSTAT, 2016). La superficie mondiale de vergers de poirier a augmenté depuis 2008 pour se stabiliser à 1,7 millions d'hectares en 2013 (FAOSTAT, 2016). La production de poires est décrite par la suite dans deux régions différentes : l'Europe (exemple : la France) et l'Afrique (exemple : la Tunisie).

La production tunisienne est destinée principalement au marché local du fruit frais. Elle est de l'ordre de 75 milliers de tonnes en 2008. Cette production inclut les variétés locales inscrites ('Radsî', 'Meski', 'Ambri', 'Meski Bouguedma' et 'poire de Mognine') ou non au catalogue officiel ainsi que des variétés européennes ('William', 'Passe Crassane', 'Louise Bonne', 'Comice' et 'Guyot') (GIFuits, 2016).

La production française de poire de table est plus importante, elle est de l'ordre de 217 milliers de tonnes en 2008 (AGRIMER, 2016). Environ 20540 tonnes sont destinées au marché des produits transformés (AGREST, 2016). Les variétés 'William' et 'Guyot', variétés d'été, et 'Conférence' et 'Comice', variétés d'automne, sont les variétés de poires de table les plus répandues. La production est majoritairement localisée dans le Sud-Est de la France : la région Provence Alpes Côtes d'Azur présente 43 % de la production totale (CTIFL, 2016). Peu de données sont disponibles sur la contribution des poires à poiré dans la production totale. La production annuelle des poires à poiré est d'une moyenne de 3000 tonnes/an (IFPC, 2016). Les variétés de poires à poiré les plus répandues sont 'De Cloche', 'Plant de Blanc', 'Fausset', 'Antricotin', 'Champagne', 'Verdot' et 'Raulin'.

## 1.2. Composition générale

La qualité de la poire est définie par ses caractéristiques physiques (texture, taille), ses caractéristiques biochimiques (teneurs en sucres, acides et arômes) ainsi que sa couleur, à l'interface des caractéristiques physiques et biochimiques (Li *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Durant ces dernières années, beaucoup de recherches se sont focalisées sur la valeur nutritionnelle des poires et leurs compositions en sucres, acides, minéraux, vitamines et composés volatils. La nature et la concentration de ces composés contribuent aux caractéristiques organoleptiques du fruit, elles sont influencées par le facteur génétique, le mode de culture et le stade de maturité (Chen *et al.*, 2007; Hudina & Stampar, 2005).

La composition nutritionnelle de quelques variétés de poires est décrite dans le tableau 1. Des travaux réalisés sur plusieurs variétés de poires asiatiques montrent que le fructose est le sucre majeur, représentant de 35 à 56 % des sucres solubles totaux, suivent ensuite le glucose et le saccharose (Chen *et al.*, 2007; Yim & Nam, 2016). De plus, des quantités élevées de sorbitol sont présentes dans certaines variétés comme 'Yali', 'Abate Feta', 'Niiitaka' et 'Jules d'Airolles' (Yim & Nam, 2016). L'acide malique et l'acide citrique sont les deux acides majeurs (Chen *et al.*, 2007; Hudina & Stampar, 2000).

Les acides gras C16: 0 (acide palmitique) et C18: 2 (acide linoléique) constituent entre 20 et 70 % de la teneur totale des acides gras (Chen *et al.*, 2007). Une gamme variée d'acides aminés peut être présente dans la poire comme l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline, la thréonine, la valine et la phénylalanine (Chen *et al.*, 2007; Yim & Nam, 2016).

Les sels minéraux majeurs sont le potassium, le magnésium et le calcium (Chen *et al.*, 2007; Yim & Nam, 2016).

La poire peut contenir aussi d'autres composés telles que les vitamines A, B1, B2, B3 et C sont détectées dans la poire (Silva *et al.*, 2014). Les concentrations en vitamine C varient de 50 à 70 mg/kg de matière fraîche (MF) dans le cas des variétés 'D'Anjou' et 'Red d'Anjou' (Galvis Sánchez *et al.*, 2003) ( Tableau 1).

La poire est également riche en composés volatils responsables de son odeur spécifique. Cent huit composés volatiles ont été identifiés à partir de 33 cultivars de poires chinoises (*Pyrus ussuriensis*) ; il apparait que les aldéhydes et les esters sont les principales classes chimiques (Qin *et al.*, 2012).

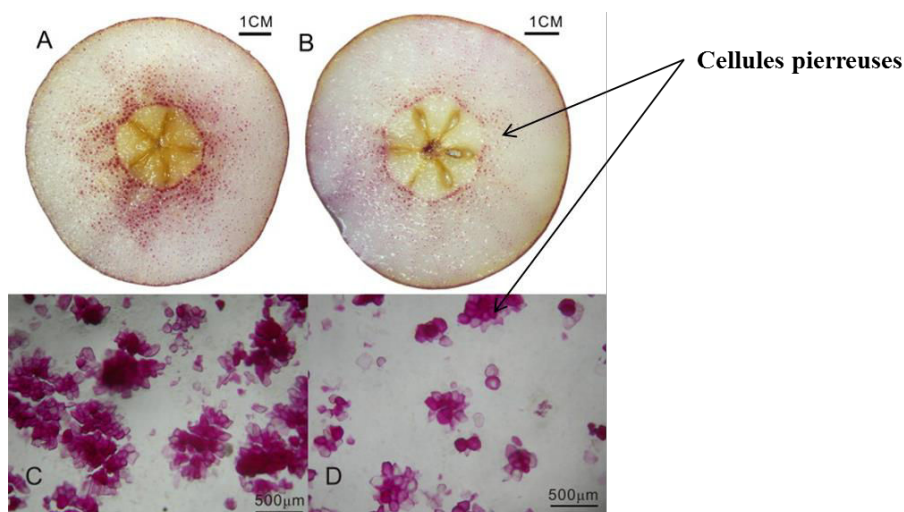
**Tableau 1:** Composition nutritionnelle de quelques variétés des poires asiatiques et européennes

Variétés	Fru g/kg MF	Glc g/kg MF	Sacch g/kg MF	Sor g/kg MF	A.ascorbique mg/kg MF	Ca g/kg MF	Mg g/kg MF	K g/kg MF	A.malique g/kg MF	A.citrique g/kg MF	A.aspartique g/kg MF	A.glutamique g/kg MF	Theronine g/kg MF	Valine g/kg MF	C16 :0 % MG	C18 :2 % MG
<b>Abate Feta</b>	66	34	16	30	-	0,2	0,1	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>D'Anjou</b>	-	-	-	-	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Dangshan</b>	56	26	5	-	-	-	-	-	2,7	0,3	545	-	19	14	25	62
<b>Jingbai</b>	58	18	5	-	-	-	-	-	1,4	0,1	297	-	15	4	29	59
<b>Jules d'Airolles</b>	63	25	27	21	-	0,2	0,2	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Kuerle Fragrant</b>	60	39	21	-	-	-	-	-	1,6	0,05	254	0,2	23	38	23	62
<b>Nanguo</b>	77	16	3	-	-	-	-	-	1,7	0,3	132	-	21	11	20	69
<b>Niitaka</b>	42	19	10	27	-	0,2	0,1	1,4	1,2	0,09	493	-	15	22	23	67
<b>Ninomiyahaku</b>	42	19	4	-	-	-	-	-	1,2	0,1	579	-	17	27	23	67
<b>Red D'Anjou</b>	-	-	-	-	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Yali</b>	35	34	8	36	-	0,3	0,2	1,4	1,1	0,1	119	-	19	18	23	54
<b>Wujiuxiang</b>	41	26	7	-	-	-	-	-	1,1	0,2	617	8	31	19	22	61
<i>Références</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007			Yim & Nam, 2016	Galvis Sánchez <i>et</i> <i>al.</i> , 2003	Yim & Nam, 2016			Chen <i>et al.</i> , 2007							

Fru : fructose, Glc : glucose, Sacch : saccharose, Sor : sorbitol, Ca : calcium, Mg: magnésium, K: potassium, A. aspartique : acide aspartique, A.citrique: acide citrique, A. glutamique : acide glutamique, A.malique: acide malique, MF : matière fraîche, MG : matière grasse, ‘-‘non déterminé



La poire est recommandée dans les régimes alimentaires en raison de sa richesse en fibres (12-15 % de la matière sèche) (Barroca *et al.*, 2006). Les fibres alimentaires incluent les composés non digestibles par les enzymes endogènes du tube digestif humain, comme la lignine et les polysides pariétaux (pectine, hémicelluloses et cellulose) (McKee & Latner, 2000). Les cellules pierreuses, cellules spécifiques des poires, riches en lignine et en cellulose, constituent une source non négligeable de fibres alimentaires (Yan *et al.*, 2014) (Figure 1). Ces cellules sont un facteur déterminant de la qualité des poires, responsables également de la texture granuleuse du fruit. Leur abondance varie principalement d'une espèce à une autre et au sein de la même espèce d'une variété à une autre, mais elle peut être aussi influencée par les pratiques culturales (Cai *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014).



**Figure 1:** Coupes transversales de poires de deux variétés asiatiques 'Jingaisu' (*Pyrus bretschneideri*) (A et C) et 'Kousui' (*Pyrus pyrifolia*) (B et D). La lignine, colorée en rouge, est majoritairement présente dans les cellules pierreuses (Tao *et al.*, 2009).

En plus de ces teneurs en fibres, la poire est riche en composées phénoliques connus pour leurs effets antioxydants, antiinflammatoires et antimicrobiens (Yim & Nam, 2016).

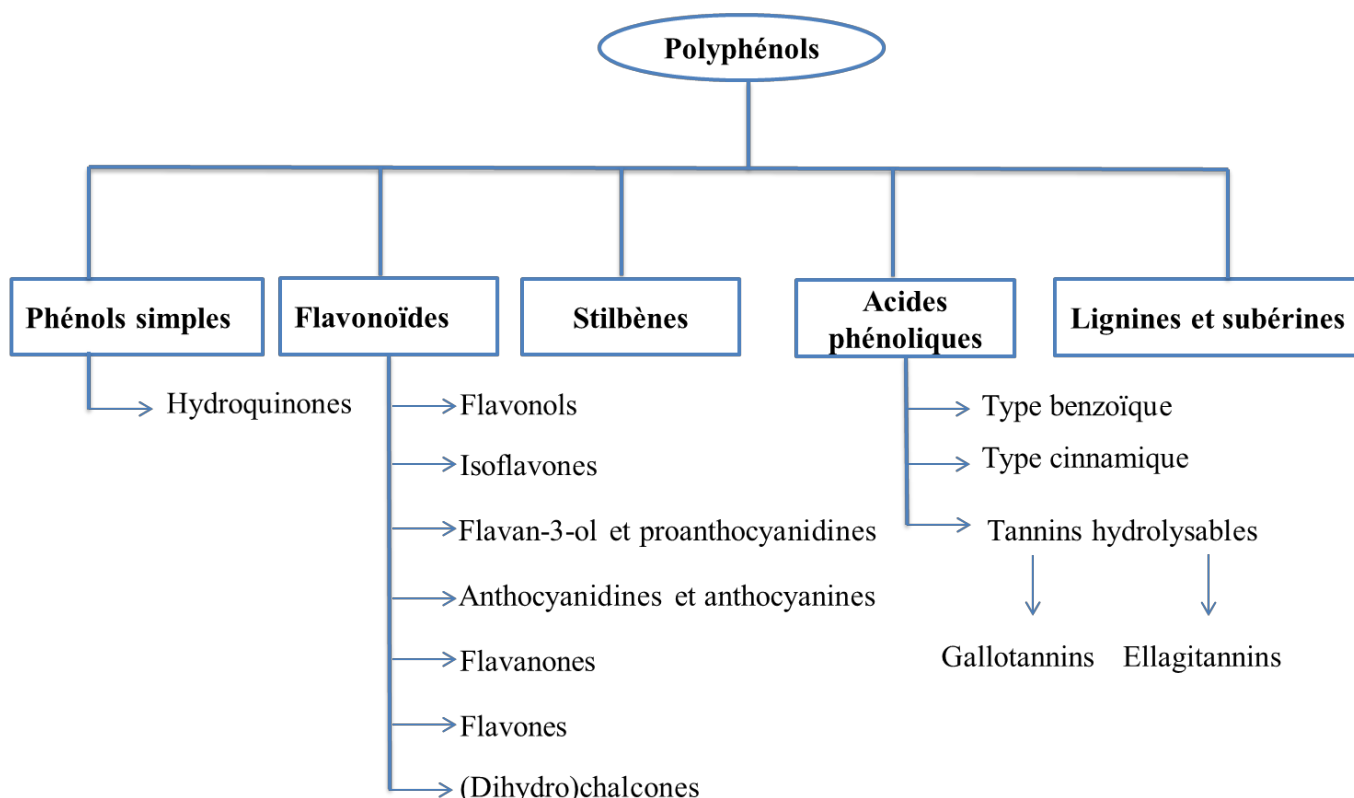
## 2. Polyphénols

Les polyphénols sont un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (Collin & Crouzet, 2011). Le terme de métabolites secondaires se réfère à des composés qui ne sont pas essentiels pour la survie de la plante. Ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la reproduction ou la croissance (Robards *et al.*, 1999). Leurs rôles restent encore flous, mais ils seraient impliqués dans les échanges avec le milieu externe (effet protecteur contre les agressions, effet attractif ou répulsif des insectes...).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés (Tsao, 2010).

### 2.1. Nomenclature des polyphénols

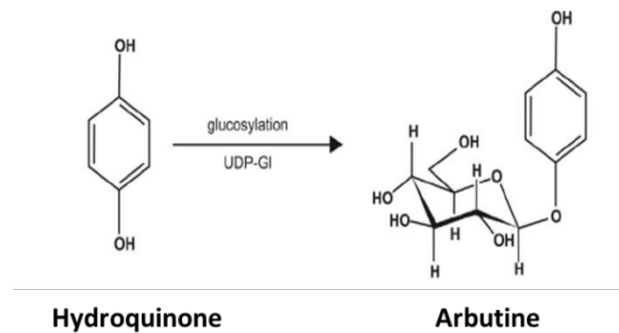
Les différentes classes de polyphénols sont représentées dans la figure 2 :



**Figure 2** : Différentes classes de polyphénols (Collin & Crouzet, 2011).

### 2.1.1. Hydroquinones : Arbutine

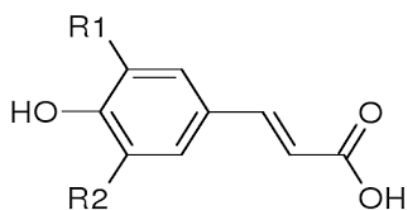
L'arbutine est un  $\beta$ -D-glucopyranoside dérivé d'hydroquinone (Figure 3). Ce composé a été détecté pour la première fois dans les feuilles de busserole. On le trouve également dans les feuilles de myrtille, de canneberge et dans la poire (Hu *et al.*, 2009). Ce composé, connu pour ses effets antibactériens et antiinflammatoires, est principalement utilisé en cosmétique comme dépigmentant grâce à son action inhibitrice de la tyrosinase, enzyme clé pour la synthèse de la mélanine (Zhu & Gao, 2008).



**Figure 3 :** Transformation de l'hydroquinone en arbutine  
(Skrzypczak-Pietraszek *et al.*, 2017)

### 2.1.2. Acides phénoliques et tannins hydrolysables

Les acides phénoliques sont des composés phénoliques non flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux types : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ils ont des rôles divers dans la plante puisqu'ils interviennent comme substrat en amont des voies de biosynthèse des flavonoïdes et de la lignine. Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) dérivent tous de l'acide benzoïque. Ils sont majoritairement présents sous forme d'esters ou de glycosides chez les plantes. Les formes libres sont parfois retrouvées mais dans de faibles proportions. Les acides hydroxybenzoïques les plus répandus dans les fruits sont l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide ellagique et l'acide syringique. Ces composés n'ont pas été identifiés dans la poire. Les acides hydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique. Ils présentent un squelette carboné de type C6-C3. L'acide férulique, l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide sinapique sont les acides majeurs de cette classe (Figure 4).

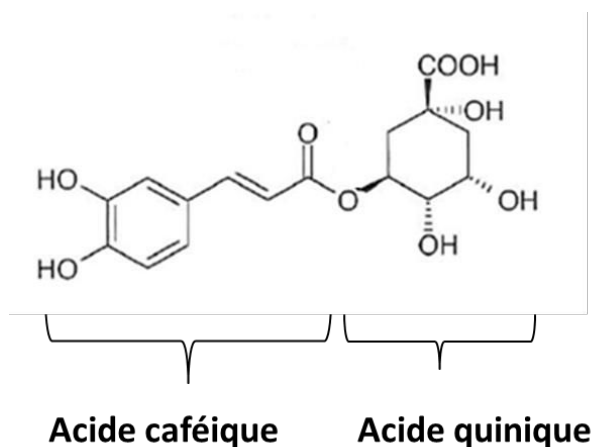


Acides hydroxycinnamiques	R1	R2
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide caféique	OH	H
Acide férulique	OCH3	H
Acide sinapique	OCH3	OCH3

**Figure 4 :** Structure des principaux acides hydroxycinnamiques

(Collin & Crouzet, 2011).

Les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous forme estérifiée par l'acide quinique, mais aussi par des sucres. Dans la poire, les acides hydroxycinnamiques sont représentés majoritairement par l'acide 5'-caféoylquinique (Figure 5).



**Figure 5 :** Structure de l'acide 5'-caféoylquinique (Collin & Crouzet, 2011)

Les tannins hydrolysables sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) associés à un polyol (habituellement le glucose). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins (Clifford & Scalbert, 2000). Ces composés ne sont pas détectés dans la poire.

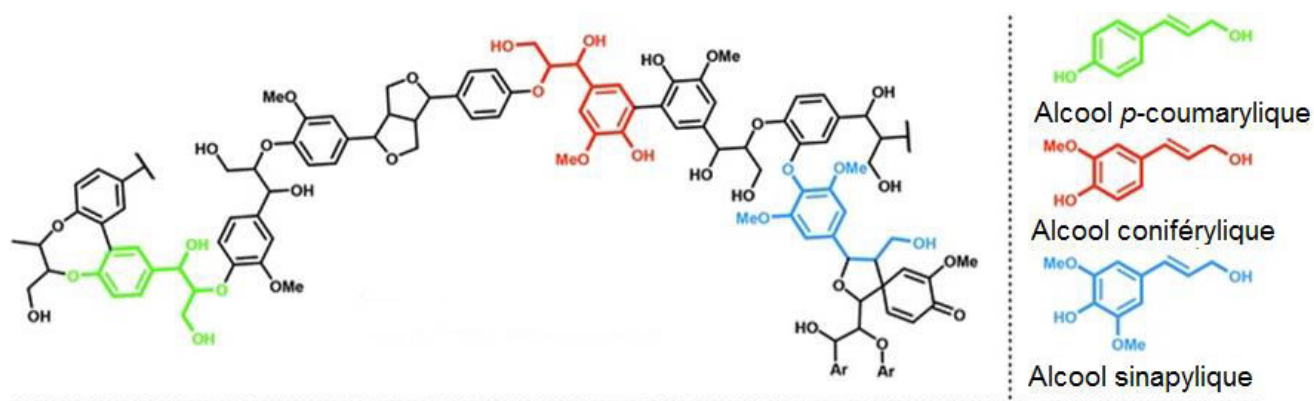
### 2.1.3. Stilbènes

Les stilbènes sont caractérisés par un squelette de 1,2-diphényléthylène (C6-C2-C6) (Goyal *et al.*, 2012). La structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques unis par un pont éthylène. Les deux formes isomères des stilbènes ((E)-1,2-diphényléthylène et (Z)-1,2-diphényléthylène) peuvent être méthylées, hydroxylées ou méthoxylées. Elles peuvent également être conjuguées avec des glycosides ou oligomérisées

en structures plus au moins complexes, ayant ainsi des propriétés chimiques différentes. La forme (E) est la plus stable et la plus bioactive et, en général, la plus abondante dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes. La distribution de ces composés est limitée à certaines familles dont les Cypéracées, Vitacées et Fabacées (Hart, 1981; Rivière *et al.*, 2012). Ces composés ne sont pas présents dans la famille des Rosacées y compris l'espèce *Pyrus* spp.

#### 2.1.4. Lignines

La lignine est le polymère le plus abondant sur Terre après la cellulose. La lignine constitue de 20 à 35 % de la biomasse végétale (Boerjan *et al.*, 2003). C'est un polymère amorphe tridimensionnel dérivé du couplage de 3 monomères d'alcools phénylpropyliques : les alcools coniférylique, sinapylique et *p*-coumarylique (dérivant respectivement des acides férulique, sinapique et *p*-coumarique) (Collin & Crouzet, 2011; Kärkäs *et al.*, 2016) (Figure 6).



**Figure 6 :** Principales unités impliquées dans la structure de la lignine

La formation de la lignine se fait directement dans la paroi végétale par la polymérisation oxydative de ses monomères. Sa structure varie selon la nature du végétal : Gymnosperme, Angiosperme monocotylédone et Angiosperme dicotylédone. La lignification correspond à un dépôt de lignine plus particulièrement au niveau de la paroi secondaire mais aussi dans la lamelle moyenne et la paroi primaire (Boerjan *et al.*, 2003). Ce mécanisme de lignification assure la rigidité, l'imperméabilité et la protection de la cellule végétale contre la dégradation biologique. La lignine intervient dans la défense des plantes contre les stress biotiques et abiotiques. La lignification des tissus végétaux a aussi un impact sur les denrées

alimentaires, en particulier sur la digestibilité des fourrages (Tao *et al.*, 2009). La lignification se produit d'une façon naturelle au cours de la différenciation des cellules mais aussi en réponse à des modifications environnementales. La localisation et le dépôt de la lignine peuvent varier d'une espèce à une autre pour assurer le bon fonctionnement et l'adaptation des plantes à leur milieu.

Dans le fruit, la lignification des cellules est un cas rare qui reste limité à quelques espèces connues pour la présence de cellules pierreuses (cellules lignifiées) comme le coing (Pacífico *et al.*, 2012), la goyave (Marcelin *et al.*, 1993b) ou la poire (Sterling, 1954). Elles sont formées par une déposition de lignine dans la paroi primaire des cellules parenchymateuses (Cai *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014). La lignification des cellules parenchymateuses peut se produire à différents stades au cours du développement du fruit. Dans l'espèce *Pyrus communis* L., les cellules pierreuses commenceraient à se différencier environ deux semaines après la floraison (Sterling, 1954). Cependant, d'autres travaux ont montré que cette différenciation commencerait déjà au cours de la phase de floraison (Choi & Lee, 2013).

### 2.1.5. Flavonoïdes

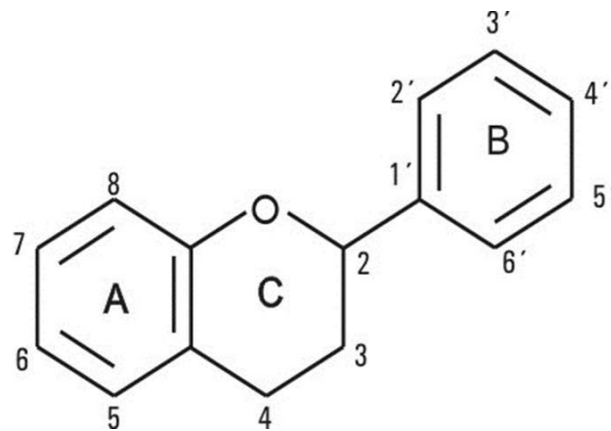
Les flavonoïdes représentent le principal groupe de polyphénols intracellulaires et sont couramment consommés sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le vin, le chocolat et le thé (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Sources alimentaires majeures de différents flavonoïdes (Manach *et al.*, 2004)

Sous-classes de flavonoïdes	Flavonoïdes	Aliments sources
Flavan-3-ols	<i>Catéchines</i> : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)- épigallocatechine, (+)-gallocatechine <i>Dimères et polymères</i> : proanthocyanidines	Thé, cacao, raisin, pomme, vin rouge
Flavonols	Isorhamnétine, kaempférol, myricétine, quercétine	Oignon, brocoli, chou, pomme, thé,
Anthocyanidines	Cyanidine, delphinidine, malvidine, pélagonidine, péonidine, petunidine	Myrtille, raisin, vin rouge

Plus de 6000 composés ont été identifiés (Harborne & Williams, 2000). Ils sont formés par un squelette à 15 carbones (C6-C3-C6) constitué de deux noyaux aromatiques (cycles A et B) et d'un noyau pyrane (hétérocycle C) (Tsao, 2010) (Figure 7). Ils peuvent se

présenter sous forme d'aglycones (entités dépourvues de résidu osidique) ou d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques).



**Figure 7 :** Structure générale des flavonoïdes

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la qualité des fruits en contribuant à leurs goûts, couleurs et valeurs nutritionnelles. Ils constituent des pigments responsables des couleurs jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Cheynier, 2005) et sont impliqués dans le brunissement enzymatique (Cheynier *et al.*, 1988). Ces composés sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, antiinflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales (Ghedira, 2005).

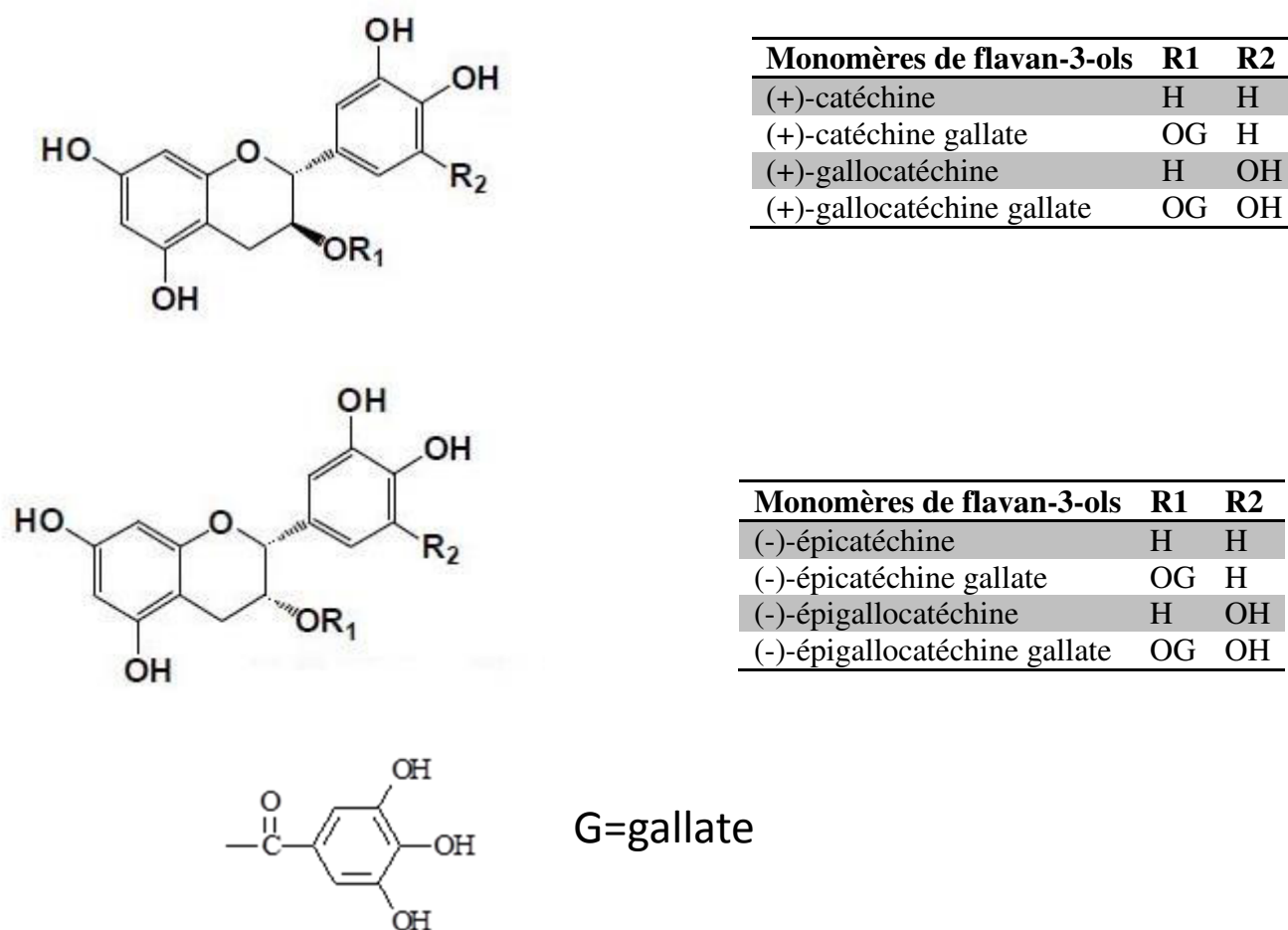
Les flavonoïdes se divisent en 7 sous-classes principales qui se distinguent par le niveau d'oxydation et les positions des substituants de leur hétérocycle principal : flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, flavan-3-ols, anthocyanes et hydrochalcones. Seuls les flavan-3-ols (monomères et polymères), flavonols et anthocyanines seront décrits ici puisque ce sont les seuls flavonoïdes présents dans la poire.

### **2.1.5.1. Flavan-3-ols**

#### **2.1.5.1.1. Monomères de flavan-3-ols**

Les monomères de flavan-3-ols sont communément appelés catéchines. Ils se caractérisent par un hétérocycle central C saturé substitué en C3 par un hydroxyle. La présence de deux carbones asymétriques en C2 et C3 ouvre la possibilité à 4 stéréoisomères. La (+)-catéchine est l'isomère de configuration *trans* alors que la (-)-épicatéchine est

l'isomère de configuration *cis*. La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine sont les deux isomères les plus répandus dans les fruits et les légumes (Tsao, 2010; Tsao *et al.*, 2003) (Figure 8). Elles sont détectées dans de nombreux fruits notamment ceux de la famille des Rosacées, tels que la pomme (Guyot *et al.*, 2003), la prune (De Pascual-Teresa *et al.*, 2000), la pêche (Ceccarelli *et al.*, 2016; Tomás-Barberán *et al.*, 2001), la poire (Kolniak-Ostek, 2016c) et le coing (Hamauzu *et al.*, 2005). Les monomères de flavan-3-ols peuvent porter de groupement gallate, comme la (+)-catéchine gallate et l'(-)-épicatéchine gallate. Ces deux monomères sont présents dans les feuilles (De Bruyne *et al.*, 1999), les pépins et les pellicules de raisins (Prieur *et al.*, 1994) et le thé (Haslam, 1998).



**Figure 8 :** Structures des différents monomères de flavan-3-ols (Tsao, 2010)



### 2.1.5.1.2. Oligomères et polymères de flavan-3-ols

#### ➤ Proanthocyanidines :

Les proanthocyanidines, également connues sous le nom de tannins condensés ou tannins catéchiques, sont des dimères, des oligomères et des polymères de flavan-3-ols. Le terme ‘tannins condensés’ est généralement utilisé pour les distinguer des tannins hydrolysables (Aron & Kennedy, 2008). Par ailleurs, ces molécules doivent leur nom de proanthocyanidines à leur capacité de générer des anthocyanidines après une hydrolyse acide (Aron & Kennedy, 2008; Thompson *et al.*, 1972; Tsao, 2010).

On distingue treize catégories de proanthocyanidines en fonction de l’unité monomérique constitutive de la molécule, c’est-à-dire du niveau d’hydroxylation des noyaux A et B (Tableau 3). Seules les procyanidines seront détaillées dans cette synthèse bibliographique car elles sont les seules proanthocyanidines présentes dans la poire.

**Tableau 3 :** Les différents types de proanthocyanidines (Aron & Kennedy, 2008; Collin & Crouzet, 2011)

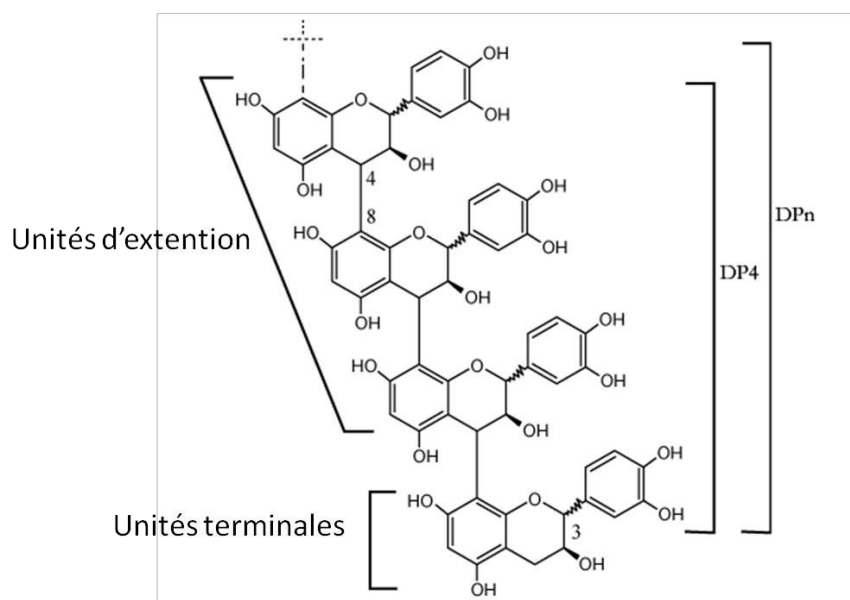
Proanthocyanidines		Position des substitutions				
Classes	Monomères	3	5	8	3'	5'
Procassinidine	Cassiaflavane	H	H	H	H	H
Probutinidine	Butiniflavane	H	H	H	OH	H
Proapigénidine	Apigénidinflavane	H	OH	H	H	H
Prolutéolinidine	Lutéoliflavane	H	OH	H	OH	H
Protricitinidine	Tricitiflavane	H	OH	H	OH	OH
Propelargonidine	Afzéléicine	OH	OH	H	H	H
<b>Procyanidine</b>	<b>Catéchine</b>	<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>
Prodelphinidine	Gallocatéchine	OH	OH	H	OH	OH
Proguibourtinidine	Guibourtinidol	OH	H	H	H	H
Profisetinidine	Fisétinitol	OH	H	H	OH	H
Prorobinetinidine	Robinétinidol	OH	H	H	OH	OH
Proteracacinidine	Oritine	OH	H	OH	H	H
Promelacacinidine	Prosopine	OH	H	OH	OH	H

### ➤ Procyanidines :

Les procyanidines se distinguent par le type d'unités monomériques, le type de liaisons interflavaniques et leur degré de polymérisation, c'est-à-dire le nombre d'unités constitutives de la molécule.

#### ✓ Unités constitutives

Les procyanidines sont des oligomères et des polymères de catéchines. Les procyanidines sont caractérisées par des unités d'extension et des unités terminales (Figure 9). Dans la pomme et la poire, les procyanidines sont principalement constituées de (-)-épicatechine, localisées en unités d'extension et en unités terminales. La (+)-catéchine quant à elle est présente uniquement en unité terminale (Guyot *et al.*, 1998; Guyot *et al.*, 2002b).



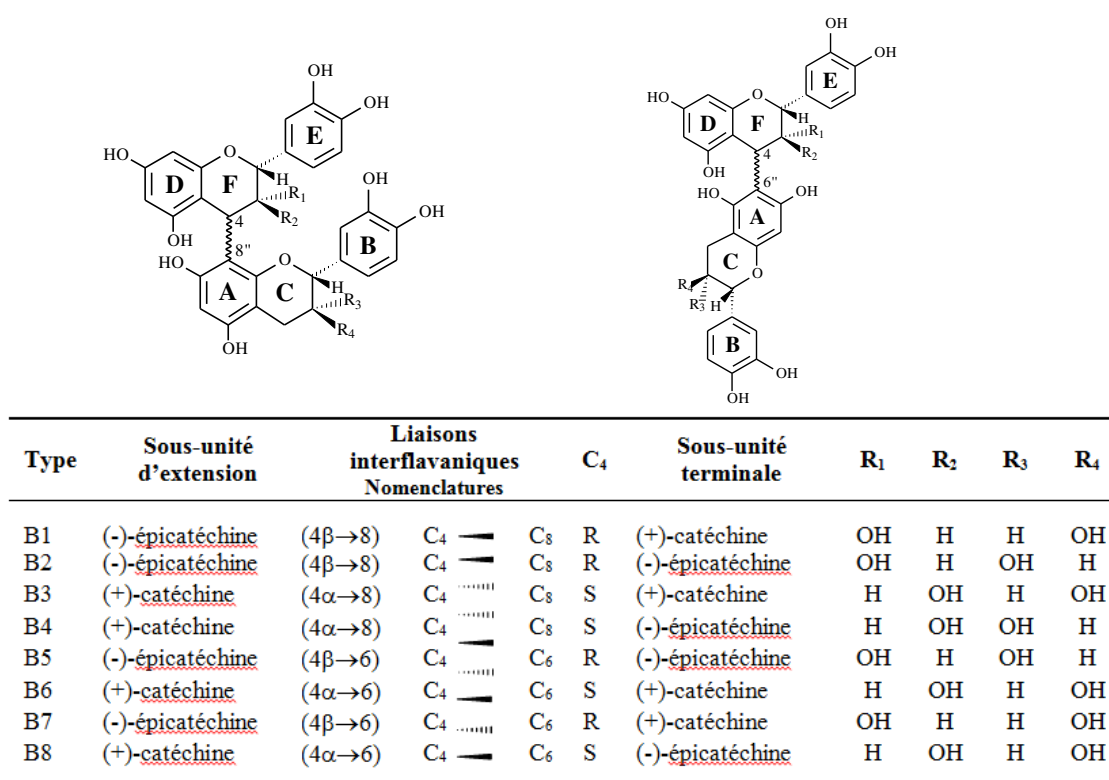
**Figure 9 :** Structure de base des procyanidines

#### ✓ Liaisons interflavaniques

Le type de liaisons interflavaniques qui lient les monomères de flavan-3-ols permet de distinguer deux types de procyanidines : les procyanidines de type A et les procyanidines de type B. Les procyanidines de type B se caractérisent par une seule liaison interflavanique entre deux unités, reliant le plus souvent les carbones C4 et C8 ou moins fréquemment les carbones C4 et C6. En revanche, les procyanidines de type A contiennent une liaison éther

supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles en C5 ou C7 (C2-O-C5, C2-O-C7) (Hemingway, 1989; Tsao, 2010).

Les procyanidines de type B sont plus répandues que les procyanidines de type A. Les procyanidines de type B ont été identifiées dans de nombreux fruits comme la pomme (Sanoner *et al.*, 1999), le raisin (Kennedy & Jones, 2001), la pêche (Ceccarelli *et al.*, 2016; Tomás-Barberán *et al.*, 2001), la prune (Tomás-Barberán *et al.*, 2001) et la poire (Kolniak-Ostek, 2016c). Les différents dimères de type B sont représentés dans la figure 10.



**Figure 10 :** Structure et nomenclature des dimères de procyanidines de type B

### ✓ Degré de polymérisation

Le degré de polymérisation moyen ( $DP_n$ ) des procyanidines est le nombre moyen d'unités constitutives d'une molécule de procyanidine. Il varie en fonction de la variété, de la localisation tissulaire (peau, pulpe, graines...) et du stade de maturité.

Le degré de polymérisation peut être calculé grâce à la réalisation d'une thioacidolyse (Figure 11). Cette dernière s'applique de manière spécifique aux procyanidines. Elle est basée sur le clivage des liaisons interflavaniques en milieu organique et acide sous certaines conditions de températures et en présence d'un excès de nucléophile soufré. Les unités

d'extensions des procyanidines sont libérées sous la forme d'un carbocation flavanyle qui réagit immédiatement avec le nucléophile pour former des dérivés benzylthioéthers. Les unités terminales sont libérées dans le milieu réactionnel sous leur forme monomère. Les unités d'extension et terminales sont par la suite quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (Guyot *et al.*, 2001). Afin de réaliser la distinction entre les flavan-3-ols natifs naturellement présents dans les échantillons et les monomères issus de la libération des unités terminales des procyanidines après la thiolyse, une analyse directe, sans thiolyse préalable, est nécessaire.

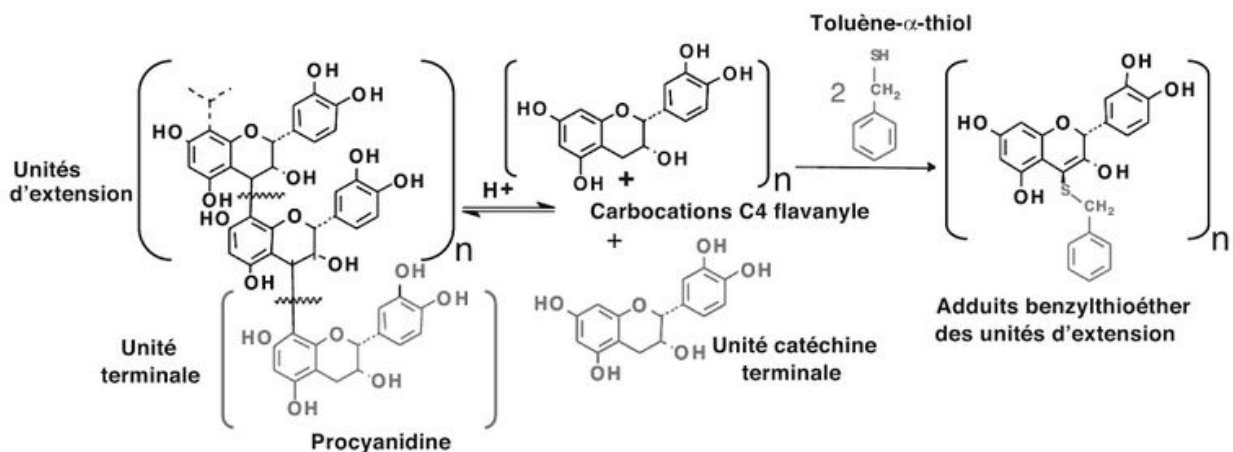
Il est calculé selon la formule décrite ci-contre (Eq1) :

$$DPn = \frac{[CAT] + [EPI] + [EPI SR] - [cat] - [épi]}{[CAT] + [EPI] - [cat] - [épi]} \quad (Eq1)$$

[CAT], [EPI] : Concentrations en unités terminales de flavan-3-ols obtenues après thioacidolyse,

[EPISR] : Concentration en (-)-épicatechine des unités d'extension liées au benzylthioéther après thioacidolyse,

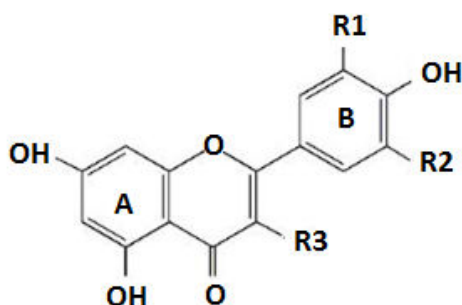
[cat], [épi] : Concentrations des flavan-3-ols libres natifs présents dans l'échantillon et déterminées par analyse directe.



**Figure 11** : Schéma réactionnel de la réaction de thioacidolyse appliquée aux procyanidines d'après Guyot *et al.* (1998)

### 2.1.5.3. Flavonols

Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné et oxydé. Ils existent principalement sous formes glycosylées avec du glucose ou du rhamnose mais d'autres sucres peuvent également être impliqués tels que le galactose, l'arabinose, le xylose et l'acide glucuronique. Les principaux aglycones de flavonols sont la quercétine, le kaempférol, l'isorhamnétine et la myricétine (Figure 12). Les flavonols sont généralement présents à des concentrations relativement variables selon les espèces. Les fruits contiennent souvent entre 5 et 10 glycosides de flavonols différents. Ils sont accumulés généralement dans l'épiderme des fruits où leur synthèse est stimulée par la lumière (Herrmann, 1976).



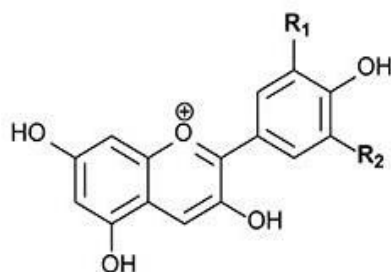
Flavonols	R1	R2	R3
Kaempférol	H	H	OH
Quercétine	OH	H	OH
Myricétine	OH	OH	OH
Isorhamnétine	OCH3	H	OH
Rutine	OH	H	rutino

**Figure 12 :** Structure chimique des principaux flavonols

### 2.1.5.4. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments de fleurs et de fruits, comme la cerise, la myrtille et le raisin, pouvant donner une couleur rose, rouge, bleue ou violette. Elles existent sous différentes formes chimiques, à la fois colorées et non colorées en fonction du pH (Clifford, 2000). Leur structure de base est caractérisée par un noyau flavonoïde chargé positivement. Ce dernier porte le nom d'anthocyanine ou d'anthocyanidine suivant qu'il est glycosylé ou non. La forme glycosylée est la plus répandue chez les plantes. Les anthocyanines se différencient par leur degré d'hydroxylation, de méthylation ainsi que par la nature, le nombre et la position des sucres liés à la molécule. Les pélagonidines, les cyanidines, les péonidines, les delphinidines, les pétunidines et les malvidines sont les plus courantes (Figure 13) (Andersen & Markham, 2005). La glycosylation et l'estérification avec divers acides organiques (acide malique, acide citrique, acide tartrique) ralentissent la dégradation des anthocyanines. Le glucose, le galactose, le rhamnose, l'arabinose sont les sucres les plus

couramment rencontrés, habituellement sous forme de 3-glycoside ou 3,5-diglycoside. D'une façon générale, les anthocyanines sont principalement localisés dans l'épiderme, à l'exception de certains fruits dont les chairs sont rouges tels que la cerise, la fraise, la myrtille et certains abricots, pêches et pommes (Clifford, 2000).



<b>Anthocyanidines</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
Pélagonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Péonidine	OCH3	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH3	OH
Malvidine	OCH3	OCH3

**Figure 13:** Structure chimique des principales anthocyanidines

## 2.2. Polyphénols majeurs de la poire

*Pyrus communis* L. fait partie des fruits dont la composition phénolique est encore peu étudiée. Les composés phénoliques de la poire sont principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Ainsi, on trouve des acides hydroxycinnamiques, des monomères et polymères de flavan-3-ols, des flavonols, des anthocyanes mais aussi des phénols simples tels que les hydroquinones. Ces composés sont répartis d'une façon hétérogène dans les différents tissus du fruit et sont généralement plus concentrés dans l'épiderme. Galvis-Sánchez *et al.* (2003) ont montré que la quantité totale de polyphénols dans quelques variétés de poires européennes (poires de table) varie de 1235 à 2005 mg/kg MF dans l'épiderme et de 28 à 81 mg/kg MF dans la chair. D'autres variétés de poire, utilisées spécifiquement pour la fabrication du poiré, ont des concentrations particulièrement élevées en polyphénols, pouvant dépasser 10 g/kg de MF (Guyot *et al.*, 2002b) (Tableau 4).

Les flavan-3-ols représentent la classe phénolique la plus abondante dans l'espèce *Pyrus communis* L.. Les procyanidines, oligomères et polymères de flavan-3-ols, sont les polyphénols majoritaires de la poire (Ferreira *et al.*, 2002; Kolniak-Ostek, 2016a, c; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a).

Les procyanidines constituent 90 % des polyphénols de certaines variétés de poires (Guyot *et al.*, 2002b; Renard, 2005a). Leur degré de polymérisation moyen ( $DP_n$ ) est très

variable et peut atteindre des valeurs élevées dans les poires à poiré (33 dans la variété ‘Fausset’, 32 dans la variété ‘Plant de Blanc’) (Guyot *et al.*, 2002b). Le degré de polymérisation est déterminant dans la capacité d’association des procyanidines avec les polysaccharides ou/et les protéines, avec des conséquences directes sur les caractéristiques organoleptiques des produits transformés tels que le jus, le vin et le cidre (Renard *et al.*, 2011; Symoneaux *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2003). Certains travaux prétendent que l’acide chlorogénique et l’arbutine sont les deux polyphénols majeurs de la poire (Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Salta *et al.*, 2010). Ceci est dû à la difficulté d’analyser les procyanidines. Leur structure polymérisée rend leur quantification difficile. La thioacidolyse couplée à la chromatographie en phase liquide permet de mesurer la juste contribution de ces composés dans les profils phénoliques des fruits notamment, dans les pommes de table, les pommes à cidre (Guyot *et al.*, 2001; Guyot *et al.*, 1998; Oszmianski *et al.*, 2007) et le raisin (Kennedy *et al.*, 2000).

La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine sont les deux flavan-3-ols monomères détectés dans la poire. Leur concentration varie de 12 à 211 mg/kg MF dans le cas des variétés ‘Comice’ et ‘Bosc’ respectivement (Tableau 4). Cependant, selon les variétés, les monomères de flavan-3-ols ne sont pas toujours détectés comme par exemple dans la variété ‘Gieser Wildeman’ destinée à être cuite (Renard, 2005a). La (-)-épicatéchine est toujours dominante quelle que soit la variété (Escarpa & Gonzalez, 2000; Ferreira *et al.*, 2002; Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Guyot *et al.*, 2002b; Le Bourvellec *et al.*, 2013).

L’acide 5'-caféoylquinique (ou acide chlorogénique) est l’acide phénolique majoritaire de la poire (Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a; Schieber *et al.*, 2001). Sa concentration varie selon la variété et peut atteindre 953 mg/kg MF dans la variété ‘Fausset’ (poire à poiré) et 624 mg/kg MF dans la variété ‘Rocha’ (Tableau 4). D’autres acides phénoliques peuvent être détectés dans la poire mais toujours en faibles concentrations comme l’acide 4'-caféoylquinique, l’acide 3'-caféoylquinique et l’acide di-*O*-caféoylquinique (Kolniak-Ostek, 2016c). La présence d’acide *p*-coumaroylquinique est rapportée par Amiot *et al.* (1995), Spanos et Wrolstad (1990) et Kolniak-Ostek (2016b). D’autres acides mineurs sont aussi détectés dans quelques variétés de poires comme les acides *p*-coumarique, syringique, férulique ainsi que des dérivés de l’acide syringique (galactoside,

glucoside), de l'acide férulique (hexoside) et de l'acide sinapique (hexoside) (Kolniak-Ostek, 2016c).

Les flavonols sont présents essentiellement sous forme glycosylée (galactoside, glucoside et rhamnoside). La quercétine, l'isorhamnetine ainsi que leurs dérivés sont généralement les plus présents dans *Pyrus communis* L.. Les concentrations les plus élevées sont détectées dans l'épiderme du fruit (Escarpa & Gonzalez, 2000; Galvis Sánchez *et al.*, 2003). Dans le cas des variétés 'Forelle' et 'Red d'Anjou', les concentrations sont >500 mg/kg MF dans l'épiderme (Tableau 4). D'autres sous-classes de flavonols peuvent être présentes dans la poire comme les dérivés du kaempférol, avec des concentrations de l'ordre de 27 mg/kg MF (variété 'Radana') et 28 mg/kg MF (variété 'Dicolor') (Kolniak-Ostek, 2016c).

Quelques anthocyanes ont été détectées, uniquement dans les poires à épiderme rouge telles que 'Red d'Anjou' et 'Forelle'. La variété 'Red d'Anjou' est plus riche en anthocyanes (121 mg/kg MF) que la variété 'Forelle' (12 mg/kg MF) (Tableau 4). Les cyanidine-3-*O*-galactoside et cyanidine-3-*O*-rutinoside sont les plus répandues (Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Kolniak-Ostek, 2016b). Les cyanidine-3-*O*-arabinoside et cyanidine-3-*O*-xyloside ont été aussi détectées, en quantités moins importantes, dans l'épiderme de la poire (Galvis Sánchez *et al.*, 2003).

L'arbutine est un composé caractéristique de la poire permettant sa différenciation du profil phénolique de la pomme avec également les dihydrochalcones spécifiques de cette dernière (Schieber *et al.*, 2001). Elle a été détectée dans différents tissus du poirier tels que l'épiderme du fruit, la tige, les pépins et le cortex ainsi que dans la chair des fruits. Sa teneur varie selon les variétés mais aussi selon le stade de maturité. Les quantités les plus faibles ont été détectées dans des poires immatures (Durkee *et al.*, 1968). La concentration en arbutine est plus élevée dans l'épiderme (1158 mg/kg FW dans la variété 'Bosc' (Galvis Sánchez *et al.*, 2003), 37 mg/kg MF dans la variété 'Conférence' (Escarpa & Gonzalez, 2000)) que dans le parenchyme (19 mg/kg FW dans la variété 'Conférence' (Escarpa & Gonzalez, 2000)) (Tableau 4).



**Tableau 4 :** Composition phénolique des poires (mg/kg MF) et des jus (mg/L) de quelques variétés européennes (*Pyrus communis* L.)

Variétés	Matrice	Acides	Flavan-3-ols	Flavonols	Anthocyanidines	Hydroquinones	Références		
		phénoliques	Catéchines	Quercétine et	Isorhamnetine	Cyanidines		Arbutine	
		Acide 5- caféoylquinique	monomères	Procyanidines polymères	ses dérivés	et ses dérivés	et ses dérivés		
Abate	Fruit	79	24	ND	ND	ND	nd	39	Salta <i>et al.</i> , 2010
Bonkrete	Fruit	64	9	38	17	33	nd	32	Kolniak-Ostek, 2016b
Carola	Fruit	77	87	45	3	10	nd	36	Kolniak-Ostek, 2016b
Comice	Fruit	43	12	ND	ND	ND	nd	56	Salta <i>et al.</i> , 2010
Dicolor	Fruit	73	93	17	158	50	nd	10	Kolniak-Ostek, 2016b
Fausset	Fruit	953	ND	10605	ND	ND	nd	nd	Guyot <i>et al.</i> , 2002
Faworytka	Fruit	35	87	19	63	31	nd	14	Kolniak-Ostek, 2016b
Hortensia	Fruit	59	104	20	49	53	nd	34	Kolniak-Ostek, 2016b
Konferencja	Fruit	47	90	26	10	50	nd	30	Kolniak-Ostek, 2016b
Lukasowka	Fruit	117	68	37	15	22	nd	27	Kolniak-Ostek, 2016b
Najabrska	Fruit	97	109	61	5	17	nd	35	Kolniak-Ostek, 2016b
Passe crassane	Fruit	53	103	ND	ND	ND	nd	31	Salta <i>et al.</i> , 2010
Plant de Blanc	Fruit	539	ND	7196	ND	ND	nd	nd	Guyot <i>et al.</i> , 2002
Rocha	Fruit	624	67	ND	ND	ND	nd	225	Salta <i>et al.</i> , 2010
Radana	Fruit	185	36	99	53	70	nd	71	Kolniak-Ostek, 2016b
Uta	Fruit	49	56	20	nd	5	nd	20	Kolniak-Ostek, 2016b
<i>Moyenne</i>	<i>Fruit</i>	<i>193</i>	<i>59</i>	<i>1136</i>	<i>23</i>	<i>21</i>	<i>nd</i>	<i>41</i>	
<i>Minimum</i>	<i>Fruit</i>	<i>35</i>	<i>9</i>	<i>17</i>	<i>3</i>	<i>5</i>	<i>nd</i>	<i>35</i>	
<i>Maximum</i>	<i>Fruit</i>	<i>953</i>	<i>109</i>	<i>10605</i>	<i>158</i>	<i>70</i>	<i>nd</i>	<i>225</i>	
Bosc	Chair	35	nd	ND	nd	nd	nd	nd	Glavis Sánchez <i>et al.</i> , 2003
Conference	Chair	12	16	ND	nd	nd	nd	19	Escarpa & Gonzalez ., 2000
Coscia	Chair	28	nd	ND	nd	nd	nd	nd	Glavis Sánchez <i>et al.</i> , 2003
D'Anjou	Chair	81	nd	ND	nd	nd	nd	nd	Glavis Sánchez <i>et al.</i> , 2003
Forelle	Chair	34	nd	ND	nd	nd	nd	nd	Glavis Sánchez <i>et al.</i> , 2003
Packams	Chair	42	nd	ND	nd	nd	nd	nd	Glavis Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<i>Moyenne</i>	<i>Chair</i>	<i>39</i>	<i>3</i>	<i>ND</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>3</i>	

Variétés	Matrice	Acides	Flavan-3-ols		Flavonols		Anthocyanidines	Hydroquinones	Références
		phénoliques	Catéchines	Procyanidines	Quercétine et	Isorhamnetine	Cyanidines	Arbutine	
		Acide 5- caféoylquinique	monomères	polymères	ses dérivés	et ses dérivés	et ses dérivés		
<i>Minimum</i>	<i>Chair</i>	12	0	ND	0	0	0	0	
<i>Maximum</i>	<i>Chair</i>	81	16	ND	0	0	0	19	
<b>Bosc</b>	Epiderme	193	211	ND	32	62	nd	1158	Glavis-Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<b>Conference</b>	Epiderme	130	43	ND	178	270	nd	37	Escarpa & Gonzalez ., 2000
<b>Coscia</b>	Epiderme	223	33	ND	297	109	nd	611	Glavis-Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<b>D'Anjou</b>	Epiderme	242	14	ND	79	76	nd	817	Glavis-Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<b>Forelle</b>	Epiderme	382	116	ND	107	411	12	583	Glavis-Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<b>Packams</b>	Epiderme	142	22	ND	87	217	nd	727	Glavis-Sánchez <i>et al.</i> , 2003
<i>Moyenne</i>	<i>Epiderme</i>	<i>224</i>	<i>46</i>	<i>ND</i>	<i>150</i>	<i>217</i>	<i>2</i>	<i>555</i>	
<i>Minimum</i>	<i>Epiderme</i>	<i>130</i>	<i>14</i>	<i>ND</i>	<i>79</i>	<i>76</i>	<i>0</i>	<i>37</i>	
<i>Maximum</i>	<i>Epiderme</i>	<i>382</i>	<i>116</i>	<i>ND</i>	<i>297</i>	<i>411</i>	<i>12</i>	<i>817</i>	
<b>Akça</b>	Jus	248	22	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<b>Ankara</b>	Jus	148	21	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<b>Santa Maria</b>	Jus	73	12	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<b>Seker</b>	Jus	95	18	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<b>Starkrimson</b>	Jus	166	81	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<b>William</b>	Jus	174	35	ND	ND	ND	ND	ND	Tanrıöven & Ekşi, 2005
<i>Moyenne</i>		<i>151</i>	<i>32</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	
<i>Minimum</i>		<i>73</i>	<i>12</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	
<i>Maximum</i>		<i>248</i>	<i>81</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	

ND : non déterminé, nd : non détecté

### 2.3. Effet de la maturité sur la composition phénolique du fruit

Les études menées sur la variation de la composition phénolique au cours de la maturation de la poire restent limitées. D'une façon générale, la maturité peut induire des différences quantitatives dans le profil phénolique de la poire (Spanos & Wrolstad, 1990) mais cette différence est moindre par rapport au facteur génétique (variété) (Amiot *et al.*, 1995). Suagawara *et al.* (2013) ont montré que les polyphénols s'accumulent essentiellement pendant la fructification et leurs concentrations diminuent avec la maturité dans les poires japonaises (essentiellement pour l'arbutine et l'acide chlorogénique).

L'évolution de la composition phénolique de la pomme est plus décrite que celle de la poire. Mosel et Herrman (1974) ont montré que le rapport (-)-épicatéchine/(+)-catéchine augmente considérablement en faveur de la (-)-épicatéchine durant le développement du fruit. Guyot *et al.* (2003) ont montré que d'une façon générale le profil phénolique de la pomme est peu modifié au cours de la maturation. Les changements sont plutôt quantitatifs : la concentration des composés phénoliques peut diminuer d'une façon significative avec la maturité, probablement due à l'effet de dilution liée à la croissance du fruit (Renard *et al.*, 2007). Dans le cas des pommes à cidre, la synthèse des polyphénols se fait essentiellement jusqu'à 40 jours après la pleine floraison (Renard *et al.*, 2007). La concentration des flavonoïdes (flavan-3-ols, flavonols et dihydrochalcones) diminue ensuite considérablement entre le 35<sup>ème</sup> jour et le 100<sup>ème</sup> jour après la floraison alors que la quantité par fruit reste stable. Le degré de polymérisation des procyanidines varie au cours du développement du fruit comme montré par Renard *et al.* (2007) dans les pommes à cidres : une augmentation dans la variété 'Avrolles' et une diminution chez la variété 'Kemerrien'.

Le raisin est le modèle le plus étudié pour ce qui est de l'évolution des composés phénoliques au cours de la maturation. D'une façon générale, Gomèz-plaza *et al.* (2017) ont montré que la concentration totale des proanthocyanidines extractibles à partir de l'épiderme de trois variétés de raisins diminue au cours de la maturité. Le rendement des flavan-3-ols libres extraits de pépins de 'Cabernet Sauvignon' diminue très rapidement au cours de la maturation, suivi par la baisse des unités d'extensions et celles des unités terminales des procyanidines (Kennedy *et al.* 2000). La proportion relative des unités d'extensions des procyanidines ne change pas au cours de la maturation et par conséquent leur degré de polymérisation demeure stable (Kennedy *et al.*, 2000). Bindon *et al.* (2011) ont montré que le

degré de polymérisation des procyanidines extraites à partir de l'épiderme de ce même cépage à différents stades de maturité augmente de 24 à 33 après la véraison. Bindon *et al.* (2014) ont confirmé que la masse moléculaire des tannins augmente avec des stades de maturité tardifs. Gangé *et al.* (2006) et Geny *et al.* (2003) ont montré que c'est plutôt le degré de polymérisation des tannins associés à la paroi cellulaire qui augmente à des stades de maturité avancés, le degré de polymérisation des tannins libres dans la vacuole restant stable.

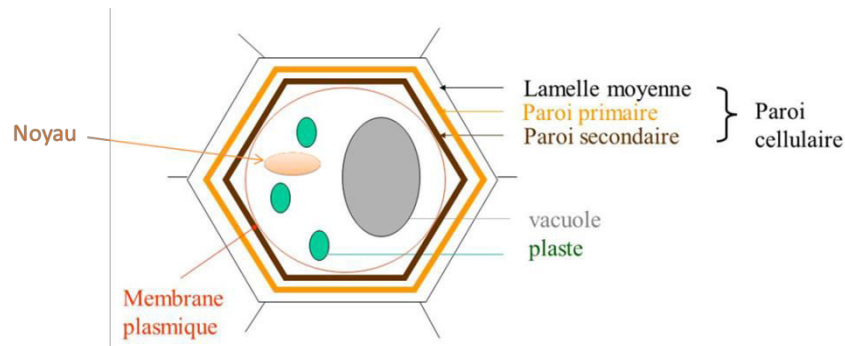
*L'effet de la surmaturation sur les polyphénols des poires, en particulier les procyanidines, n'est pas encore étudié.*

### **3. Paroi**

Cette partie présente la définition de la paroi cellulaire végétale, la description de sa structure ainsi que ses éléments constitutifs (pectine, hémicelluloses et cellulose) avec une focalisation sur son évolution au cours de la maturité et/ou la surmaturation. La composition de la paroi de poire ainsi que son évolution avec la maturité sont aussi décrites.

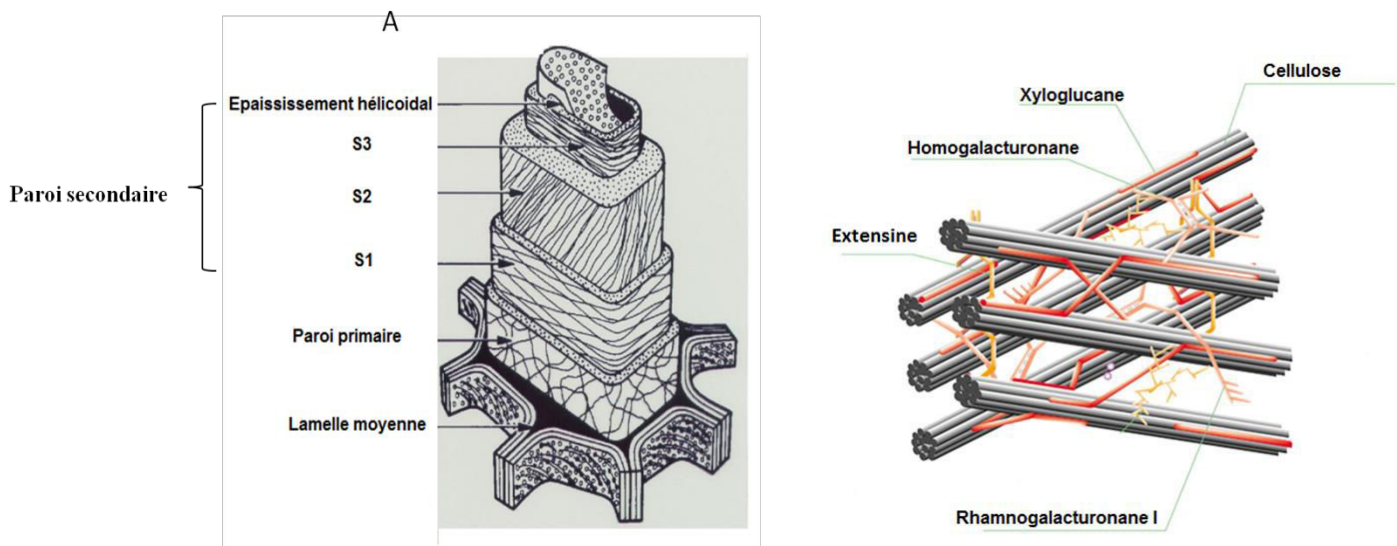
#### **3.1. Définition et structure de la paroi cellulaire végétale**

La cellule végétale se distingue de la cellule animale par la présence d'une paroi pectocellulosique (Figure 14). Cette structure correspond à l'enveloppe la plus externe de la cellule ayant une structure rigide microfibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble. Elle est principalement formée de polysides (pectine, hémicellulose et cellulose), de protéines (extensine, enzymes) et de composés de nature phénolique (lignine). La paroi assure plusieurs rôles indispensables pour le maintien de la cellule végétale. Elle permet de maintenir et de déterminer la forme des cellules et l'architecture des plantes. Elle doit être modulable au rythme de la croissance des jeunes cellules, tout en restant ferme afin d'assurer son rôle dans le port érigé des plantes, ainsi qu'en tant que barrière protectrice contre les agents pathogènes, la déshydratation et les agressions environnementales. Elle permet la cohésion et la communication entre les cellules (Cosgrove, 2005). La paroi végétale est également à l'origine de multiples applications en tant que source agroalimentaire, source de biomatériaux ou encore de biomasse valorisable à des fins énergétiques.



**Figure 14 :** Structure générale d'une cellule végétale

Différents niveaux d'organisation confèrent à la paroi végétale son aspect dynamique et rigide. Elle est composée d'une lamelle moyenne, d'une paroi primaire et d'une paroi secondaire (Figure 15A).



**Figure 15 :** A) Organisation de la paroi végétale en lamelle moyenne, paroi primaire et paroi secondaire (Hopkins, 2003). B) Schéma structurel de la paroi primaire d'après Carpita et Gibeaut (1993)

### ➤ Lamelle moyenne

C'est la partie la plus externe de la paroi végétale. Elle est commune à deux cellules contiguës. La lamelle moyenne se forme en premier lors de la division cellulaire et elle est constituée principalement de matières pectiques (Hopkins, 2003).

### ➤ **Paroi primaire**

La paroi primaire caractérise les cellules en croissance. Elle est fine, souple et fortement hydratée. Elle se compose d'une trame lâche de microfibrilles de cellulose baignant dans une matrice amorphe de pectines et d'hémicelluloses (Figure 15B). Cette paroi a une double spécificité du fait qu'elle doit être rigide pour jouer le rôle de squelette, bien qu'elle soit relativement souple par rapport à la paroi secondaire, et elle doit assurer une certaine plasticité et/ou élasticité permettant la croissance cellulaire (Carpita & Gibeaut, 1993; McNeil *et al.*, 1984).

### ➤ **Paroi secondaire**

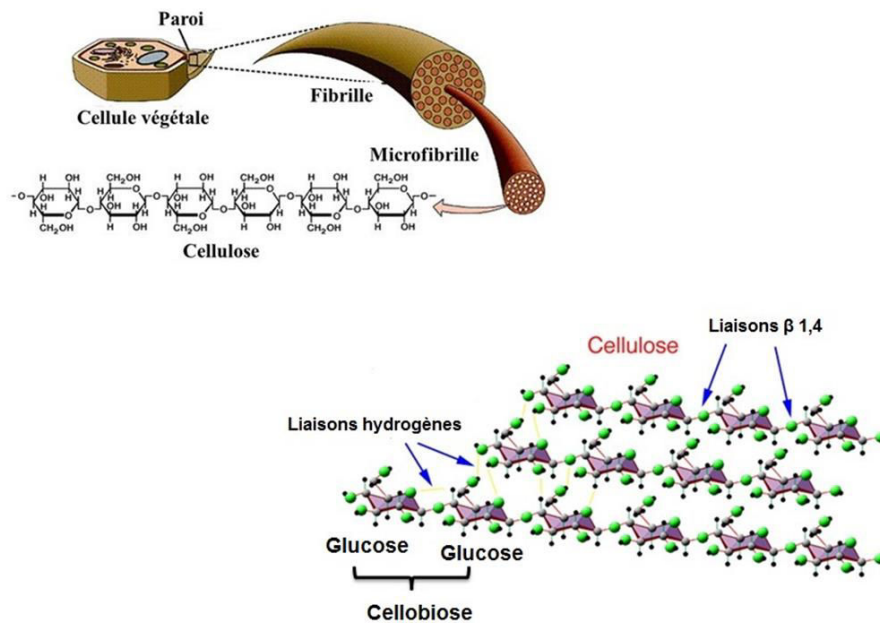
La paroi secondaire apparaît au moment de la différenciation des cellules. Elle est épaisse, rigide et dense. Elle est appliquée contre la paroi primaire et à l'intérieur de celle-ci. Elle se compose de cellulose hautement cristalline et d'hémicelluloses et est enrichie en composés phénoliques, comme la lignine pour renforcer sa rigidité, ou en cutine et subérine en surface pour renforcer son imperméabilité. La lignification se déroule après la mise en place de la cellulose et des hémicelluloses. Cette différenciation peut toucher les cellules de vaisseaux conducteurs (bois), de tissu de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège). La paroi secondaire est déposée en trois étapes successives formant des couches aux orientations définies, appelées S1, S2 et S3 (Figure 15A). Cette disposition joue un rôle primordial pour définir les propriétés physiques de la paroi (Hopkins, 2003).

## **3.2. Composition de la paroi végétale**

### **3.2.1. Cellulose**

La cellulose (Figure 16) est le bio-polymère le plus abondant sur Terre. Elle constitue 20 à 30 % de la matière sèche des parois primaires et de 40 à 90 % des parois secondaires (Fry, 1988). C'est un polyside homogène insoluble constitué d'unités de glucose liées en  $\beta$ -1,4, avec un degré de polymérisation élevé (Kroon-Batenburg & Kroon, 1997). Deux molécules de glucose consécutives s'orientent l'une par rapport à l'autre et forment l'unité structurelle de base, le cellobiose (Brown *et al.*, 1996; McNeil *et al.*, 1984). Les molécules de cellulose ont la propriété de pouvoir s'associer par des liaisons hydrogènes et des forces de Van der Waals, formant des structures cristallines insolubles et très résistantes aux dégradations chimiques et enzymatiques (Kroon-Batenburg & Kroon, 1997). Les propriétés de la cellulose dépendent de la longueur et du diamètre des microfibrilles ainsi formées. Les principales formes de cellulose sont la forme I et II selon l'orientation parallèle ou

antiparallèle de leurs chaînes. Dans les végétaux, les microfibrilles de cellulose sont essentiellement de type I avec deux conformations possibles I $\alpha$  et I $\beta$  (O'sullivan, 1997).



**Figure 16 :** Structure générale de la cellulose

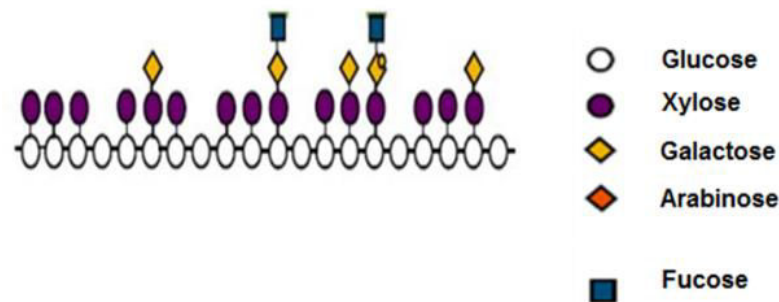
### 3.2.2. Hémicelluloses

Le terme d'hémicelluloses regroupe les polysides non cellulosiques et non pectiques de la paroi végétale. Ce sont des polymères hétérogènes à structure linéaire pourtant de courtes chaînes latérales. Elles sont définies comme des polysides dont le squelette est composé de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-pyranose. Elles sont généralement extraites par des solutions alcalines à différentes concentrations. Les molécules d'hémicelluloses se lient étroitement à la surface des microfibrilles de cellulose par des liaisons hydrogènes. Elles représentent environ 20 à 40 % de la biomasse végétale. Les hémicelluloses sont de différents types selon qu'elles entrent dans la constitution des parois primaires ou des parois secondaires (Fry, 1988; McNeil *et al.*, 1984). Au niveau de la membrane primaire des dicotylédones, les xyloglucanes sont majoritaires et jouent un rôle de cohésion entre la cellulose et les constituants ramifiés de la paroi (Hayashi, 1989). Les xylanes sont les hémicelluloses majeures dans la paroi primaire des monocotylédones (environ 20 %). Les mannanes constituent les composés majeurs de la paroi secondaire des gymnospermes (Scheller & Ulvskov, 2010).

Dans les dicotylédones, on trouve trois groupes d'hémicelluloses :

➤ **Xyloglucanes**

Ce sont les hémicelluloses prédominantes de la paroi primaire ; ils peuvent représenter de 20 à 25 % du poids sec. Leur squelette de base est formé par des résidus de D-glucose liés en  $\beta$ -(1,4). Leurs unités principales peuvent être substituées en  $\alpha$ -(1,6) par des résidus de D-xylose (Hayashi, 1989), qui peuvent eux-mêmes porter des résidus de galactose et de fucose (Figure 17) .



**Figure 17** : Structure schématique d'une molécule de xyloglucane

➤ **Xylanes**

Les xylanes constituent dans les dicotylédones entre 5 et 20 % des parois primaire et secondaire respectivement. Leur chaîne principale est constituée d'unités de xylopyranose reliées par des liaisons  $\beta$ -(1,4). Contrairement aux xyloglucanes, les xylanes n'ont pas de structure régulière. Ils peuvent être ramifiés par des courtes chaînes et leur variabilité structurale se manifeste par le degré et la nature des substitutions qui peuvent apparaître sur les C2 et les C3 des unités de xylose, telles que les groupements arabinosyles et glucuronosyles. Les xylanes porteurs de substituants arabinose, ceux porteurs de substituants d'acide glucuronique et son dérivé *O*-méthylé, ceux porteurs de deux types de substituants et ceux non substitués sont appelés respectivement arabinoxylanes, glucuronoxylanes, glucuronoarabinoxylanes et homoxylanes. Des groupements acétyles peuvent être portés par les C2 et C3 des unités de xylose. Les xylanes les plus ramifiés sont moins liés aux microfibrilles de cellulose et plus solubles dans l'eau (Fry, 1988; McNeil *et al.*, 1984). Les xylanes peuvent former des liaisons avec la lignine via les résidus d'arabinose qui peuvent être estérifiés par les acides hydroxycinnamiques (acide férulique ou *p*-coumarique). Cette



association entre la lignine et les polymères polyosidiques confère plus de rigidité à la paroi végétale (McNeil *et al.*, 1984; Scheller & Ulvskov, 2010).

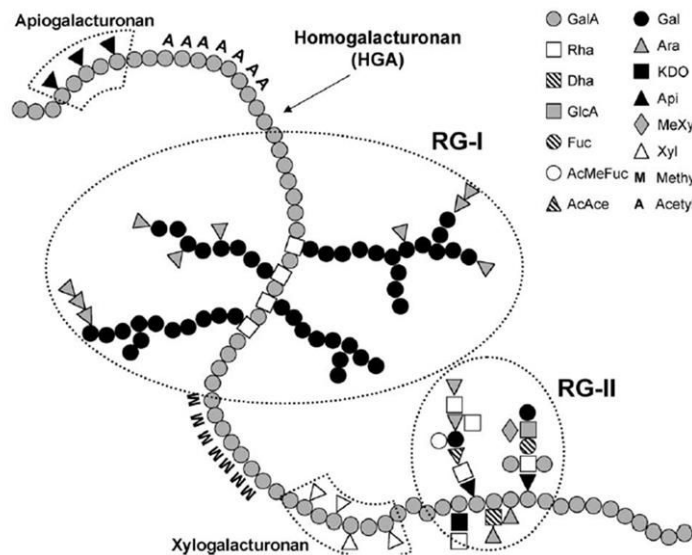
➤ **Mannanes et glucomannanes**

Les mannanes et les glucomannanes sont largement répandus dans la paroi secondaire lignifiée. Les mannanes possèdent un squelette de résidus D-mannose liés en  $\beta$ -(1,4) alors que les glucomannanes ont un squelette de résidu D-mannose et D-glucose liés également en  $\beta$ -(1,4). Ces deux hémicelluloses peuvent être substituées en  $\alpha$ -1,6 par des résidus de D-galactose (les galactomannanes et galactoglucomannanes). Les mannanes et les glucomannanes existent souvent sous forme acétylée en C2 ou C3 (Stumpf *et al.*, 2012).

### **3.2.3. Pectines**

C'est le polyoside le plus complexe de la paroi végétale. Les pectines sont des molécules colloïdales ayant un rôle de maintien des cellules en formant un ciment intercellulaire. Les pectines sont principalement localisées au niveau de la lamelle moyenne. Leurs rôles ne se limitent pas à l'échelle cellulaire. Ces substances sont aussi utilisées dans de nombreux domaines comme dans les industries cosmétique et pharmaceutique mais l'utilisation la plus importante est dans l'industrie agroalimentaire où les pectines sont essentiellement utilisées comme des agents de texture, gélifiants, stabilisants et épaississants (Thakur *et al.*, 1997) (E440). Les principales sources agroalimentaires des pectines sont les marcs de pommes et les écorces d'agrumes.

Les pectines sont des polyosides hétérogènes acides. Elles sont décrites comme un enchaînement de deux structures majoritaires : une chaîne principale dont les monomères de bases sont les acides  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en (1,4) (zone lisse = homogalacturonane) (Ridley *et al.*, 2001) et une chaîne rhamnogalacturonique portant des résidus de  $\alpha$ -L-rhamnose liés en (1,2) (zone hérissée = rhamnogalacturonane). De nombreuses chaînes latérales essentiellement composées d'arabinose et de galactose (les galactanes, les arabinanes et les arabinogalactanens) peuvent être portées par les résidus rhamnose (Figure 18) (De Vries *et al.*, 1983).



**Figure 18** : Structure schématique des différents domaines pectiques dans la paroi primaire (Perez, 2003).

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, la présence des chaînes latérales, le degré d'acétylation (DAc) et le degré de méthylation (DM). Le DM et le DAc sont définis comme étant le pourcentage de groupement carboxyles méthylés ou d'acides galacturoniques acétylés. Du point de vue fonctionnel, on distingue trois groupes de pectines en fonction de leur degré de méthylation :

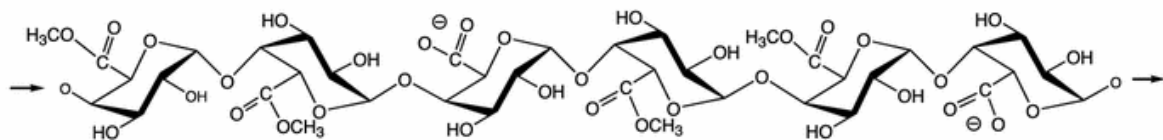
- Les acides pectiques possédant un DM inférieur à 5 % ;
- Les pectines faiblement méthylées ayant un DM inférieur à 50 % ;
- Les pectines hautement méthylées ayant un DM supérieur à 50 %.

Dans les fruits, les pectines sont généralement hautement méthylées (DM>50) (exemple : le citron (Renard & Jarvis, 1999), la pomme (Fischer *et al.*, 1994)).

Les pectines peuvent être aussi classées suivant leur mode d'extraction soit par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique, CTDA : Acide DiaminoCyclohexane Tétraacétique, oxalate d'ammonium) pour les pectines liées par des ponts de calcium, soit par le carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) pour les pectines liées par des ponts esters et soit par l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique) (Brummell, 2006; Fischer & Bennett, 1991).

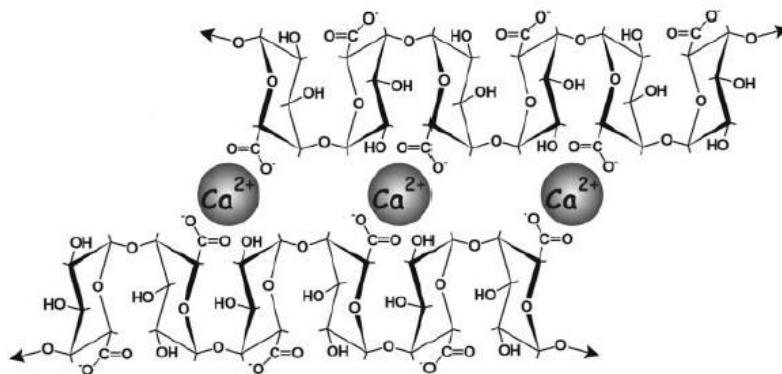
### 3.2.3.1. Homogalacturonanes

Les homogalacturonanes (Figure 19) sont les polymères pectiques les plus simples. Ils sont constitués d'une chaîne polygalacturonique non ramifiée (zone lisse) généralement intercalée entre des zones rhamnogalacturoniques. Ils constituent environ 60 % des pectines de la paroi végétale. Les acides  $\alpha$ -D-galacturoniques peuvent être méthylés en C6 et /ou acétylés en position C2 ou C3 (Ridley *et al.*, 2001). Le degré d'estérification varie selon l'origine des homogalacturonanes et il détermine dans une large mesure l'application industrielle des pectines et leurs capacités d'interactions. Des segments d'homogalacturonanes constitués de 70 à 100 unités d'acide galacturonique ont été rapportés dans le citron, la betterave sucrière ou la pomme (Thibault *et al.*, 1993).



**Figure 19** : Structure primaire des homogalacturonanes (Wong, 2008).

Deux chaînes d'homogalacturonanes peuvent interagir par des ponts calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Cette interaction est contrôlée par le degré d'estérification des homogalacturonanes, qui masque les groupes carboxyles pouvant participer à ces liaisons ioniques (Figure 20). En effet, l'acide carboxylique non méthylyé en C6 de l'acide galacturonique constitutif des chaînes d'homogalacturonanes peut être chargé négativement selon le pH du milieu et il peut fixer le calcium pour former un gel stable avec d'autres molécules pectiques. Le complexe homogalacturonane-calcium est généralement décrit par le modèle « boîte à œufs » (Rees, 1982)



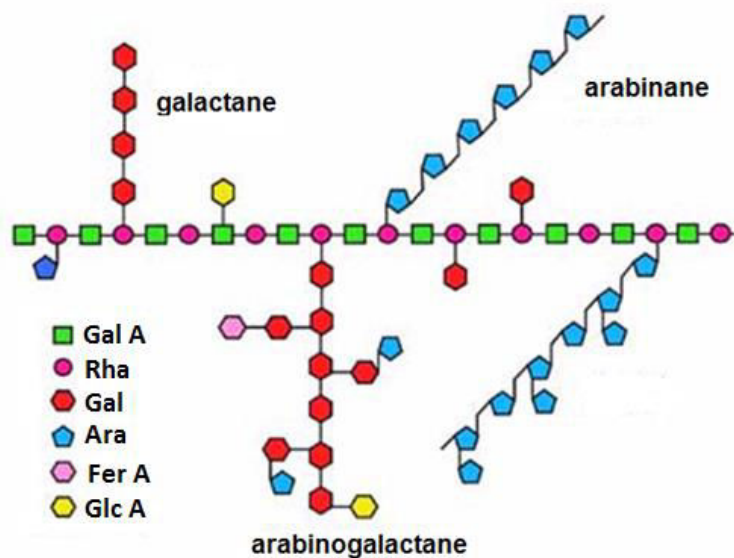
**Figure 20** : Modèle « boîte à œufs » de la dimérisation des homogalacturonanes (Vincken *et al.*, 2003).

### 3.2.3.2. Rhamnogalacturonanes

On distingue deux types de rhamnogalacturonanes : les rhamnogalacturonanes I (RG I) et les rhamnogalacturonanes II (RG II).

#### ➤ Rhamnogalacturonanes I

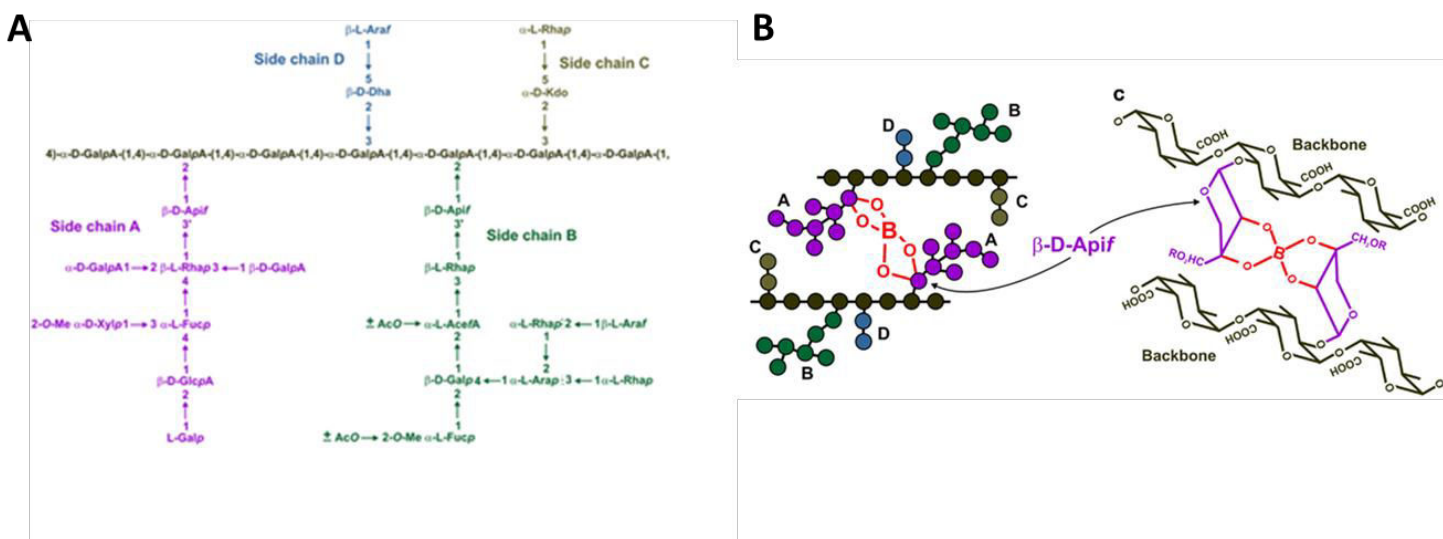
Contrairement aux homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes I possèdent un squelette hétérogène constitué de résidus  $\alpha$ -L-rhamnose liés en (1,2) et alternés des résidus d'acide  $\alpha$ -D-galacturoniques liés en (1,4). Certains résidus d'acide galacturonique peuvent être acétylés en C2 ou C3 ou substitués par de l'acide glucuronique en C3 (Renard *et al.*, 1999; Wong, 2008). Les résidus de rhamnose peuvent être substitués en C4 (ou C3) par des chaînes latérales d'oses neutres à base d'arabinose et de galactose (des arabinanes, des galactanes et des arbinogalactanes) (Figure 21) (Thibault *et al.*, 1993; Wong, 2008). Dans certaines espèces, notamment dans la famille des Chénopodiacées, les chaînes latérales peuvent être aussi substituées par des acides phénoliques (acide férulique ou acide *p*-coumarique) estérifiant les fonctions alcools en C6 des résidus de galactose ou en C2 des résidus d'arabinose (Oosterveld *et al.*, 1996). Les rhamnogalacturonanes I peuvent représenter de 7 à 14 % de la pectine (Ridley *et al.*, 2001).



**Figure 21** : Structure schématique de rhamnogalacturonanes I (RG I) composé d'un squelette d'acide D-galacturonique et de L-rhamnose. Des chaînes latérales d'arabinanes, galactanes et arabinogalactanes peuvent se fixer sur les molécules de rhamnose.

## ➤ Rhamnogalacturonanes II

Les rhamnogalacturonanes II sont des homogalacturonanes hautement substitués et ramifiés, portant des chaînes latérales distinctes avec une grande diversité de sucres constitutifs. Les rhamnogalacturonanes II sont les seuls à présenter un domaine pectique avec un agencement bien défini et dont l'architecture est similaire dans toutes les plantes étudiées (O'Neill *et al.*, 1996). Ils comprennent approximativement neuf résidus d'acides galacturoniques liés en  $\alpha$ -(1,4) constituant la chaîne principale, sur laquelle sont fixées quatre chaînes latérales complexes (Figure 22A). Ces chaînes sont composées d'arabinofuranose, d'arabinopyranose, de glucopyranose, de fucopyranose, d'apiofuranose et de galactopyranose ainsi que certains oses plus rares tels que le Dha (acide-3-déoxy-D-lyxo-heptulosarique), le Kdo (acide-3-déoxy-D-manno-octulosonique) et l'acide acérique (O'Neill *et al.*, 1996). Au niveau de la paroi cellulaire, les rhamnogalacturonanes existent sous forme monomère ou dimère par l'intermédiaire d'une liaison covalente via le diester de borate (Figure 22B). Cette réticulation est importante pour la formation de la paroi ainsi que pour le contrôle de sa porosité et son épaisseur (Cosgrove, 2005).



**Figure 22 :** A) Structure schématique de rhamnogalacturonanes II (polyoside constitué d'un squelette d'homogalacturonane substitué par quatre chaînes latérales A, B, C, D). B) Pont d'ester-borate entre deux chaînes A du rhamnogalacturonanes II (Bar-Peled *et al.*, 2012).

### 3.2.3.3. Arabinanes, galactanes et arabinogalactanes

Les arabinanes sont constitués d'un squelette d' $\alpha$ -(1,5)-L-arabinofuranose qui peut être substitué en position C2 ou en position C3 par des résidus d' $\alpha$ -(1,5)-L-arabinofuranose (McNeil *et al.*, 1984).

Les galactanes sont des polymères de  $\beta$ -D-galactopyranose. Ces chaînes de galactanes peuvent être substituées par des résidus de  $\alpha$ -L-arabinofuranose et on distingue ainsi deux types d'arabinogalactanes : les arabinogalactanes de type I et les arabinogalactanes de type II (McNeil *et al.*, 1984).

Les arabinogalactanes de type I sont composés d'un squelette de  $\beta$ -(1,4)-D-galactopyranoses éventuellement substitués en position C3 par des résidus de  $\alpha$ -L-arabinofuranose liés en (1,5) (McNeil *et al.*, 1984).

Les arabinogalactanes de type II sont des polysides hautement ramifiés et très répandus dans les espèces végétales. Leur squelette est formé de résidus de  $\beta$ -(1,3)-D-galactopyranose portant en position C6 soit des courtes chaînes de  $\beta$ -(1,6)-D-galactopyranose qui à leur tour peuvent être substitués en position C3, soit des chaînes de  $\alpha$ -(1,5)-L-arabinofuranose. Les arabinogalactanes de type II sont principalement associés à des protéines (arabinogalactanes-protéines) (Carpita & Gibeaut, 1993). Les pectines et les arabinogalactanes de type II sont souvent extraits au même temps et leur séparation assez difficile, ce qui peut entraîner des confusions (Vincken *et al.*, 2003).

L'abondance, la répartition et la nature des chaînes latérales à l'échelle de la paroi végétale varient considérablement en fonction des espèces (Vincken *et al.*, 2003). Les arabinanes et les galactanes sont présents dans la pomme (Schols & Voragen, 1994), la poire (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b), la betterave sucrière (Sakamoto & Sakai, 1995), le soja (Huisman *et al.*, 2001) et le raisin (Vidal *et al.*, 2001). De plus, l'apparition et la disparition des galactanes et des arabinanes jouent un rôle important dans la structure, les fonctions et les propriétés de la paroi végétale (McCartney *et al.*, 2000).

### 3.2.3.4. Xylogalacturonanes et apiogalacturonanes

Les homogalacturonanes peuvent être également substitués par des unités simples de  $\beta$ -D-xylose lié sur le C3 des acides galacturoniques, constituant ainsi les chaînes de xylogalacturonanes. Ces derniers sont présents dans quelques espèces telles que la pomme (De Vries *et al.*, 1983; Schols *et al.*, 1995) et les coques de pois (Le Goff *et al.*, 2001). Des

apiogalacturonanes, homogalacturonanes substitués par des monomères d'apiose ont été détectés dans plusieurs plantes aquatiques (*Lemna* et *Spirodela*) (Fry, 1988; Hart & Kindel, 1970).

### 3.3. Particularités de la paroi de poire

Etant donné l'hétérogénéité de sa chair, la paroi cellulaire de la poire présente une composition assez particulière. Peu de données sont disponibles sur la composition de la paroi en séparant les sclérides (cellules pierreuses) et les cellules parenchymateuses. Des travaux menés par Martin-Cabrejas *et al.* (1994a,b) sur des extractions pariétales de poires espagnoles ont mis en évidence des teneurs importantes de glucose (>20 %) et de xylose (Tableau 5). Ces teneurs élevées reflètent l'abondance des cellules pierreuses riches en cellulose et en hémicelluloses (Ferreira *et al.*, 2001; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b). Une composition similaire a été détectée dans la goyave (Marcelin *et al.*, 1993a). Dans la majorité des fruits, où les cellules parenchymateuses sont les plus abondantes, la paroi cellulaire est composée essentiellement d'acide galacturonique et de glucose, comme c'est le cas dans la plupart des espèces de la famille des Rosacées comme la pomme (Le Bourvellec *et al.*, 2009; Renard, 2005b; Renard *et al.*, 2001), la prune (Kosmala *et al.*, 2013; Renard & Ginies, 2009), la cerise (Kosmala *et al.*, 2009) ou l'abricot (Femenia *et al.*, 1998). Certaines variétés de poire sont pauvres en cellules pierreuses et leurs parois présentent une composition proche de celles d'espèces dont le parenchyme des fruits est homogène. Ainsi, Renard (2005a) a montré que la paroi du parenchyme des poires 'Gieser Wildeman' est plutôt riche en glucose (208 mg/g paroi) et en acide galacturonique (198 mg/g paroi). De même, la paroi de la variété 'William' est riche en acide galacturonique (223 mg/g paroi) et en glucose (187 mg/g paroi) (Tableau 5) (Le Bourvellec *et al.*, 2013).

**Tableau 5** : Composition osidique de la paroi végétale de quelques variétés de poires européennes

Variétés	Exprimé en	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AUA	Références
<b>Bartlett</b>	mg/poire	50	35	980	590	21	300	1070	1040	(Ahmed & Labavitch, 1980)
<b>Gieser Wildeman</b>	mg/g paroi	8	4	57	111	11	24	208	198	(Renard, 2005a)
<b>William</b>	mg/g paroi	9	7	156	44	24	59	187	223	(Le Bourvellec <i>et al.</i> , 2013)
<b>Blanquille</b> (parenchyme)	mol%	2	1	13	37	1	2	28	16	(Martin-Cabrejas <i>et al.</i> , 1994b)
<b>Blanquille</b> (épiderme)	mol %	2	trace	15	43	1	2	27	10	(Martin-Cabrejas <i>et al.</i> , 1994b)
<b>San Bartolomeu</b>	mol%	1	0	21	17	2	8	36	16	(Ferreira <i>et al.</i> , 2001)
<b>San Bartolomeu</b> (poires séchées)	mol%	3	3	11	41	1	3	27	12	(Ferreira <i>et al.</i> , 2001)

Rha : rhamnose, Fuc : fucose, Ara : arabinose, Xyl : Xylose, Man : mannose, Gal : galactose, Glc : Glucose, AUA : acide uronique (exprimé sous forme anhydre).

Des extractions séquentielles ont été réalisées sur la paroi des variétés ‘Blanquille’ et ‘San Bartolomeu’ afin de mettre en évidence les oses caractéristiques de chaque polyside (pectine, hémicelluloses et cellulose) (Tableau 6) (Ferreira *et al.*, 2001; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). Les fractions pectiques ont ainsi été extraites successivement par de l’eau, du CTDA et du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Elles sont principalement constituées d’arabinose et d’acide galacturonique. Elles présentent également des quantités non négligeables de xylose. Les fractions hémicellulosiques (extraites par concentrations croissantes de KOH) sont surtout riches en xylose et en glucose. Les xylanes représentent l’hémicellulose majeure dans ces deux variétés. Quelques polysides pectiques ont également été détectés dans ces fractions. Le résidu final est constitué de glucose, xylose et d’acides uroniques (environ 35 %). La faible teneur d’acides uroniques a été attribuée à la richesse de cette fraction en lignine (> 60 % dans les poires immature et > 50 % dans les poires mûres) (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). Cependant, la concentration de la paroi en lignine est rarement mesurée. Jermyn et Isherwood (1956) ont montré que le taux de lignine dans la paroi extraite à partir de l’épiderme de la variété ‘Conférence’ peut aller de 16 % à 23 % des constituants pariétaux.



**Tableau 6 :** Composition osidique des fractions obtenues par des extractions séquentielles de la paroi de la poire (mol %)

Variétés	Extraits	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	AUA	Références
Blanquille	Eau	1	2	22	7	1	5	4	59	(Martin-Cabrejas <i>et al.</i> , 1994a)
	CDTA 0,05M	2	1	16	6	1	3	4	67	
	CDTA 0,05M	2	2	14	9	3	3	10	57	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	2	0	21	7	1	3	3	63	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	3	-	30	7	1	5	2	53	
	KOH 0,5M	2	2	16	37	2	7	17	18	
	KOH 1M	3	2	21	29	3	8	21	14	
	KOH 4M	1	2	3	45	4	6	17	23	
	Résidu	1	-	3	28	2	2	43	22	
	CDTA 0,05M	0	0	18	1	0	2	0	79	
San Bartolomeu	CDTA 0,05M	0	0	24	2	0	3	1	71	(Ferreira <i>et al.</i> , 2001)
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	0	0	50	4	0	13	0	33	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	0	0	52	5	0	14	0	29	
	KOH 0,5M	0	2	31	26	0	14	15	13	
	KOH 1M	0	4	6	35	2	14	31	7	
	KOH 1M	0	4	5	33	3	15	35	5	
	KOH 4M	0	5	2	30	4	16	40	3	
	KOH 4M	0	2	17	21	9	16	27	7	
	Résidu	0	0	7	36	1	3	44	9	

Rha : rhamnose, Fuc : fucose, Ara : arabinose, Xyl : Xylose, Man : mannose, Gal : galactose, Glc : Glucose, AUA : acides uroniques exprimé sous forme anhydre, - : traces.

### 3.4. Effet de la maturité sur la paroi

La paroi végétale n'est pas une structure statique au cours du développement de la cellule. La maturation des fruits est associée à des altérations texturales prononcées dans les fruits climactériques, avec un ramollissement du fruit résultant de la dégradation enzymatique des polysides pariétaux (Bartley & Knee, 1982; Goulao & Oliveira, 2008). D'une façon générale, les modifications majeures se déroulent au niveau de la paroi primaire et de la lamelle moyenne (Bartley & Knee, 1982; Ben-Arie *et al.*, 1979; Crookes & Grierson, 1983). La dégradation des polysides pariétaux favorise une augmentation de la séparation cellulaire

et par conséquent le ramollissement des fruits et l'altération de leur texture. Les principaux changements sont :

1) Une perte des chaînes latérales pectiques : les arabinanes et les galactanes. Cette perte a comme conséquence indirecte l'augmentation de la porosité de la matrice pariétale puisque le réseau pectique est un facteur déterminant de la taille des pores de la paroi. Ces pores permettent ou non le passage transpariétal de certaines macromolécules et un accès accru des enzymes de dégradation (Baron-Epel *et al.*, 1988; Brummell, 2006).

2) Une solubilisation et une dépolymérisation des polyosides de la paroi cellulaire. Cela peut engendrer des réarrangements de leurs associations suite à l'action des enzymes pariétales agissant à la fois sur les fractions pectique et la fraction hémicellulosique (Goulao & Oliveira, 2008). La dépolymérisation des pectines commence en général au milieu de la maturation et est plus prononcée vers les stades les plus avancés, mais elle n'est pas commune à toutes les espèces (Brummell, 2006).

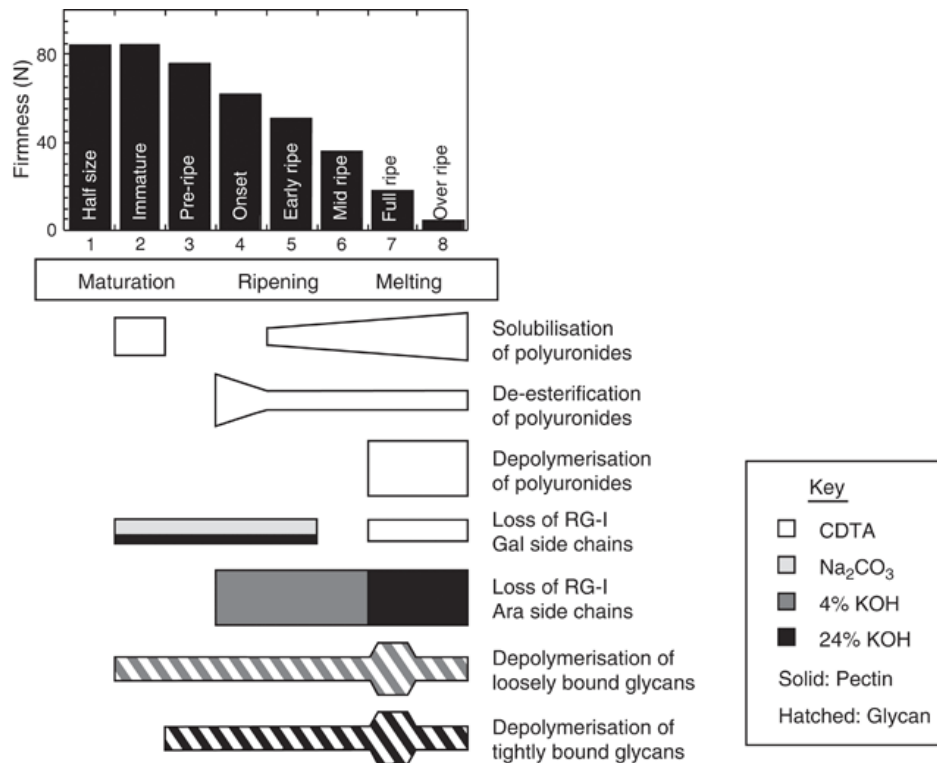
3) une réduction du degré de méthylestérification de la pectine. Ceci est probablement une caractéristique commune du développement de la plupart des plantes, mais ce phénomène est particulièrement notable au cours de la maturation des fruits (Brummell, 2006; Ortega-Regules *et al.*, 2008).

4) La dépolymérisation des xyloglucanes (fraction hémicellulosique) par des enzymes spécifiques telles que les endoglucanases ou les xyloglucane-endotransglycosidases. La cellulose semble être moins sensible aux changements au cours de la maturation et son poids moléculaire semble être constant ou bien il peut légèrement diminuer avec la maturité (Goulao & Oliveira, 2008).

L'ensemble de ces phénomènes varie essentiellement en fonction de l'espèce mais aussi selon la diversité variétale de chaque espèce. Ainsi, certains peuvent être absents ou se produire à différentes intensités (Goulao & Oliveira, 2008).

Dans la majorité de fruits de la famille des Rosacées, les changements au cours de la maturation ont lieu au niveau des cellules parenchymateuses. Dans la pêche (Figure 23), la maturité se manifeste par une perte de galactose, probablement issu des chaînes latérales pectiques, les galactanes et une large diminution de degré de méthylation des pectines (Brummell *et al.*, 2004). Ensuite, une perte d'arabinose, probablement issu des chaînes d'arabinanes, se produit aux stades plus avancés, suivie par une intense dépolymérisation des

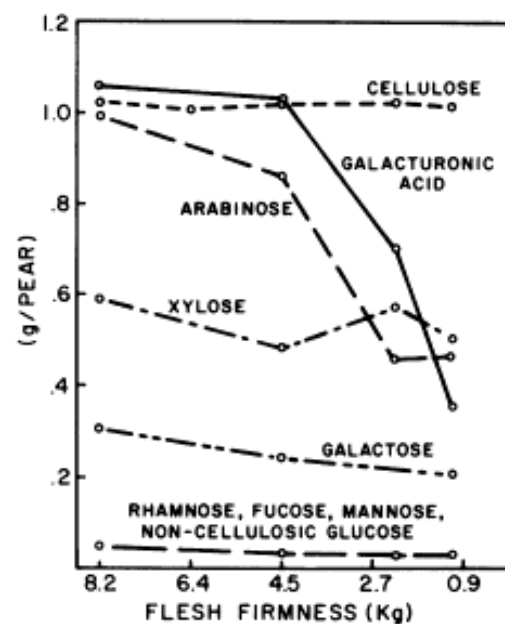
polyuronides à la sénescence. Ceci est accompagné par une activité croissante des polygalacturonases,  $\alpha$ -arabinosidases et  $\beta$ -galactosidases (Brummell *et al.*, 2004). Ces phénomènes ont également été montrés pour la pomme (Fischer *et al.*, 1994) à l'exception de la dépolymérisation interne des polyuronides. En revanche, seule une dégradation des galactanes a été observée dans les cerises, sans solubilisation des arabinanes (Batisse *et al.*, 1994).



**Figure 23 :** Chronologie des changements de la paroi cellulaire au cours du développement et de la maturation des pêches (les différents stades de maturité sont numérotés de 1 à 8) (Brummell, 2006; Brummell *et al.*, 2004).

Pour la poire, dont le parenchyme est formé des deux types de cellules : les cellules parenchymateuses et les cellules pierreuses. Ces dernières peuvent devenir assez lignifiées et développées au cours de la maturation des fruits (Cai *et al.*, 2010) avec une paroi secondaire très développée. Les changements de la paroi cellulaire de poire les plus fréquemment rapportés impliquent une dissolution de la lamelle moyenne et une dégradation de son réseau fibrillaire (Ben-Arie *et al.*, 1979). Cette dissolution entraîne une augmentation de la solubilité des polysides pectiques, accompagnée par une diminution de la teneur en arabinose et/ou en acides uroniques et/ou en galactose (Ahmed & Labavitch, 1980; Dick & Labavitch, 1989; Jermyn & Isherwood, 1956; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b)

(Figure 24). La diminution des teneurs en arabinose détectée dans les parois de poires de la variété 'Bartlett' a été expliquée par une dégradation des chaînes latérales mais aucune dépolymérisation des acides uroniques n'a été rapportée (Dick & Labavitch, 1989). Dans la variété 'Spadona', la maturité est accompagnée par une augmentation des unités d'acides galacturoniques libres, indiquant une dépolymérisation intense des chaînes homogalacturoniques (Ben-Arie *et al.*, 1979). Le même phénomène a également été observé dans la variété 'Red Bartlett' (Yoshioka *et al.*, 1992).



**Figure 24** : Changements de la composition de la paroi cellulaire au cours de la maturation des poires de la variété 'Bartlett' (Ahmed & Labavitch, 1980).

Une augmentation de la teneur en glucose et en xylose a aussi été détectée entre les poires immatures et les poires mûres (essentiellement dans le résidu) (Tableau 7). Cette augmentation pourrait être expliquée par le développement des cellules lignifiées au cours de la maturation (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b). Comme pour la plupart des fruits, les fractions cellulosiques et hémicellulosiques de la paroi de poire semblent être moins sensibles aux changements au cours de la maturation (Ahmed & Labavitch, 1980). Cependant, Yamaki *et al.* (1979) ont noté une diminution des composés cellulosiques au cours des différents stades du développement du fruit (Yamaki *et al.*, 1979). Dans d'autres cas, le ramollissement des poires nécessite à la fois des modifications des pectines et des hémicelluloses (Hiwasa *et al.*, 2004).

**Tableau 7** : Composition osidique de la paroi ( $\mu\text{g/g}$  MF) et de ses différentes fractions d'extraction séquentielle (mol %) à deux stades de maturité des poires de la variété 'Blanquille' (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a)

Extraits	Stade de maturité	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AUA
AIS	Immature	0,2	0,2	3	4	0,2	0,6	4	6
	Mûr	0,2	0,2	2	5	0,3	0,5	4	5
Eau	Immature	0,8	1	22	7	1	8	5	56
	Mûr	0,9	2	22	7	1	5	4	59
CDTA 0,05M	Immature	1	1	15	6	1	4	6	68
	Mûr	2	1	16	6	1	3	4	67
CDTA 0,05M	Immature	2	2	13	5	4	2	18	55
	Mûr	2	2	14	9	3	3	10	57
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	Immature	1	-	34	3	0,2	3	1	57
	Mûr	2	0,03	21	7	1	3	3	63
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05M	Immature	1	-	60	4	0,2	3	1	31
	Mûr	3	-	30	7	1	5	2	53
KOH 0.5M	Immature	1	1	24	36	1	7	17	13
	Mûr	2	2	16	37	2	7	17	18
KOH 1M	Immature	1	1	18	20	1,3	5	14	40
	Mûr	3	2	20	29	3	8	21	14
KOH 4M	Immature	1	2	4	51	3	7	20	13
	Mûr	1	2	3	45	4	6	17	23
Résidu	Immature	1	0,3	10	22	2	3	40	23
	Mûr	1	-	3	28	2	2	43	22

AIS: paroi (Alcohol Insoluble Solids), Rha: rhamnose, Fuc: fucose, Ara: arabinose, Xyl: xylose, Man: mannose, Gal: galactose, Glc: glucose, AUA: acides uronique sous forme anhydre, -: traces

Pour conclure sur cette partie le tableau 8 résume les principaux changements qui pourront avoir lieu au cours de la maturation des fruits :

**Tableau 8** : Synthèse des principaux phénomènes susceptibles de se dérouler au cours de la maturation des fruits (Brummell, 2006).

<b>Chronologie au cours de la maturation</b>	<b>Modifications au sein de la paroi végétale</b>
Au début	*Perte des chaînes latérales (galactanes et arabinane) des rhamnogalacturonanes I. *Dépolymérisation progressive de la matrice des glycanes (xyloglucanes, xylanes, mannanes). *Déméthylestérification des homogalacturonanes *Solubilisation des polyuronides.
Au milieu	*Dépolymérisation des polyuronides (avocat, tomate,...)
Plus tard	*Dépolymérisation des polyuronides (melon, pêche, ...)

*L'effet de la surmaturation sur l'évolution de la structure pariétale de la poire et ses conséquences technologiques n'a jamais été étudié.*

#### **4. Interactions non covalentes entre les procyanidines et la paroi végétale**

Afin de mieux comprendre les interactions qui peuvent se produire entre les polyphénols et les autres composés de la matrice alimentaire, il est important de comprendre la structure et la localisation de ces composés. Les fruits et les légumes sont constitués de cellules hydratées entourées d'une paroi rigide et contenant une grande vacuole centrale renfermant entre autres les polyphénols. Ainsi, au sein d'une cellule végétale intacte, les polyphénols et la paroi végétale se trouvent dans deux compartiments distincts. Le contact entre ces deux composés peut se produire lors de certaines actions entraînant la déstructuration de la cellule. La simple mastication des fruits peut engendrer la rupture de ces cellules, ce qui permet aux composés phénoliques d'être libérés. Les traitements thermiques industriels et domestiques (blanchiment, appertisation, cuisson...) ou bien le broyage et le pressage des fruits lors de la fabrication des jus déstructurent la cellule et les polyphénols peuvent ainsi réagir avec les parois. D'autres facteurs, comme un stress environnemental, le stockage post-récolte et la maturation des fruits peuvent avoir un effet sur la déstructuration de la cellule végétale et par conséquent sur les interactions parois-polyphénols.

Les polyosides pariétaux peuvent s'associer à différentes classes de polyphénols comme les acides phénoliques (acide 5'-caféoylquinique et acide férulique) (Padayachee *et*

*al.*, 2012a) et les anthocyanes (Padayachee *et al.*, 2012b) au cours du processus de digestion des aliments. Les proanthocyanidines possèdent les affinités et les niveaux de saturation les plus élevés vis-à-vis des polyosides pariétaux (Bautista-Ortín *et al.*, 2014; Renard *et al.*, 2001). Toutefois, l'oxydation enzymatique des acides phénoliques (acide 5'-caféoylquinique) au cours de processus de transformation des fruits peut entraîner la formation de nouvelles structures phénoliques, telles que les quinones, ayant la capacité de former des liaisons covalentes irréversibles avec la paroi (Le Bourvellec *et al.*, 2009; Le Bourvellec *et al.*, 2004b).

Puisque la paroi cellulaire végétale contient de multiples composants et que les proanthocyanidines ont également des structures complexes, les interactions sont susceptibles de dépendre à la fois des caractéristiques chimiques des proanthocyanidines, telles que la structure et le poids moléculaire, et de la composition chimique des parois cellulaires végétales ainsi que de leurs propriétés physiques. Des facteurs extrinsèques aux molécules jouent également un rôle sur la formation des complexes polyphénols-parois.

#### **4.1. Définition des mécanismes d'interactions non covalentes**

Les interactions entre les proanthocyanidines et les parois cellulaires végétales s'établissent grâce à des liaisons réversibles de faible énergie, similaires aux interactions proanthocyanidines/protéines. Le mécanisme d'adsorption implique de manière plus précise la formation à la fois de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes :

- Les liaisons hydrogènes s'établissent entre les groupes hydroxyles des noyaux aromatiques A et B des proanthocyanidines et les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques des chaînes polyosidiques de la paroi ou avec les groupements hydroxyles ou acétyles des polyosides (De Freitas *et al.*, 2003; Le Bourvellec *et al.*, 2005; Renard *et al.*, 2001).
- Les interactions hydrophobes s'établissent entre les groupements aromatiques des proanthocyanidines et les groupements hydrophobes, tels que les méthyles des pectines (Le Bourvellec *et al.*, 2005; Pinelo *et al.*, 2006; Renard *et al.*, 2001; Watrelot *et al.*, 2014).

L'établissement de ce type de liaisons est dû aux propriétés des polyosides et des proanthocyanidines. Les proanthocyanidines sont des molécules amphiphiles ayant à la fois des cycles aromatiques hydrophobes et des groupes hydroxyles hydrophiles, ce qui leur

permet de se lier simultanément à plusieurs sites moléculaires (Haslam, 1998). Les polyosides de la paroi cellulaire contiennent également des groupes hydroxyles ainsi que des atomes d'oxygène, constitutifs des liaisons glycosidiques, ayant la capacité de former des liaisons hydrogènes et hydrophobes (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; McManus *et al.*, 1985). Plusieurs travaux ont montré que l'établissement des liaisons hydrogènes est le principal mécanisme impliqué dans la mise en place des associations polyphénols-protéines (Frazier *et al.*, 2010) et polyphénols-polyosides (Saura-Calixto, 2010) en raison de la présence de nombreux sites disponibles.

#### **4.2. Impact des conditions physico-chimiques**

La question du mécanisme d'association entre les proanthocyanidines et la paroi cellulaire végétale a été étudiée dans des suspensions/ solutions modèles entre des fractions phénoliques purifiées et des parois végétales, simplement entre des fractions phénoliques purifiées et des fractions osidiques purifiées, tout en faisant varier les paramètres physicochimiques ou en utilisant des composés ayant la capacité d'inhiber ou de moduler les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogènes (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Phan *et al.*, 2016).

Des facteurs extrinsèques tels que la force ionique, la température, la teneur en éthanol ou le pH du milieu ont un effet sur l'association entre les proanthocyanidines et les polyosides pariétaux. Ainsi, l'augmentation de la température rompt les liaisons hydrogènes et diminue par conséquent la formation de complexes proanthocyanidines-polyosides (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Phan *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014). L'urée est un agent chaotropique dont la structure lui permet d'agir comme donneur ou accepteur de proton et donc de participer à la formation de liaisons hydrogènes. Son addition dans le milieu entraîne la dissociation des complexes proanthocyanidines-parois confirmant ainsi la participation de liaisons hydrogènes au mécanisme d'interaction (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Renard *et al.*, 2001). La diminution de la polarité du milieu réactionnel par l'addition d'éthanol provoque une diminution de la quantité de proanthocyanidines fixées sur la paroi végétale, du fait de la rupture des interactions hydrophobes. L'éthanol inhibe les associations entre la paroi et les proanthocyanidines mais à un moindre degré que l'urée (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). L'augmentation de la force ionique du milieu réactionnel de 0,01 mol.L<sup>-1</sup> à 1 mol.L<sup>-1</sup> favorise la rétention des proanthocyanidines sur la paroi. En revanche, le pH, dans une gamme de variation de 2 à 7, a peu d'effet sur ces interactions (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). Dans cette



gamme de pH, les procyanidines ne possèdent pas de groupements chargés (pKa de 9 à 10) (Vernhet *et al.*, 1996) tandis que la charge des parois cellulaires riches en pectines dont le pKa est de 2,9 est variable (Ralet *et al.*, 2001). Ainsi, les interactions ioniques ne semblent pas contribuer à la formation des complexes proanthocyanidines-parois.

Les effets du pH, de la température et de la force ionique ont aussi été testés sur les interactions polyphénols-cellulose. Phan *et al.* (2016) ont confirmé que le pH (3-7) et la température (4-37°C) n'ont pas d'effet significatif sur l'association cellulose-(+)-catéchine, alors que d'autres composés, tels que la cyanidine-3-glucoside, semblent être plus sensibles à ces variations, probablement en lien avec leur transformation structurale et leur stabilité relative dans ces conditions.

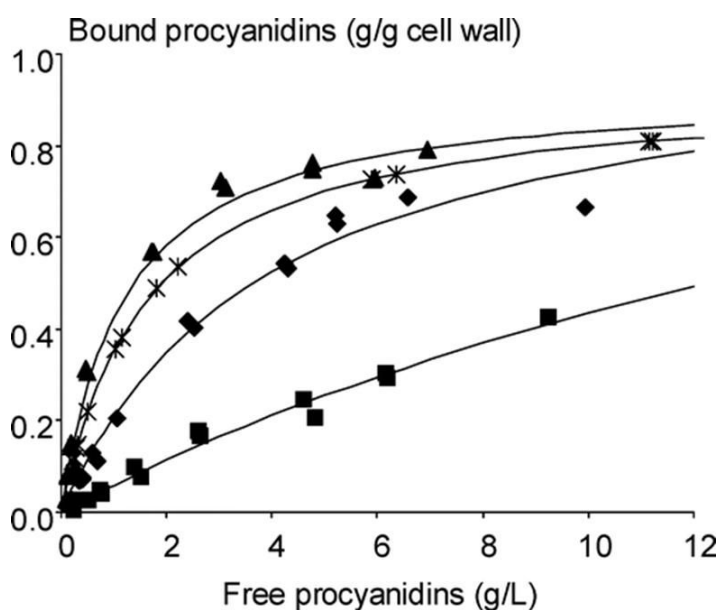
### **4.3. Relations structure / affinité des proanthocyanidines**

La rétention des proanthocyanidines par le matériel pariétal s'apparente à un effet tannant tel que décrit pour les interactions proanthocyanidines-protéines (Bate-Smith, 1962). La capacité d'interaction des proanthocyanidines est directement fonction de leurs concentrations et de leurs caractéristiques intrinsèques telles que la masse molaire, le degré de polymérisation, le degré de galloylation, la conformation et la stéréochimie (Bautista-Ortín *et al.*, 2014; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; McManus *et al.*, 1985; Riou *et al.*, 2002).

#### **4.3.1. Taille et degré de polymérisation**

Renard *et al.* (2001) ont montré que la taille moyenne et la concentration des procyanidines ont un rôle majeur. Ces deux paramètres varient très largement dans la matière première notamment dans le cas de la pomme (Sanoner *et al.*, 1999). Des travaux en suspensions modèles mettant en jeu des procyanidines solubles de différents degrés de polymérisation et du matériel pariétal insoluble purifié à partir de pomme ont montré que la quantité de procyanidines fixées sur la paroi augmente très nettement avec leur degré de polymérisation (Renard *et al.*, 2001). Le degré de polymérisation peut également modifier les caractéristiques de l'association procyanidines-pectines. Watrelot *et al.* (2013) ont montré que les affinités les plus fortes sont établies entre des pectines commerciales de pomme et de citron avec des procyanidines ayant un degré de polymérisation de 30 (DP<sub>n</sub> 30) par rapport à un degré de polymérisation de 9 (DP<sub>n</sub> 9).

En utilisant des isothermes d'adsorption, il a également été montré que la quantité de procyanidines fixées augmente avec la concentration en solution jusqu'à une certaine limite, celle-ci étant largement plus élevée pour les procyanidines les plus polymérisées (Le Bourvellec *et al.*, 2007; Renard *et al.*, 2001) (Figure 25). Chaque liaison individuelle formée est faible, mais si on considère la somme de l'énergie de liaison pour une molécule, la force d'interaction augmente avec la taille des procyanidines (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Renard *et al.*, 2001).



**Figure 25** : Isothermes d'adsorption des procyanidines sur la paroi à pH = 3.8, T= 25 °C, force ionique = 0,1 mol/L. (▲): DPn 70, (×) : DPn 35, (◆) : DPn 10, and (■) : DPn 3, (—) : ajustements des courbes obtenues à partir de l'équation de Langmuir (Le Bourvellec *et al.*, 2007).

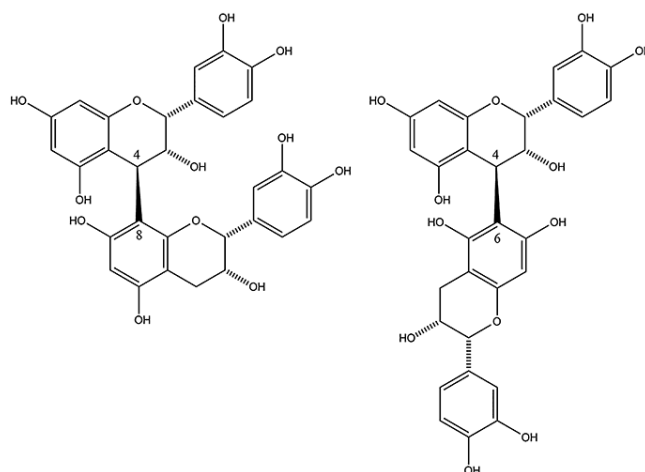
#### 4.3.2. Galloylation

L'énergie de ces interactions peut aussi augmenter avec le degré de galloylation des proanthocyanidines (Haslam, 1998; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; McManus *et al.*, 1985). La galloylation des chaînes de flavan-3-ols augmente le nombre de sites actifs permettant l'interaction à plusieurs points de la paroi cellulaire. Cependant, il a été démontré que l'affinité de la paroi cellulaire pour les proanthocyanidines était d'avantage liée à leurs masse moléculaire qu'à leur pourcentage de galloylation (Bautista-Ortín *et al.*, 2014; Bindon *et al.*, 2010b; Le Bourvellec *et al.*, 2004a).

### 4.3.3. Stéréochimie

La stéréochimie du noyau pyrane des flavan-3-ols ainsi que la nature de la liaison interflavanique des proanthocyanidines peuvent modifier leurs capacités d'adsorption. Une conformation ouverte et flexible peut créer des sites réactifs plus accessibles à la formation de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes comme pour les interactions proanthocyanidines-protéines (Hagerman & Butler, 1981). Ainsi, la (+)-catéchine a une activité tannante spécifique supérieure à celle de la (-)-épicatéchine vis-à-vis de la polyproline (De Freitas & Mateus, 2001).

Les dimères des proanthocyanidines liés en C4-C8 ont également une activité tannante spécifique supérieure à celle des proanthocyanidines liés en C4-C6. La stéréochimie de la liaison interflavanique en C4-C8 engendre une configuration ouverte et flexible favorisant la formation des liaisons non covalentes (De Freitas & Mateus, 2001) (Figure 26).



**Figure 26 :** Dimères de (-)-épicatéchine liés en C4-C6 et en C4-C8 (Hanlin *et al.*, 2010).

### 4.4. Relations structure / affinité de la paroi

La paroi végétale est une structure poreuse, complexe et caractérisée par la présence de domaines hydrophiles et hydrophobes lui conférant ainsi des affinités différentes vis-à-vis d'autres macromolécules (Renard *et al.*, 2001). Néanmoins, la structure et la composition de la paroi cellulaire sont des facteurs déterminants de l'affinité de la paroi vis-à-vis des proanthocyanidines et qui peuvent varier selon le tissu d'origine.

#### 4.4.1. Origine de la paroi et porosité

Des différences d'affinité entre les parois extraites à partir de la chair et celles extraites de la pellicule de raisins (variété 'Shiraz') ont été observées. Les parois de la chair ont une affinité plus élevée vis-à-vis des proanthocyanidines ; elles peuvent fixer jusqu'à 47 et 57 % de la quantité totale des proanthocyanidines des pépins et de l'épiderme respectivement (Bindon *et al.*, 2010b).

Les parois cellulaires possèdent des caractéristiques physiques particulières, telles que la porosité et la surface spécifique, qui peuvent limiter la taille des molécules qui pénètrent et interagissent avec elles (Carpita & Gibeau, 1993). La taille des pores de la paroi cellulaire varie de 4 à 10 nm (Baron-Epel *et al.*, 1988; Carpita *et al.*, 1979) ce qui peut restreindre la pénétration des proanthocyanidines ayant un haut poids moléculaire, dépassant donc le diamètre des pores de la paroi. Des travaux réalisés par Le Bourvellec *et al.* (2005b) ont montré que différentes conditions de séchage ont un impact sur les propriétés physiques de la paroi de pomme et plus particulièrement sur sa porosité. La diminution de la porosité de la paroi de pomme par séchage à 100 °C conduit à une diminution de son affinité vis-à-vis des proanthocyanidines. La réduction de la surface spécifique de la paroi pourrait empêcher l'accès des proanthocyanidines hautement polymérisées aux sites potentiels de fixation ou limiter l'espace disponible pour une auto-association entre les proanthocyanidines.

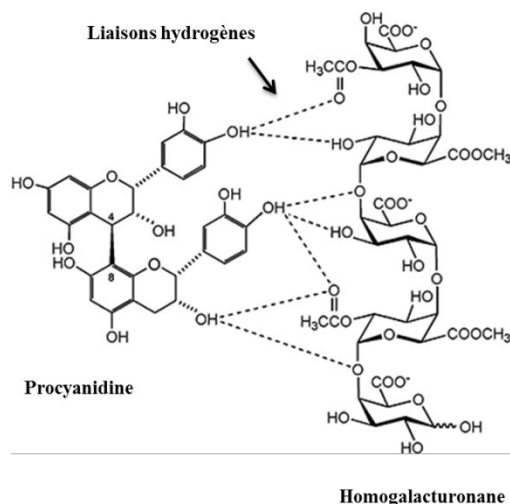
#### 4.4.2. Polyosides

Des travaux réalisés par Le Bourvellec *et al.* (2005a) sur des polyosides purifiés (pectine sous forme réticulée, xyloglucane, cellulose et amidon) donnent le classement d'affinité suivant pour les procyanidines: pectine>>xyloglucane>amidon>cellulose. Les pectines présentent ainsi les plus fortes affinités vis-à-vis des proanthocyanidines.

Dans le même contexte et en tenant compte de la diversité des structures pariétales, des extractions séquentielles ont été réalisées sur des parois des raisins ('Cabernet Sauvignon' et 'Shiraz') afin de déterminer la fraction contribuant le plus à l'association polyosides-proanthocyanidines. Plus de 54 % des proanthocyanidines liées à la paroi ont été localisées dans la fraction pectique (plus précisément dans les pectines liées par des ponts de calcium). La réduction de la capacité d'adsorption de la paroi est plus importante au fur et à mesure de l'élimination des fractions pectiques, indépendamment du stade de maturité et de la variété.

La fraction hémicellulosique suivie par la fraction cellulosique présentent les capacités d'adsorption les plus faibles (Ruiz-Garcia *et al.*, 2014). Cette faible affinité pourrait être due à une faible porosité liée à la structure assez dense de la cellulose, empêchant la diffusion des composés phénoliques et limitant ainsi le phénomène d'interaction à un phénomène de surface (Le Bourvellec & Renard, 2005). D'autres travaux ont montré que la capacité d'adsorption des polyphénols est fortement influencée par le degré d'agrégation des microfibrilles et la disponibilité des groupements hydroxyles dans la structure cellulosique (Liu *et al.*, 2017).

Des travaux utilisant la calorimétrie à titration isotherme (ITC) ont confirmé l'affinité élevée des pectines commerciales de pomme (principalement des homogalacturonanes) vis-à-vis des proanthocyanidines. La plus forte association a été obtenue entre les procyanidines les plus polymérisées et les pectines les plus méthylées (WatreLOT *et al.*, 2013) (Figure 27). Ces interactions sont probablement dues à des interactions hydrophobes entre les groupements méthyles des pectines et les hétérocycles pyranes (noyaux C) des procyanidines (WatreLOT *et al.*, 2013). Ces fortes affinités pourraient expliquer la capacité des pectines à dissocier les complexes protéines-polyphénols, liés par des liaisons hydrogènes (De Freitas *et al.*, 2003; McManus *et al.*, 1985). De plus, la conformation étendue des homogalacturonanes (Pérez *et al.*, 2000) facilite l'association procyanidines-polyosides. De faibles affinités ont été détectées entre les procyanidines (DP<sub>n</sub> 30) et les chaînes latérales pectiques, spécifiquement les arabinanes (WatreLOT *et al.*, 2013).



**Figure 27 :** Diagramme schématisant la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles d'une molécule de procyanidines et les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques, les groupements hydroxyle et acétyle d'un homogalacturonane. Certains des résidus d'homogalacturonane sont méthylés en position C6 et acétylés en position C2 et C3 (d'après Hanlin *et al.*, (2010)) .

La variation de l'affinité des proanthocyanidines envers les différentes classes de polysides pariétaux soutient l'hypothèse que la capacité de la paroi à se lier aux proanthocyanidines est influencée par sa composition et sa structure. Cette capacité est d'autant plus grande qu'il y a une forte proportion de pectines et une faible teneur en cellulose. Ceci suggère que les proanthocyanidines sont plus susceptibles de se fixer au niveau de la lamelle moyenne et de la paroi primaire (riches en pectines) qu'au niveau de la paroi secondaire (plutôt riche en hémicelluloses et cellulose).

Les changements de propriétés de la paroi végétale peuvent aussi être provoqués par des facteurs intrinsèques tels que la maturité. Le développement de la baie de raisin pourrait augmenter la capacité des parois à interagir avec les tannins (Hanlin *et al.*, 2010). Bindon *et al.* (2014) ont supposé que la paroi de la pellicule des raisins devient plus poreuse durant la maturation, ce qui facilite l'adsorption des tannins sur la fraction pariétale.

#### 4.5. Conséquences technologiques

La complexation des proanthocyanidines avec les polysides pariétaux jouent un rôle majeur dans la régulation du pool phénolique de certaines boissons. La forte adsorption des

proanthocyanidines sur les parois végétales, notamment dans le cas de la pomme et du raisin, a été bien démontrée en utilisant des parois et des fractions phénoliques purifiées. L'impact de certaines conditions (la force ionique, la température, la teneur en procyanidines et leur degré de polymérisation et la nature des polyosides,) sur l'équilibre d'adsorption a été démontré et quantifié (Bindon *et al.*, 2012; Bindon & Kennedy, 2011; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Renard *et al.*, 2001; Renard *et al.*, 2011; Watrelot *et al.*, 2013; Watrelot *et al.*, 2014).

#### **4.5.1. Jus de pomme/cidre**

En technologie cidricole, la phase de pressage des fruits (extraction des moûts) est une étape essentielle au cours de laquelle les polyphénols sont particulièrement concernés par des phénomènes de partition physicochimiques et/ ou des réactions biochimiques, avec des conséquences notoires sur les qualités sensorielles des produits finis. Deux phénomènes peuvent avoir lieu simultanément lorsque la compartimentation cellulaire est rompue : l'oxydation par la polyphénoloxidasase de certains composés phénoliques ainsi que la rétention de proanthocyanidines sur les parois cellulaires insolubles du fruit. De plus, ces deux phénomènes sont en interactions étroites. L'oxydation des polyphénols modifie leur réactivité et leurs propriétés physicochimiques et par conséquent leur capacité à s'associer aux polyosides pariétaux (Le Bourvellec *et al.*, 2009). La formation des produits d'oxydation (*o*-quinones) des procyanidines augmentent leur capacité d'adsorption sur des parois de pommes (Le Bourvellec *et al.*, 2009). L'oxydation au cours de pressage diminue par conséquent la sensation d'astringence et d'amertume des jus de pommes (Renard *et al.*, 2011). Des travaux menés par Guyot *et al.* (2003) et sur plusieurs variétés des pomme à cidre et par Le Bourvellec *et al.* (2007) en solution modèle ont montré que le transfert des procyanidines après le pressage des fruits est faible (< 50 %). Ainsi, une partie importante des procyanidines se trouve retenue dans le marc des pommes pressées, coproduit riche en polyphénols et pouvant faire l'objet d'une valorisation industrielle (Foo & Lu, 1999).

Le transfert des procyanidines du fruit vers le cidre peut être modifié par plusieurs facteurs. L'interaction procyanidines-parois est un phénomène sélectif, favorisé par des degrés de polymérisation élevés. Ainsi, par rapport aux fruits, le degré moyen de polymérisation des procyanidines est significativement réduit dans le jus, ce qui influence les caractéristiques organoleptiques des produits finaux (Guyot *et al.*, 2003). La concentration en procyanidines et leur degré de polymérisation sont des facteurs déterminants des sensations d'amertume et d'astringence (Lea & Arnold, 1978) : les oligomères (DP<sub>n</sub><5) sont sensés être

principalement amères alors que les procyanidines hautement polymérisées participent plutôt à la sensation d'astringence. Dans le même contexte, Symoneaux *et al.* (2015) ont montré que l'ajout d'un supplément de marc de pommes au cours de pressage diminue la teneur en procyanidines ainsi que leur degré de polymérisation, donnant des cidres moins astringents.

L'augmentation de la température de 5 à 24 °C augmente le rendement d'extraction des procyanidines (Renard *et al.*, 2011) et peut induire la rupture des liaisons hydrogènes à fortes températures.

L'ajout des préparations enzymatiques pectinolytiques dans la râpuration, surtout réalisé dans l'industrie du jus de pomme pour augmenter les rendements et faciliter les opérations de pressage, n'a pas de forte influence sur les concentrations en polyphénols (Lea & Timberlake, 1978). Dans certains cas, l'ajout de ces enzymes entraînant une diminution des teneurs en polyphénols des jus : l'augmentation de la déstructuration de la matrice pariétale de la râpuration provoquerait une augmentation des contacts entre les polyphénols et les polyosides, entraînant une rétention accrue des polyphénols sur les parois cellulaires (Mihalev *et al.*, 2004).

#### **4.5.2. Vin**

Les polyphénols sont particulièrement importants dans l'industrie du vin car ils sont responsables de la couleur, du goût et des changements qui se produisent au cours du vieillissement du produit. Une fois que les fruits sont broyés, les proanthocyanidines des pépins et de la pellicule peuvent être en contact avec les polyosides des parois du fruit ainsi que ceux des parois des levures utilisées au cours de la fermentation (Riou *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2004). Ces composés sont responsables de la sensation d'astringence en interagissant avec les protéines salivaires. Cette perception est plus ou moins modulée par l'interaction des proanthocyanidines avec d'autres macromolécules dont les polyosides (Carvalho *et al.*, 2006).

##### **4.5.2.1. Régulation de l'extraction des tannins**

Une forte affinité du matériel pariétal de raisin vis-à-vis des proanthocyanidines est à l'origine d'une extraction limitée de la fraction phénolique lors du processus de vinification (Bindon *et al.*, 2012; Bindon *et al.*, 2010a). Une extraction efficace des tannins dépend donc de la capacité de perturber ou de gérer les associations polyphénols-parois. L'utilisation d'enzymes de dégradation des parois au cours de la production de vin augmente le transfert des tannins du fruit vers le produit final en réduisant par conséquent la quantité de



proanthocyanidines adsorbées sur les parois cellulaires (Bautista-Ortín *et al.*, 2016; Del Rocío Castro-López *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). L'utilisation d'un polygalacturonase en solution modèle permet de diminuer la proportion de proanthocyanidines adsorbée de 57.2 à 36.4 % alors lorsqu'une cellulase est utilisée la proportion de proanthocyanidines adsorbées baisse jusqu'à 27.5 % (Bautista-Ortín *et al.*, 2016). Il semble que l'élimination de la cellulose par la cellulase rend la paroi plus accessible permettant ainsi un meilleur accès des tannins œnologiques aux structures pectiques.

De même, Li *et al.* (2017) ont suggéré que la dégradation enzymatique peut améliorer l'extraction des tannins de deux façons : 1) la dégradation des parois des pépins et de l'épiderme des baies de raisins durant la macération peut faciliter la diffusion des composés phénoliques du fruit vers le vin suite à la déstructuration de la barrière principale, la paroi végétale ; 2) Les enzymes peuvent réduire l'adsorption des tannins sur la paroi végétale au moment de la macération, un procédé qui peut favoriser autrement l'adsorption des tannins solubles dans les marcs ou leurs pertes sous formes de lie (sédiment) à la fin de la fermentation.

#### **4.5.2.2. Tannins en solution**

Une extraction excessive des tannins peut engendrer en contrepartie une astringence indésirable dans le vin altérant la qualité du produit ce qui nécessite d'autres techniques pour moduler cette propriété, comme le collage (Poncet-Legrand *et al.*, 2007). Le collage est une étape cruciale dans l'industrie de fabrication du vin mais son mécanisme est encore mal connu (Maury *et al.*, 2016). Des protéines animales sont généralement utilisées pour faire précipiter les tannins, mais les polyosides semblent aussi avoir un rôle dans la régulation des propriétés organoleptiques de vin. Les parois de pommes ont des propriétés d'adsorption élevées pour les tannins de masse moléculaire élevée alors que les parois des raisins ont la capacité de réduire les tannins à haut et à moyen poids moléculaire (Guerrero *et al.* 2013).

L'astringence augmente avec la concentration des tannins dans le vin et diminue en rajoutant des rhamnogalacturonanes II, qui sont les polyosides majeurs du vin extrait à partir de cépage 'Grenache Blanc' alors qu'ils ne constituent que 1 à 2 % de la paroi végétale de fruit (Vidal *et al.*, 2001). De plus, Riou *et al.* (2002) ont testé l'incidence des polyosides majeurs purifiés de vin rouge sur la formation de complexe tannins-polyosides. Les rhamnogalacturonanes II sous leur forme dimère ont plus d'impact sur la complexation tannins-polyosides que les arabinogalactanes-protéines et les rhamnogalacturonanes II sous

leur forme monomère. Ceci a été confirmé par Watrelot *et al.* (2017) qui ont montré que les rhamnogalacturonanes II semblent favoriser la précipitation des protéines soit par la formation de complexes insolubles entre les tannins et les polyosides soit en raison d'interactions protéines-polyosides. Maury *et al.* (2016) ont aussi évalué l'influence des polyosides (arabinogalactanes, manoprotéines et rhamnogalacturonanes) sur la précipitation des tannins condensés. Les polyosides modifient essentiellement les quantités de procyanthocyanidines précipitées et non pas leurs natures. Ainsi, étant donnée la capacité que possède la paroi végétale à s'associer avec les tannins condensés, les polyosides pariétaux pourraient être utilisés comme agents de collage alternatifs aux protéines classiques (Bindon & Smith, 2013; Guerrero *et al.*, 2013).

#### **4.5.2.3. Utilisation des tannins œnologiques**

Les interactions tannins-parois susceptibles de se produire dans le moût au cours de l'étape de macération pourraient aussi influencer le calendrier d'ajout de tannins exogènes (tannins œnologiques). L'ajout de ces tannins est une pratique courante utilisée afin d'augmenter la teneur en tannins du vin et gérer ses qualités organoleptiques finales. Les résultats de la littérature sont contradictoires concernant le moment de leur ajout. Une étude menée par Parker *et al.* (2007) sur le vin extrait à partir de cépage 'Shiraz' a rapporté qu'il n'y a pas d'influence du moment de l'addition des tannins sur la qualité du vin, à l'exception d'effets mineurs sur la perception d'astringence. Li *et al.* (2017) ont montré à leur tour que l'addition des tannins exogènes durant la fermentation n'engendre pas de différences significatives sur la concentration, la composition et la masse moléculaire de la fraction phénolique du vin. Cependant, d'autres travaux ont montré une amélioration de la composition phénolique, due à une augmentation de la teneur en polyphénols, du vin rouge lorsque les tannins œnologiques sont ajoutés lors de la fermentation alcoolique (Alcalde-Eon *et al.*, 2014) ou même après la fermentation alcoolique (Neves *et al.*, 2010).

La faible teneur détectée pour un ajout en pré-fermentation pourrait être le résultat de la formation de liaisons avec les polyosides au cours de la macération. L'ajout des tannins exogènes serait plus efficace après l'élimination des polyosides (Hanlin *et al.*, 2010). Ceci a été confirmé par Bautista-Ortin *et al.* (2014), qui ont montré que les tannins œnologiques devaient être ajoutés au vin quand le contenu en matériel pariétal est faible dans le milieu, c'est-à-dire soit après la fermentation alcoolique, soit après le pressage. Lorsque ces composés sont ajoutés dans un milieu contenant encore des résidus de paroi végétale, une partie pourrait être perdue suite à leur complexation avec les polyosides.

## 4.6. Conséquences nutritionnelles

Les fruits et les légumes sont le plus souvent consommés à l'état transformé. Cela signifie que la destruction de l'intégrité des cellules est déjà réalisée. Le contact entre les parois et les polyphénols se produit dès la mise en place des procédés de transformation ou simplement au cours de la mastication des fruits et des légumes, ce qui peut avoir des répercussions sur leurs effets nutritionnels. Les conséquences de ces interactions sont multiples mais elles affectent essentiellement la biodisponibilité et la bioaccessibilité des polyphénols (Jakobek, 2015; Liu *et al.*, 2017).

### 4.6.1. Bioaccessibilité et biodisponibilité

Le terme «bioaccessibilité» est utilisé pour définir la proportion d'un élément nutritif qui est libéré de la matrice alimentaire et disponible pour le passage à travers la barrière intestinale (Saura-Calixto *et al.*, 2007), tandis que le terme «biodisponibilité» est défini comme la fraction d'un élément nutritif absorbée dans l'intestin et par conséquent disponible pour le corps humain pour assurer des fonctions physiologiques ou pour le stockage (Bohn, 2014; Saura-Calixto *et al.*, 2007).

La plupart des polyphénols sont généralement très peu biodisponibles et leur absorption dans l'iléon est limitée. Les formes aglycones ainsi que les flavan-3-ols monomères sont généralement absorbés au niveau de l'intestin grêle. Les formes les plus complexes des composés phénoliques, dont les polyphénols glycosylés et estérifiés ainsi que les formes polymérisées, sont absorbés au niveau du colon (Manach *et al.*, 2004; Pérez-Cano *et al.*, 2013). Quand ils sont absorbés, les composés phénoliques sont métabolisés et les formes circulantes sont des dérivés glucuronides, méthylés et/ou sulfatés, seuls pertinents en terme d'activités biologiques (Crozier *et al.*, 2010).

La bioaccessibilité et la biodisponibilité et des polyphénols sont limitées par leur complexation aux polyosides (Bohn, 2014; Jakobek, 2015; Liu *et al.*, 2017). Adam *et al.* (2000) ont montré que la biodisponibilité de l'acide férulique est réduite suite à son association avec les arabinoxylanes. Récemment, beaucoup de travaux se sont intéressés à l'étude des interactions polyphénols-parois, principalement via un focus sur les interactions polyphénols-cellulose puisque ce polyoside constitue la partie majeure des fibres alimentaires (Liu *et al.*, 2017; Phan *et al.*, 2015).

La libération des composés phénoliques adsorbés aux fibres alimentaires est influencée par différents facteurs tels que la structure des polyphénols, la complexité de l'ensemble polyphénols-carbohydrates et l'activité enzymatique (Saura-Calixto, 2010).

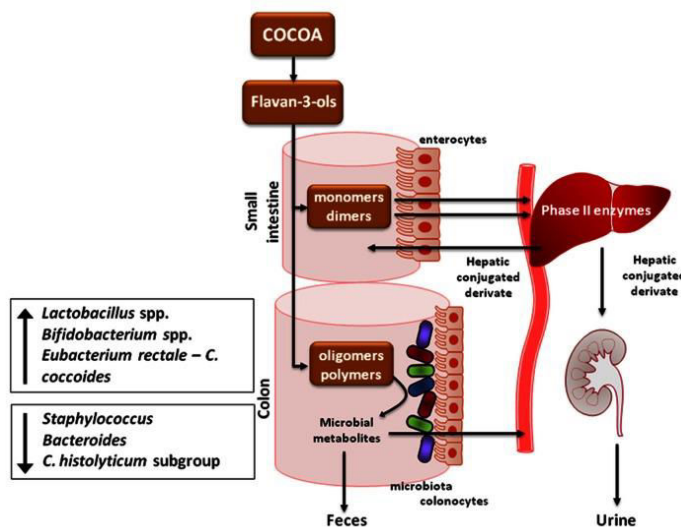
#### **4.6.2. Métabolisation colique des procyanidines**

Parmi les composés phénoliques qui restent associés à la matrice alimentaire se trouvent les procyanidines (tannins condensés) (Pérez-Jiménez & Torres, 2011). Les effets biologiques des procyanidines ne seraient pas directement dus aux composés natifs présents dans les aliments mais plutôt à leurs dérivés produits ainsi dans le colon. Les procyanidines associées aux parois ne sont pas digérées dans la partie haute du tube digestif et elles atteignent le colon où elles deviennent des substrats métabolisés par la microbiote intestinale qui les convertit en métabolites coliques fortement absorbés par le corps humain (Appeldoorn *et al.*, 2009; Saura-Calixto, 2010). Les métabolites coliques produits sont des valérolactones, des acides valériques, des acides phénylpropioniques, des acides phénylacétiques et des acides benzoïques (Appeldoorn *et al.*, 2009; Margalef *et al.*, 2014). Les métabolites phénoliques peuvent créer un environnement antioxydant positif dans le colon (Del Rio *et al.*, 2013; Pérez-Jiménez & Torres, 2011; Williamson & Clifford, 2010) et avoir ainsi une action locale. De plus, les procyanidines et les fibres alimentaires peuvent influencer positivement la croissance de la microflore colique (Bazzocco *et al.*, 2008; Saura-Calixto, 2010)

Serra *et al.* (2010) ont étudié la stabilité des procyanidines ainsi que leur biodisponibilité *in vitro* et *in vivo*. Ils ont montré une bonne stabilité des procyanidines sous l'effet des conditions gastriques et duodénales. Les formes libres de dimères et trimères ont été détectées dans le plasma des rats, avec une concentration maximale une heure après la prise orale d'un extrait de pépins de raisin. L'absorption de ces dimères et trimères de procyanidines a été limitée par la présence des fibres alimentaires.

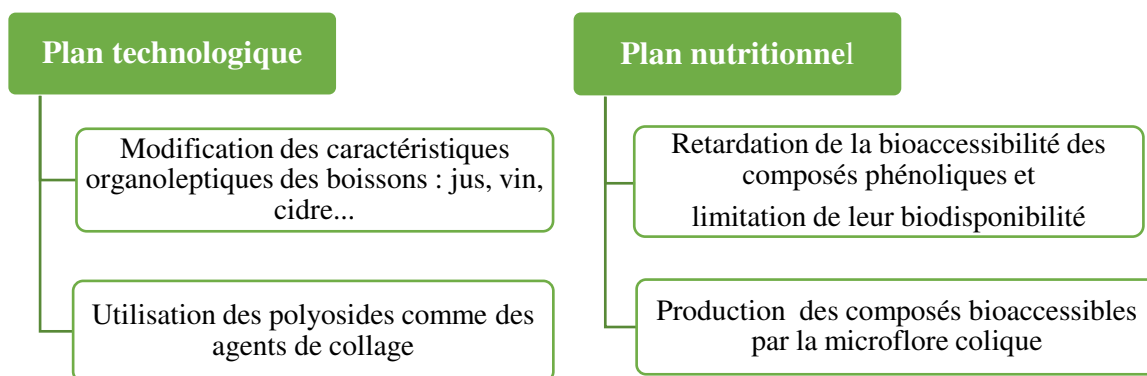
L'absorption des procyanidines dépend fortement de la taille de ces composés. Le taux de conversion des procyanidines en métabolites coliques est moins élevé avec les formes polymérisées. Les procyanidines les plus polymérisées sont aussi capables d'inhiber la formation des acides gras à chaînes courtes. Cependant, cette inhibition est réduite en présence de la matrice alimentaire (Aura *et al.*, 2013; Bazzocco *et al.*, 2008). Dans le même contexte, Pérez-Cano *et al.* (2013) ont montré que les procyanidines de cacao atteignent le colon et réagissent avec la microflore microbienne par une relation bidirectionnelle : les

bactéries sont impliquées dans le métabolisme de la dégradation des polyphénols et les flavonoïdes peuvent influencer la croissance et la composition de la flore microbienne. Les changements dans la composition de l'environnement intestinal peuvent influencer le système immunitaire ainsi que les composés provenant du métabolisme bactérien (Figure 28) : les procyanidines sont métabolisés par la microflore colique en divers acides phénoliques qui sont ensuite absorbés. Les composés absorbés sont métabolisés dans le foie et ensuite éliminés dans l'urine. Une partie des métabolites microbiens est éliminée dans les selles.



**Figure 28** : Schéma de la voie métabolique des flavonoïdes de cacao (Pérez-Cano *et al.*, 2013).

Pour résumer cette dernière partie, les interactions polyphénols-polyosides agissent principalement sur la modulation des caractéristiques organoleptiques de certaines boissons, sur le plan technologique, et la modulation de la bioaccessibilité et la biodisponibilité des composés phénoliques, sur le plan nutritionnel (Figure 29).



**Figure 29** : Schéma récapitulatif des principales conséquences des interactions procyanidines-parois.

*Il est indispensable de comprendre le devenir des composés phénoliques et de la matrice pariétale depuis la matière première (fruit) jusqu'au produit final (jus, cidre, vin...). Cet aspect sera étudié avec le modèle 'poire' en mettant en œuvre différents types de parois et différents stades de maturité.*



## *Problématiques & démarches*



## Problématiques & démarches

Dans une cellule végétale intacte, la paroi végétale et les polyphénols se trouvent dans deux compartiments distincts. Les polyphénols, et notamment les procyanidines, sont majoritairement localisés dans la vacuole alors que la paroi végétale constitue la barrière la plus externe de la cellule végétale.

Un stress environnemental, la mastication, les procédés technologiques de transformation des fruits et des légumes (traitements thermiques, pressage des fruits, production de jus, cidre et vin) induisant une décompartmentation cellulaire provoquant la mise en contact des polyosides pariétaux et des polyphénols.

*Néanmoins, la surmaturation des fruits pourrait-elle modifier les tissus et conduire à une déstructuration in situ des cellules ? La surmaturation pourrait-elle favoriser la mise en contact des procyanidines avec la paroi avant le processus de broyage des fruits lors de la production de jus ? Les polyphénols et la paroi pourraient-ils être modifiés au cours de la surmaturation des fruits ?*

De plus, la poire est un fruit très hétérogène avec la présence de deux types de cellules, les cellules parenchymateuses et les cellules pierreuses.

*Ces cellules pourraient-elles avoir des affinités différentes vis à vis des procyanidines ? Quel tissu de la poire pourrait être responsable de ces interactions ? Quel type de polyoside pariétal pourrait avoir plus d'affinité pour les procyanidines ?*

Pour répondre à ces questions, cinq parties expérimentales ont été envisagées et les résultats seront présentés sous forme des articles dans la partie 'résultats et discussions' :

### **\*Partie 1 : Caractérisation de la composition phénolique d'une large gamme de variétés de poires**

Un ensemble de variétés (19 variétés) de poires de table et de poires à poiré a été utilisé pour caractériser les polyphénols présents dans ce fruit. Les variétés ont été collectées dans des régions différentes de manière à obtenir une grande variabilité génétique. Les poires de table se divisent en deux groupes :

-Seize variétés de poires de table avec des variétés locales fournies par l'Institut Supérieur Agronomique (à Chott Mariem, Sousse, Tunisie), et des variétés européennes (achetées au supermarché, Avignon, France).



-Trois variétés de poires à poiré, fournies par l'Institut Français de Production Cidricoles ((IFPC), Sées, France). Ces variétés sont uniquement utilisées pour la production de poiré.

D'après la littérature, la composition phénolique varie selon la variété mais aussi selon le type de tissu. La composition phénolique a été analysée dans l'épiderme et le parenchyme pour chaque variété.

➤ Une grande variabilité génétique



- ✓ **Quelle est la composition phénolique pour chaque variété de poire étudiée ?**
- ✓ **Quelle est la particularité de chaque type de poire ?**

### **\*Partie 2 : Préparation des molécules d'intérêts (parois + procyanidines)**

Une grande partie de ce travail a été consacrée à la préparation des molécules d'intérêts (procyanidines et parois) en quantités suffisantes pour la caractérisation de leur composition et l'étude de leurs interactions. La variété 'De Cloche', variété de poires à poiré, a été utilisée pour l'extraction de ces deux macromolécules à deux stades de maturité (poires mûres et poires surmatures).

Les procyanidines ont été extraites par des solvants organiques à partir de parenchyme lyophilisé et purifiées par chromatographie liquide en phase inverse selon le protocole de Guyot *et al.* (1998).

Les parois ont été extraites à partir de quatre tissus différents (le parenchyme total, les cellules parenchymateuses, les cellules pierreuses et l'épiderme). L'extraction des parois a été

réalisée selon une méthode adaptée de Renard (2005b). Cette méthode consiste à préparer les parois en trois étapes principales :

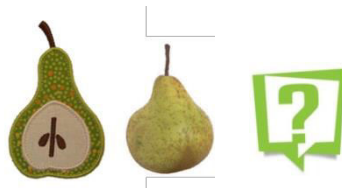
1-élimination des sucres solubles et des acides organiques par rinçage du broyat de fruit avec une solution saline;

2-élimination des protéines pariétales par incubation du broyat du fruit avec du phénol;

3-finalement, élimination des polyphénols par un mélange acétone-eau. Ce mélange permet également une déshydratation de la préparation pariétale.

Les polysides constitutifs (pectines, hémicelluloses et cellulose) ont été ensuite isolés par des extractions séquentielles (Renard & Ginies 2009) et caractérisés séparément pour les quatre types de parois et les deux stades de maturité indiqués ci-dessus.

- La poire est un fruit hétérogène du fait de la présence de deux types de cellules caractéristiques : les cellules parenchymateuses et les cellules pierreuses



- ✓ **Quelle est la composition de la paroi pour les différents tissus de la poire : le parenchyme total (cellules parenchymateuses + cellules pierreuses), les cellules parenchymateuses, les cellules pierreuses et l'épiderme ?**
- ✓ **Quelle est l'évolution des tissus étudiés entre les poires mûres et les poires surmatures ?**
- ✓ **Quelles sont les caractéristiques des procyanidines des poires à poiré ?**
- ✓ **Comment évoluent les procyanidines entre les deux stades de maturité ?**

### **\*Partie 3 : Identification des mécanismes d'interactions parois-procyanidines**

Cette partie consiste à mettre en évidence l'effet de la surmaturité et du type de paroi sur les interactions parois-procyanidines. Ces interactions ont été caractérisées par trois méthodes différentes :

#### **1- Réalisation d'isothermes d'adsorption**

Le taux d'adsorption des procyanidines par une quantité fixe de parois est mesuré pour des concentrations variées de procyanidines : les isothermes d'adsorption sont basées sur le modèle de Langmuir, traduisant l'existence ou non d'un équilibre dynamique qui s'établit, à température fixe, entre la fraction des procyanidines fixées à la paroi végétale et la fraction des procyanidines libres en solution. Cette dernière est mesurée par son absorbance à 280 nm. Les isothermes de Langmuir permettent de définir certains paramètres tels que l'affinité et le nombre de site de fixation des procyanidines sur les parois.

#### **2-Spectroscopie infrarouge**

Cette technique a été utilisée pour discriminer les complexes parois-procyanidines des parois purifiées et tenter de localiser les zones préférentielles de fixation des procyanidines sur les parois.

#### **3-Calorimétrie de titration isotherme (ITC)**

Cette technique permet de quantifier directement, d'un point de vue thermodynamique, la chaleur dégagée (interaction exothermique) ou absorbée (interaction endothermique) au cours de la mise en place d'interactions entre les procyanidines et la paroi végétale. Elle permet aussi de donner des réponses quantitatives sur les affinités et la stœchiométrie établies lors des réactions (comme les isothermes).

- Mise en contact des procyanidines et de la paroi végétale:



❖ **4 types de parois :**

- \*Parenchyme total
- \*Cellules pierreuses
- \*Cellules parenchymateuses
- \*Epiderme



❖ **Deux stades de maturité :**

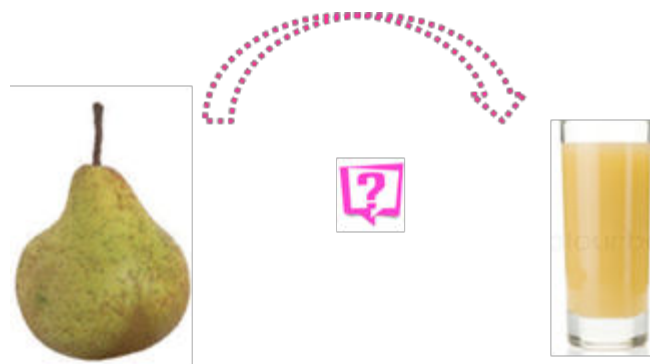
- \*Poires mûres
- \*Poires surmatures

- ✓ **Quel est l'effet du type de tissu sur l'affinité et le nombre de sites de fixation des parois ?**
- ✓ **Quel est l'effet du stade de maturité sur l'affinité et le nombre de sites de fixation des parois ?**

#### **\*Partie 4 : Validation sur un essai expérimental**

En collaboration avec l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC, Le Rheu, France), les résultats obtenus ont été confrontés à des pressages. Deux variétés représentatives de celles utilisées par les producteurs ont été transformées, 'De Cloche' et 'Plant De Blanc', à deux stades de maturité (poires mûres et poires surmatures). La composition phénolique a été caractérisée dans les fruits, les jus et les marcs. La composition de la paroi végétale a été analysée uniquement dans le fruit et dans le marc après le pressage.

- Validation des résultats sur un modèle réel
- Pressage de deux variétés de poires à poiré ('De Cloche' et 'Plant de Blanc') à deux stades de maturité (poires mûres et poires surmatures)



- ✓ **Quelle est la composition initiale en polyphénols et en paroi du fruit aux deux stades de maturité choisis ?**
- ✓ **La surmaturation modifie-t-elle le transfert des procyanidines vers le jus ?**

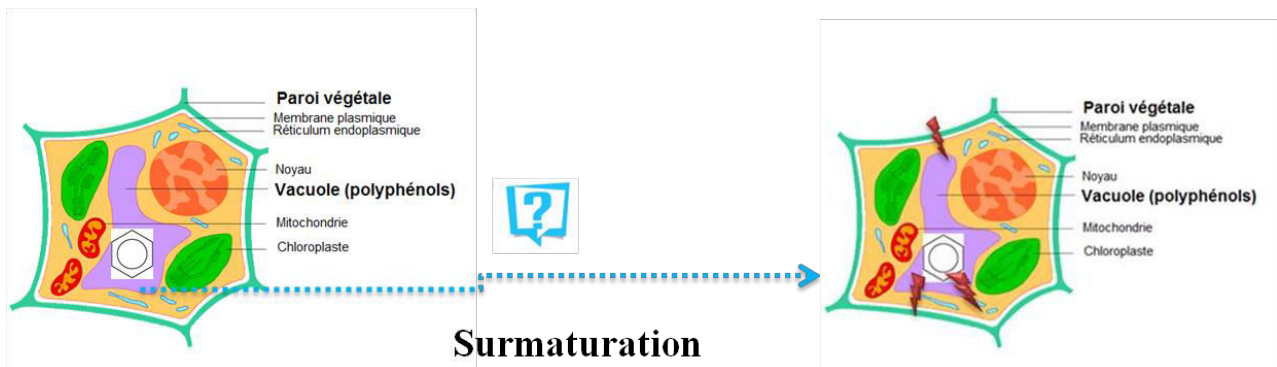
#### **\*Partie 5 : Localisation des tannins condensés par microscopie électronique**

Pour mieux mettre en évidence la localisation des procyanidines avec la paroi végétale, l'outil biochimique a été complété par l'outil histologique. Des coupes ont été réalisées sur des poires fraîches mûres et surmatures. Initialement, la localisation des

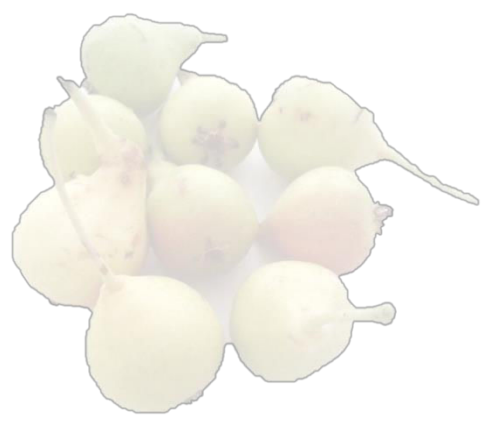
procyanidines a été faite sur des fruits frais en utilisant comme colorant le *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA), colorant spécifique des procyanidines. Les analyses histochimiques ont eu pour but de localiser *in situ* les procyanidines de manière à connaître leur répartition au sein même de la cellule. Ensuite, des zones préférentielles ont été choisies pour être observées en microscopie électronique à transmission.

### Localisation des procyanidines dans la cellule et le fruit

- Evolution de la compartimentation cellulaire avec la sénescence du fruit



- ✓ La surmaturation se traduit-elle par une perte d'intégrité des membranes ?
- ✓ Les interactions parois-procyanidines peuvent-elles s'amorcer avec la surmaturation ?



# *Chapitre 1*

## **Composés phénoliques des poires : Diversité & purification**



## Chapitre1 : Composés phénoliques des poires (Diversité & purification)

### Introduction à l'étude

Alors que certains travaux ont montré que les procyanidines sont les composés phénoliques majoritaire des poires (Ferreira *et al.*, 2002; Guyot *et al.*, 2002b; Kolniak-Ostek, 2016c; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a), la plupart des études ne les prennent cependant pas en compte (Amiot *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 2005; Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Oleszek *et al.*, 1994; Salta *et al.*, 2010; Yim & Nam, 2016), ce qui conduit à des estimations biaisées des teneurs en polyphénols des poires ainsi que de la répartition des différentes classes phénoliques.

Le but de ce chapitre est donc d'étudier la composition phénolique d'un ensemble de variétés de poires d'origines et d'utilisations diverses (poires de table et poires à poirés) en prenant en compte les procyanidines, afin d'avoir une meilleure vision de la variabilité phénolique dans *Pyrus communis* L.. Les composés phénoliques ont été identifiés par spectroscopie de masse et quantifiés par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrette de diode et précédée ou non à la thioacidolyse. Cette dernière permet de quantifier les oligomères et polymères de procyanidines, composés abondants dans les fruits de la famille des Rosacées, de connaître la nature de leurs unités constitutives ainsi que leurs degré de polymérisation moyen ( $DP_n$ ), un indicateur crucial pour estimer leurs impacts organoleptiques. Des procyanidines de faible degré de polymérisation ( $DP_n < 5$ ) sont perçues comme étant amères alors que des procyanidines ayant un degré de polymérisation plus élevé sont plutôt astringentes (Lea & Arnold, 1978; Peleg *et al.*, 1999).

Les analyses ont été faites sur le parenchyme et l'épiderme de poire séparément dans la mesure où il a été démontré que les teneurs et les classes phénoliques sont différentes entre ces deux tissus.

Parmi les différentes variétés étudiées, les poires à poiré se caractérisent par de fortes teneurs en polyphénols ainsi qu'un profil phénolique simple constitué seulement de trois classes phénoliques dont les acides phénoliques, les flavan-3-ols (catéchines et procyanidines) et les flavonols, ces derniers étant présents uniquement dans la peau. En raison de leurs fortes teneurs en procyanidines hautement polymérisées, ces poires ont été choisies pour l'extraction et la purification de fractions de procyanidines.

## Partie 1 : Diversité des composés Phénoliques

Cette partie a fait l'objet d'un article publié dans '*Food Research International* (2017),95, 125-133'.

🍏 **Titre:** *Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars*

🍏 **Auteurs:** *Marwa Brahem, Catherine M.G.C. Renard, Severin Eder, Michèle Loonis, Rim Ouni, Messaoud Mars & Carine Le Bourvellec*



## 1. Introduction

*Pyrus communis* L. is a typical fruit crop of temperate climates such as Europe, North America, North Africa and the temperate regions of the Southern hemisphere. It is the fifth most widely produced fruit in the world, being produced mainly in China, Europe, and the United States. *Pyrus communis* belongs to Rosaceae family. There are over 2000 pear cultivars, but only few are relevant in terms of volume of production and commercialization. Pears are typically eaten fresh and also used to produce juice, puree, and jam (Raffo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). The quality of pear fruit is known to be influenced by both external (size, shape, and color) and internal characteristics (nutritional and taste qualities) (Choi *et al.*, 2007). It has high nutritional value with reasonable amounts of sugars, amino acids and minerals like sodium, potassium, calcium, magnesium and iron (Yim & Nam, 2016). It has also higher dietary fiber level than most common fruits and vegetables, giving excellent results in the treatment of constipation and intestine inflammation (Silva *et al.* 2014). Pears also contain other nutritional and bioactive components as polyphenols.

Polyphenols are an important group of secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom. They are linked to many health benefits and are strong natural antioxidants (El Gharras, 2009; Tsao, 2010). Phenolic compounds contribute also to the sensory quality of fruit (color, astringency, bitterness and flavor) (Fernandez de Simon *et al.*, 1992). Phenolic compounds are generally more concentrated in the peel than in the fruit flesh (Andreotti *et al.*, 2006; Kolniak-Ostek, 2016a). Pear polyphenols have diverse structures and belong to different classes, namely as flavonoids (monomers and polymers of flavan-3-ols, flavonols and anthocyanins), phenolic acids (hydroxycinnamic acids derived from caffeic acid and *p*-coumaric acid) and simple phenolics (the *p*-hydroquinone-glucoside: arbutin) (Es-Safi *et al.*, 2006; Kolniak-Ostek, 2016c; Öztürk *et al.*, 2015). Many studies on polyphenol composition conclude that hydroxycinnamic acids and arbutin are the main phenolic compounds in pear (Amiot *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 2005; Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Lin & Harnly, 2008; Oleszek *et al.*, 1994; Yim & Nam, 2016). However, procyanidins are usually underestimated when alcoholic or hydro-alcoholic extractions are used; most of them are not extracted and remain in the insoluble part of the cortex (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013). Moreover, after extraction, their estimation by direct HPLC remains incomplete because polymeric forms do not give well-resolved peaks on chromatograms (Thompson *et al.*, 1972). The thioacidolysis-HPLC analysis allows quantitative and qualitative information on the procyanidin contents of fruit by cleaving oligomeric and polymeric procyanidins into their constitutive units (Guyot *et*

*al.*, 2001; Guyot *et al.*, 1998). Ferreira *et al.* (2002), Renard (2005a), Le Bourvellec *et al.* (2013) or Kolniak-Ostek (2016b), detected procyanidins in pear fruit and report that are the predominant class of phenolic compounds in some cultivars such as ‘Bartolomeu’, ‘William’ and ‘Gieser Wildeman’.

Among *Pyrus communis* cultivars, perry pears are specific cultivars used to make perry, a slightly alcoholic fizzy drink; little data is available about their phenolic composition (Guyot *et al.*, 2002b) and differences might exist between dessert and perry pear cultivars as observed between cider and dessert apple by Guyot *et al.* (2003). The aim of this study was to characterize and quantify the peel and flesh phenolic composition of dessert pears (Tunisian and European cultivars) and perry pears (French cultivars).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals compounds**

Acetonitrile of chromatographic grade quality was obtained from VWR (Leuven, Belgium). Methanol of chromatographic quality, acetic acid and hydrochloric acid were from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid, and benzyl mercaptan were provided by sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Polyphenol standards (3'-caffeoylquinic acid, 5'-caffeoylquinic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, quercetin-3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin, cyanidin-3-*O*-galactoside, peonidin-3-*O*-galactoside) were provided by Extrasynthèse (Lyon, France).

### **2.2. Plant Material**

Pears (*Pyrus communis* L.) from eight European dessert cultivars (‘Abate,’ ‘Comice’, ‘Conference’, ‘Passe-Crassane’, ‘Louise Bonne’, ‘Rochas’, ‘William vert’, and ‘William rouge’) were purchased at commercial maturity in September 2015 in a local supermarket (Avignon, France). Perry pears (‘Fausset’, ‘De Cloche’ and ‘Plant de Blanc’) were supplied by the Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC, Sées, France) in September 2015. Based on previous diversity studies (Brini *et al.*, 2008), eight Tunisian dessert cultivars (‘Arbi Bouficha’, ‘Tourki’, ‘Arbi Sidi Bou Ali’, ‘Meski Arteb’, ‘Soukri’, ‘Arbi Chiheb’, ‘Jrani’, ‘Rads’i) were harvested in July 2015 in Tunisian orchards (Table 9). For each cultivar, three batches of 10 pears were constituted. Each pear was peeled and cored manually and then the flesh was divided into 8 equal portions, of which two opposite quarters were used. For each cultivar and each batch, flesh and skin were freeze-dried and stored at -20 °C until analysis.

**Table 9 :** Geographic origins, different uses, and astringency characteristic of studied pear cultivars.

Cultivars	Abbreviations	Origins	Main uses	Astringency perception
Abate	AB	Italy	Dessert pears	No astringent
Arbi Bouficha	AF	Bouficha, Sousse, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Arbi Chiheb	AC	Monastir, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Arbi Sidi Bou Ali	AS	Sidi Bou Ali, Sousse, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Comice	CO	France	Dessert pears	No astringent
Conference	CF	England	Dessert pears	No astringent
De Cloche	DC	Sées, France	Perry pears	Very astringent
Fausset	FA	Sées, France	Perry pears	Very astringent
Jrani	JR	Monastir, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Louise Bonne	LB	France	Dessert pears	No astringent
Meski Arteb	MA	Sousse, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Radsi	RD	Sousse, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Passe Crassane	CR	France	Dessert pears	No astringent
Plant De Blanc	PB	Sées, France	Perry pears	Perceivable astringency
Rochas	RC	Portugal	Dessert pears	No astringent
Soukri	SK	Sousse, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
Tourki	TR	Monastir, Tunisia	Dessert pears	Perceivable astringency
William rouge	WR	United Kingdom	Dessert pears	No astringent
William vert	WV	United Kingdom	Dessert pears	No astringent

### 2.3. Extraction of phenolic compounds

Polyphenol extracts were prepared as described by Guyot *et al.* (2001). About 30 mg of freeze-dried flesh and peel were directly submitted to extraction (“crude” samples) or thioacidolysis. For thioacidolysis, 400  $\mu$ L of dried methanol acidified by concentrated HCl (0.4 mol/L) and 800  $\mu$ L of a toluene- $\alpha$ -thiol solution (50 mL/L in dried methanol) were added. The extraction was performed by incubation of mixture for 30 min at 40°C with agitation on a vortex every 10 min. Samples were cooled in ice in order to stop thioacidolysis reaction. For crude extraction, samples were dissolved in 1200  $\mu$ L of dried methanol acidified by acetic acid (10 mL/L). The reaction was carried out in an ultrasonic batch during 15 min. All samples (“thioacidolysis” and “crude” extracts) were filtered (PTFE, 0.45  $\mu$ m) and injected (20  $\mu$ L) into HPLC-DAD (see 2.5 section).

## 2.4. Identification of phenolic compounds by HPLC/ESI-MS<sup>2</sup>

HPLC/ESI-MS<sup>2</sup> analysis was performed on an Acquity Ultra performance LC (UPLC) apparatus from Waters (Milford, MA, USA), equipped with a photodiode array detector (detection at 280, 320, 350 and 520 nm) coupled with a Bruker Daltonics (Bremen, Germany) HCT ultra ion trap mass spectrometer with an electrospray ionization source. Separations were achieved using a Licrospher RP-18 5 $\mu$ m column (Merck, Darmstadt, Germany) protected by a guard column of the same material (Licrospher RP-18 5 $\mu$ m column, Merck Darmstadt, Germany) operated at 30°C. The mobile phase consisted of water/formic acid (99:1, mL/mL) (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The flow rate was 1 mL/min. The elution program was as follows: 3–9% B (0–5 min); 9–16% B (5–15 min); 16–50% B (15–45min); 50–90% B (45–48 min); 90–90% B (48–52 min). Samples (crud extracts) were injected at a level of 10  $\mu$ L. For polyphenol characterization, a capillary voltage of 2 kV was used in the negative ion mode. Nitrogen was used as drying and nebulizing gas with a flow rate of 12 L/min. The desolvation temperature was set at 365°C and the nebulization pressure at 0.4 MPa. The ion trap was operated in the Ultrascan mode from m/z 100 to 1000. For anthocyanin characterization, a capillary voltage of 1.8 kV was used in the positive ion mode with the same previous conditions.

## 2.5. Quantification of polyphenols by HPLC-DAD

Phenolic compounds were quantified by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection (RP-HPLC-DAD) (Shimadzu, Kyoto, Japan) including two pumps LC-20AD Prominence liquid chromatograph UFLC, a DGU-20A5 Prominence degasser, a SIL-20A8 Prominence autosampler, a CTO-20AC Prominence column oven, a SPD-M20A Prominence diode array detector, a CBM-20A Prominence communication bus module and controlled by a LC Solution software. Analyzes of polyphenols were carried out with or without thioacidolysis as described by Guyot *et al.* (2001) . Thioacidolysis was used to determine the content of procyanidins, their subunit composition and their number average degree of polymerization (DP<sub>n</sub>). The DP<sub>n</sub> of procyanidins was calculated as the molar ratio of all the flavan-3-ol units (thioether adducts plus terminal units, minus (-)-epicatechin and (+)-catechin from crude extract) to (-)-epicatechin and (+)-catechin corresponding to terminal units minus (-)-epicatechin and (+)-catechin from crude extract. HPLC-DAD analysis of methanolic extracts (crud extracts) which were not submitted to thioacidolysis were performed to assay separately monomeric

catechins. Individual compounds were quantified in mg/kg of fresh weight (FW) by comparison with external standards at 280 nm for (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin benzyl thioether (quantified as (-)-epicatechin); at 320 nm for 5'-caffeoylquinic acid; at 350 nm for flavonols (quantified as quercetin and isorhamnetin), and at 520 nm for cyanidin glycosides (quantified as cyanidin-3-*O*-hexoside) and peonidin (quantified as peonidin-3-*O*-hexoside).

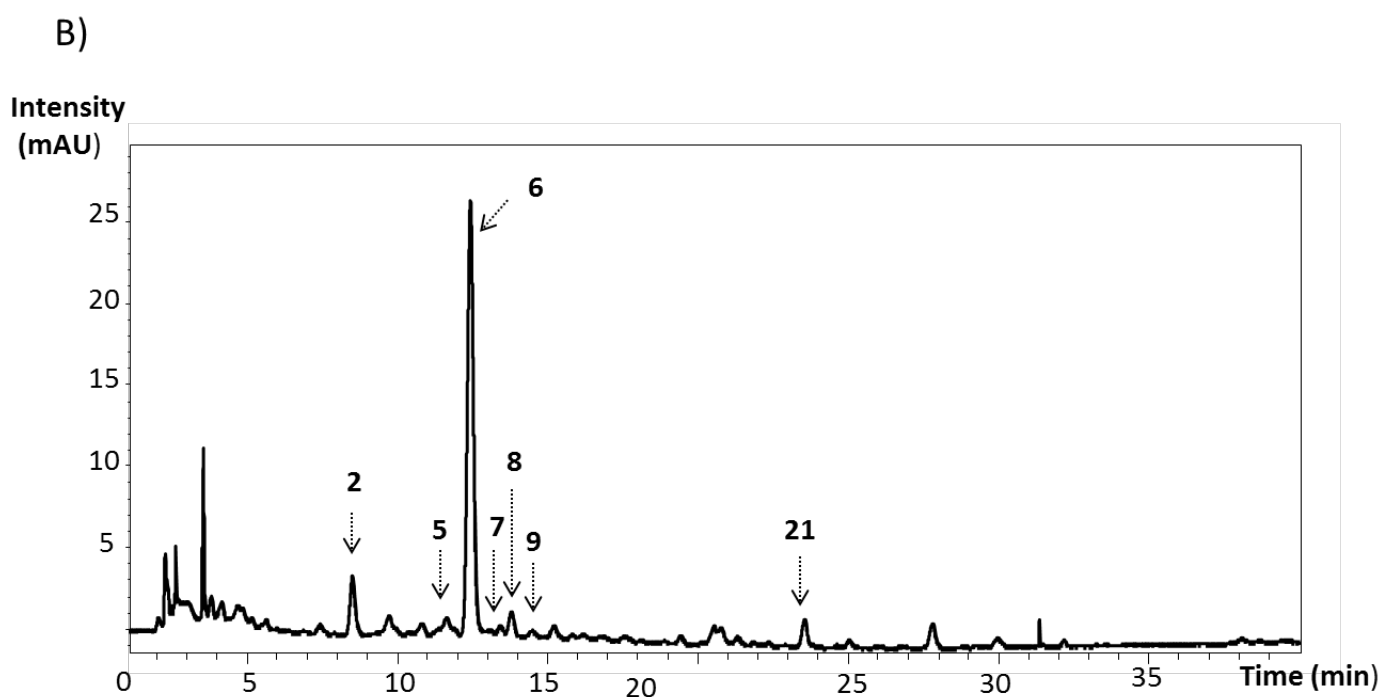
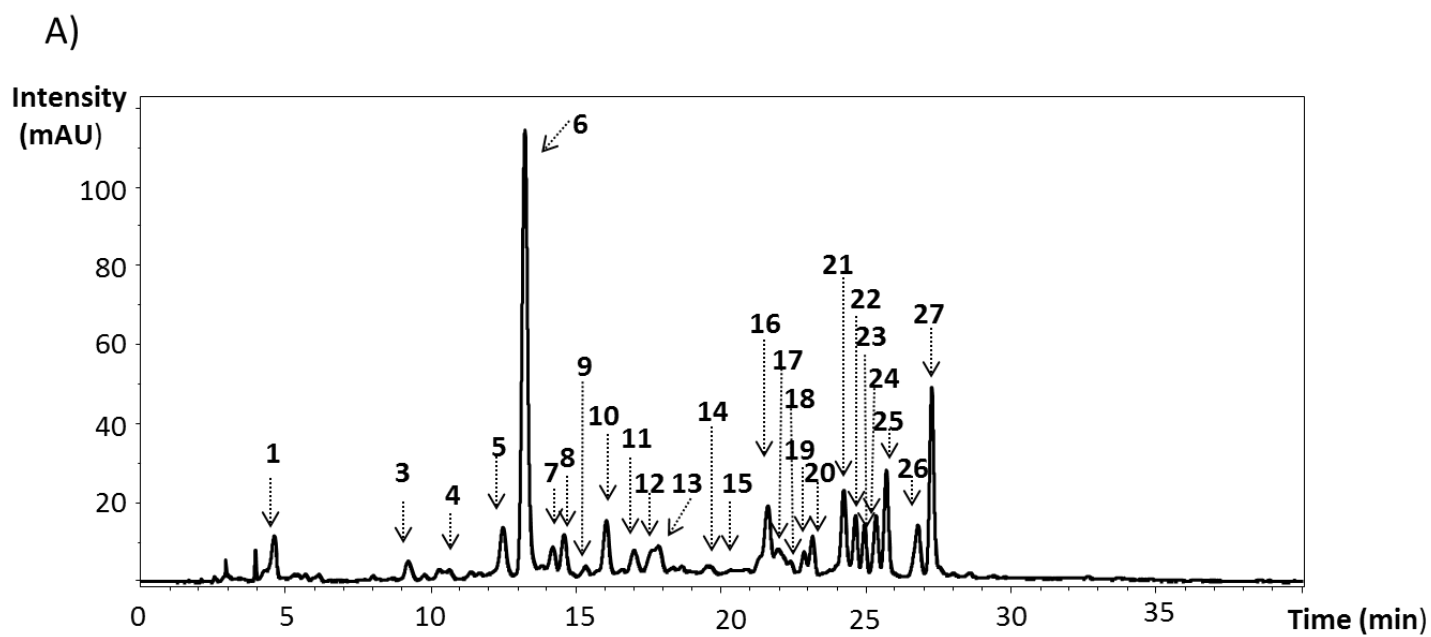
## **2.6. Statistical analyses**

Results are presented as mean values of triplicates for each cultivar and phenolic compound. The analytical reproducibility of the results was determined as pooled standard deviations (Pooled SD). Pooled SDs were calculated for each series of replicates using the sum of individual variances weighted by individual degrees of freedom (Box *et al.*, 1978). To respect homogeneity of value ranges, the pooled standard deviations were separately calculated for pears of high and low polyphenol concentrations. ANOVA and Principal Component Analysis (PCA) were performed on chemical data using the Excel stat package of Microsoft Excel.

## **3. Results**

### **3.1. Pear fruit phenolic profile from HPLC/ESI-MS<sup>2</sup> analysis**

Example of HPLC-MS<sup>2</sup> chromatogram at 280 nm for peel and flesh “crude” extracts is presented in figures 30A and 30B respectively. The chromatographic profile showed 27 peaks that included phenolic acids, flavan-3-ol monomers, flavan-3-ol polymers, flavonols, anthocyanins and others phenolic compounds such as hydroquinones (Table 10). Phenolic compounds were identified by comparison with authentic standards and by interpretation of the observed MS<sup>2</sup> spectra with those found in the literature.



**Figure 30** : Chromatographic profile extracted at 280 nm of ‘William rouge’ peel (A) and flesh (B) extracts obtained by HPLC-MS<sup>2</sup> (Licospher RP-18 column). Peak numbers are displayed in table 10.

**Table 10** : Phenolic compounds detected by HPLC/ESI MS<sup>2</sup> in nineteen pear cultivars

Peak	Retention time (min)	UV (nm)	m/z	MS <sup>2</sup> fragments (m/z)	Compounds
1	4.7	283	271	109, 161	Arbutin <sup>d,i</sup>
2	8.2	326	365	203, 159	Tryptophan derivative <sup>d</sup>
3	9.4	297-326	353	191, 179	3'-caffeoylquinic acid <sup>a</sup>
4	10.7	279	577	559, 451, 425, 407, 289, 245	Procyanidin dimer <sup>i,d</sup>
5	12.5	279	289	245, 205, 179, 161	catechin <sup>a</sup>
6	13.3	297-326	353	191	5'-caffeoylquinic acid <sup>a</sup>
7	14.2	279	577	541, 425, 407, 289, 245	Procyanidin dimer <sup>i,d</sup>
8	14.6	281	441	325, 163	Coumaroyl hexoside malic acid <sup>g</sup>
9	15.3	297-326	353	191, 179, 173	4'-caffeoylquinic acid <sup>b,c</sup>
10	16.1	278	289	245, 205, 179, 161	epicatechin <sup>a</sup>
11	17.1	280-310	337	191, 163	Coumaroylquinic acid <sup>d,f</sup>
12	17.6	280-511	449	287	Cyanidin-3- <i>O</i> -hexoside <sup>a</sup>
13	17.9	279	577	559, 451, 425, 407, 289	Procyanidin dimer <sup>i,d</sup>
14	20.0	277	359	197, 153	Syringic acid hexoside <sup>h</sup>
15	20.6	280-511	463	301	Peonidin-3- <i>O</i> -hexoside <sup>a</sup>
16	21.7	290-313	163	119	Coumaric acid <sup>d</sup>
17	22.0	280	577	451, 425, 407, 289	Procyanidin dimer <sup>i,d</sup>
18	22.4	252-346	609	301	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside <sup>a</sup>
19	22.8	255-346	463	301	Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside <sup>a</sup>
20	23.1	255-346	463	301	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside <sup>a</sup>
21	24.0	297-326	515	353, 191	di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid <sup>d,e</sup>
22	24.5	254-266-346	623	357, 315, 300, 255	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside <sup>e,d</sup>
23	25.0	253-266-346	623	315, 300, 255	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside <sup>e,d</sup>
24	25.4	254-267-353	477	499, 357, 314, 285	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -hexoside <sup>d</sup>
25	25.7	254-267-353	477	499, 357, 314, 285	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -hexoside <sup>d</sup>
26	27.3	254-266-356	519	477, 357, 315, 271	Isorhamnetin acetyl hexoside <sup>d,e,j</sup>
27	27.3	254-266-356	519	477, 357, 315, 271	Isorhamnetin acetyl hexoside <sup>d,e,j</sup>

<sup>a</sup>:identification confirmed by authentic standards

<sup>b</sup>:Bujor *et al.* (2016)

<sup>c</sup>:Chanforan *et al.* (2012)

<sup>d</sup>:Kolniak-Ostek (2016c)

<sup>e</sup>:Oszmiński and Wojdyło (2014)

<sup>f</sup>: Ncube *et al.* (2014)

<sup>g</sup>:Abu-Reidah *et al.* (2015)

<sup>h</sup>:Barros *et al.* (2012)

<sup>i</sup>: Kalisz *et al.* (2015)

<sup>j</sup>:Simirgiotis *et al.* (2016)

### 3.1.1. Phenolic acids and derivatives

Eight phenolic acid derivatives could be identified. Compounds 3 and 6 were identified as 3'-caffeoylquinic acid and 5'-caffeoylquinic acid respectively and were confirmed by authentic standards. Compound 9 displayed a major fragment ion at  $m/z$  353 and fragments ion at  $m/z$  191 and 173 typical of 4'-caffeoylquinic acid (Bujor *et al.*, 2016; Chanforan *et al.*, 2012). Compound 21 displayed a parent ion at  $m/z$  515 and fragment ions at  $m/z$  353 and 191 corresponding to caffeoylquinic acid and quinic acid respectively, and was assigned as di-*O*-caffeoylquinic acid as reported in Polish pear cultivars by Kolniak-Ostek (2016c) and Oszmiański and Wojdyło (2014). Compound 11 displaying a parent ion  $m/z$  377 and a typical fragmentation at  $m/z$  191 corresponded to *p*-coumaroylquinic acid (Kolniak-Ostek, 2016c; Ncube *et al.*, 2014). Compound 8 was identified as a derivative of *p*-coumaroylquinic acid (coumaroyl hexoside malic acid,  $m/z$  441,  $R_t=14.6$  min) as described by Abu-Reidah *et al.* (2015). Compound 14 was characterized as a derivative of syringic acid (syringic acid hexoside) based on its  $m/z$  359, which fragmented at  $m/z$  197, due to the loss of an hexose, and 153 due to the loss of CO<sub>2</sub> (Barros *et al.*, 2012). Compound 16 had a parent ion at  $m/z$  163 typical for coumaric acid (Kolniak-Ostek, 2016c).

### 3.1.2. Flavan-3-ol monomers and polymers

Six flavan-3-ols were detected in pear as: catechin, epicatechin and 4 procyanidin dimers. Compounds with retention times at 12.5 min (compound 5) and 16.1 min (compound 10) were identified as (+)-catechin and (-)-epicatechin. Their retention times,  $m/z$ , UV spectrum, were consistent with the values achieved for their standards. Compounds 4, 7, 13 and 17 were characterized as dimer procyanidins, due to their  $m/z$  577 and fragmentation ions at  $m/z$  289 corresponding to the monomer of catechin as reported in different pear extracts (Kalisz *et al.*, 2015; Kolniak-Ostek, 2016c).

### 3.1.3. Flavonols

Nine flavonols were detected in pear skin extracts: 3 quercetin derivatives and 6 isorhamnetin derivatives. Quercetin derivatives were represented by: quercetin-3-*O*-rutinoside (peak 18,  $m/z$  609,  $R_t=22.4$  min), quercetin-3-*O*-galactoside (peak 19,  $m/z$  463,  $R_t=22.8$  min) and quercetin-3-*O*-glucoside (peak 20,  $m/z$  463,  $R_t=23.1$  min) and were confirmed by authentic standards. Peak 22 and 23 were identified as isorhamnetin-hexoside-desoxyhexose isomers (probably isorhamnetin rutinoside) (Kolniak-Ostek, 2016c; Oszmiański & Wojdyło,



2014). Compounds 24 and 25 were identified as isorhamnetin hexosides ( $m/z$  447) as described by Kolniak-Ostek (2016c). The hexoses likely are glucose and galactose respectively, as the elution order of glycosylated compounds for C18 columns is constant (Kolniak-Ostek, 2016c). Compounds 26 and 27 were identified as isorhamnetin acylated hexosides due to loss of a hexose residue and the acetyl group (Oszmiański & Wojdyło, 2014; Simirgiotis *et al.*, 2016). The same flavonols were detected in ‘Alexander Lucas’, ‘Anjou’ and ‘William rouge’ cultivars (Schieber *et al.*, 2001). However, others flavonols, such as malonylated quercetin glucoside present in some pear cultivars (Galvis Sánchez *et al.*, 2003), were not detected the studied pear cultivars. Lin and Harnly (2008) report that pear peel of ‘Red d’Anjou’ and ‘Comice’ cultivars contain significant quantities of isorhamnetin glycosides, the malonyl forms, and lesser quantities of quercetin glycosides than Asian pears.

#### **3.1.4. Anthocyanins**

Two anthocyanins were found, exclusively in the peel of ‘William rouge’: cyanidin-3-*O*-hexoside (peak 12,  $m/z$  449,  $R_t=17.6$ ) and peonidin-3-*O*-hexoside (peak 14,  $m/z$  577,  $R_t = 20.6$ ). They showed a higher response factor in the ion trap mass spectrometer in the positive mode than in negative mode. Cyanidin-3-*O*-hexoside and peonidin-3-*O*-hexoside have been reported in ‘Red Delicious’ (Timberlake & Bridle, 1971) and ‘Red d’Anjou’(Galvis Sánchez *et al.*, 2003). Cyanidin-3-*O*-arabinoside and cyanidin-3-*O*-rutinoside, previously identified in ‘Forelle’ cultivar(Galvis Sánchez *et al.*, 2003), were not detected in ‘William rouge’ cultivar.

#### **3.1.5. Others phenolic compounds**

Others compounds were also characterized specially arbutin, a specific phenolic compound detected in pear as described by Schieber *et al.* (2001). Arbutin (compound 1) had characteristic fragmentation at  $m/z$  271 and was identified by comparison of observed MS<sup>2</sup> spectra with those found in the literature (Kalisz *et al.*, 2015; Kolniak-Ostek, 2016c; Lin & Harnly, 2008). Compound 2 ( $m/z$  365,  $R_t=8.2$ ), only present in pear flesh (cv ‘William rouge’) was probably a tryptophan derivative as described by Kolniak-Ostek (2016c).

### **3.2. Phenolic contents in fruit flesh vs peel**

Some phenolic compounds were identified by HPLC/ESI-MS<sup>2</sup> but not quantified by HPLC-DAD, such as arbutin, 3'-caffeoylquinic acid, 4'-caffeoylquinic acid, di-*O*-

caffeoylquinic acid and coumaric acid, as they were present in low concentrations. Only the concentrations of the major phenolic compounds are shown in Tables 11 and 12.

The sum of phenolic compounds ranged between 115 mg/kg fresh weight (FW) in ‘Conference’ flesh to 40400 mg/kg FW in ‘Arbi Chiheb’ peel. Thus, the polyphenol content in peel was higher than in the flesh as reported in other pear cultivars by Galvis Sánchez *et al.* (2003) and in apple by Guyot *et al.* (2002a). The phenolic profile in flesh was simple with mainly two classes, flavan-3-ols and hydroxycinnamic acids, as reported by Ferreira *et al.* (2002), Le Bourvellec *et al.* (2013) and Renard (2005) and probably some traces of arbutin.

**Table 11:** Major polyphenol concentrations (mg/kg of fresh weight (FW)) in the flesh of studied pears

Cultivars	Flavan-3-ols monomers (catechins)			Flavan-3-ols polymers (Procyanidins)			Phenolic acids	Flavonols	Total	
	CAT	EC	PCA	DP <sub>n</sub>	%CAT <sub>t</sub>	%EC <sub>t</sub>				%EC <sub>ext</sub>
Abate	7	20	758	18	0.6	4.9	94.5	92	n.d.	876
Arbi Bouficha	n.d.	5	6160	209	0.3	0.2	99.5	122	n.d.	6290
Arbi Chiheb	n.d.	n.d.	6320	195	0.3	0.2	99.5	96	n.d.	6420
Arbi Sidi Bou Ali	n.d.	4	1810	37	0.3	2.5	97.3	99	n.d.	1920
Comice	4	11	561	29	0.5	3.0	96.5	35	n.d.	610
Conference	n.d.	8	51	8	4.6	8.3	87.1	57	n.d.	115
De Cloche	n.d.	40	6630	31	0.7	2.6	96.7	229	n.d.	6900
Fausset	n.d.	43	4050	36	0.6	2.2	97.2	52	1	4140
Jrani	n.d.	n.d.	6020	161	0.3	0.3	99.4	125	n.d.	6140
Louise Bonne	n.d.	6	1330	37	0.2	2.5	97.3	77	n.d.	1410
Meski Arteb	n.d.	n.d.	1900	44	0.5	1.8	97.7	173	n.d.	2070
Radsı	n.d.	4	1270	25	0.5	3.6	95.9	406	2	1690
Passe Crassane	n.d.	9	1490	68	0.1	1.4	98.5	113	n.d.	1620
Plant De Blanc	n.d.	26	7870	58	0.4	1.3	98.3	661	2	8560
Rochas	n.d.	7	417	15	0.8	5.9	93.2	90	n.d.	514
Soukri	n.d.	5	596	44	0.9	1.4	97.7	66	n.d.	667
Tourki	n.d.	12	2760	48	0.2	1.9	97.9	114	n.d.	2880
William rouge	4	10	141	14	4.3	2.9	92.9	77	n.d.	231
William vert	4	7	83	19	3.2	2.0	94.8	49	n.d.	143
<i>Pooled SD</i>	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>5.4</i>	<i>5.9</i>	<i>0.0</i>	<i>4.9</i>	<i>94.5</i>	<i>0.2</i>	<i>0.0</i>	<i>5.4</i>
<i>(total&gt;2 g/kg)</i>										
<i>Pooled</i>	<i>0.0</i>	<i>0.0</i>	<i>1.2</i>	<i>1.6</i>	<i>0.1</i>	<i>0.4</i>	<i>0.4</i>	<i>0.1</i>	<i>0.0</i>	<i>1.3</i>
<i>SD(total&lt;2g/kg)</i>										
<i>ANOVA (F value)</i>	<i>598***</i>	<i>223***</i>	<i>531***</i>	<i>233***</i>	<i>168***</i>	<i>44***</i>	<i>104***</i>	<i>671***</i>	<i>6***</i>	<i>549***</i>

CAT: (+)-catechin, EC: (-)-epicatechin, PCA: procyanidins, (DP<sub>n</sub>): average degree of polymerization of procyanidins, % CAT<sub>t</sub>: percentage of (+)-catechin as terminal unit, %EC<sub>t</sub>: percentage of (-)-epicatechin as terminal unit, % EC<sub>ext</sub>: percentage of (-)-epicatechin as extension unit, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, Flavonols: sum of flavonols, Total: sum of polyphenols, n.d: not detected, Pooled SD: pooled standard deviation were calculated for two groups (Sum of polyphenols >2 g/kg and < 2 g/kg). Fisher's Value F value, P≤0.05: \*, P≤0.01: \*\*, P≤0.001: \*\*\*.

**Table 12 :** Major polyphenol concentrations (mg/kg of fresh weight (FW)) in the peel of studied pears

Cultivars	Flavan-3-ol monomers (catechins)			Flavan-3-ol polymers (Procyanidins)				Phenolic acids			Flavonols				Total	
	CAT	EC	PCA	$\overline{DP}_n$	%CAT <sub>t</sub>	%EC <sub>t</sub>	%EC <sub>ext</sub>	CQA	Rutin	Q3Glu	Q3Gal	Ih3R	Ih3H	Ih3aH		Flavonols
Abate	39	363	2800	5	3.4	15.9	80.6	556	13	18	47	234	188	42	542	4300
Arbi Bouficha	50	214	25300	18	1.4	4.2	94.5	1720	776	134	242	3340	227	n.d.	4720	32000
Arbi Chiheb	155	242	31800	18	1.5	4.2	94.3	2090	1110	53	227	4410	242	n.d.	6050	40400
Arbi Sidi Bou Ali	n.d.	460	5960	8	2.1	11.2	86.7	1800	744	205	319	1950	178	81	3480	11700
Comice	43	215	3180	8	1.1	12.2	86.7	515	n.d.	1	36	29	98	31	194	4150
Conference	21	116	756	4	2.6	23.3	74.1	322	21	18	46	148	113	2	348	1600
De Cloche	37	280	6940	9	2.0	9.1	88.9	705	70	n.d.	25	136	15	n.d.	246	8210
Fausset	28	181	2750	7	2.8	11.5	85.7	217	10	8	28	3	4	4	57	3230
Jrani	24	69	22400	20	1.5	3.5	95.0	1560	764	77	165	3350	155	n.d.	4510	28600
Louise Bonne	12	336	5010	7	2.6	11.4	86.0	1270	30	23	77	371	185	n.d.	686	7310
Meski Arteb	n.d.	284	14000	9	2.3	9.0	88.7	3330	17	741	1220	253	848	n.d.	3080	20700
Radsi	n.d.	373	10400	7	5.4	8.5	86.1	3180	169	785	1360	349	334	564	3560	17500
Passe Crassane	16	136	1410	10	1.5	8.6	89.9	326	9	66	65	75	102	45	363	2250
Plant De Blanc	28	92	7850	17	1.1	4.9	94.0	1300	n.d.	37	54	28	35	18	172	9440
Rochas	34	169	1110	5	2.1	17.0	80.9	642	148	n.d.	98	178	20	23	467	2430
Soukri	225	574	7990	7	1.9	12.2	85.9	795	182	457	753	124	233	214	1960	11500
Tourki	n.d.	327	11600	12	1.0	7.1	91.9	2020	718	234	366	1770	202	105	3390	17400
William rouge	69	139	1130	4	6.8	16.9	76.3	714	24	69	30	221	249	93	685	2910

	Flavan-3-ol monomers (catechins)			Flavan-3-ol polymers (Procyanidins)				Phenolic acids			Flavonols				Total	
Cultivars	CAT	EC	PCA	$\overline{DPn}$	%CAT <sub>t</sub>	%EC <sub>t</sub>	%EC <sub>ext</sub>	CQA	Rutin	Q3Glu	Q3Gal	Ih3R	Ih3H	Ih3aH	Flavonols	
William vert	30	132	847	5	4.0	16.7	79.3	329	14	9	36	84	82	16	240	1580
<i>Pooled SD (total&gt;10g/kg)</i>	1.5	8.8	264	1.0	0.2	0.5	0.6	28.6	24.8	19.4	24.6	75.7	15.5	7.9	141	372
<i>Pooled SD (total&lt;10 g/kg)</i>	2.2	17.5	183	0.4	0.2	0.8	0.9	34.5	8.6	6.6	12.4	8.0	11.9	10.0	44.5	230
<i>ANOVA (Fvalue)</i>	147***	65***	196****	70***	72***	54***	57***	136***	39***	21***	26***	62***	40***	19***	26***	138***

CAT: (+)-catechin, EC: (-)-epicatechin, PCA: procyanidins,  $\overline{DPn}$ : average degree of polymerization of procyanidins, % CAT<sub>t</sub>: percentage of (+)-catechin as terminal unit, %EC<sub>t</sub>: percentage of (-)-epicatechin as terminal unit, % EC<sub>ext</sub>: percentage of (-)-epicatechin as extension unit, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, Q3Gal: quercetin-3-O-galactoside, Q3Glu: quercetin-3-O-glucoside, Ih3R: isorhamnetin-3-O-rutinoside, Ih3H: isorhamnetin-3-O-hexoside, Ih3aH: isorhamnetin-3-O-acetyl hexoside, Flavonols: sum of flavonols, Total: sum of polyphenols, n.d.: not detected, Pooled SD: pooled standard deviation calculated for two groups (sum of polyphenols > 10 g/kg and < 10 g/kg). Fisher's Value F value, P≤0.05: \*, P≤0.01: \*\*, P≤0.001: \*\*\*.

### 3.2.1. Flavan-3-ol monomers and polymers

Procyanidins accounted for more than 90 % of all the phenolic compounds, except in ‘Radsis’, ‘William vert’ and ‘Conference’ cultivars, for which they represented 76 %, 58 % and 44 % respectively. Within pear peels, the proportion of procyanidins varied between 48% (‘Conference’) and 85 % (‘De Cloche’) as reported by Sanoner *et al.* (1999) for apple. Procyanidin concentrations ranged between 51 mg/kg fresh weight (FW) in ‘Conference’ flesh to 7870 mg/kg FW in ‘Plant de Blanc’ flesh. In the peel, procyanidin concentrations ranged between 756 mg/kg FW in ‘Conference’ to 31800 mg/kg FW in ‘Arbi Chiheb’. Procyanidins were more concentrated in the peel as described in apple and in grape (Bindon & Kennedy, 2011; Guyot *et al.*, 1998). For all cultivars, in the flesh, the procyanidins average degrees of polymerization (DP<sub>n</sub>) were significantly higher than those of the peel, ranging respectively from 8 (‘Conference’) to >209 (‘Arbi Bouficha’), and from 4 (‘Conference’ and ‘William rouge’) to 20 (‘Jrani’). High DP<sub>n</sub>, ranging between 4 and 44, have been reported earlier in some pear cultivars as ‘San Bartolomeu’ and ‘William’ (Ferreira *et al.*, 2002; Le Bourvellec *et al.*, 2013). However, Tunisian pears (cultivars ‘Arbi Bouficha’, ‘Arbi Chiheb’ and ‘Jrani’) stood out due to their striking high degree of polymerization. Procyanidin constitutive units were found in each cultivar as (+)-catechin and (-)-epicatechin, both in the flesh and peel. (-)-Epicatechin was always the predominant constitutive unit, which was found as terminal and extension units, accounting for more than 95 % of total units in the pulp and in the peel. (+)-Catechin was only found as terminal units. (+)-Catechin accounted from 0.1 % to 5 % of the total constitutive units in the flesh and from 1 % to 7 % of the total constitutive units in the peel.

Flavan-3-ol monomers were present in low concentration in pear flesh. Only (-)-epicatechin was detected (4-43 mg/kg FW), except for ‘Abate’, ‘Comice’, ‘William vert’ and ‘William rouge’ cultivars where small quantities of (+)-catechin (4-7 mg/kg FW) were found. However, Salta *et al.* (2010) reported higher (+)-catechin contents (12-103 mg/kg FW) in ‘Abate’, ‘Comice’ and ‘Passe Crassane’. In some Tunisian cultivars (‘Meski Arteb’, ‘Arbi Chiheb’ and ‘Jrani’) no flavan-3-ol monomers could be detected in the flesh, as already reported by Le Bourvellec *et al.* (2013) in ‘William’ pears. However for perry pears, they were in relatively high concentration in the three cultivars analyzed: ‘Fausset’ (43 mg/kg FW), ‘De Cloche’ (40 mg/kg FW) and ‘Plant De Blanc’ (26 mg/kg FW).

### 3.2.2. Phenolic acids

Hydroxycinnamic acids, were the second most abundant class in the flesh, where they reached 50 % of total phenolic compounds in ‘Conference’ cultivar and about 1/3<sup>d</sup> in ‘William’, but less than 10 % in most Tunisian and European perry pear cultivars. However, they only represented 5 % to 26 % of the total phenolic compounds in the peel. 5'-Caffeoylquinic acid has been reported as the main hydroxycinnamic acid in many pear cultivars (Cui *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2002; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a). It was present in higher amount in perry pear flesh especially ‘Plant De Blanc’ (661 mg/kg FW) and ‘De Cloche’ (229 mg/kg FW) and in Tunisian cultivars ‘Radsî’ (406 mg/kg FW), ‘Meski Ardeb’ (173 mg/kg FW) and ‘Jrani’ (125 mg/kg FW) as compared to dessert pears. These concentrations were higher than those reported by other authors where 5'-caffeoylquinic acid content do not exceed 80 mg/kg FW in pear flesh (Escarpa & Gonzalez, 2000; Kolniak-Ostek, 2016c; Schieber *et al.*, 2001). The 5'-caffeoylquinic acid concentrations were higher in pear peels, ranging from 322 mg/kg FW to 3330 mg/kg FW as reported in apple Guyot *et al.* (2002) and in pears by Galvis Sánchez *et al.* (2003) and Kolniak-Ostek (2016b), but in even higher concentrations. Other phenolic acids were reported in different pear cultivars. Escarpa and Gonzalez (2000) reported the presence of coumaric acid from 1 to 8 mg /kg FW in the flesh and from 6 to 16 mg/kg FW in the peel in ‘Agua’ and ‘Blanquilla’ pears and caffeic acid up to 40 mg/kg in ‘Pasagrana’ peel. 4'-caffeoylquinic and di-*O*-caffeoylquinic acids were also found in some Polish cultivars (36 and 30 mg/kg FW respectively) (Kolniak-Ostek, 2016c). These compounds were only present as traces in our case. Caffeic, ferulic and syringic acid were also reported as major phenolic acids in ‘Abate’, ‘Comice’ and ‘Passe Crassane’ pears (Salta *et al.*, 2010). However these compounds were not detected in our conditions.

### 3.2.3. Flavonols

Flavonols were mainly detected in pear peels as reported by Galvis Sanchèz *et al.* (2003), Kolniak-Ostek (2016b) and Li *et al.* (2014). Major flavonols were quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin), quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-hexoside and isorhamnetin-3-*O*-acetylhexoside. No kaempferol derivatives such as kaempferol-3-*O*-galactoside and kaempferol-3-*O*-rutinoside detected by Kolniak-Ostek, 2016b (1.2 mg/kg FW to 33.4 mg/kg FW for ‘Uta’ and ‘Hortensia’ pears respectively) were found here. Flavonol contents ranged from 57 mg/kg FW in ‘Fausset’ cultivar to 6050 mg/kg FW in ‘Arbi Chiheb’ cultivar. Flavonol concentrations were higher in

Tunisian cultivars (> 1.5 g/kg) while the amounts of flavonols do not exceed 0.7 g/kg FW for European cultivars. Tunisian pears had the highest amount of quercetin-3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin-3-*O*-rutinoside whereas in European pear cultivars the main flavonols were isorhamnetin-3-*O*-rutinoside and isorhamnetin-3-*O*-hexoside. The presence of flavonol traces only in the flesh of ‘Radsı’ (quercetin-3-*O*-galactoside and isorhamnetin-3-*O*-acetyl hexoside), ‘Plant De Blanc’ (quercetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin-3-*O*-acetyl hexoside) and ‘De Cloche’ (quercetin-3-*O*-glucoside) could arise from remnants of pear peel, as these fruits were small and not smoothly shaped.

### 3.2.3. Anthocyanins

Anthocyanins were only detected in the red skinned cultivar ‘William rouge’ with concentrations of  $134 \pm 3.1$  mg/kg FW for cyanidin-3-*O*-hexoside and  $38 \pm 0.8$  mg/kg FW peonidin-3-*O*-hexoside. These concentrations were quite similar to those in the peel of ‘Red d’Anjou’(120 mg/kg FW), whereas ‘Forelle’ peel contained a lower amount of anthocyanin (12 mg/kg FW) (Galvis Sánchez *et al.*, 2003).

### 3.3. Source of variability of pear phenolic composition

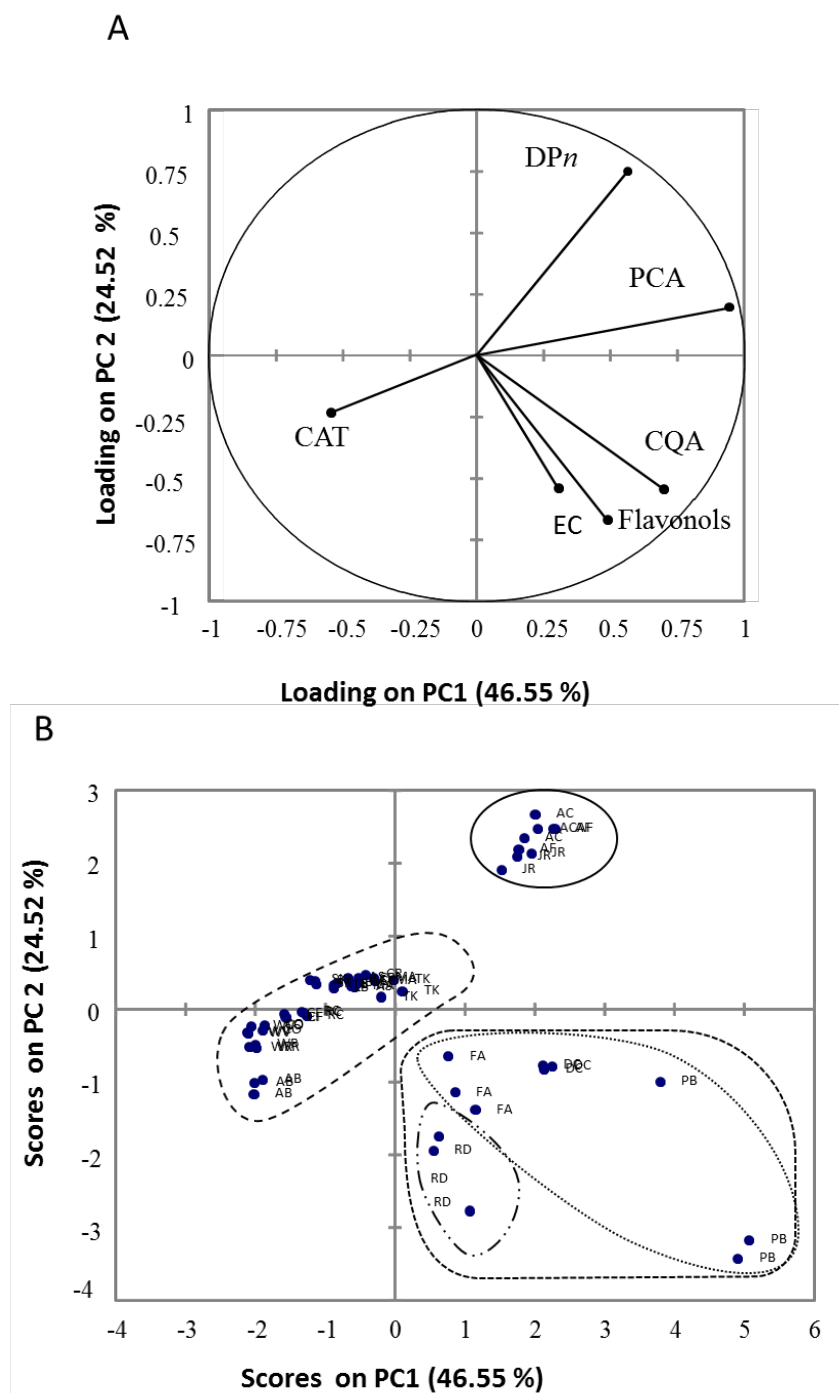
Principal component analysis (PCA) was applied to phenolic composition data to visualize the diversity of polyphenols for the flesh (Figure 31) and peel (Figure 32).

For the flesh phenolic composition, the two first axes (PC1 and PC2) explained more than 70 % of the total variance. The first principal component (PC1) contributed with 46% of the total variance and had a high contribution of procyanidins and 5'-caffeoylquinic acid (Figure 31A). The nineteen cultivars were clearly divided into three groups (Figure 31B). The first group was located in the positive side of PC1 and PC2 and included three Tunisian cultivars (‘Arbi Bouficha’, ‘Arbi Chiheb’ and ‘Jrani’). This group was characterized by high level of highly polymerized procyanidins (> 6 g/kg FW, DP<sub>n</sub> >160). Thus, the highly polymerized procyanidins could explain the specific astringency of these dessert pears, which remains acceptable by the Tunisian consumer. The second group was located in the negative side of PC1 and PC2 and included all perry pear cultivars (‘De Cloche’, ‘Plant De Blanc’ and ‘Fausset’). The Tunisian cultivar ‘Radsı’ was also located in the negative side of PC1 and PC2 and might be grouped with European perry pear group. In fact, these cultivars were characterized by similar concentrations of 5'-caffeoylquinic acid and (-)-epicatechin and medium polymerized procyanidins (between 25 and 58). The third group contains the other



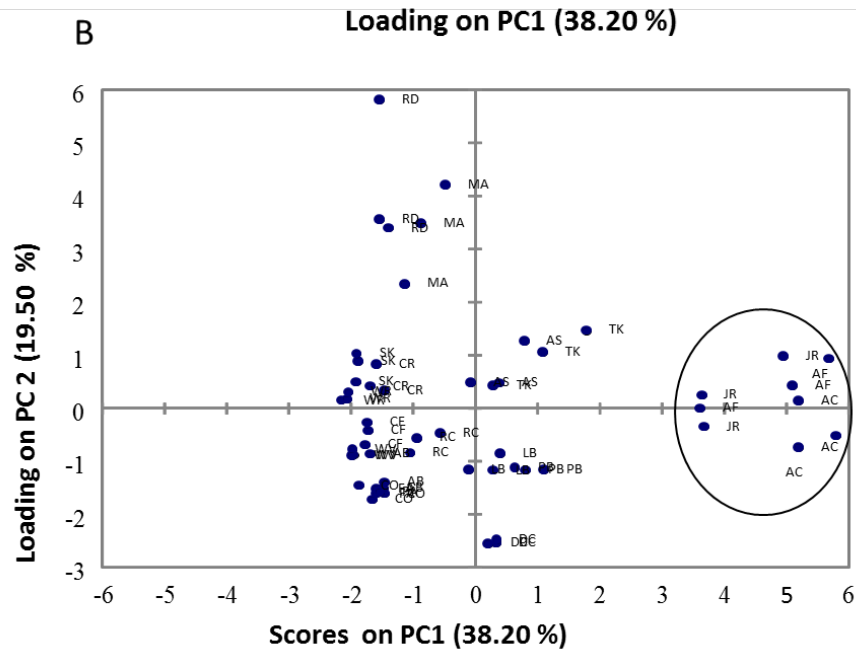
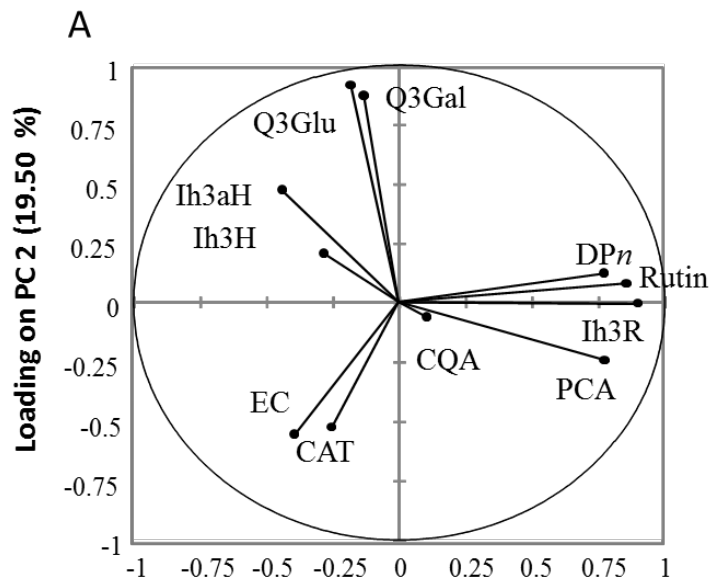
twelve cultivars including all European dessert pears and some Tunisian cultivars ('Tourki', 'Soukri', 'Arbi Sidi Bou Ali', 'Meski Arteb') which correspond to cultivars with low procyanidin contents.

PCA analysis of phenolic composition of pear peel is presented for the first two principal components (Figure 32). The discrimination of different cultivars was less clear and a high dispersion was observed (Figure 32B). However, all triplicates were reasonably grouped. Only 'Arbi Bouficha', 'Arbi Chiheb' and 'Jrani' were also discriminated according to peel phenolic composition (Figure 32B). This variability could be attributed to the diversity of flavonols in peel extracts.



**Figure 31:** Principal component analysis based on phenolic composition of fruit flesh of nineteen pear cultivars. A: Scatter plot of loadings on principal components PC1 and PC2, B: Sample map of scores on PC1 and PC2 as function of the cultivar. CAT: (+)-catechin, EC: (-)-epicatechin, PCA: procyanidins, DPn: average degree of polymerization of procyanidins, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, Flavonols: sum of flavonols.

**Cultivar's codes** are AB: 'Abate', AF: 'Arbi Bouficha', AC: 'Arbi Chiheb', AS: 'Arbi Sidi Bou Ali', CO: 'Comice', CF: 'Conference', DC: 'De Cloche', FA: 'Fausset', JR: 'Jrani', LB: 'Louise Bonne', MA: 'Meski Arteb', RD: 'Rads'i', CR: 'Passe Crassane', PB: 'Plant De Blanc', RC: 'Rochas', SK: 'Soukri', TR: 'Tourki', WR: 'William Rouge', WV: 'William Vert'.



**Figure 32** : Principal component analysis based on phenolic composition of fruit peel of nineteen pear cultivars. A: Scatter plot of loadings on principal components PC1 and PC2, B: Sample map of scores on PC1 and PC2 as function of the cultivar. CAT: (+)-catechin, EC: (-)-epicatechin, PCA: procyanidins, DP<sub>n</sub>: average degree of polymerization of procyanidins, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, Q3Glu: quercetin-3-*O*-glucoside, Q3Gal: quercetin-3-*O*-galactoside, Ih3R: isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, Ih3H: isorhamnetin-3-*O*-hexoside, IH3aH: isorhamnetin-3-*O*-acetyl hexoside.

**Cultivar's codes** are AB: 'Abate', AF: 'Arbi Bouficha', AC: 'Arbi Chiheb', AS: 'Arbi Sidi Bou Ali', CO: 'Comice', CF: 'Conference', DC: 'De Cloche', FA: 'Fausset', JR: 'Jrani', LB: 'Louise Bonne', MA: 'Meski Artéb', RD: 'Radsí', CR: 'Passe Crassane', PB: 'Plant De Blanc', RC: 'Rochas', SK: 'Soukri', TR: 'Tourki', WR: 'William Rouge', WV: 'William Vert'.

### 3.4. Impact of pear procyanidins on fruit and perry astringency

Procyanidins are responsible for organoleptic properties such as bitterness and astringency of some beverages such as cider (Lea & Arnold, 1978; Lea & Timberlake, 1974). Astringency has been shown to be a complex perceptual phenomenon that involves several sensations that are simultaneously perceived (Lee & Lawless, 1991). It is usually ascribed to binding and precipitation of salivary protein. Astringency was related most strongly to the molecular weight of procyanidins. Polymeric procyanidins ( $DP_n > 5$ ) were found to be more astringent than oligomeric forms ( $DP_n < 5$ ) (Lea & Arnold, 1978; Peleg *et al.*, 1999). Vidal *et al.* (2003) conclude that the overall astringency perception was higher for procyanidins with  $DP_n$  70 than  $DP_n$  3 and  $DP_n$  10. However, Peleg *et al.* (1999) and Vidal *et al.* (2003) report that the astringency of procyanidins might increase with chain length up to a maximum level (not determined) and decrease beyond this value.

Procyanidins were an essential factor to be taken into consideration in PCA for discriminating pear cultivars due to their different degree of polymerization, which might confirm the classification of cultivars taking into account their astringency (Table 1). Perry pear cultivars, classified as very astringent, are very typical and only used in the West Midlands (UK), in Bretagne and Normandie (France) to make perry (Guyot *et al.*, 2002b). Because of this high concentration of medium polymerized procyanidins, perry producers use fruits at the overripe stage to favor procyanidin-cell wall interactions in order to decrease procyanidins  $DP_n$  and concentrations in the juices, thus reducing perry astringency and increasing the colloidal stability during storage (Lea & Arnold, 1978). However, some Tunisian dessert pears with more polymerized procyanidins ( $DP_n > 100$ ) have a perceivable astringency (Table 1) which is appreciated by consumers and they are only eaten as fresh fruit. The relation between procyanidin structures and astringency sensation described by Symoneaux *et al.* (2014) can explain this difference. In some other fruits like mature green banana, phenolic composition was characterized by the presence of highly polymerized procyanidins but there is no perceived astringency. This could be due to the combination of procyanidins with other macromolecules (Barnell & Barnell, 1945; Santos *et al.*, 2010). Persimmon fruit contain high levels of highly polymerized procyanidins (Taira *et al.*, 1997) but lose this astringency upon maturation, also probably because of formation of pectin-tannin complexes. This phenomenon, among others, might explain the moderate sensation of astringency despite the high degree of polymerization of procyanidins in Tunisian pear cultivars. Particular agro-ecological environment could affect fruit biochemical

transformation during maturation and sensory properties development. Also, the astringency perception may vary greatly from one region to another, as for fruit sweetness and acidity. The determination of organic acid and sugars composition of studied pears, especially Tunisian pears, could complete their organoleptic characteristics.

#### **4. Conclusions**

This study compared the phenolic composition in peel and flesh of dessert pear cultivars with local Tunisian dessert pear and French perry pear cultivars. Among the different Tunisian and European pears, quantitative rather than qualitative differences in the phenolic composition could be observed. Thioacidolysis-HPLC confirmed that procyanidins were the main phenolic compounds for *Pyrus communis* L. Procyanidins were followed by 5'-caffeoylquinic acid in the flesh and flavonols then 5'-caffeoylquinic acid in the peel.

Exceptionally high content of very highly polymerized procyanidins were detected for the first time in some Tunisian dessert pear cultivars ( $DP_n > 100$ ). However, for perry pears cultivars known for their astringency, procyanidins were less polymerized ( $30 < DP_n < 60$ ). Previous works (Lea & Arnold, 1978; Symoneaux *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2003) indicate that astringency in cider and wine increases with the  $DP_n$ . This discrepancy with results found here, within a complex fruit matrix, might be due either to complexation of the highly polymerized procyanidins with other macromolecules present, and notably formation of adducts with polysaccharides, or to the conformation of highly polymerized procyanidins.

#### **5. Acknowledgements**

Thanks are due to Tunisians farmers and the “Institut Français des Productions Cidricoles” (Sées, France) for providing pear cultivars. We also thank Marielle Boge (UMR SQPOV, Avignon, France) for her technical help.

Marwa Brahem was supported by a PhD grant (RB35-2476) from the Higher Ministry of Education and Scientific Research of Tunisia.

## Partie 2 : Purification des procyanidines

### 1. Plant material

'De cloche' perry pear cultivar was chosen to extract procyanidins at two maturity stage based on the empirical assessment of perry producers: "Ripe" corresponding to pears at harvest, i.e. December 03, 2013 in the orchard of Mr. Aubry (Clécy, France), and "Overripe" (described as "soft under the fingers") corresponding to fruits stored for 5 days at 10°C and then for 3 days at room temperature.

### 2. Procyanidin extraction and purification:

Hexane, methanol and aqueous acetone extracts of pear polyphenols were obtained by successive solvent extractions of freeze-dried pulp material of French perry pear cultivar (*Pyrus communis* L., cv 'De Cloche') at ripe and overripe stage according to Guyot *et al.*, (1997). Around 150 g of freeze dried pear powder was treated with 500 mL hexane during 10 min under vigorous stirring. Hexane powder mixture was then filtered through a G3 sintered glass filter and discarded. The remaining powder was then extracted three times with 750 mL of methanol acidified with acetic acid (99:1, mL: mL) during 15 min in order to eliminate sugars, organic acids and phenolic compounds of low molecular weight (Guyot *et al.*, 1997). Methanolic extracts were then discarded. Acidified methanol powder mixture was then filtered through a G3 sintered glass filter. The remaining powder was finally extracted three times with 500 mL aqueous acetone acidified with acetic acid (60:39:1, mL:mL:mL) with the same procedure to extract highly polymerized procyanidins. Acetone fractions were pooled and concentrated on a rotary evaporator prior to freeze-drying.

The freeze dried aqueous acetone were dissolved in water acidified with formic acid (99.9:0.1, mL:mL) (100g/L), centrifuged (16800 g, 15 min) and then filtered. They were injected on a 20×5 cm column of LiChrospher 100 RP-18 (12 µm, Merck, Darmstadt, Germany) (Le Bourvellec *et al.*, 2006; Watrelot *et al.*, 2013). The column was first washed by acidified water until absence of sugars (detected by the phenol-sulphuric test, Dubois *et al.*, 1956) in the eluate, then a gradient of acetonitrile was applied. Polyphenol fractions were concentrated on a rotary evaporator then freeze-dried and stored under vacuum at -20°C until used. Thus, two purified procyanidin fractions were obtained: PCA-R from ripe perry pears and PCA-O from overripe perry pears.

### 3. Polyphenol characterization

**Thioacidolysis** : Lyophilized perry pear flesh and purified acetonic fraction (PCA-R and PCA-O) were characterized by HPLC-DAD after thioacidolysis as described by Guyot *et al.* (2001). Analyses were performed using an Ultra Fast Liquid Chromatography Shimadzu Prominence system (Kyoto, Japan) including two pumps LC-20AD Prominence liquid chromatograph UFLC, a DGU-20A5 Prominence degasser, a SIL-20AHT Prominence autosampler, a CTO-20AC Prominence column oven, a SPD-M20A Prominence diode array detector, a CBM-20A Prominence communication bus module and controlled by LC Solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Thioacidolysis was used to determine the content of procyanidins, their subunit composition and their number average degree of polymerization ( $DP_n$ ). The  $DP_n$  of procyanidins was calculated as the molar ratio of all the flavan-3-ol units (thioether adducts plus terminal units, minus (-)-epicatechin and (+)-catechin from crude extract) to (-)-epicatechin and (+)-catechin corresponding to terminal units minus (-)-epicatechin and (+)-catechin from crude extract (Eq 1). Crude extracts which were not submitted to thioacidolysis were performed to assay separately monomeric catechins.

$$DP_n = \frac{[CAT] + [EPI] + [EPI SR] - [cat] - [\acute{e}pi]}{[CAT] + [EPI] - [cat] - [\acute{e}pi]} \quad (Eq1)$$

[CAT], [EPI]: Concentrations of terminal unit of flavan-3-ols after thioacidolysis,

[EPISR]: Concentration of extension units of flavan-3-ols (thioether adducts) after thioacidolysis,

[cat], [ $\acute{e}pi$ ]: Concentrations of flavan-3-ols corresponding to terminal units (epicatechin and (+)-catechin from crude extract).

**Gel permeation chromatography (GPC)** : The size distribution of purified procyanidins (PCA-R and PCA-O) were characterized by gel permeation chromatography as described by Kennedy & Taylor (2003) and Watrelot *et al.* (2017) with minor modifications as follows: the system consisted of two porous PLgel columns (300 x 7.5 mm, 5  $\mu$ m, 50 and 100 nm) connected in series and protected by a guard column containing the same material (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), maintained at 60°C. The HPLC system used was an Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). It consisted of a quaternary pump, column heater, autosampler, diode array detector (DAD) and a refractive index detector (RID) and was controlled by Chemstation software.

Standards used for the calibration curve (1 g/L) and samples (10 g/L) were dissolved in water: methanol (1:9, mL:mL). Samples (20 µL), previously prepared in methanol: mobile phase (1:1, mL:mL) were injected at a flow rate of 1 mL/min in isocratic mode. The mobile phase consisted of *N,N*-dimethylformamide : glacial acetic acid : water (94 :1 :5, mL:mL:mL) and 0.15 mol/L lithium chloride. The detection occurred with a DAD at 280 nm. Calibration curve was constructed using (-)-epicatechin and procyanidins of various average degree of polymerization (DP<sub>n</sub>) previously extracted and fractionated from apple parenchyma (cv. ‘Kermerrien’ (DP<sub>n</sub> 2) (WatreLOT *et al.*, 2016) and ‘Kermerrien’ DP<sub>n</sub> 4, ‘Marie Ménard’ (DP<sub>n</sub>10) (WatreLOT *et al.*, 2013) and ‘Avrolles’ (DP<sub>n</sub> 30) (WatreLOT *et al.*, 2013), by correlating their average molecular mass (determined by thioacidolysis) with their cumulative mass distribution at 50 % elution volume. The characterization was carried out in duplicate.

**Mid infrared spectroscopy (MIR)** : Lyophilized purified procyanidins (PCA-R and PCA-O) were analyzed by ATR-Diamond spectrum acquisition. MIR spectra were collected at room temperature with a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker Optics, Wissembourg, France) equipped with a single-reflectance horizontal ATR cell (Golden Gate equipped with diamond crystal, Bruker Optics). PCA-R and PCA-O were placed on the ATR and were pressed with a system press tip flap. The samples were scanned at wavenumbers ranging from 4000 to 600 cm<sup>-1</sup> and corrected against the background spectrum of air. Each spectrum was obtained by taking the average of 16 scans.

#### **4. Phenolic composition of perry pear flesh**

The phenolic composition of ‘De Cloche’ flesh is summarized in Table 13. Phenolic profile was simple with only two classes, flavan-3-ols and hydroxycinnamic acids, as reported in our previous works on perry pear cultivars (Brahem *et al.*, 2017b). Polymeric flavan-3-ols, procyanidins, were the predominant class. Procyanidin content varied from 33 mg/g DM (ripe stage) to 36 mg/g DM (overripe stage) and represent about 97 % of total phenolic. Procyanidins were mainly composed by (-)-epicatechin as extension unit (96 %). Their degree of polymerization were very close between the two maturity stage with slightly decrease at the overripe stage.

Hydroxycinnamic acids were mainly represented by 5'-caffeoylquinic acid, which has been reported as the main hydroxycinnamic acids in pears (Brahem *et al.*, 2017b; Ferreira *et al.*, 2002; Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a). Very low



concentrations were detected in ‘De Cloche’ flesh (1 mg/g DM) and remained stable at the overripe stage.

**Table 13 :** Composition of pear flesh and purified acetic fraction (mg/g DM) from ripe and overripe ‘De Cloche’ perry pears

	Maturity stage	Yields	Flavan-3-ol monomers		Flavan-3-ol polymers		Purified PCA Constitutive units (%)			Flavonols	CQA	Total
			CAT <sub>t</sub>	EC <sub>t</sub>	PCA	DP <sub>n</sub>	CAT <sub>t</sub>	EC <sub>t</sub>	EC <sub>ext</sub>			
<b>Flesh</b>	Ripe	-	-	0.3	33	28	0.6	3.0	96.4	0	1	34
	Overripe	-	-	0.2	36	26	0.8	3.2	96.1	0	1	37
	<i>Pooled SD</i>	-	-	0.02	1	1.77	0.00	0.29	0.29	0.00	0.03	1
<b>Acetonic fraction</b>	Ripe	7.7	-	-	717	26	0.6	3.3	96.1	-	3	720
	Overripe	5.2	-	-	704	26	0.6	3.3	96.1	-	3	707
	<i>Pooled SD</i>	1.93	-	-	53	0.72	0.01	0.09	0.05	-	0.31	53

CAT<sub>t</sub>: terminal (+)-catechin units, EC<sub>t</sub>: terminal (-)-epicatechin units, EC<sub>ext</sub>: extension (-) epicatechin units, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, DM: dry matter, DP<sub>n</sub>: average degree of polymerization of procyanidins, PCA: procyanidins, Pooled SD: pooled standard deviation, -: not detected.

## 5. Procyanidin characterization and evolution at the overripe stage

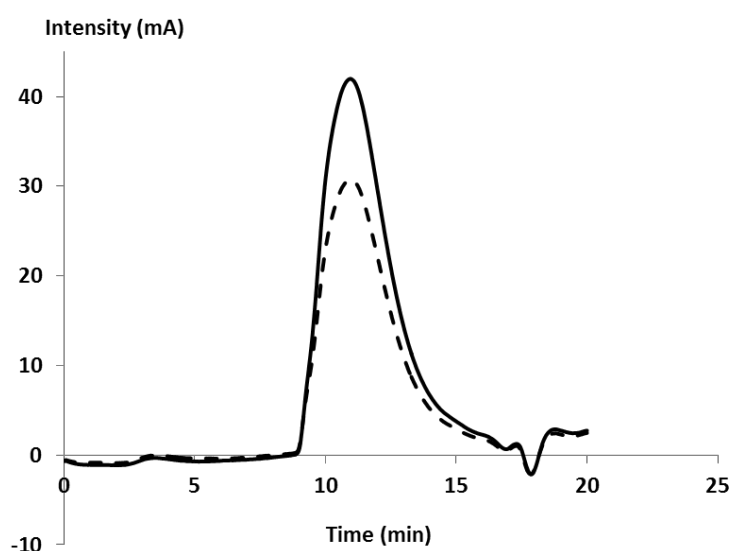
The composition and characterization of purified acetic fraction are described in Table 13. The acidolysis yields for purified acetic fraction were about 7.7 mg /g DM at the ripe stage and 5.2 mg/g DM at the overripe stage. Those results were close to those reported in cider apple (‘Avrolles’ and ‘Kermerrien’). Acetonic extracts contained more than 700 mg/g of polyphenols mainly constituted by procyanidins (99 %) plus traces of 5'-caffeoylquinic acid as reported in ‘Fausset’ acetonic fraction (Le Bourvellec *et al.*, 2006). ‘De Cloche’ procyanidins were characterized by a DP<sub>n</sub>=26 and were constituted by 96 % (-)-epicatechin as extension units which was consistent with previous work (Le Bourvellec *et al.*, 2006). Procyanidin composition did not change between the two maturity stages and was very close to those obtained in pear flesh.

The purification of procyanidins extracted from the pear flesh resulted in circa 20 folds enrichment in procyanidins, elimination of catechin monomers and relative decrease of

caffeoylquinic acid, from ~ 3 % to < 0.5 % of polyphenols. There was no impact on the number average degree of polymerization.

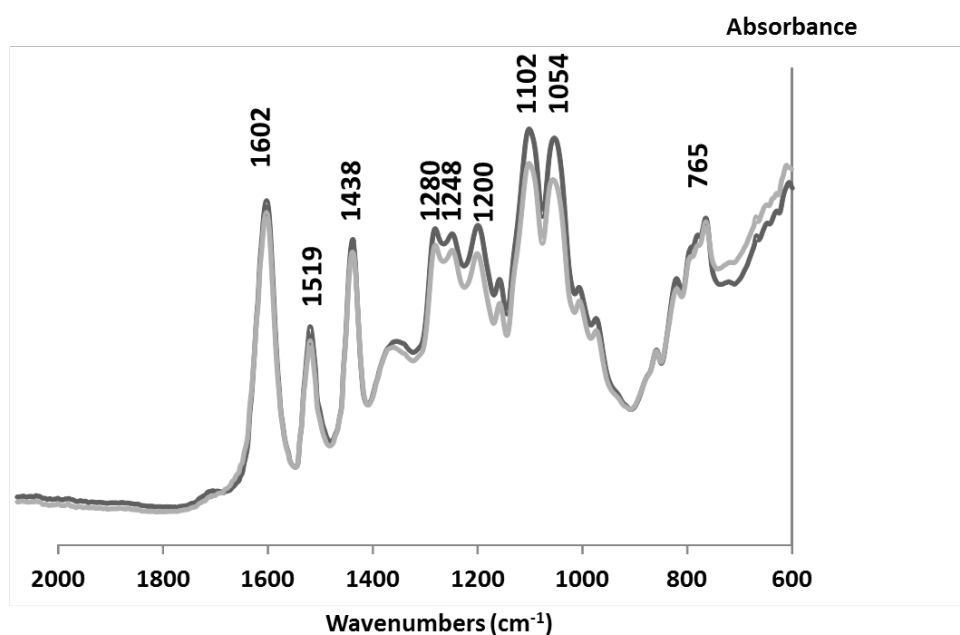
The molecular mass distribution of acetonic fraction was illustrated in Figure 33. Gel permeation chromatograms of purified procyanidins showed a single peak eluting at 11 min. ‘De cloche’ acetonic fraction was close to acetonic fraction of ‘Fausset’ perry pear juice which are constituted by two peaks: one eluting earlier corresponding to procyanidins and a second peak eluting later corresponded to hydroxycinnamic acids (88 mg/g DM) which not detected in our case due to their low concentrations (3 mg/g DM). Those results were in contrast to what Bindon *et al.* (2010b), Bindon and Kennedy (2011), Bindon *et al.* (2012) and Bindon *et al.* (2014) observed for grape skin and seed where proanthocyanidins were constituted by different population of different molecular mass.

The GPC profile of procyanidins from ripe and overripe (after 10 days of storage) did not show any difference and confirmed the HPLC-thioacidolysis data indicating that the mean degree of polymerization remained constant. However, some changes were reported by previous work on procyanidin evolution with ripeness. The average degree of polymerization of apple procyanidins decreased slightly 6 weeks after harvest stage and their size-exclusion chromatograms showed disappearance of highly polymerized fraction (Le Bourvellec *et al.*, 2006).



**Figure 33** : Size distribution of purified procyanidins by Gel Permeation Chromatography (GPC). — : purified procyanidins from ripe ‘De Cloche’ perry pears, - - - : purified procyanidins from overripe ‘De Cloche’ perry pears

Using the 1800-700  $\text{cm}^{-1}$  region (Passos *et al.*, 2010), ripe and overripe purified procyanidin spectra were similar and did not show visually difference according to maturity stage. Perry pear procyanidins spectra were close to those obtained for different proanthocyanidins fractions (Fernández & Agosin, 2007; Foo, 1981; Jensen *et al.*, 2008). Purified procyanidins were characterized by absorption at 1602, 1520, 1438, 1280, 1248, 1200, 1102, 1054 and 765  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 34) which were found both in ripe and overripe phenolic fractions with slightly different relative intensity. Bands at 1600 and 1519  $\text{cm}^{-1}$  could be assigned to C=C bonds vibrations, which are typical for aromatic systems (Edelmann *et al.*, 2001; Foo, 1981). Foo (1981) showed that absorbance at 1520  $\text{cm}^{-1}$  could be characteristic for procyanidin monomers (catechins). A strong contribution of OH deformation vibrations could be found in the region 1410-1260  $\text{cm}^{-1}$ . 770-780  $\text{cm}^{-1}$  bands corresponded to the  $\beta$ -ring hydroxylation pattern of procyanidins (Edelmann *et al.*, 2001; Foo, 1981).



**Figure 34 :** Mid-infrared spectra of purified procyanidins extracted from ripe and overripe pear flesh. — : purified procyanidins from ripe ‘De Cloche’ perry pears, - - : purified procyanidins from overripe ‘De Cloche’ perry pears.



## *Chapitre 2*

### **Préparation & caractérisation des parois de poires**



## Chapitre 2 : Préparation & caractérisation des parois de poires

### Introduction à l'étude

Les premiers travaux réalisés sur la composition phénolique de poires à poiré ont montré que l'état de maturation du fruit impacte l'extraction des procyanidines dans le jus alors que la composition phénolique dans des fruits mûrs et des fruits surmatures ne change pas (Guyot *et al.*, 2002b). L'extraction des polyphénols et en particulier les procyanidines était en grande partie modulée par la formation de manière spontanée lors de la décompartmentation tissulaire (mastication, broyage, traitement thermique...) des adduits non covalentes avec la paroi végétale (Renard *et al.*, 2001). Des modifications de la paroi végétale pourraient être à l'origine de ces différences, d'où la nécessité de caractériser ces parois et de déterminer leurs affinités pour les procyanidines.

Etant donnée l'hétérogénéité tissulaire de la poire, due à la présence des cellules parenchymateuses et des cellules pierreuses (Choi *et al.*, 2007; Choi & Lee, 2013; Yan *et al.*, 2014), différentes parois ont été extraites et analysées en termes d'ultrastructures et composition chimique pour connaître finement les parois de la poire non seulement pour les deux états de maturation (fruits mûrs et fruits surmatures) mais aussi pour les différents types de tissus. Ces parois ont été utilisées par la suite pour étudier les interactions parois-procyanidines (Chapitre 3).

Les parois du parenchyme, des cellules parenchymateuses, des cellules pierreuses et de l'épiderme pour les deux états de maturité ont été extraites et caractérisées. Des extractions séquentielles ont été effectuées pour décrire l'effet de la surmaturation à l'échelle de chaque polyside pariétal (pectine, hémicellulose, cellulose).

Ce chapitre a fait l'objet d'un article publié dans *Carbohydrate Polymers* (2017), 156, 152-164.

🍏 **Titre :** *Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit*

🍏 **Auteurs :** *Marwa Brahem, Catherine M.G.C Renard, Barbara Gouble, Sylvie Bureau, Carine & Le Bourvellec*

## 1. Introduction

Cell walls are important features of plant cells and are implicated in evolution of fruit firmness and texture during ripening. Cell walls have among others a major impact on fruit juice composition by their interactions with condensed tannins also known as proanthocyanidins (Le Bourvellec *et al.*, 2007). Pear juice but not pear fruit phenolic composition depends on fruit maturity at pressing. Previous studies showed that pear juice with very high procyanidin concentrations is obtained from ripe fruit whereas juice obtained from overripe fruit is almost devoid of procyanidins although they are strongly present in the fruit (Guyot *et al.*, 2002b). The availability of procyanidins in the juice was limited by the formation of non-covalent adducts with cell walls (Guyot *et al.*, 2003; Le Bourvellec *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2015), hence modifications of pear cell wall affinity for procyanidins might also explain this difference between ripe and overripe stage.

In most species of the Rosaceae family fruit flesh is very homogeneous and is predominantly composed of parenchyma cells. However, in pears, *Pyrus communis* L., the cortical tissue contains also stone cells. The later, also known as sclereids, give a gritty texture when pears are eaten or processed into juice, puree and jam. Stone cells are a type of sclerenchyma cell formed by the secondary thickening of cell walls, followed by the deposition of lignin on the primary walls of parenchyma cells. Occurrence of stone cells has also been reported in other fruits such as guava (Marcelin *et al.*, 1993b). The formation of stone cells is influenced by several factors such as cultural practices, post-harvest handling but the most important factor is the genetic variability (Cai *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014), from almost imperceptible in some cultivars to very gritty texture in perry pears. Their formation includes lignification, which usually occurs during plant growth, when cell growth is completed or cells undergo secondary growth. It plays crucial role in plant defense against biotic and abiotic stress (Vance *et al.*, 1980). Sclereids contain abundant cellulose (Cai *et al.*, 2010) and a high level of glucose and xylose (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b). Data which already exists on pear cell walls take into account only the whole flesh without separation between stone cells and parenchyma cells (Ahmed & Labavitch, 1980; Almeida *et al.*, 2009; Hiwasa *et al.*, 2004; Jermyn & Isherwood, 1956; Murayama *et al.*, 2006; Raffo *et al.*, 2011; Renard, 2005b; Yamaki *et al.*, 1979).

In general, cell wall modifications during fruit ripening involve hydrolysis of neutral sugars from pectin side chains, depolymerization and increased solubilization of pectins and

hemicelluloses (Brummell, 2006). Minor changes can occur in cellulosic material (Houben *et al.*, 2011). During ripening of pears, the most commonly reported modifications taking into account only the whole flesh indicate a loss of arabinose (Ahmed & Labavitch, 1980; Jermyn & Isherwood, 1956), or arabinose and uronic acid (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Yamaki *et al.*, 1979). Hiwasa *et al.* (2004) suggested that cell wall degradation is correlated with a decrease in firmness during ripening and the modification of both pectins and hemicelluloses are essential for the development of melting texture in different species of pears. Although in lignified cell wall of stone cells the ultrastructure does not change during fruit maturation, in overripe fruit the parenchyma cell walls became extremely thin and fragile (Ben-Arie *et al.*, 1979). Therefore, our hypothesis is that pear cell walls from parenchyma and sclereids have different compositions and evolve differently from ripe to overripe stage. These differences further may influence the affinity of cell wall for procyanidin and their extraction to juice. This cell wall-procyanidin interaction is background information and not tested here. However, little data was available on pear cell wall composition taking into account sclereid cells and parenchyma cells separately.

The aim of this study was to characterize the composition and ultrastructure of pear cell walls differentiating skin and flesh tissue, and in the flesh differentiating parenchyma and stone cells. We report also the changes that occur in the various types of cell walls (whole flesh, parenchyma cells, stone cells and skin) to better understand the evolution of each tissue for ripe and overripe pears. This work provides the baseline data for further studies examining the impact of cell walls-procyanidins interactions in pears.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Standards and Chemicals**

Phenol, methanol and ammonium oxalate were from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium carbonate, sodium hydroxide, sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>), sodium acetate, N-methylimidazole, acetic anhydride, formic acid, lignin alkali, glucose, galacturonic acid, toluene- $\alpha$ -thiol, methanol-d<sub>3</sub>, (+)-catechin and (-)-epicatechin and inositol were from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). Sugars (arabinose, fucose, galactose, xylose, mannose and rhamnose) were from Fluka (Buchs, Switzerland). Dextrans were from Pharmacia BioProcess Technology (Uppsala, Sweden). Acetonitrile of HPLC grade was obtained from VWR International (Radnor, USA). Ethanol and acetone were from Fisher Scientific (Strasbourg, France).



## **2.2. Plant material**

*Pyrus communis* L. cv 'De Cloche', a special cultivar used to make perry, was used. Perry manufacturers produce pear juice from fruits in advanced stage of maturity to decrease the astringency and to increase colloidal stability during storage of perry. Two maturity stages were chosen from this empirical assessment, "Ripe" corresponding to pears at harvest, i.e. December 03, 2013 in the orchard of Mr. Aubry (Clécy, France), and "Overripe" (described as "soft under the fingers") corresponding to fruits stored for 5 days at 10°C and then for 3 days at room temperature. Ripe and overripe pears were peeled and cored manually. Formic acid solution (10 mL/L) was sprayed on the fresh material during these later operations to avoid phenolic oxidation. Skin and flesh were separately frozen (-20°C) until used.

## **2.3. Firmness**

Firmness was measured at harvest for ripe pears and after 8 days of storage corresponding to the 5 days at 10 °C and 3 days at room temperature for overripe pears using a multi purpose texturometer (Texture analyser TApplus: Ametek, Lloyd Instruments Ltd., Fareham, UK). Fruit without skin was placed on a stationary steel plate and penetrated to depth of 3 mm with a 2 mm diameter probe at a speed of 100 mm / min. A batch of five fruits was constituted for each maturity stage. Four determinations were conducted in the four sides for each fruit. The work to limit, defined as the energy of penetration into flesh up to 3 mm depth, was registered during the test and results were expressed in Joules (J) (Choi *et al.*, 2007; Sirisomboon *et al.*, 2000).

## **2.4. Cell wall isolation and extraction**

Cell Wall Materials (CWM) were prepared by the phenol buffer method according to a method adapted from Renard (2005b) for each maturity and from fruit differentiating skin and flesh tissue, and in the whole flesh differentiating parenchyma and stone cells.

### **2.4.1. Phenol buffer method**

Frozen pear flesh and skin (2 kg and 1 kg, respectively) were suspended in chilled buffer (2 L, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 6.7 mM KCl, 60 mg/L ascorbic acid and 4 g/L malic acid, sodium disulfite 1 g/L, adjusted to pH 3.5 with 5 M NaOH; this solution will be called "buffer" in the following paragraphs) with Triton ×100 (0.1 g /L) and mixed in a

Kitchen blender until an homogenous mixture was obtained. The detergent was then washed off with chilled buffer until the washings were sugar-free (absence of sugars tested by the phenol-sulphuric method of Dubois *et al.*,(1956). Cell walls were then suspended for 15 min in acetone: water (60:40, v:v) to eliminate polyphenols and transferred to a G3 sintered glass filter. Excess solvent was removed by aspiration under vacuum, the remaining paste was suspended in four times its weight of phenol for 1 h at room temperature. The saturated phenol solution was removed by extensive washing with buffer on G3 sintered glass filter (until the phenol smell disappeared). The sample was finally solvent-exchanged in 50 % acetone (three times), 75 % acetone (three times) and 100 % acetone (three times) then overnight in an oven at 40°C and ground. We obtained at this step CWM from the whole flesh (this sample was named FL) and CWM from skin (this sample was named SK).

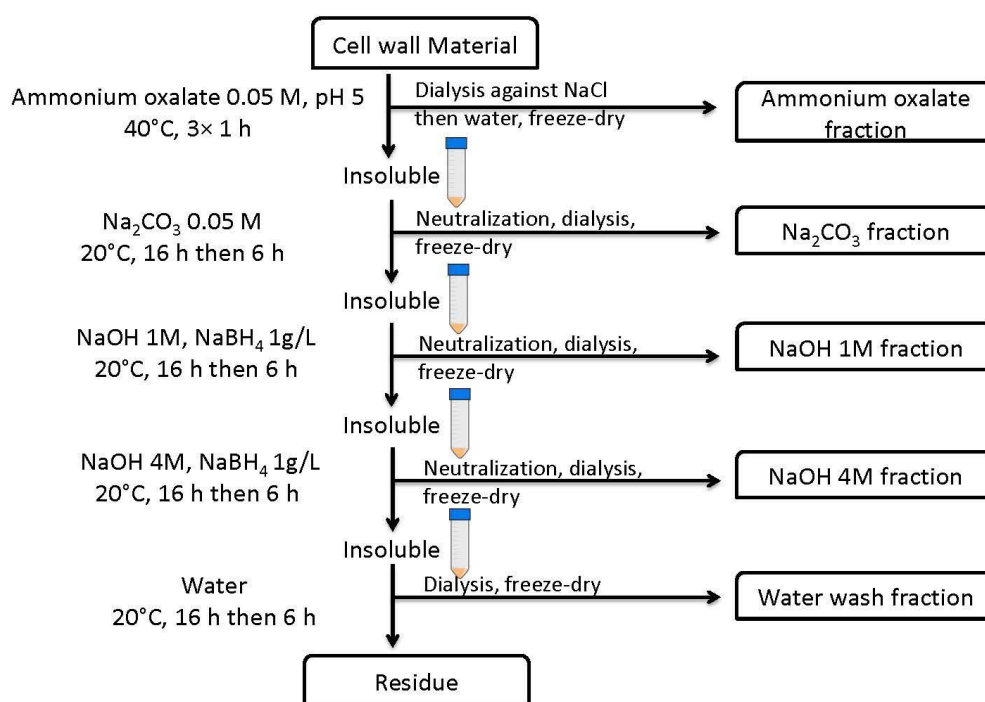
To extract cell walls from stone cells and parenchyma cells separately, 2 kg of frozen pear flesh was used. The separation of stone cells from parenchymatous tissues was based on their higher density. After washing with acetone: water, the pulp was stored overnight at 4°C in the same acetone: water solution. Stone cells sedimented and formed a distinctive yellow layer at the bottom of the container. The upper layer representing the parenchyma cells was carefully discarded and kept separately. Parenchyma cells (still containing some stone cells) were then centrifuged (20 min, 5000 g) and collected carefully to further separate stone cells. The other extraction steps were applied to the two cell types as explained above and we obtained CWM from parenchyma cells (this sample was named PC) and CWM from stone cells (this sample was named ST).

#### **2.4.2. Sequential polysaccharide extractions**

The cell wall polysaccharides present in different CWM were extracted sequentially by ammonium oxalate, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH 1M, NaOH 4M and water according to a scheme by Renard and Ginies (2009). The fractionation procedure (Figure 35) was done in triplicate.

For each sample, 1.5 g of CWM and 45 mL of ammonium oxalate (0.05 M, pH 5) were incubated 1 h at 40 °C under slow planetary agitation. The solid/liquid separation was carried by centrifugation (10 min at 13600 g for all consecutive extractions). This was repeated twice, and the three supernatants were pooled and dialyzed against 0.1 M NaCl, then against water, and freeze-dried (this fraction was named ammonium fraction). The residue was extracted for 16 h with 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, then for the second time for 6 h; the supernatants were pooled and neutralized with acetic acid to pH 4-5, dialyzed against water and freeze-

dried (this fraction was named Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fraction). The residue was extracted with 1 M NaOH + 1 g/L NaBH<sub>4</sub> solution for 16 h, and then for a second time for 6 h; the supernatants were pooled and neutralized with acetic acid to pH 4-5. Foam formation during neutralization due to hydrogen release was decreased by the addition of ethanol drops. The extract was dialyzed against water and freeze-dried (this fraction was named NaOH 1M fraction). The residue was extracted with 4 M NaOH + 1 g/L NaBH<sub>4</sub> solution for 16 h. This step was repeated with an incubation time of 6h. Supernatants were pooled, neutralized with acetic acid to pH 4-5. Appearing foam was lessened by addition of a few drops of ethanol. The extract was dialyzed against water and freeze-dried (this fraction was named NaOH 4M fraction). The residue was extracted with water until the washing water was no longer alkaline. The washing waters were pooled, dialyzed and freeze-dried (this fraction was named water wash). The final solid residue was also freeze-dried (this fraction was named residue).



**Figure 35 :** Scheme of the sequential polysaccharide extractions from pear flesh, parenchyma cells, stone cells and skin at two maturity stages (ripe and overripe)

## **2.5. Mid infrared spectroscopy (MIR)**

FL, SK, PC and ST were analyzed by ATR-Diamond spectrum acquisition. MIR spectra were collected at room temperature with a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker Optics, Wissembourg, France) equipped with a single-reflectance horizontal ATR cell (Golden Gate equipped with diamond crystal, Bruker Optics). CWM were placed on the ATR as powder and were pressed with a system press tip flap. The samples were scanned at wavenumbers ranging from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  and corrected against the background spectrum of air. Each spectrum was obtained by taking the average of 16 scans. Three spectra were acquired for each sample to evaluate their heterogeneity. The absorption ranged between 2400 and 2200  $\text{cm}^{-1}$ , due to carbon dioxide, was discarded prior the calculation. The data treatment applied here on spectral data is described by Bertrand *et al.*, (1990). Principal Component Analysis (PCA) was first applied on the raw spectral data, using 20 components, sufficient to include the total variance. Factorial discriminant analysis (FDA) was then applied using the principal components of the PCA. The analysis of discriminant patterns allows the identification of the spectral area involved in the sample discrimination according to the cell wall or the maturity. Spectral pre-processing and data treatment using multivariate analyses were performed with Matlab 7.5 (Mathworks Inc. Natick, MA) software using SAISIR package (Cordella & Bertrand, 2014). The MIR data were transformed with standard normal variate (SNV) to correct multiplicative interferences and variations in baseline shift before any multivariate analysis.

## **2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Dried and homogenized PC and ST for each maturity were mounted on specimen stubs with double-sided, carbon-conductive, adhesive tape and covered with 20 nm gold layers by ion sputtering (Balzers SCD 004 Sputter Coater, Balzers, Bal Tec. AG, Furstentum, Lichtenstein). Samples were examined by a Philips XL30 (FEI/Philips, Eindhoven, The Netherlands) scanning electron microscope operated at an accelerating voltage of 10 kV.

## **2.7. Analytical**

All analyses were carried out in triplicates.

### **2.7.1. Neutral sugar composition**

Neutral sugars were analyzed as alditol acetates after acid hydrolysis with 2 options. For samples including cellulose, about 10 mg were submitted to prehydrolysis with 250  $\mu$ L 72% sulphuric acid for 1 h at room temperature (Saeman *et al.*, 1954), then diluted to 1 M sulphuric acid by addition of water and internal standard (inositol). For extracted polysaccharides, no prehydrolysis was carried out, samples were dissolved in 1 M sulphuric acid with internal standard. All samples were hydrolyzed at 100°C for 3 h, then derivatised to volatile alditol acetates (Englyst *et al.*, 1982). They were injected into a GC-FID HP 5890 Series II (Agilent, Inc., Palo Alto, USA) with a capillary column of 30 m  $\times$  0.25 mm id coated with DB225 MS, 0.25  $\mu$ m film thickness (J&W Scientific, Agilent, Inc., Palo Alto, USA). The conditions were as follows: temperature of injection 250°C in split mode (1:25 ratio); hydrogen as carrier gas at 45 cm/s (215°C), column flow 1.3 mL/min, oven temperature 215°C (isothermal).

### **2.7.2. Uronic acids content**

Uronic acids were measured spectrophotometrically (V-530 Jasco, Tokyo, Japan) by the *m*-hydroxydiphenyl assay as described by Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973) with galacturonic acid as external standard. Samples were prepared after acid hydrolysis for CWM and residue according to Saeman procedure (Saeman *et al.*, 1954) and after saponification for ammonium extracts. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH 1M, NaOH 4M and water wash extracts, already deesterified, were simply dissolved in water.

### **2.7.3. Methanol and degree of methylation**

Methanol was determined in CWM and ammonium fractions by stable isotope dilution Headspace-GC-MS (QP2010 Shimadzu Kyoto, Japan) after saponification as described in Renard and Ginies (2009).

### **2.7.4. Lignin content**

Lignin was analysed in CWM and final residues as described by Syros *et al.* (2004) with some modifications. Samples (10-15 mg) were digested in 1 mL 25 % acetyl bromide in acetic acid containing 2.7 % (v/v) perchloric acid. Then, the mixture was incubated for 30 min at 70°C. 10  $\mu$ L for each sample were added to 570  $\mu$ L of a solution of [17.24 % (v/v) 2N

NaOH and 82.76% (v/v) acetic acid] and 20  $\mu$ l of 7.5 M hydroxylamine hydrochloride to stop the reaction. The volume was corrected to 2 mL with acetic acid and the absorbance was read at 280 nm using a spectrophotometer V-530 (Jasco, Tokyo, Japan). The lignin content was calculated from calibration curve with lignin alkali.

### **2.7.5. Procyanidins content**

Some procyanidins remain bound to the cell walls after the phenol buffer preparation. They were measured by HPLC-DAD (CBM 20A, Shimadzu Kyoto, Japan) after thioacidolysis as described by Guyot *et al.* (1998) and Le Bourvellec *et al.* (2011). Calibration was achieved by injection of (+)-catechin and (-)-epicatechin solutions of known concentrations. The average degree of polymerisation (DP<sub>n</sub>) of procyanidins was calculated as the molar ratio of all the flavan-3-ol units (thio ether adducts plus terminal units) to (-)-epicatechin and (+)-catechin corresponding to terminal units.

### **2.7.6. Acetic acid content**

Acetic acid was released by incubating CWM with NaOH 0.25 M for 3 hours. Acetyl groups were quantitated using an acetic acid assay kit based on the use of acetyl-coenzyme A synthetase (Acetic acid, Acetyl-CoA Synthetase Format, Megazyme international, Ireland). Absorbance was determined at 340 nm and the acetic acid content was calculated from a linear calibration.

### **2.7.7. Size exclusion of pectin fractions**

The hydrodynamic volume distribution of ammonium and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> soluble pectin for each CWM was studied by HPSEC system (Jasco, Tokyo, Japan). Separation were achieved using two columns in series, an OH-pack SB-802 HQ (300 mm x 0.8 mm ID) (Showa Denko Europe, Munich, Germany) and a TSK-Gel PWXL (300 x 7.8 mm ID) (Tosohaas, Stuttgart, Germany) at 35°C in combination with a guard column (40x6.0 mm i.d.) TSK-Gel PWXL (Tosohaas). The columns were eluted by sodium acetate/ acetic acid buffer 0.4 M pH 3.6 with a flow of 0.8 mL/min. The calibration curve was obtained using dextran standards: T500, T70, T40, T10, glucose.

## 2.8. Statistics

Results are presented as mean values of triplicates. The analytical reproducibility of the results was determined as pooled standard deviations (Pooled SD). This last was calculated for each series of replicates using the sum of individual variances weighted by the individual degrees of freedom (Box *et al.*, 1978). ANOVA and Principal Component Analysis (PCA) were performed on chemical data using the Excel stat package of Microsoft Excel.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Texture evolution during overripening

Due to the heterogeneity of pear flesh with the presence of different cell types, the work to limit was chosen as more illustrative of overall fruit texture than the maximum force which might be due only to a cluster of stone cells in the path of the probe. It was considered as the most representative variable of fruit firmness. The work to limit decreased from the ripe to overripe pears, with respectively  $83 \pm 17 \cdot 10^{-4} \text{J}$  and  $70 \pm 10 \cdot 10^{-4} \text{J}$  after 8 days of storage.

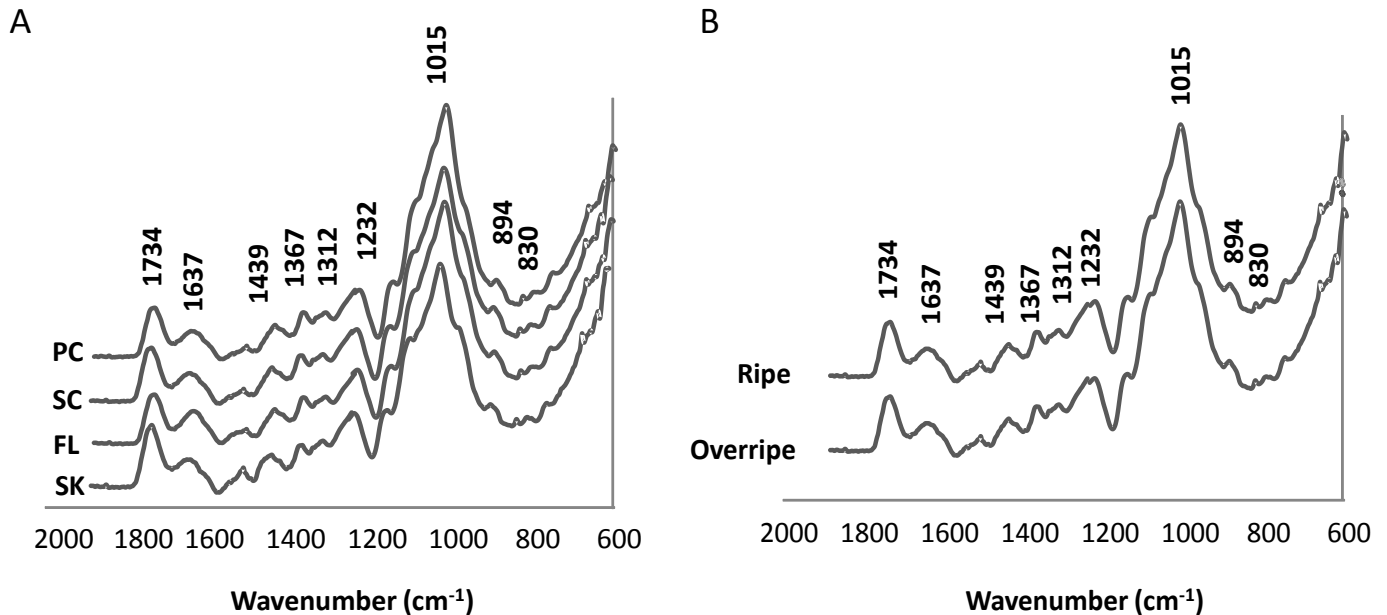
### 3.2. General characteristics of cell walls

The Mid Infrared Spectroscopy (MIR) and Scanning electron microscopy (SEM) were used as non destructive methods to obtain the general characteristics of different pear cell walls, taking into account the tissue type and the maturity stage.

#### 3.2.1. Mid infrared spectroscopy

Infrared spectroscopy is one of the most widely used spectroscopic tools for the study of polymers, which provides information about the sample component structures. The method is simple, non destructive, fast and exhibits high sensitivity. It was used here to highlight potential differences between the pear cell walls from the different tissues at two maturity stages. Infrared spectroscopy analysis is based on the specific absorptions at different wavenumbers in mid infrared regions of various functional groups such as carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) and ester carbonyl ( $\text{C=O}$ ) groups (Kyomugasho *et al.*, 2015). Averaged spectra obtained from all pear tissues were ranged between 1800 and  $700 \text{ cm}^{-1}$ . This region includes the most informative spectral region and presents the characteristic band for the main polysaccharides from cell walls (Coimbra *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001; Kačuráková *et al.*, 2000; Kačuráková & Wilson, 2001). All spectra were very similar, they did not show visually

change according to tissue type and maturity stage (Figure 36). Pear cell wall spectra were close to those obtained on apple cell wall during fruit development by Szymanska-Chargot *et al.*, (2015).

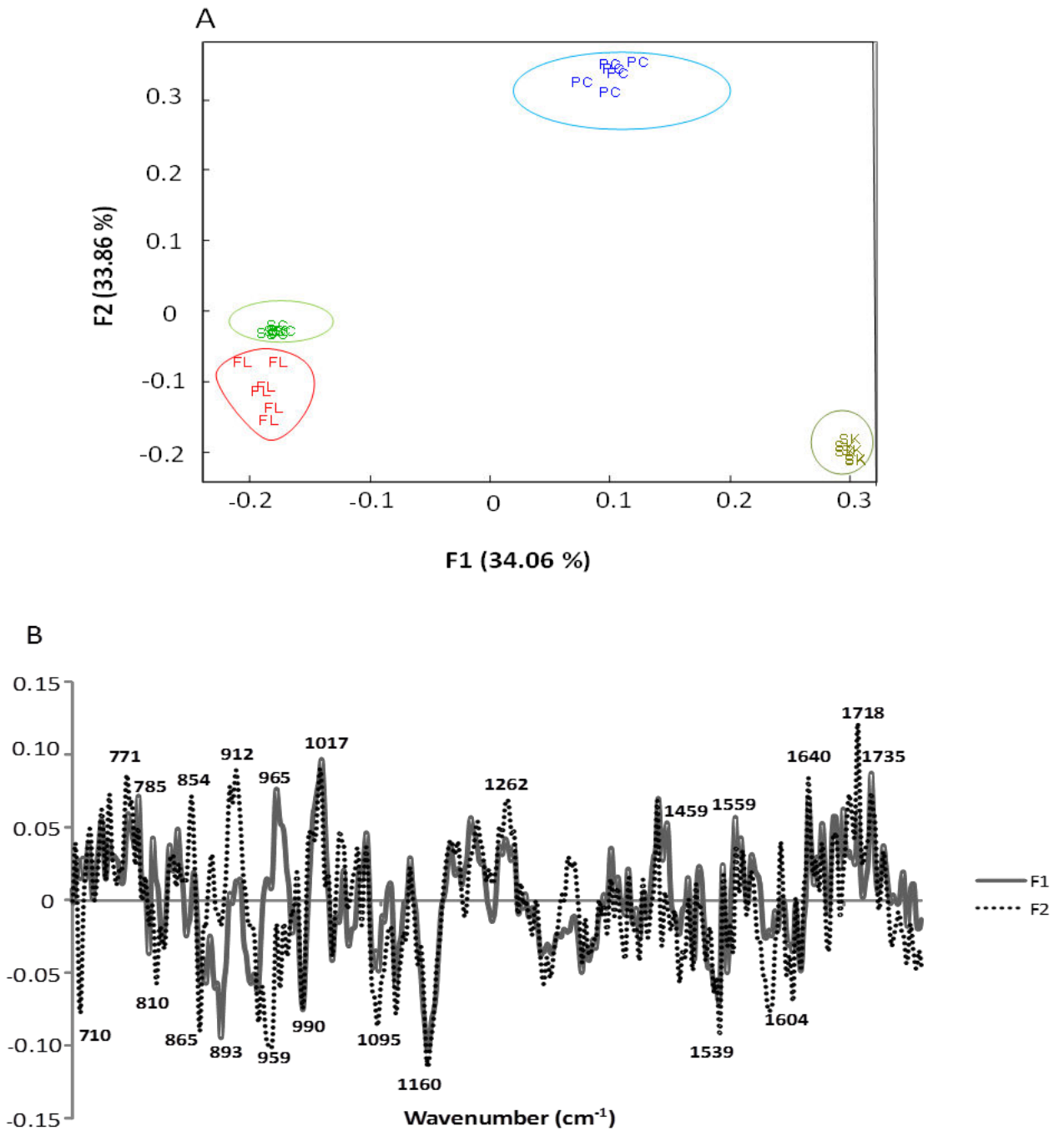


**Figure 36 :** The mid-infrared spectra (2000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) of pear cell walls. (A) The mid-infrared spectra (2000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) of pear cell walls obtained from flesh, parenchyma cells, stone cells and skin regardless the maturity stage. (B) The mid-infrared spectra (2000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) of pears cell walls obtained at two maturity stages, ripe and overripe regardless the tissue type. FL: cell walls from ripe and overripe flesh, PC: cell walls from ripe and overripe parenchyma cells, ST: cell walls from ripe and overripe stone cells, SK: cell walls from ripe and overripe skin, Ripe: cells walls from all ripe tissue, Overripe: cell walls from all overripe tissue.

However, the ANOVA analysis performed showed that the tissue type effect was four times higher than the ripening one (data not shown). As the aim was to highlight differences, it was decided to apply a FDA using the principal components of the PCA. Even if the sample discrimination was obtained from the tenth principal components, the FDA using the 20 principal components allowed the best discrimination. The two first factorial scores from FDA (Figure 37A) together explained about 68 % of the variability (F1 34.06 %, F2 33.86 %). Flesh, skin, parenchyma and stone cells (FL, SK, PC and ST) were pooled in four discrete groups. FL, ST and SK were scattered along the first axis F1, while PC was



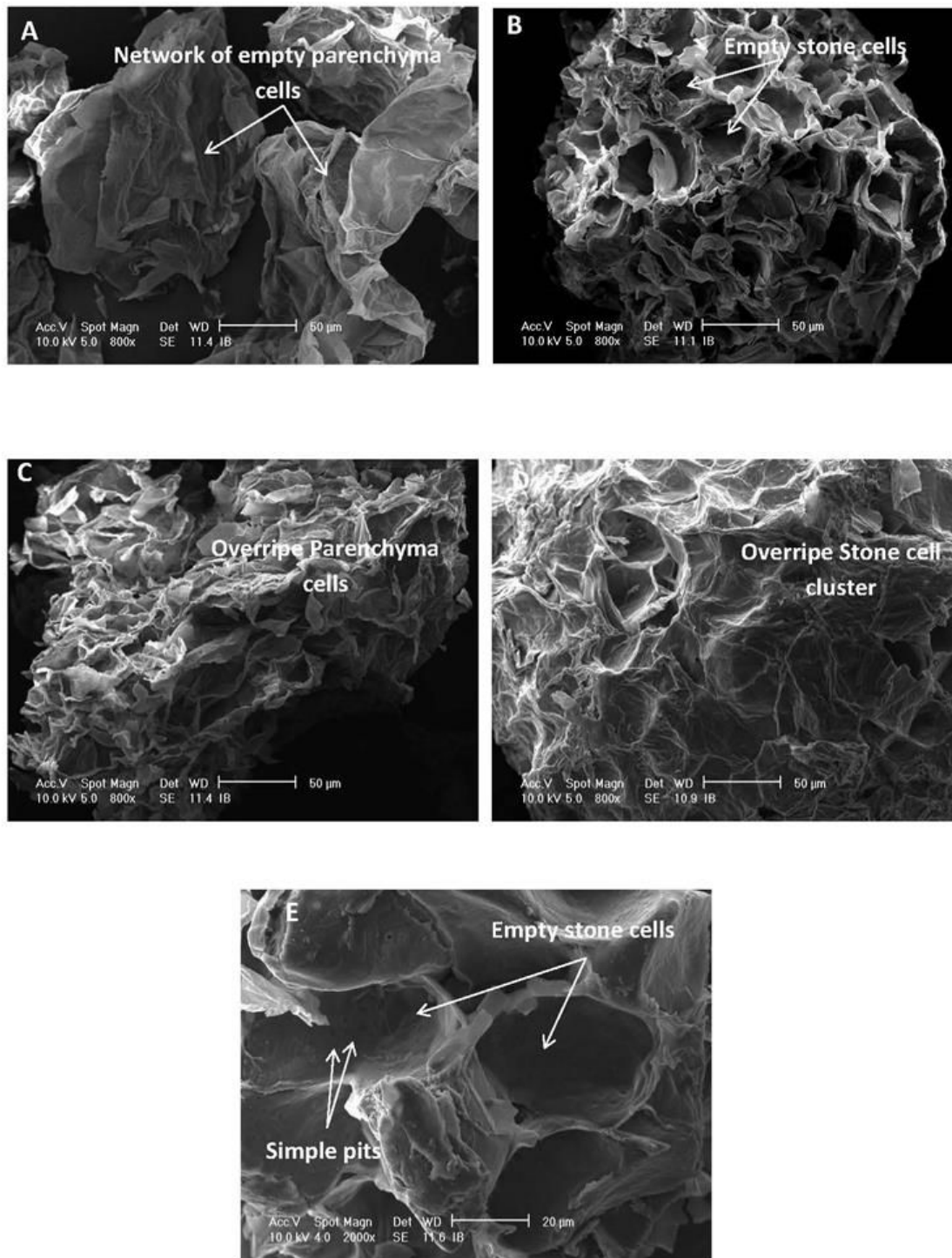
separated from the others along the F2 axis. F3 explain also 32.07% of the variability (data not shown) and discriminated FL and ST. The discriminant patterns were extracted (Figure 37B) in order to identify the most relevant wavelength for this discrimination. This discrimination is expected to be mainly related to the presence of functional groups characteristic of pear cell wall polysaccharides (Ferreira *et al.*, 2001). It could be influenced also by bands characteristic of cutin and waxes especially for skin (Heredia-Guerrero *et al.*, 2016) and lignin for stone cells (Kačuráková & Wilson, 2001). Some absorption bands appeared to be specific in particular of FL and ST such as 710, 810, 865, 893, 959, 1095, 1160, 1539 and 1604  $\text{cm}^{-1}$ . Positive peaks along F1 at 785, 965, 1495, 1559 and 1735  $\text{cm}^{-1}$  were specific of SK whereas, positive peaks along F2 such as 771, 854, 912, 1262, 1640 and 1718  $\text{cm}^{-1}$  were characteristic of PC. Most important wavelengths characteristic for discriminated groups indicated a variable composition depending on tissular origin of cell walls. 1160  $\text{cm}^{-1}$  is characteristic of antisymmetric stretching of C-O-C in cellulose structure and 1604  $\text{cm}^{-1}$  band of  $\text{COO}^-$  antisymmetric stretching polygalacturonic acid and pectin ester groups (Szymanska-Chargot *et al.*, 2015). A contribution coming from pectin and cellulose could be present between 1050 and 1015  $\text{cm}^{-1}$  (Fasoli *et al.*, 2016). 1735  $\text{cm}^{-1}$  is characteristic of C=O stretching in aliphatic polyesters in cuticle structure (Fasoli *et al.*, 2016). The detailed composition of pear cell walls will be given following biochemical analysis.



**Figure 37 :** (A) Factorial discriminant analysis (FDA) based on tissue types using mid infrared spectral data between 1800 and 700  $\text{cm}^{-1}$ . (B) Discriminant patterns of the two first factorial scores. FL: cell walls from the whole flesh, PC: cell walls from parenchyma cells, ST: cell walls from stone cells, SK: cell walls from skin.

### 3.2.2. Scanning electron microscopy (SEM)

Pears are one of the few fruits that have a heterogeneous flesh due to the simultaneous presence of parenchyma and stone cells. The SEM was used to illustrate the different aspects between these two cell types for ripe and overripe pears. Parenchyma cells were large cells with thin cell walls (Figure 38A). ST appeared in SEM as clusters of small cells with thick cell walls (Figure 38B) connected by simple pits (Figure 38E). Micrographs obtained from European and Asian pears (Ferreira *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014) show the same structures of stone cells and parenchyma cells. During ripening, changes involved a loss of cell definition especially for stone cells clusters and less for parenchyma cells (Figures 38C, 38D). SEM micrographs done by Almeida *et al.*, (2009) on fresh tissue from ‘Rocha’ pear flesh at two maturity stages showed cell walls that these authors described as being stiff in crispy pears and becoming flaccid in soft pears.



**Figure 38** : Scanning Electron Microscopy showing the differences between the two cell types in Perry pears. (A) General aspect of cell walls isolated from ripe parenchyma cells (800 $\times$ ) ; (B) General aspect of cell walls isolated from ripe stone cells (800 $\times$ ); (C) Ultrastructure changes in parenchyma cells during overripening (800 $\times$ ); (D) Ultrastructure changes in stone cells during overripening (800 $\times$ ); (E) Higher magnification (2000 $\times$ ) detecting simple pits in stone cells.

### 3.3. Cell walls: Yields and compositions

Table 14 summarizes yields and compositions of the different tissues at both maturity stages (ripe and overripe pears).

**Table 14 :** Yields (mg/g fresh weight) and composition (mg/g CWM) of cell wall isolated from ripe and overripe pears by the phenol buffer method.

Tissue	Maturity	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. A	AUA	MeOH	DM (%)	Lig	PCA	DP <sub>n</sub>
Flesh (FL)	Ripe	15.3	7	3	70	169	6	40	202	51	114	16	78	119	2	39
	Overripe	19.7	7	5	63	155	7	41	195	46	95	15	87	97	3	52
Parenchyma Cells (PC)	Ripe	3.4	11	7	110	101	10	70	247	41	177	25	77	17	1	36
	Overripe	4.7	11	1	85	97	7	58	239	30	166	27	89	66	3	51
Stone Cells (SC)	Ripe	12.9	6	3	44	213	5	27	234	62	101	15	82	156	1	20
	Overripe	15.1	8	2	48	192	4	33	243	46	112	13	65	200	3	50
Skin (SK)	Ripe	117.3	5	2	65	199	5	26	166	40	76	11	75	244	3	7±0.2
	Overripe	96.1	7	2	53	200	5	22	169	52	71	9	72	279	3	9±2.0
	<i>Pooled SD</i>		0.5	0.5	4.1	13.9	1.3	2.2	11.4	4.3	5.0	1.7	7.0	11.1	0.2	6.7*

CWM: cell wall material, FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin, Rha: rhamnose, Fuc: fucose, Ara: arabinose, Xyl: xylose, Man: mannose, Gal: galactose, Glc: glucose, Ac.A: acetic acid, AUA: anhydrous uronic acids, MeOH: methanol, DM: degree of methylation, Lig: lignin, PCA: procyanidins, DP<sub>n</sub>: degree of polymerization of procyanidins, Pooled SD: pooled standard deviation (degree of freedom: 16). \*: Pooled SD of the degree of polymerisation was calculated for flesh, parenchyma cells and stone cells. For ripe and overripe skin, only individual standard deviations were calculated.

### 3.3.1. Cell wall yields

The CWM yields for fruit flesh varied from 15.3 mg/g fresh weight (FW) (ripe) to 19.3 mg/g FW (overripe), and were higher by about 6 times (117.3–96.1 mg/g FW) for skin. The PC yields varied from 3.4 mg/g (ripe) to 4.7 mg/g (overripe) fresh weight of total pear flesh, and were higher by about 3 times (12.9–15.1 mg/g FW) for ST, i.e. approximately  $\frac{3}{4}$  of the cell walls in ‘De Cloche’ pear flesh came from stone cells. In spite of the separation procedure, there was little loss of cell walls during centrifugations and the total yields of FL correspond to the sum of yields of PC and ST. Few data are available on the extraction of the cell walls from stone cells and parenchyma cells separately. Stone cells represented 37 % of guava cell walls in the endocarp and 78 % in the mesocarp (Marcelin *et al.*, 1993b).

The yields of FL from ‘De Cloche’ perry pears were lower than those of cell walls isolated as alcohol-insoluble solids (AIS) from ‘Blanquilla’ pears (30 mg /g FW) (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a), ‘Gieser Wildeman’ pears (23 mg/g FW) (Renard, 2005a), ‘Bartlett’ pears (25 mg/g FW) (Raffo *et al.*, 2011) and ‘William’ pears (28 mg/g FW) (Le Bourvellec *et al.*, 2013). In comparison, yields of cell walls prepared using the phenol: buffer method from cider apple were 27 mg/g FW of apple parenchyma (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). For SK, the yields (117.3–96.1 mg/g FW) were also lower than skin cell wall isolated as alcohol-insoluble solids (AIS) from ‘Blanquilla’ pears (121-142 mg/g FW) (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). The lower yields obtained for FL and SK with the phenol buffer method could be due to a better elimination of protein and polyphenols (Renard, 2005b). The yields slightly increased with maturity except for SK.

### 3.3.2. Cell wall compositions

#### 3.3.2.1. Elimination of intracellular polyphenols

CWM were isolated by a phenol: buffer method to obtain cell walls devoid of protein and with low procyanidin contents (Le Bourvellec *et al.*, 2004a). Procyanidins bind spontaneously to the cell walls during extraction (Renard *et al.*, 2001) but the cell wall preparation method used here specifically limits this phenomenon (Renard, 2005b). The amount of bound procyanidins varied between 1 and 3 mg/g of CWM. However, significant differences were observed between ripe and overripe pears. Both procyanidin contents and their degree of polymerization increased from ripe to overripe essentially for FL, PC and ST (Table 14). For SK, both the amounts of procyanidins and their degree of polymerization were

still stable during maturity and only procyanidins with low DP<sub>n</sub> (7- 9 for ripe and overripe pears respectively) were bound. This also reflects the different polyphenols compositions in skin and flesh. Increasing binding between procyanidins and cell walls might be due to loss of cell integrity in overripe fruit (Bindon *et al.*, 2014). Furthermore, affinity between cell walls and procyanidins could be modified by ripening as described for grape skin cell walls and procyanidins (Bindon & Kennedy, 2011).

### 3.3.2.2. Polysaccharides composition

The main components for different pear cell walls at the two maturity stage were glucose (166-247 mg/g CWM), xylose (97-213 mg/g CWM), uronic acids (71-177 mg/g CWM) and arabinose (44-110 mg/g CWM). ST and FL had similar compositions than PC with slightly less glucose, uronic acids and arabinose, high xylose, as well as higher lignin content. Tao *et al.* (2009) quantified in dried stone cells of two *Pyrus* species ‘Jingaisu’ and ‘Kousui’ 298 and 245 mg/g of lignin respectively. SK was richer in lignin and xylose and had lower amounts of uronic acids. The degree of methylation of pectins was > 50 %, reaching 80 % in FL and PC. Galactose was present at higher concentration in the FL and PC (40-70 mg/g CWM). Mannose, rhamnose and fucose were minor components (1-10 mg/g CWM). This composition was close to those reported in pears (Le Bourvellec *et al.*, 2013; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Renard, 2005a). In general, the composition of pear cell walls shows high amounts of glucose and xylose that can be attributed to the presence of stone cells. Lignified cell walls from pears are rich in xylans and cellulose (Ben-Arie *et al.*, 1979; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). During overripening, uronic acids and arabinose tended to decrease, essentially for FL and PC. Ahmed and Labavitch (1980) showed extensive loss of arabinose from cell wall polysaccharides from ‘Bartlett’ pears during ripening.

High levels of acetyl groups were found in pear cell walls especially for ST (>60 mg/g CWM). These high amounts could be explained by the richness of pear cell walls in xylose and lignin. *O*-acetyl-substituents can be present on almost cell wall polymers, and in particular, hemicelluloses (xyloglucan, xylan and glucomannan) and pectins are often acetylated (Gille & Pauly, 2012; Pawar *et al.*, 2016). Lignin can also be *O*- acetylated (Del Río *et al.*, 2008).

### **3.4. Sequential extractions: yields and characterizations**

The polysaccharide compositions of the CWM of ripe and overripe ‘De Cloche’ pears were investigated using a fractional extraction scheme (Figure 35). Carbohydrate compositions of all extracts from ripe and overripe pears are given in Table 15, typical sugar ratios in Table 16 and Figure 39 shows the corresponding PCA analysis.



**Table 15 :** Yields (mg/g CWM), carbohydrates and lignin composition (mg/g of polysaccharide fraction) and statistical results (Pooled SD, two way ANOVA) of sequential extracts of flesh, parenchyma cells, stone cells and skin from ripe and overripe pears.

Cell walls	Maturity	Fractions	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Lig	Gal	Glc	AUA	MeOH	DM(%)	Lig
FL	Ripe	Ammonium 0.05 M	36	4	1	339	13	0	50	4	146	23	87	nd
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.05 M	87	12	1	115	14	0	43	0	543	nd	nd	nd
		NaOH 1M	17	9	18	91	140	7	85	141	20	nd	nd	nd
		NaOH 4M	149	4	7	43	49	7	39	60	14	nd	nd	nd
		Water wash	61	3	1	33	25	1	17	12	29	nd	nd	nd
		Residue	622	3	0	35	183	0	13	238	24	nd	nd	155
	Overripe	Ammonium 0.05 M	23	8	5	115	26	1	44	31	301	49	90	nd
		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.05 M	65	11	1	72	14	0	30	0	532	nd	nd	nd
		NaOH 1M	30	8	19	48	118	5	71	139	67	nd	nd	nd
		NaOH 4M	50	16	20	91	141	24	103	179	33	nd	nd	nd
		Water wash	28	21	3	148	101	0	79	19	255	nd	nd	nd
		Residue	698	4	0	20	190	0	11	222	32	nd	nd	189
Ripe	Ammonium 0.05 M	29	6	4	324	20	1	71	26	343	54	86	nd	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.05 M	87	10	1	63	11	0	25	3	621	nd	nd	nd	
	NaOH 1M	14	8	27	69	135	8	104	204	20	nd	nd	nd	
	NaOH 4M	75	13	27	81	153	26	118	235	59	nd	nd	nd	
	Water wash	61	20	3	175	54	0	100	19	350	nd	nd	nd	

Cell walls	Maturity	Fractions	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Lig	Gal	Glc	AUA	MeOH	DM(%)	Lig
		<b>Residue</b>	513	9	1	74	148	1	43	278	62	nd	nd	208
<b>PC</b>	<b>Overripe</b>	<b>Ammonium 0.05 M</b>	20	13	8	225	43	2	81	62	432	66	84	nd
		<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	82	14	1	78	18	0	34	3	629	nd	nd	nd
		<b>NaOH 1M</b>	51	23	9	187	88	0	110	57	275	nd	nd	nd
		<b>NaOH 4M</b>	92	10	25	59	148	28	95	210	38	nd	nd	nd
		<b>Water wash</b>	30	10	32	58	154	10	112	246	43	nd	nd	nd
		<b>Residue</b>	557	11	2	80	156	0	44	342	74	nd	nd	207
	<b>Ripe</b>	<b>Ammonium 0.05 M</b>	22	8	4	278	21	4	67	26	287	40	76	nd
		<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	66	15	2	156	22	1	65	2	527	nd	nd	nd
		<b>NaOH 1M</b>	20	13	24	96	307	9	108	184	60	nd	nd	nd
		<b>NaOH 4M</b>	60	9	16	64	111	19	74	134	16	nd	nd	nd
		<b>Water wash</b>	41	29	3	292	146	0	137	13	208	nd	nd	nd
		<b>Residue</b>	631	5	0	21	321	0	12	340	13	nd	nd	384
<b>SC</b>	<b>Overripe</b>	<b>Ammonium 0.05 M</b>	10	6	4	109	20	2	37	27	244	36	81	nd
		<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	69	10	1	80	13	0	35	0	644	nd	nd	nd
		<b>NaOH 1M</b>	26	6	17	43	128	5	65	132	65	nd	nd	nd
		<b>NaOH 4M</b>	33	12	18	64	122	20	86	157	57	nd	nd	nd

Cell walls	Maturity	Fractions	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Lig	Gal	Glc	AUA	MeOH	DM(%)	Lig
		<b>Water wash</b>	58	9	2	73	45	0	38	11	141	nd	nd	nd
		<b>Residue</b>	640	4	0	21	173	0	14	212	23	nd	nd	402
	<b>Ripe</b>	<b>Ammonium 0.05 M</b>	36	4	1	366	10	0	37	6	159	29	100	nd
		<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	55	13	2	217	8	2	46	1	523	nd	nd	nd
		<b>NaOH 1M</b>	19	12	15	84	161	25	88	154	28	nd	nd	nd
		<b>NaOH 4M</b>	26	21	25	171	167	63	155	256	16	nd	nd	nd
		<b>Water wash</b>	12	18	5	177	143	9	83	44	65	nd	nd	nd
		<b>Residue</b>	716	4	0	31	177	1	13	178	48	nd	nd	331
<b>SK</b>	<b>Overripe</b>	<b>Ammonium 0.05 M</b>	21	4	1	173	7	3	24	13	268	39	80	nd
		<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	51	8	1	107	5	1	23	1	536	nd	nd	nd
		<b>NaOH 1M</b>	20	7	9	39	103	12	44	84	26	nd	nd	nd
		<b>NaOH 4M</b>	23	12	13	77	84	33	69	122	24	nd	nd	nd
		<b>Water wash</b>	30	15	1	159	49	0	44	6	163	nd	nd	nd
		<b>Residue</b>	647	3	0	15	163	1	7	157	24	nd	nd	334
		<b><i>Pooled SD</i></b>	<i>10.0</i>	<i>0.7</i>	<i>0.5</i>	<i>7.4</i>	<i>6.0</i>	<i>0.9</i>	<i>3.2</i>	<i>6.9</i>	<i>13.3</i>	<i>0.7</i>	<i>1</i>	<i>10.9</i>
	<b><i>ANOVA</i></b>	<b><i>Extract</i></b>	<i>4433</i> ***	<i>234</i> ***	<i>2065***</i>	<i>718</i> ***	<i>1108</i> ***	<i>1163</i> ***	<i>627</i> ***	<i>1553</i> ***	<i>1949</i> ***	<i>4872</i> ***	<i>5784</i> ***	<i>877</i> ***
		<b><i>Tissue</i></b>	<i>12</i> ****	<i>56</i> ***	<i>319</i> ***	<i>62</i> ***	<i>79</i> ***	<i>231</i> ***	<i>192</i> ***	<i>166</i> ***	<i>109</i> ***	<i>100</i> ***	<i>4</i> **	<i>32</i> ***

Cell walls	Maturity	Fractions	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Lig	Gal	Glc	AUA	MeOH	DM(%)	Lig
		<i>Maturity</i>	5	2	2	590	107	25	169	7	65	85	2	0.9
			*			***	***	***	***	**	***	***		
		<i>Tissue * Maturity</i>	3	160	121	68	184	82	178	77	17	25	6	0.3
			*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	

CWM: cell wall material, FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin, Rha: rhamnose, Fuc: fucose, Ara: arabinose, Xyl: xylose, Man: mannose, Gal: galactose, Glc: glucose, Ac.A: acetic acid, AUA: anhydrous uronic acids, MeOH: methanol, DM: degree of methylation, Lig: lignin, nd: not determined.

Pooled SD: pooled standard deviation (degree of freedom: 96)

Fisher's Value F value,  $P \leq 0.05$ : \*,  $P \leq 0.01$ : \*\*,  $P \leq 0.001$ : \*\*\*.

Extract: Ammonium oxalate fraction,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  fraction, NaOH 1M fraction, NaOH 4M fraction, Water wash fraction and Residue fraction.

Tissue: Flesh, parenchyma cells, stone cells and skin.

Maturity: Ripe and overripe stages.

**Table 16 :** Characteristic sugar ratios in the different polysaccharide fractions from the cell walls of different pear tissues at two maturity stages (ripe and overripe fruit)

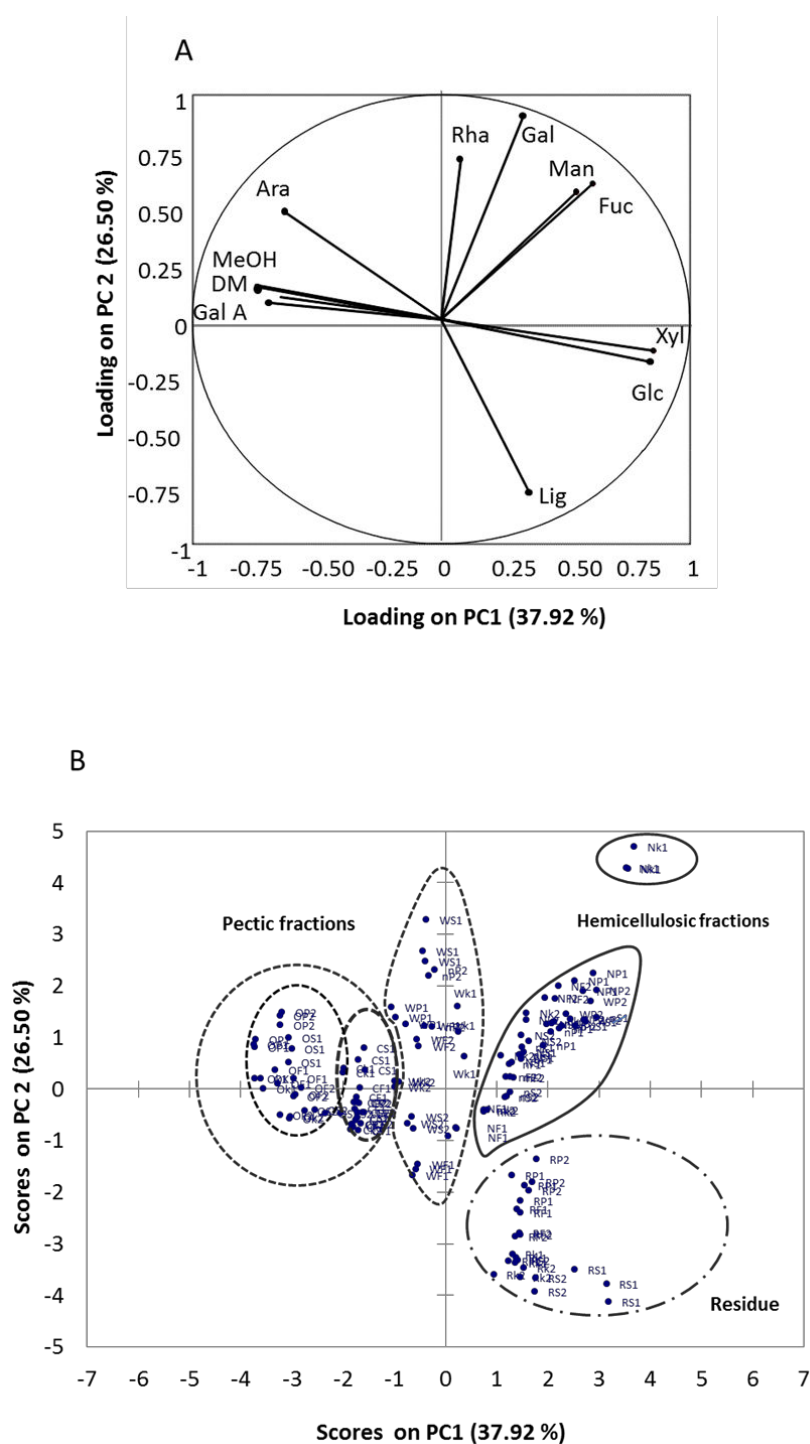
	Ratios	FL		PC		SC		SK	
		Ripe	Overripe	Ripe	Overripe	Ripe	Overripe	Ripe	Overripe
<b>Ammonium oxalate 0.05 M</b>	AUA/Rha	21	26	37	22	36	49	22	48
	(Ara+Gal)/Rha	74	17	55	20	55	37	74	46
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M</b>	AUA/Rha	35	39	41	39	31	79	29	74
	(Ara+Gal)/Rha	13	10	8	9	16	18	19	23
<b>Water wash</b>	AUA/Rha	8	11	17	4	6	16	4	10
	(Ara+Gal)/Rha	14	10	14	13	13	12	16	12
<b>NaOH 1 M</b>	Xyl/Man	30	28	27	14	42	32	8	12
<b>NaOH 4M</b>	Xyl/Man	8	7	8	7	7	9	3	3

Ratios are calculated using the yields of neutral sugar expressed in mole %. Ratios AUA/Rha and (Ara+AUA) are characteristic for pectin.

Xyl/Man for hemicelluloses. FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin, AUA: anhydrous uronic acids, Rha: rhamnose, Ara: arabinose, Gal: galactose, Man: mannose, Xyl: xylose

ANOVA (Table 15) was performed using the sequential extraction results for four cell walls (FL, ST, PC and SK), six extracts (Ammonium oxalate, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH 1M, NaOH 4M, water wash and residue fractions), two maturity stages (ripe and overripe). ANOVA indicated that the type of extract was the most significant factor, tissue type and ripeness had also significant effect. Arabinose, xylose, galactose, uronic acids and mannose were the most relevant compounds for differentiating maturity. The interaction 'tissue type × maturity' influenced significantly uronic acids and neutral sugars from pectic polysaccharides such as rhamnose, fucose, arabinose and galactose. Xylose and glucose, the most two neutral sugars characteristic of pear cell walls, had a very high difference with maturity and tissue type.

In the PCA analysis the two first axes (PC1 and PC2) explained close to 65 % of the total variance (Figure 39A). Uronic acids, methanol and the DM contents were strongly correlated. Xylose and glucose were also strongly correlated indicating co-occurrence of xylans and cellulose in the residues, as were fucose and mannose, indicating co-extraction of xyloglucans and mannans in hemicellulose extracts. The evolution of lignin during overripening was correlated with xylose and glucose (Figure 39A). The scatter plot (Figure 39B) differentiated pectic, hemicellulosic and cellulosic extracts along the PC 1 axis which correspond to about 40 % of the variability. In fact, Figure 39B showed a clear differentiation of the different type of fractions with separation of pectic extracts, (Ammonium oxalate extract and diluted alkali soluble pectin) and hemicellulosic extract (NaOH 1M and 4M) while the water wash fraction had intermediate composition, and residues were clearly separated.



**Figure 39** : Principal component analysis (PCA) of sequential fractions of the CWM carbohydrates composition for ripe and overripe pears. (A) Correlation circle of variables loadings on PC1 (37.92 %) and PC2 (26.50 %). (B) Sample map of scores on PC1 (37.92 %) and PC2 (26.50 %) as function of extracts, tissue types and maturity stages.

*Sample codifications:*

*Extracts*:-O: Ammonium oxalate fraction, C: Dilute alkali soluble pectin (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), n: NaOH 1M fraction, N: NaOH 4M fraction, W: Water wash fraction and R: Residue.

*Tissue type*:- F: Flesh, P: Parenchyma cells, S: Stone cells, K: Skin.

*Maturity*:- 1: -Ripe, 2: -Overripe.

### 3.4.1. Composition of pectic extracts

Three of the extracts were clearly pectic in nature: the first two (ammonium oxalate and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), in which uronic acids and arabinose were predominant, and also the water wash after the hemicellulose extraction, in which galactose and arabinose were the main sugars. This last fraction could be attributed to two phenomena: presence of a pectic fraction closely associated, through its neutral side-chains (Renard *et al.*, 1991; Zykwinska *et al.*, 2006) to the cellulose microfibrils, and low pectin solubility at high salt concentrations. This material was thus loosened from the microfibrils during the concentrated alkali steps, but only became soluble when the ionic strength decreased.

Ammonium oxalate extracted little material from pear cell walls, the highest yields (3%) being obtained for FL, PC and SK. The diluted alkali fraction ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) reached about 10 % of PC (Table 15). These low yields could be partially explained by loss of water soluble material during the CWM preparation, as previously shown by Renard (2005b). Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) extracted pectin, using CDTA (Cyclohexanediaminotetraacetic acid) (12 %) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , from alcohol insoluble residue of Spanish pears. CDTA soluble pectin content was higher than obtained here with ammonium oxalate. In addition to different cell wall preparation methods, it should be noted that CDTA is often more efficient in pectin extraction but also very difficult to totally eliminate during analysis. In our case, ammonium oxalate was used for extracting pectin because it is easier to remove from cell wall fractions after dialysis despite its lower yield.

The highest uronic acid concentrations were found in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  extracts (> 500 mg/g). Ammonium oxalate fraction contained mainly arabinose (20-60 mol%). This high arabinose indicated that the pear pectins were rich in hairy region. Modified hairy regions isolated from 'Conference' pears contain about 40 mol% of arabinose (Schols & Voragen, 1994). In addition smaller but significant amounts of galactose were present (30-70 mg/g). Both ammonium oxalate and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  fractions contained low content of xylose (8-21 mg/g) close to those reported by Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) which might originate from xylogalacturonans (Wong, 2008). Uronic acids/rhamnose (AUA/Rha) and arabinose + galactose to rhamnose ((Ara+Gal)/Rha) ratios were calculated for pectic fractions (ammonium oxalate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and water wash fractions) (Table 16). The relative richness of the pectic material in homogalacturonans versus rhamnogalacturonans can be followed by the AUA/Rha ratio. As one might presume that most of the arabinose and galactose are associated



with pectin's hairy regions, (Ara+Gal)/Rha was calculated to estimate the importance of the neutral side chains relative to the rhamnogalacturonan backbone (Table 16). The AUA/Rha ratio was higher in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> than in ammonium oxalate fraction indicating the presence of pectins with a high contribution of homogalacturonans, especially for overripe ST and SK. Water wash fraction had the lowest AUA/Rha ratio ranging between 6 for overripe ST and 17 for ripe parenchyma cells, indicating presence of highly retained rhamnogalacturonans. The AUA/Rha ratio decreased with overripening in all three pectic extracts for PC but increased for ST and SK, probably indicating loss of depolymerized homogalacturonans during overripening. Ammonium oxalate fraction contained rhamnogalacturonans with a high degree of branching ((Ara+Gal)/Rha >17). The ripe FL and SK had the more branched rhamnogalacturonans. (Ara+ Gal)/Rha ratio decreased mainly in overripe FL and PC showing a loss of side chain sugars (arabinose and galactose). Thus, overripening seemed to be associated with increased removal of rhamnogalacturonans side chains from the FL and PC tissues. This ratio did not change significantly for the other two pectin fractions. The ammonium oxalate extract showed the most differences as function of overripening.

The DM (Table 15) was only measured for the ammonium oxalate fraction as all other fractions were saponified during extraction. It was very high for pectin isolated from FL, PC and SK (>80 %), and only a little lower for ST (76 %). The presence of a high DM in chelator soluble fraction (CDTA) has been reported by Fischer *et al.* (1994) in ripe apple cell walls (DM close to 100 %). Le Bourvellec *et al.* (2009) showed a lower DM in the ammonium oxalate fraction from cider apple (73 %) than this obtained in pear.

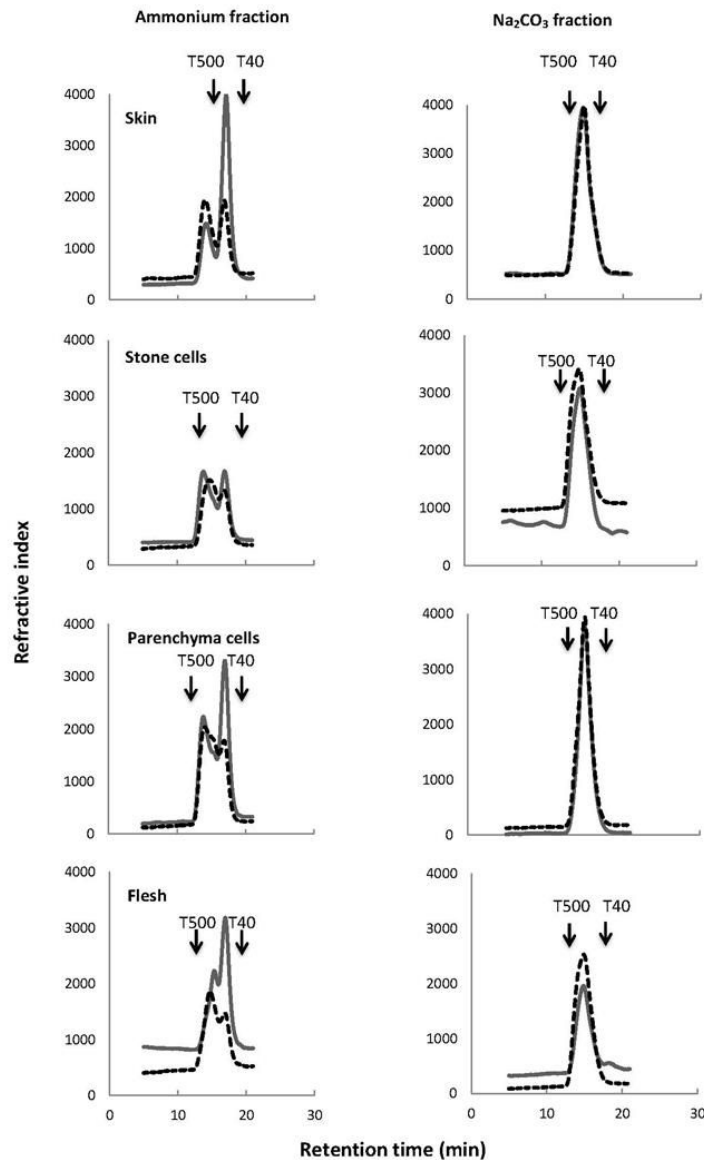
From the ripe to overripe pears, the main changes occurred in the pectic fractions (ammonium oxalate and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Both ammonium oxalate and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> yields decreased in overripe FL. The ammonium oxalate yields decreased in overripe PC, ST and SK while the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extracts were rather stable. Yoshioka *et al.* (1992) report a decrease of chelator soluble pectin extracted with Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in apples and pears during softening while Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) observe an increase in the water and CDTA soluble pectins and a decrease of the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extractions. In the same way, EDTA soluble pectin increase from the cell division period to overripening in Japanese pears (*Pyrus serotina* L.) (Yamaki *et al.*, 1979). In the overripe pears, ammonium oxalate fraction lost about 50 % of its arabinose for all tissues. The uronic acid content of this fraction increased at the overripe stage for FL, PC and SK, but it stayed relatively stable for ST. This increase of

uronic acid content could be explained by the loss of arabinose and decrease in hairy regions, so that the polyuronides became relatively more abundant. Yoshioka *et al.* (1992) showed that the depolymerisation of polyuronide is relatively limited in pear. Galactose decreased for FL, ST and SK. In PC, the amounts of galactose increased slightly. (Ara+Gal)/ Rha ratio was lower for the overripe pear indicating the degradation of neutral side chains of pectin during ripening. In the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fraction, arabinose and galactose seemed to have similar trends during ripening. In fact, their amounts decreased for FL, ST and SK and slightly increased for PC. The uronic acid amounts did not change for overripe FL, PC and SK. They increased slightly for ST. In ‘Bartlett’ pears, the softening is marked by a loss of cell wall uronic acid attributed to the depolymerisation of rhamnogalacturonan (Dick & Labavitch, 1989). Also, in pear, Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) find that ripening is accompanied by a decrease in cell wall arabinose and uronic acids. The same tendency is observed in the uronic acid content of the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fraction from “Yali” pears (Hiwasa *et al.*, 2004). In apple, galactose and arabinose decrease in CDTA and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extracts during ripening (Fischer *et al.*, 1994). There was no significant change of the DM between ripe and overripe stage except for SK which DM decreased in the overripe pears but remained high. In apple, the DM appears to be relatively stable during development and ripening (Fischer *et al.*, 1994).

### **3.4.2. Size exclusion chromatography of pectic extract**

To further explore the overripening effect on pectic polysaccharides, both ammonium and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> soluble fractions were analyzed by HPSEC. Ammonium oxalate fractions (Figure 40) presented two populations for FL, PC, ST and SK: one fraction of high molecular weight eluted at 14 min (void volume) and the second of lower molecular weight eluted at 16 min. During ripening, the low molecular weight fraction decreased for overripe pears. This decrease might be due to depolymerisation during overripening, as pectins are converted to oligomers which are not retained during washing with ionic buffer during the isolation of cell walls. All Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extracts (Figure 40) showed a single peak without marked differences between ripe and overripe pears for all tissues. During ripening, the water soluble pectin increase with a simultaneous decrease in high molecular weight CDTA soluble pectin from ‘Bartlett’ pears and ‘Red Gold’ apples (Yoshioka *et al.*, 1992). Also, in the water soluble pectin extracted from European pear cv. ‘La France’, the proportion of the low molecular weight polysaccharides increased with ripening (Hiwasa *et al.*, 2004). Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> extracts often elute as a peak of moderate molecular weight, and often show little change in molecular weight profile with ripening (Brummell *et al.*, 2004). Fischer *et al.* (1994) observe no

decrease of the average molecular weight in apple extracts during growth and ripening. Absence of pectin depolymerisation is described during ripening of cherry (Batisse *et al.*, 1994). Ripening only led to slight pectin depolymerisation in pears as reported e.g. in other Rosaceae such as apple (Fischer *et al.*, 1994).



**Figure 40 :** The molecular weight distribution of ammonium oxalate and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  fractions of flesh, parenchyma cells, stone cells and skin CWM from ripe and overripe 'De Cloche' pears by HPSEC. Arrows indicate the retention time of dextran molecular weight markers (500 and 40 kDa).

Ripe ——— Overripe - - - -

### 3.4.3. Composition of hemicellulosic extracts

Different classes of hemicelluloses were extracted by progressively increasing NaOH concentrations (NaOH 1M and NaOH 4M). For FL, PC and ST NaOH 4M was the main extract while NaOH 1M extracts constituted a very minor fraction (Table 15). For SK, NaOH 4M and NaOH 1M yields were close. The yield of NaOH 4M extract decreased by about 50% during overripening for FL and ST, while it was stable for SK and increased slightly for PC. Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) and Yamaki *et al.* (1979) report also a sharp decrease in hemicellulose fractions during pear maturation. The composition of NaOH 1M and 4M extracts indicated the probable presence of linear xylans and mannans. Xylans and mannans constitute 21 % and 1 % respectively of the ethanol insoluble material in ‘Conference’ pears (Jermyn & Isherwood, 1956).

NaOH 1M and NaOH 4M fractions contained mainly xylose, glucose, galactose and arabinose. The highest xylose concentration was detected in ST, linked to deposition of xylans during secundarization of cell walls. Fucose was also present in all CWM types (about 4 mol%) and it might indicate the presence of fucogalactoxyloglucan as a minor component in pear cell walls. Mannose was especially extracted in the NaOH 4M fraction, indicating the presence of mannans.

The ratio Xyl /Man (Table 16) describes the contribution of xylans or mannans to the hemicellulose population. Xylose (hence xylans) was always much more abundant. Xyl/Man ratio was highest in NaOH 1M fractions indicating a prevalence of xylans especially for ST, FL and PC. It was lower for skin (8 for ripe SK and 12 for overripe SK) showing a relative higher contribution of mannans in the skin. Though xylans were still dominant, the FL, ST and PC NaOH 4M fractions also contained non negligible mannans. However, NaOH 4M skin extract contained less mannans than NaOH 1M extract. The non negligible amounts of arabinose (>11 mol %) could point to the presence of arabinoxylans or the incidence of highly branching of rhamnogalacturonans I. The presence of high arabinoxylans content was reported in ‘Bartlett’ pears after ripening (Raffo *et al.*, 2011).

### 3.4.4. Composition of residue

All CWM isolated from ripe and overripe ‘De Cloche’ pears showed very high contents of cellulose and lignin, and final residues were in all cases the main fraction, with yields generally > 65 % of initial weight except for PC (Table 15). The proportion of residue increased for overripe FL and PC and for SK. It remained relatively stable for ST. In Japanese

and Spanish pears, the cellulosic residue decrease with overripening (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a; Yamaki *et al.*, 1979). For other pears, the amounts of cellulose is unchanged (Ahmed & Labavitch, 1980). The residue had high proportions of glucose (about 40 mol % for FL, PC and ST). Xylose was also present in high amounts in ST, SK and FL (>40 mol %), probably from highly retained xylans. Stone cells residue had the highest lignin content (40 % of residue) followed by skin (33 % of residue). Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) report about 52 % Klason lignin in pear residue. In parenchyma cells and flesh residues, the content of lignin varied between 15 and 20 %.

The composition of hemicelluloses fractions differed slightly in the xylose and glucose amounts and in some pectic monomers such as arabinose. The composition of residue fraction was relatively less modified during overripening except stone cells for which glucose and xylose decreased in the overripe pears.

#### **4. Conclusion**

Pear cell walls were very heterogeneous compared to other fruits due to the presence of two types of cells in the flesh: parenchyma cells and stone cells with different ultrastructures and compositions. The use of non destructive methods as infrared spectroscopy and scanning electron microscopy allows a differentiation between different pear tissues.

Chemically, the main difference was a higher pectin content (uronic acid, arabinose, rhamnose and galactose) in the parenchyma cells and a higher hemicellulose, cellulose and lignin in the stone cells. Thus, stone cells are harder and stiffer than parenchyma cells. The skin cell wall was also distinct, notably by its higher proportion of lignin and cellulose, and lower pectins. The clearest difference after overripening was found in the proportion of arabinose and in less extent galactose, which decreased in ammonium oxalate fraction of all overripe tissues, indicating the breakdown of arabinogalactan side chain presumably from rhamnogalacturonans. However, the (Arabinose+galactose) to rhamnose ratio decreased most in parenchyma cells (and whole flesh). Stone and skin are less affected by overripening due to their richness in cellulose and lignin. Therefore, for parenchyma cells (and whole flesh), the loss of arabinan/galactan side chains might modify physical properties of cell walls by increasing their pore size. Thus, the cell wall might become a much more open structure allowing enhanced accessibility of binding side for other polymers such as procyanidins, especially after overripening. (Brummell, 2006; Watrelot *et al.*, 2014).

## **5. Acknowledgements**

The authors thank Isabelle Bornard (INRA, Avignon) for microscopy sessions, Line Touloumet, Marielle Boge and Romain Bott (INRA, Avignon) for their technical help. We gratefully acknowledge Henk Schols and Suzanne Broxterman (Wageningen University, Netherlands). We thank also Régis Aubry (Clécy, France) for the supply of pears.

Marwa Brahem was supported by a PhD grant from the Ministry of Education and Scientific Research of Tunisia.



## *Chapitre 3*

### **Interactions parois-procyanidines**



## **Chapitre 3 : Interactions parois-procyanidines**

### **Introduction à l'étude**

Les deux chapitres précédents ont permis de caractériser plus précisément les parois et les procyanidines, et leurs affinités vont maintenant pouvoir être déterminées.

Les parois de poire présentent des compositions très variables selon leur origine tissulaire et la maturité. Les parois des cellules parenchymateuses sont plus riches en pectines que les parois de l'épiderme et des cellules pierreuses, elles même riches en hémicelluloses, cellulose et lignine. La surmaturation est essentiellement marquée par une perte des chaînes latérales pectiques, arabinanes et galactanes, dans les cellules parenchymateuses et le parenchyme total.

Les procyanidines qui ont été isolées à partir du parenchyme de poires à poiré sont caractérisées par des DP moyens de 26, et elles ne montrent pas de différences selon le stade de maturité avec les différentes méthodes de caractérisation utilisées. Leur degré de polymérisation et la distribution de leur masse molaire restent constants. Nous supposons alors que la modification de la capacité d'adsorption des procyanidines est plutôt liée aux changements de la paroi végétale en fonction de stade de maturité.

Après avoir analysé les procyanidines et la paroi végétale ainsi que leurs évolutions respectives avec la surmaturation, la quantification des interactions est étudiée par différentes méthodes (isothermes de fixation - calorimétrie à titration isotherme) en suspension modèle. Les isothermes de fixation permettent de suivre l'évolution de la capacité d'adsorption à différentes concentrations et d'estimer selon le modèle de Langmuir l'affinité des procyanidines vis-à-vis de la paroi et la quantité maximale fixée. La calorimétrie à titration isotherme est utilisée d'une part pour confirmer les résultats obtenus par les isothermes de fixation et d'autre part pour déterminer les paramètres thermodynamiques de la réaction ainsi que le mécanisme mis en jeu.



Ce chapitre est présenté sous forme d'un projet d'article :

🍏 **Titre :** *Interaction between procyanidins and pear cell walls: impact of ripeness and tissue type*

🍏 **Auteurs :** *Marwa Brahem, Catherine M.G.C Renard, Sylvie Bureau, Aude A. Watrelot, Carine Le Bourvellec*

Et qui sera soumis dans '*Food Chemistry*'

## 1. Introduction

Oligomeric and polymeric procyanidins can be selectively associated non covalently to cell wall polysaccharides by simple incubations in aqueous buffer as reported in apples and grapes (Bindon *et al.*, 2010b; Renard *et al.*, 2001). Cell wall-procyanidin associations were found to be spontaneous and quick via hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Renard *et al.*, 2001). These interactions play an important role in the sensory characteristics of juices, ciders and wines, notably in their astringency (Renard *et al.*, 2011; Symoneaux *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2003). Traditionally overripe pears are used for manufacture of perry, a slightly fizzy alcoholic drink. Different level of extraction of procyanidins from pear fruit to pear juice from ripe to overripe stage were observed, likely related to different levels of procyanidin – cell wall interactions (Brahem *et al.*, 2016).

Proanthocyanidins or condensed tannins are oligomers or polymers of flavan-3-ol units. Proanthocyanidins composed exclusively of (+)-catechin and (-)-epicatechin subunits are called procyanidins. In type-B procyanidins, monomers are linked by C4-C6 or C4-C8 bonds (Aron & Kennedy, 2008). They are further characterized by their number average degree of polymerization (DP<sub>n</sub>) and the proportion and position of their constitutive units which differs widely among species and cultivars. Procyanidins are the main phenolic class in many fruit such as grapes (Kennedy & Jones, 2001), apples (Guyot *et al.*, 2003), and pears (Brahem *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2002; Guyot *et al.*, 2002b; Kolniak-Ostek, 2016c; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a). They occur also in many derived beverage, such as tea, beer, wine and juice, making them significant in human nutrition due to their antioxidant effect (Cheynier, 2005).

In intact cells, polyphenols and cell walls, a complex porous polysaccharidic material mainly composed of cellulose, hemicelluloses and pectins, occur in segregated compartments. Cell walls represent a barrier to the diffusion of intracellular phenolic material (Bindon *et al.*, 2010b; Renard *et al.*, 2001). However, during food processing, such as juice processing, winemaking, cider and perry production, fruit cells are damaged and therefore cell walls and procyanidins come into contact. Association between procyanidins and cell wall polysaccharides has major technological implications. The astringency of perry pear juice depends heavily on fruit ripeness (Brahem *et al.*, 2016), with overripening practices being commonly used for production of perry of low astringency. Overripening might have the same impact that grinding, pressing, or even chewing involving tissues disruption leading

contact between polyphenols and cell walls. It could modify cell wall composition and physical state (Brummell, 2006).

To date, there does not appear to be systematic adsorption studies which investigate the impact of maturity stage of fruit, except for grapes (Bindon *et al.*, 2012; Bindon & Kennedy, 2011), in the establishment of cell wall-procyanidin associations and their technological impacts especially in juice industries (Bindon *et al.*, 2010a; Le Bourvellec *et al.*, 2009). Moreover, impact on binding to cell walls of proanthocyanidin concentrations, structures and compositions including stoichiometry, conformational flexibility, molecular weight, degree of polymerization and percentage of galloylation are well studied (Bindon & Kennedy, 2011; Le Bourvellec *et al.*, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Le Bourvellec & Renard, 2005) compared to cell wall evolutions and modifications.

Pear cell walls have a large heterogeneity compared to other fruits due to the presence of parenchyma and stone cells and represent a good example to study procyanidin-cell wall interactions. Stone cells and parenchyma cells have different compositions and evolve differently during overripening (Brahem *et al.*, 2017a). Those changes can affect differently the affinity of cell walls to procyanidins thus organoleptic properties of pear juice (Brahem *et al.*, 2016).

In this work, we examined the ability of pear cell walls, from different tissue (flesh, stone cells, parenchyma cells and skin) at two maturity stages (ripe and overripe) to adsorb procyanidins. Interactions were quantified via Langmuir isotherms and new approaches as isothermal titration calorimetry to measure changes of energy caused by non covalent binding (Frazier *et al.*, 2010; Watrelot *et al.*, 2015).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals**

Acetonitrile of HPLC grade was obtained from VWR International (Radnor, USA). Acetone was from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Hexane, methanol, hydrochloric acid and acetic acid were from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid, benzyl mercaptan, (+)-catechin and (-)-epicatechin and chlorogenic acid were provided from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

For gel permeation chromatography, all reagents were HPLC grade. Lithium chloride, *N,N*-dimethylformamide and methanol were from VWR International (Radnor, USA).

## 2.2. Plant material

*Pyrus communis* L. cv “De Cloche”, a special cultivar used to make perry, was used. Perry manufacturers produce pear juice from fruits in advanced maturity stage to decrease the astringency and to increase colloidal stability during storage of perry. ‘De Cloche’ perry pears were harvested in the orchard of Mr Aubry (Clécy, France). Two maturity stages (ripe and overripe) were chosen from this empirical assessment as described by Brahem *et al.* (2017a). Pears were peeled and cored manually. Formic acid solution (10 mL/L) was sprayed on the fresh material during these later operations to avoid phenolic oxidation. Skin and flesh were separately frozen (−20°C) until used.

## 2.3. Procyanidin purification and characterization

The extraction, purification and characterization of procyanidins were described in ‘Chapter 1, part 2’.

## 2.4. Cell wall extraction and characterization

The preparation of cell walls was carried out using a phenol-buffer method adapted from Renard (2005b) to obtain cell walls with very low amount of proteins. Cell wall materials (CWM) were extracted for each maturity from skin and flesh tissue, and in the whole flesh from parenchyma and stone cells. Thus, eight CWM fractions were obtained: cell walls extracted from ripe and overripe flesh (FL), cell walls from ripe and overripe parenchyma cells (PC), cell walls from ripe and overripe stone cells (ST) and cell walls from ripe and overripe skin (SK). A minor amount of procyanidins bound during cell wall preparations, was detected after thioacidolysis. For more details including cell wall compositions see Brahem *et al.* (2017a).

Surface area was determined from nitrogen adsorption isotherms for ripe and overripe CWM, using a Micromeritics AZAP 2010 system and monitored by an AZAP 2010 version 5.01 (Micromeritics, Norcross, GA, USA). Samples were degassed prior to generation of a Brunauer-Emmett-Teller (BET) isotherm using nitrogen at −196 °C.

## 2.5. Procyanidin-cell wall interactions

### 2.5.1. Binding isotherm methodology

All experiments were carried out in duplicate at 25 °C, using a citrate/phosphate buffer, pH 3.8, ionic strength at 0.1 mol/L according to Renard *et al.*, (2001). Cell wall suspensions (5 g/L) and procyanidin solutions (varying concentrations 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 g/L for PCA-R and PCA-O) were incubated in an 8 mL empty Sep-pack prep column (Interchim, Montluçon, France) equipped with a sinter of porosity 20 µm under stirring. After incubation, the solution and the cell wall-procyanidin complexes were separated by filtration under vacuum. The content of free procyanidins was measured by spectroscopy at 280 nm (SAFAS, Monaco). The amount of adsorbed procyanidins to cell wall materials was determined by subtracting the amount in the supernatant from the initial polyphenol solution. Isotherms were adjusted by a type-I of Langmuir formula (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Renard *et al.*, 2001). This method describes the amount of bound solute (procyanidins)  $[PP_b]$  (expressed in g/g of adsorbent) as a function of the free solute (procyanidins) concentration  $[PP_f]$  at equilibrium (Eq 2).

$$PP_b = \frac{N_{max} K_L [PP_f]}{1 + K_L [PP_f]} \quad (Eq2)$$

Where  $K_L$  is apparent affinity constant expressed in (L/g) and  $N_{max}$  is the total amount of available binding site or apparent saturation level (expressed in g/g adsorbent).

### 2.5.2. Mid Infrared Spectroscopy (MIR)

Lyophilized cell wall material–procyanidin complexes (CWM-PCA) obtained at a procyanidin concentration of 1 g/L, purified cell walls (FL, PC, ST, SK) and purified procyanidins at ripe and overripe stage were analyzed by ATR-Diamond spectrum acquisition. MIR spectra were collected at room temperature with a Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bruker Optics, Wissembourg France) equipped with a single-reflectance horizontal ATR cell (Golden Gate equipped with diamond crystal, Bruker Optics). CWM and CWM-PCA complexes were analyzed as described by Brahem *et al.* (2017a). Principal component analysis (PCA) was performed on spectral data comprised between 1800 and 700  $cm^{-1}$ , this region already known to be the most informative (Brahem *et al.*, 2017a). Spectral pre-processing and data treatment using multivariate analyses were performed with Matlab 7.5 (Mathworks Inc. Natick, MA) software using SAISIR package (Cordella & Bertrand,

2014). The MIR data were transformed with standard normal variate (SNV) to correct multiplicative interferences and variations in baseline shift before any multivariate analysis.

### 2.5.3. Isothermal titration microcalorimetry (ITC)

Isothermal titration calorimetry is a physical technique used to determine the thermodynamic parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) of interactions between macromolecules (Turnbull & Daranas, 2003). Thus, a TAM III microcalorimeter (TA instruments, New Castle, USA) was used to measure enthalpy ( $\Delta H$ ) changes during the titration of cell walls by procyanidins at 25°C. Procyanidins and cell walls were dissolved in the same phosphate/citrate buffer pH 3.8, ionic strength 0.1 mol/L. In order to allow comparison between the different cell wall materials, and given polydispersity in molecular weight for procyanidins, all concentrations are expressed relative to the main monomers, i.e; uronic acids for cell walls and (-)-epicatechin for procyanidins. All solutions were degassed prior to measurements. The reference cell was filled by water. Different concentrations were tested in order to obtain a hyperbolic curve as recommended for low affinity systems (Turnbull & Daranas, 2003). In our conditions, a cell wall suspension was placed in the sample cell of the calorimeter and a procyanidin solution was loaded into the injection syringe. Procyanidin solution was titrated into the sample cell as a sequence of 50 injections of 5  $\mu\text{L}$  aliquots. The duration of injection was 20 s, and the time delay between successive injections was 20 min. The contents of the sample cell were stirred throughout the experiment to ensure mixing (90 rev/min).

Raw data obtained as a plot of heat flow ( $\mu\text{J/s}$ ) against time (minutes) was then integrated peak-by-peak and normalized to obtain a plot of observed enthalpy change per mole of injectant ( $\Delta H$ , kJ mol/L) against the molar ratio ((-)-epicatechin/uronic acids). Peak integration was performed using Nanoanalyze<sup>TM</sup> software v2.4.1. (TA, instruments software, New Castle, USA). The blanks corresponding to the titration of procyanidin fractions (PCA-R and PCA-O) into buffer were subtracted from titration experiments. The experimental data were fitted to a theoretical titration curve with  $\Delta H$  (enthalpy change),  $K_a$  (association constant), and  $n$  (number of binding sites per macromolecule) as adjustable parameters from equation 3 where:

$P_t$  was the cell wall concentration in mol/L,  $A_t$  was the total (-)-epicatechin concentration in mol/L,  $V_0$  was the volume of the cell, and  $Q_i$  was the total heat released for

injection i. The one set of independent binding sites was chosen because analyses were expressed in constitutive unit equivalent and results were correctly fitted using that model.

$$Q_i = \frac{nP_t \Delta HV_0}{2} \left[ 1 + \frac{A_t}{nP_t} + \frac{1}{nK_a P_t} - \sqrt{1 + \left( 1 + \frac{A_t}{nP_t} + \frac{1}{nK_a P_t} \right)^2} - 4 \frac{A_t}{nP_t} \right] \quad (Eq3)$$

The thermodynamic parameters were calculated from the van't Hoff equation (Eq4):

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad (Eq4)$$

Where  $\Delta G$  is the free enthalpy,  $K_a$  is the association constant,  $\Delta H$  is the enthalpy and  $\Delta S$  is the entropy of reaction.

## 2.6. Statistical analysis

Results are presented as mean values of two replicates, and the reproducibility of the results is expressed as pooled standard deviation (Pooled SD). Pooled SD were calculated for each series of replicates using the sum of individual variances weighted by the individual degrees of freedom (Box *et al.*, 1978). Analysis of variance (ANOVA) by Fisher's test (F) was used to performe significant impact of maturity stage and tissue type. Differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Composition of the fractions

#### 3.1.1. Procyanidins

Purified perry pear procyanidins were isolated from ripe and overripe flesh. Their composition and molar mass distribution were described in "Chapter 1, part 2". Briefly, perry pear procyanidins were of high degree of polymerization ( $DP_n = 26$ ) and showed a single peak on GPC chromatography. There were no differences between ripe and overripe stage.

#### 3.1.2. Cell walls

Pear cell wall compositions including fractional extraction of their constituent polysaccharides are detailed in Brahem *et al.* (2017a). Briefly, parenchyma cells had high levels of glucose, uronic acids and arabinose. However, stone cells and skin cell walls were rich in glucose, xylose, and lignin. Sequential extraction of cell wall polymers revealed that

pear pectins had highly branched rhamnogalacturonans and were very highly methylated (DM >80 %). At overripe stage, cell walls were affected differently due to the heterogeneous composition of pear. Neutral sugars from pectic polysaccharides were significantly influenced by maturity stage, with marked decrease in arabinose and in lesser extent galactose from pectic side chains (arabinans and galactans), mostly for parenchyma cells and less for the whole flesh, stone cells or skin (Brahem *et al.*, 2017a).

The surface area determined by N<sub>2</sub> binding isotherms, varied from 0.2 g/m<sup>2</sup> (overripe ST) to 1.5 g/m<sup>2</sup> (ripe and overripe PC). At the ripe stage, parenchyma cells had the higher surface area (1.5 m<sup>2</sup>/g) followed by stone cells, flesh and skin respectively. Then, cell walls from parenchyma cells (PC) had the more porous structure. At the overripe stage, the specific surface area evolved differently according to the type of pear cell walls. It remained stable for PC and SK, increased for FL and decreased for ST (Table 17). ST was more compact with overripening (Figure 38) and their separation of parenchyma cells was easier. This might be due an increase of cell wall lignification for overripe pears.

## **3.2. Quantification of binding level**

### **3.2.1. Binding isotherms**

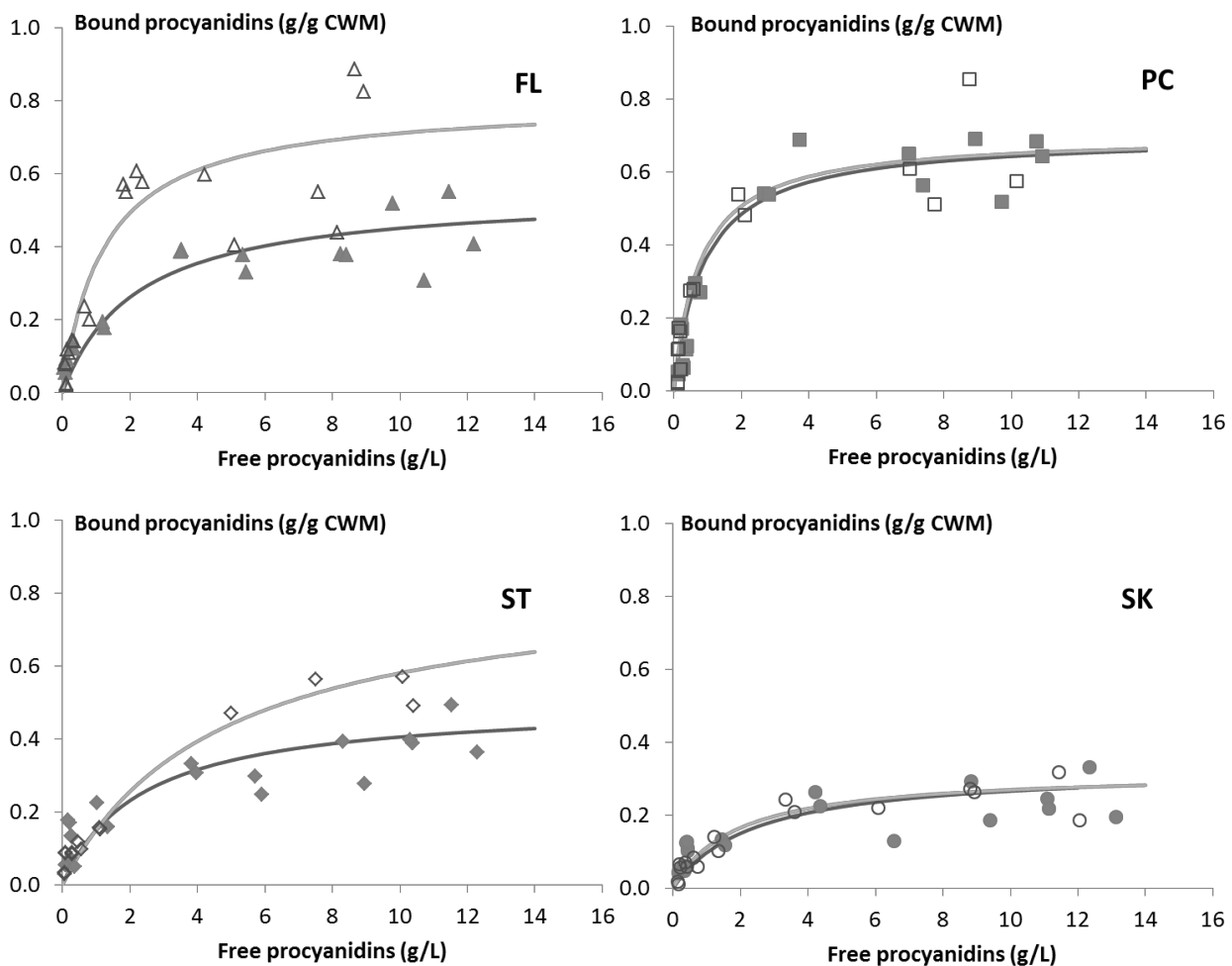
Binding isotherms were obtained for all cell wall fractions and both procyanidin fractions (PCA-R and PCA-O). Isotherms are represented using the Langmuir formulations (Eq1) in Figure 41 and the parameters of the Langmuir equation ( $K_L$  and  $N_{max}$ ) calculated per g of adsorbent or per m<sup>2</sup> are summarized in Table 17. Polysaccharide-procyanidin interactions by binding isotherms were well described by previous works as type I isotherm (Bindon *et al.*, 2017; Bindon *et al.*, 2014; Le Bourvellec *et al.*, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Le Bourvellec & Renard, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2012; Renard *et al.*, 2001). This adjustment is only an empirical description and not meant to imply a mechanism such as described by Langmuir (1918) for gas adsorption on solid surfaces.

Satisfactory fitting of the data were obtained with the Langmuir isotherm formula ( $r^2 > 0.90$ ) for PC, FL and ST, except for ripe SK, where  $r^2 = 0.85$  (data not shown). Satisfactory fitting were close to those obtained previously for apple cell walls ( $r^2 > 0.90$ ) (Le Bourvellec & Renard, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2012).

Isotherms curves were different depending on CWM type and maturity stage (Figure 41). Highest affinity for PC was obtained with a very definite plateau. Whereas, for FL and



ST, plateau was not reached in the explored concentration range. SK curve was characterized by the lowest plateau.



**Figure 41:** Binding isotherms for pear cell wall materials and procyanidins at pH 3.8, ionic strength 0.1 mol/L, 25°C. (▲): experimental curve for the whole flesh at ripe stage, (Δ): experimental curve for the whole flesh at overripe stage. (■): experimental curve for parenchyma cells at ripe stage, (□): experimental curve for parenchyma cells at overripe stage, (◆): experimental curve for stone cells at ripe stage, (◇): experimental curve for stone cells at overripe stage. (●): experimental curve for stone cells at ripe stage, (○): experimental curve for stone cells at overripe stage.

The lines are the corresponding Langmuir adsorption isotherms for which the calculated parameters are given in Table 3 for ripe (—) and overripe pears (---).

FL: cell walls from the whole flesh, PC: cell walls from parenchyma cells, ST: cell walls from stone cells, SK: cell walls from skin.

The amount of bound procyanidins increased with the concentration of procyanidins until the formation of a plateau at high concentration indicating a saturation level of CWM (Figure 41) as reported by Renard *et al.* (2001) and Le Bourvellec and Renard (2005) . However, cell wall type and maturation level had an impact on both apparent affinity ( $K_L$ ) and apparent saturation level ( $N_{max}$ ). Langmuir parameters are summarized in Table 17.

**Table 17** : Specific surface area (BET) and apparent Langmuir parameters for binding isotherms of different pear cell walls at varying concentrations of procyanidins.

CWM	Maturity	BET (m <sup>2</sup> /g)	$K_L$ (L/g)	$N_{max}$ (g/g)	$K_L$ (L/m <sup>2</sup> )	$N_{max}$ (g/m <sup>2</sup> )
FL	Ripe	0.4	0.45	0.55	1.07	1.31
	Overripe	1.0	0.80	0.80	0.80	0.80
PC	Ripe	1.5	1.12	0.70	0.75	0.47
	Overripe	1.5	1.30	0.70	0.88	0.47
ST	Ripe	0.6	0.43	0.50	0.71	0.83
	Overripe	0.2	0.22	0.85	0.96	3.69
SK	Ripe	0.4	0.42	0.33	1.02	0.80
	Overripe	0.4	0.54	0.32	1.43	0.85

FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin,  $K_L$ : apparent affinity constant,  $N_{max}$ : apparent saturation level.

The apparent affinity ( $K_L$ ) increased as follows  $SK \leq ST \leq FL \leq PC$ . In fact, SK, FL and ST had close  $K_L$  value with 0.42 L/g, 0.43 L/g and 0.42 L/g respectively. The higher affinity was detected in parenchyma cells ( $K_L = 1.12$  L/g) and PC isotherms (Figure 41B) showed total adsorption at low concentrations. At the overripe stage, the apparent affinity increased as follows  $ST \leq SK \leq FL \leq PC$ . Overripening was marked by a slightly decrease on ST affinity (0.22 L/g) and a noticeable increase of FL affinity (0.8 L/g). The highest affinity remained stable for PC with 1.30 L/g.

The apparent saturation level ( $N_{max}$ ) classification at the ripe stage was close to those of the affinity except for PC and FL where  $N_{max}$  increased as follows  $SK \leq ST \leq PC \leq FL$ . FL had the higher saturation level with 0.8 g/g. At the overripe stage, an important increase of  $N_{max}$  was noted for FL and ST (Figures 41A, 41C). ST isotherms did not show the formation of clear plateau indicating that  $N_{max}$  might increase at higher concentrations of procyanidins. SK and PC saturation levels remained stable at the overripe stage.

Then, two distinct evolutions could be noted between ripe and overripe stage for different cell wall materials: 1) Procyanidin adsorptions for FL and ST were both characterized by an increase of bound procyanidin at the overripe stage and a specific increase of FL affinity. 2) Procyanidin adsorptions for SK and PC were similar with a slightly increase of cell wall affinity whereas  $N_{\max}$  remained stable.

The classification of the binding capacity of pear cell walls was different when apparent Langmuir parameters were calculated as a function of the amount of procyanidins bound per surface area of cell walls. The apparent affinity ( $L/m^2$ ) was less variable from that expressed in  $L/g$  (from  $0.7 L/m^2$  to  $1.4 L/m^2$  versus  $0.2 L/g$  to  $1.3 L/g$ ).  $K_L$  increased as follows  $ST \leq PC \leq SK \leq FL$ . Overripening induced an increase of the apparent affinity only for PC ( $0.9 L/m^2$ ), ST ( $1.0 L/m^2$ ) and SK ( $1.4 L/m^2$ ). The apparent saturation level ( $N_{\max}$ ) increased as follows  $FL \leq PC \leq ST \leq SK$ . At the overripe stage, only the comparison between FL and ST changed since the surface area remained stable for PC and SK. A remarkably increase of the apparent saturation level of ST ( $N_{\max} = 3.7 g/m^2$ ) was accompanied by a decrease of the surface area available to bind procyanidins. However, the apparent saturation level decreased for FL ( $N_{\max} = 0.8 g/m^2$ ) whereas the surface area increased.

In order to discuss quantitative data on free and bound procyanidin characteristics, a focus was performed at  $1 g/L$  of the phenolic fraction based on a range of literature sources (Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Le Bourvellec *et al.*, 2012; Renard *et al.*, 2001). Table 18 summarizes cell wall-procyanidin interaction characteristics (the amount of bound procyanidins,  $DP_n$  of bound procyanidins and  $DP_n$  and molecular mass of free procyanidins).

The average amount of bound procyanidins varied between  $0.11 g/g$  CWM (Ripe SK) and  $0.17 g/g$  (Overripe PC), corresponding to 60 % and 95 % of the initial procyanidins used. Different levels of bound procyanidins were found for each cell wall type and maturity stage and the binding between procyanidins and cell wall materials were found to decrease as follows: parenchyma cells (PC) > Flesh (FL) > stone cells (ST) > skin (SK).

Furthermore, overall the amount of bound procyanidins increased with overripening for each cell wall material. Overripe parenchyma cells had the high proportion of bound procyanidins ( $0.17 g/g$ ).

ANOVA analysis based on the degree of polymerization of bound and free procyanidins showed that the maturity stage influenced mainly the  $DP_n$  of bound

procyanidins. A selective partition of procyanidins between the soluble phase and the insoluble material was observed. Bound procyanidins were more polymerized ( $31 < DP_n < 43$ ) in comparison with procyanidins remaining free in the supernatant ( $12 < DP_n < 20$ ) and the initial procyanidin fractions as reported by Bindon and Kennedy (2011), Le Bourvellec *et al.* (2004a) and Renard *et al.* (2001). At the overripe stage, pear cell walls were more selective for highly polymerized procyanidins and less polymerized procyanidins remained free in solution as reported by Renard *et al.* (2001) for apple and Bindon *et al.* (2012) for grape skin proanthocyanidins.

**Table 18 :** Quantification and characterization of binding reaction of purified procyanidin fractions (1 g/L) with pear cell wall material (5 g/L)

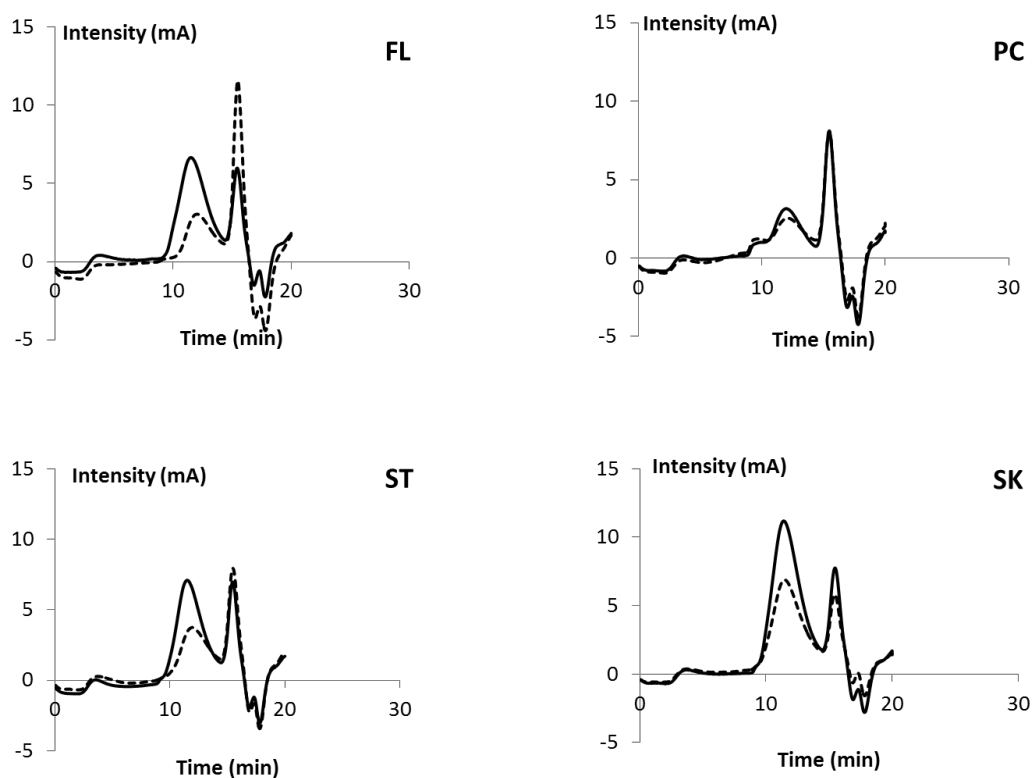
CWM	Maturity	Bound procyanidins (g/g CWM)	% of initial PCA	DP <sub>n</sub> of purified PCA	DP <sub>n</sub> of bound PCA	DP <sub>n</sub> of free PCA
FL	Ripe	0.136	74	26	36	18
	Overripe	0.151	83	26	36	12
PC	Ripe	0.148	81	26	31	14
	Overripe	0.169	95	26	34	14
ST	Ripe	0.133	72	26	43	19
	Overripe	0.141	72	26	39	12
SK	Ripe	0.111	60	26	37	20
	Overripe	0.138	91	26	36	19
<i>Pooled SD</i>		<i>0.006</i>	<i>0.04</i>	<i>0.72</i>	<i>1.18</i>	<i>1.07</i>
<i>ANOVA(F-value)</i>						
	<i>Tissue</i>	<i>12**</i>	<i>6*</i>	-	<i>9**</i>	<i>17***</i>
	<i>Maturity</i>	<i>18**</i>	<i>24***</i>	<i>1</i>	<i>19**</i>	<i>0</i>
	<i>Tissue*Maturity</i>	<i>1</i>	<i>5*</i>	-	<i>5*</i>	<i>3</i>

CWM: cell wall material, FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin, DP<sub>n</sub>: Average degree of polymerization of procyanidins, Pooled SD: pooled standard deviation. Fisher's Value (F-value), P≤0.05: \*, P≤0.01: \*\*, P≤0.001: \*\*\*.

The use of GPC elution chromatograms allowed the visualization of the molecular mass distribution of the free procyanidins which remained in solution after addition of cell wall materials (Figure 42). Free procyanidins presented two populations for FL, ST and SK at ripe and overripe stage: one fraction of high molecular weight (earlier eluting at 11 min corresponding to the elution time of purified procyanidins (Figure 33) and the second fraction of lower molecular weight (later eluting at 15 min). For PC, free procyanidins seemed to be

constituted of 3 populations: one of very high molecular mass eluted at 10 min, a second fraction of high molecular mass eluted at 12 min and the last fraction of lower molecular mass eluted at 15 min.

The changes in procyanidins molecular mass distribution after binding observed with cell walls at the overripe stage were remarkably dependent on tissue type. For FL and ST, the fraction corresponding to the high molecular weight did not change at the overripe stage. However, a slight retention time shift of the low molecular weight fraction was noted at the overripe stage. This result was coherent with the distribution of the degree of polymerization of free procyanidins where the  $DP_n$  of free procyanidins for FL and ST decreased from 18 to 12 and from 19 to 12 respectively. Moreover, no modifications were noted for the distribution of the molecular mass for SK whereas a slightly decrease of the  $DP_n$  of free procyanidins from 20 to 19. For PC, free procyanidin distributions were the same between the ripe and the overripe stage as well as their degree of polymerization ( $DP_n = 14$ ).



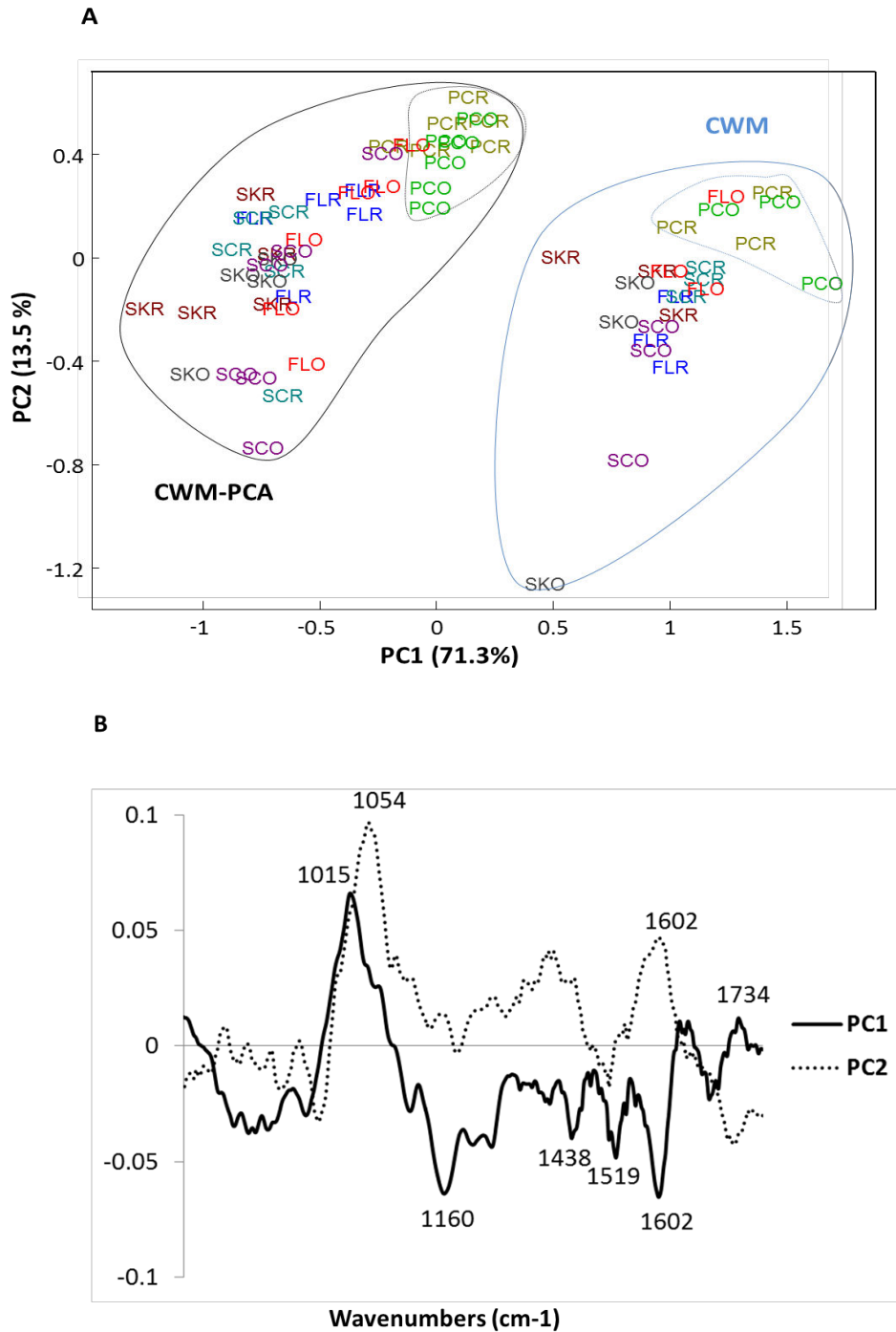
**Figure 42** : Molecular mass distribution of free procyanidins after cell walls binding determined by gel permeation chromatography (GPC). FL: cell walls from the whole flesh, PC: cell walls from parenchyma cells, ST: cell walls from stone cells, SK: cell walls from skin, —: ripe, - - -: overripe.

### 3.2.2. Infrared spectroscopy (MIR)

Mid infrared spectroscopy is a simple, rapid and non destructive method used to characterize macromolecules as cell wall polysaccharides (Brahem *et al.*, 2017a; Coimbra *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2001; Kačuráková *et al.*, 2000; Kačuráková & Wilson, 2001; Szymanska-Chargot *et al.*, 2015) and polyphenols (Bureau *et al.*, 2012; Edelman *et al.*, 2001; Frago *et al.*, 2011). In this study, MIR combined to multivariate data analysis was applied to evaluate if a non-destructive method is able to discriminate the samples composed of cell wall of different tissues and two maturity stages in presence or not of procyanidins. ANOVA analysis performed on the spectral data revealed a very significant effect of procyanidins (F-value = 600) and an effect of tissue type (F-value = 14) slightly higher than the maturity stage (F-value = 12) (data not shown). Previous works showed that the tissue type effect was four times greater than the ripening one on the same purified pear cell walls, devoid of procyanidins (Brahem *et al.*, 2017a).

A descriptive analysis of the data was performed by principal component analysis (PCA) on spectral regions between 1800 and 700  $\text{cm}^{-1}$  containing characteristic bands of pear cell wall polymers (Brahem *et al.*, 2017a; Ferreira *et al.*, 2001) and procyanidins (Figure 34) (Passos *et al.*, 2010). The two first principal components (PC) explained 84.8 % of the total variance (PC1 71.3 % and PC2 13.5 %) (Figure 43). Procyanidin-CWM complexes and CWM were discriminated into two distinct groups. Within each group, ripe and overripe parenchyma cells constituted a distinct sub-group whereas the other cell walls were overlapped. No clear samples discrimination according to maturity stage or tissue type was obtained. However, differences between purified CWM were highlighted using infrared spectroscopy in our previous works (Brahem *et al.*, 2017a). The loadings on PC1 and PC2 revealed similar patterns and only relevant wavenumbers are highlighted (Figure 43B). Comparing these results with those of Brahem *et al.* (2017a) and Ferreira *et al.* (2001), only 5 wavenumbers were identified due the interference of several factors (heterogeneity of pear cell walls, maturity impact, and cell wall-procyanidin associations). Along the PC1 axis, samples are scattered due to the presence or not of procyanidines. PC1 discriminated CWM-procyanidin complexes on the left and purified CWM on the right according to the presence of linked procyanidins or/and cell walls. PC1 was characterized by an opposition of 1015  $\text{cm}^{-1}$  (positive PC1) on the right on the plot probably characteristics of pectic compound (Brahem *et al.*, 2017a) and both 1160 and 1604  $\text{cm}^{-1}$  (negative side) on the left of the plot that could be due to

procyanidin absorptions (Edelmann *et al.*, 2001) (Figure 34). PC2 allowed sample discriminations between ripe and overripe at the top of the left plot with higher absorption at 1052 and 1604  $\text{cm}^{-1}$  (positive PC2) (Figure 36). Some characteristic bands of purified procyanidins appeared along negative side of PC1 as 1519  $\text{cm}^{-1}$  that could be characteristic for procyanidin monomers (catechins) (Foo, 1981). However, the identification of specific wavenumbers due cell wall-procyanidin was still difficult due to the overlapping infrared absorption bands of most interesting compounds.



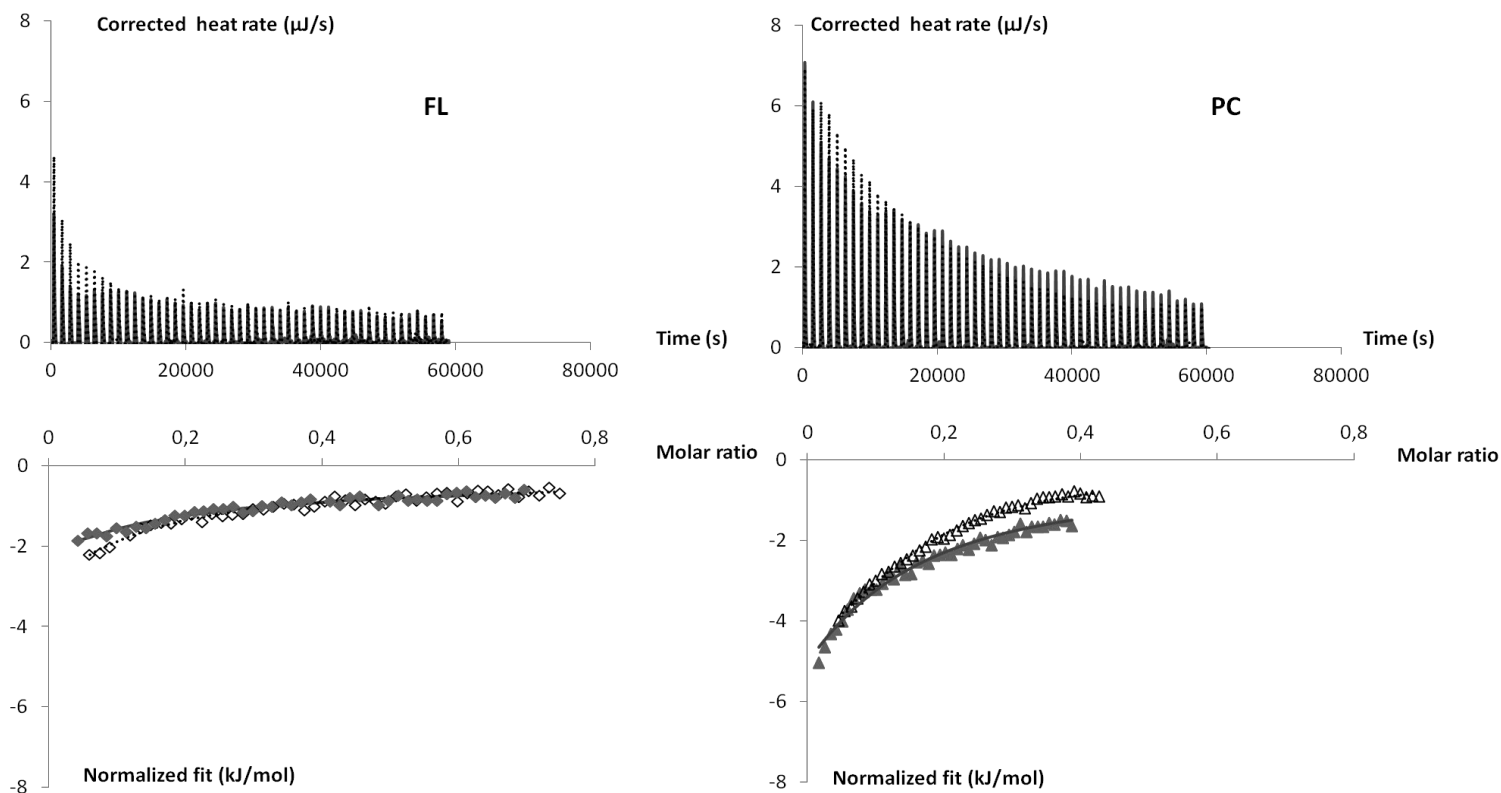
**Figure 43 :** A) Principal component analysis (PCA) of the first derivative of infrared spectra of cell wall materials-procyanidins in the range of 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ . B) Loading profile of component PC1 and PC2. FL: cell walls from the whole flesh, PC: cell walls from parenchyma cells, ST: cell walls from stone cells, SK: cell walls from skin, R: ripe, O: overripe.



### 3.3.3. Isothermal titration calorimetry (ITC)

Only FL and PC had measurable thermodynamic responses (Figure 44), the low affinity obtained for cell walls from stone cells (ST) and skin (SK), as shown by Langmuir isotherms above could explain this results. The isothermal titration calorimetry method may not be the most appropriate one for such low affinity as reported by Watrelot *et al.* (2014) for interaction between procyanidins and some hairy regions of pectins (rhamnogalacturonans II and arabinogalactan proteins).

The titration of cell walls (uronic acid equivalent) by procyanidins (epicatechin equivalent) is shown in Figure 44. Each peak corresponded to the heat change associated to procyanidin injections. As the procyanidin concentrations increased, the number of available site decreased until the formation of a plateau indicating a saturation of binding sites. The PC titration was characterized by a strong exothermic peak compare to FL. At the overripe stage the heat change increased for both PC and FL indicating the presence of more available site for procyanidins binding. Nevertheless, the shape of the adjustment curve indicated a low affinity of pear cell walls, as strong affinities are generally deemed to require  $K_a > 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Turnbull & Daranas, 2003).



**Figure 44 :** Isothermal titration calorimetry of the interaction of procyanidins with cell wall extracted from pear flesh (A) and from parenchyma cells (B) at ripe at ripe (—) and overripe (•••••) stages (pH 3.8, FI 0.1 M, 25°C). Upper plot: raw data plot of heat flow against time for the titration of 30 Mm (epicatechin equivalent) fraction DP<sub>n</sub> 26 into 20 mM (uronic acids equivalent). Lower plot: integration of peak areas and normalization yields a plot of molar enthalpy change against molar ratio. Experiments were done in duplicate. (◇): Ripe FL, (◆) overripe FL, (▲): Ripe PC, (Δ): overripe PC. FL: cell walls from the whole flesh, PC: cell walls from parenchyma cells.

Thermodynamic parameters of cell wall- procyanidin associations (stoichiometry, association constant, and enthalpy of interaction) were determined for FL and PC (Table 19). Ripe FL stoichiometry ( $n$ ) was 0.01, suggesting that approximately 1 molecule of (-)-epicatechin bound to 100 molecules of uronic acids. Ripe PC stoichiometry was three times higher than FL ( $n=0.03$ ). The association constants  $K_a$  were very similar,  $183 \text{ M}^{-1}$  for ripe FL and  $156 \text{ M}^{-1}$  for ripe PC.

The Gibbs free energy change ( $\Delta G$ ) of binding for ripe FL and PC were close ( $\Delta G = -13$  and  $-12 \text{ kJ/mol}$  respectively) and indicated that the adsorption of procyanidins to pear cell

walls was a spontaneous process. The free energy was close to that obtained for the adsorption of (-)-epigallocatechin to apple pomace ( $-\Delta G=15.90-22.98$  kJ/mol) (Wu *et al.*, 2014) and for the adsorption of catechins onto tea stalk lignocellulose ( $\Delta G=-12.75$  kJ/mol) (Ye *et al.*, 2009). Pear cell walls could be similar to apple pomace and tea stalk lignocellulose on account of their richness in cellulosic compounds. Analysis of thermodynamic contributions showed an enthalpy contribution higher for flesh cell wall (negative entropy  $\Delta S= -497$  J/mol/K) indicating that the dominant contribution was from hydrogen binding (Frazier *et al.*, 2010).

At the overripe stage, an increase of the stoichiometry ( $n$ ) and the affinity ( $K_a$ ) was observed for flesh and parenchyma cells. The affinity of overripe parenchyma cells was about 3 times higher than that for the ripe stage ( $K_a= 436$  M<sup>-1</sup>). However, the apparent affinity ( $K_L$ ) obtained by Langmuir isotherms changed slightly between ripe and overripe stage. Overripening was characterized by a decrease in the enthalpy change. A positive entropy ( $\Delta S= 29$  J/mol/K) was found in overripe parenchyma cell-procyanidin interactions indicating a higher contribution of the entropy term suggesting that the binding system was mostly driven by hydrophobic interactions.

Statistical analysis indicated that the greatest effect on binding capacity was due to the tissue type, rather than maturity stage which influenced only the entropy on cell wall-procyanidin mechanism.

**Table 19** : Thermodynamic parameters of interactions between pear cell walls and procyanidins

CWM	Maturity	n	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol/K)	$\Delta G$ (kJ/mol)
FL	Ripe	0.01	183	-161	-497	-13
	Overripe	0.03	209	-61	-109	-13
PC	Ripe	0.08	156	-27	-48	-12
	Overripe	0.21	436	-6	29	-15
<i>Pooled SD</i>		<i>0.03</i>	<i>81</i>	<i>24</i>	<i>83</i>	<i>0.60</i>
<i>ANOVA(Fvalue)</i>	<i>Tissue</i>	<i>16*</i>	<i>2</i>	<i>16*</i>	<i>12*</i>	<i>1</i>
	<i>Maturity</i>	<i>6</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>8**</i>	<i>5</i>
	<i>Tissue*Maturity</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>3</i>

CWM: cell wall material, FL: cell wall from the whole flesh, PC: cell wall from parenchyma cells, ST: cell wall from stone cells, SK: cell wall from skin, n: stoichiometry,  $K_a$ : affinity,  $\Delta H$ : enthalpy,  $\Delta G$ : free enthalpy,  $\Delta S$ : entropy, Pooled SD: pooled standard deviation calculated for the whole flesh and parenchyma cells at ripe and overripe stage. Anova was calculated for the whole flesh and parenchyma cells at ripe and overripe stage, Fisher's Value (F-value),  $P \leq 0.05$ : \*,  $P \leq 0.01$ : \*\*,  $P \leq 0.001$ : \*\*\*.

#### 4. Discussion

Cell wall-procyanidin complexes were characterized using Langmuir isotherms and isothermal titration calorimetry. Langmuir isotherms showed that cell walls isolated from parenchyma cells (PC) and the whole flesh (FL) had the higher affinity. This result was confirmed by ITC where cell walls from skin and stone cells did not have a measurable response, indicating that the resulting heat was beyond the limit of detection of the calorimetric method.

The obtained data can be explained by changes occurring either in the procyanidins or in pear cell walls at the overripe stage. However, pear procyanidin compositions and structures, characterized by thioacidolysis, gel permeation chromatography and infrared spectroscopy, remained stable between ripe and overripe stage and could not be used to qualify changes in procyanidin cell wall binding properties. Brahem *et al.* (2017a) showed that pear cell wall compositions varied with their tissular origin and were influenced by overripening.

Higher affinities of PC and FL obtained by ITC ( $K_a=183 \text{ M}^{-1}$  for FL and  $K_a=156 \text{ M}^{-1}$  for PC) were closely related to their richness in pectic compounds as reported by previous works. Selective removal of a pectic rich polysaccharide fraction by boiling during apple processing reduced the affinity ( $K_L$ ) of apple cell walls for procyanidins. In grape, Chelator soluble fraction rich in pectic polysaccharides contained more than 54 % cell wall-bound proanthocyanidins (Ruiz-Garcia *et al.*, 2014). However, cell wall hemicellulosic fraction retained a high binding capacity for proanthocyanidins but lower than that observed for pectic fraction. The lignocellulosic fraction obtained by removal of pectin and hemicellulosic fractions had the lowest affinity for proanthocyanidins. This result was coherent with that Le Bourvellec *et al.* (2005) who observed that pectin was characterized by high affinity followed by hemicellulose and cellulose. The apparent saturation level ( $N_{\max}$ ) was important for PC, FL and ST respectively. SK had the lowest  $N_{\max}$  (0.33 g/g) as reported by Bindon *et al.* (2012) where the adsorption of grape proanthocyanidins (prepared from “Cabernet Sauvignon” and “Shiraz” at pre-veraison and ripe stage) in different conditions (proanthocyanidin concentration of 2 g/L, cell wall / procyanidin ratio of 10) was consistently lower for skin cell wall material (0.047-0.094 g/g CWM) than for flesh cell wall material (0.138-0.168 g/g CWM) at two different seasons and independently of the ripeness stage tested.

The expression of the apparent affinity and apparent saturation level per  $\text{m}^2$  of absorbent highlighted the role of cell wall porosity on binding events. Cell wall porosity was correlated with the surface area available for binding events to occur. Cell wall affinity ( $K_L$  ( $\text{L}/\text{m}^2$ )) and the apparent saturation level ( $N_{\max}$  ( $\text{g}/\text{m}^2$ )) were very close for different pear tissues at the ripe stage.

Changes occurring in pear cell walls at overripe stage increased their binding properties with procyanidin: overripening can facilitate procyanidin-cell wall complexations. This mechanism explains the beneficial impact of overripening on processing of pear to juice and justify the empirical use of overripe pears by perry producers. Preferential removal of arabinans and galactans is probably the driving mechanism, especially by allowing better access to the uronic-acid rich molecules. It was proposed that methylated homogalacturonans interacted with procyanidins mainly through hydrophobic interactions (Watrelet *et al.*, 2013). Further work is needed to confirm the role of these pectin side-chains, for example by assessing the impact of selective action of arabinans or galactanas on cell walls.

Overripening influence differently pear cell wall porosity which confer distinct differences to the binding properties of cell walls for procyanidin. The elimination of pectic

side chain seemed not have an impact on PC surface area which remained stable at the overripe stage. However, Le Bourvellec *et al.* (2012) observed an increase of the saturation level ( $N_{\max}$ ) that could be explained by an increase of the surface area of apple cell wall from 2.35 m<sup>2</sup>/g for ‘Ariane CWM’ to 3.16 m<sup>2</sup>/g for ‘Ariane’ CWM 100°C after soluble pectin elimination by boiling and drying by solvent exchange.

The reduction of ST surface area was accompanied by a remarkably increase on the saturation level ( $N_{\max}$ ) at the overripe stage. The reduction of surface area of stone cells might be explained by a collapse of cell wall pores due to an increase of lignin concentration at the overripe stage as demonstrated by Brahem *et al.* (2017a). This result suggest the presence of a dual binding mechanism, in which procyanidin bind to the cell walls and then interact by secondary hydrogen bonding with further procyanidin to increase their association with cell wall material. This results could explain the higher saturation level obtained ( $N_{\max} = 3.7 \text{ g/m}^2$ ).

## 5. Conclusion

Procyanidin adsorption increased as ripening progressed and highly polymerized procyanidins were selectively adsorbed by cell walls. This phenomenon was pronounced by two different mechanisms characteritisc for pear cell walls: 1) The removal of pectic side chains especially in parenchyma cells at the overripe stage increased cell wall affinity as shown by ITC and promoted procyanidin access to highly methylated homogalacturonanes. 2) The reduction of surface area espically in stone cells due to cell wall lignification at the overripe stage promoted the autoassociation of procyanidins and increased the propotion of bound procyanidins as described by Langmuir isotherms.

Under similar conditions to those of ‘De Cloche’ perry pear juice ( about 3 g/L of procyanidins) (Brahem *et al.*, 2016), the proportion of bound procyanidins increased from 65% at the ripe stage to 80% at the overripe stage taking into account cell walls from the whole flesh.

## 6. Acknowledgments

The authors thank Marielle Boge for her technical help. Marwa Brahem was supported by a PhD grant (RB3C-2476) from the Ministry of High Education and Scientific Research of Tunisia.



## *Chapitre 4*

**Validation des résultats sur un modèle réel :  
jus de poire**



## Chapitre 4 : Validation des résultats sur un modèle réel (jus de poire)

### Introduction à l'étude

En suspension modèle, les procyanidines de poire présentent des affinités différentes selon le type de paroi et le stade de maturité. D'une part, les parois du parenchyme ont une affinité plus élevée que les parois de l'épiderme. D'autre part, les isothermes de Langmuir et la calorimétrie à titration isotherme ont montré que les parois des cellules parenchymateuses ont les affinités les plus élevées. Ceci est attribué au fait que les cellules parenchymateuses sont très riches en composés pectiques.

La surmaturation des poires favorisent la capacité d'adsorption des procyanidines indépendamment du type de paroi utilisé. La dégradation des chaînes latérales pectiques (les arabinanes et les galactanes) permet un accès plus faciles aux chaînes rhamnogalacturoniques qui ont plus d'affinité vis-à-vis des procyanidines (WatreLOT *et al.*, 2014). Une quantité importante des procyanidines hautement polymérisée reste alors adsorbée sur la paroi des poires surmatures. L'élimination de cette fraction phénolique pourrait moduler les caractéristiques organoleptiques du jus poire et du poiré.

Afin de valider ces résultats sur un modèle réel, le taux de transfert des procyanidines des fruits vers le jus a été étudié en fonction du stade de maturité (fruits mûrs ou surmatures) pour deux variétés de poires à poiré ('De cloche', variété sur la quelle toutes les analyses précédentes ont été réalisées, et 'Plant De Blanc'). Les pressages ont été réalisés selon les méthodes classiques (pressage direct après broyage sans enzymation), et en préservant le jus de l'oxydation, par l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC). Les polyphénols présents dans les fruits, les jus et les marcs ont été analysés. Les parois ont aussi été analysées de façon globale pour les deux variétés et les deux stades de maturité dans les fruits et les marcs.



Ce chapitre a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans LWT- Food Science and Technology, (DOI : <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.009>)

🍏 **Titre :** *Effect of maturity on the phenolic compositions of pear juice and cell wall effects on procyanidins transfer*

🍏 **Auteurs:** *Marwa Brahem, Severin Eder, Catherine M.G.C. Renard, Michèle Loonis, Carine Le Bourvellec*

## 1. Introduction

Perry pears are used in the west Midlands (UK) and in the regions of Bretagne and Normandie in France for the production of perry, a fermented fizzy beverage close to cider. They are specific cultivars characterized by their high content in polyphenols. Phenolic compounds have an important role in food industry. They contribute to flavor and color characteristics of fruit juices and wines (Spanos & Wrolstad, 1990). Polyphenols are divided into several classes, i.e. phenolic acids (hydroxybenzoic acids and hydroxycinnamic acids), flavonoids (flavonols, flavones, flavanols, flavanones, isoflavones, proanthocyanidins), stilbenes, and lignans (Collin & Crouzet, 2011). Procyanidins are the major polyphenols class in pear (dessert and perry pear cultivars) (Guyot *et al.*, 2002b; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Renard, 2005a) where they contribute to astringency of perry. In perry processing, the use of fruit at the overripe stage is the normal practice to decrease the astringency and to increase colloidal stability during storage. Further, preliminary studies have shown that the concentration of procyanidins in the juices varied with the fruit maturity at pressing (Alberti *et al.*, 2016; Guyot *et al.*, 2003; Spanos & Wrolstad, 1990). Low quantities of procyanidins are found in juices compared with the initial quantities measured in fruit (Guyot *et al.*, 2002b). Therefore, factors such as maturity that can induce change in the cell wall composition and structure can modulate the extractability of polyphenols and the organoleptic properties of perry.

The association between procyanidins and cell wall polysaccharides, especially pectins, can influence the transfer of procyanidins from fruit to juice (Guyot *et al.*, 2003; Taira *et al.*, 1997). The binding of condensed tannins to cell walls depends on one hand on the molecular characteristics of procyanidins, mainly their degree of polymerization but also the pyranic ring stereochemistry of the flavan-3-ols, and on the other hand on cell wall structure and composition. Associations differ depending on neutral sugar composition and the structure of pectic fractions. Arabinogalactan had the lowest affinity for procyanidins (Watrelet *et al.*, 2014). Watrelet *et al.* (2013) showed also that the strongest association was obtained with highly polymerized procyanidins and highly methylated pectins. The adsorption mechanism involves the establishment of non-covalent interactions, hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Le Bourvellec *et al.*, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Lea & Arnold, 1978).

In general, cell wall modifications in ripening fruit involve hydrolysis of neutral sugars from side chains of pectin, depolymerization and increased solubilization of pectins (Brummell, 2006). Pear cell walls have a large heterogeneity compared to other fruits due to the presence of parenchyma and stone cells. Their cell walls have different polysaccharide compositions and evolve differently during ripening. In Spanish pears, changes were predominant in parenchyma cells and were accompanied by a decrease in pectic polysaccharides ( arabinose, uronic acids) and an increase in their solubility (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b). Those changes can affect differently the affinity of cell walls for procyanidins thus the organoleptic properties of pear juice.

The aim of this work was to determine the polyphenols and cell wall compositions of two perry pears cultivars at two different ripeness stages and to investigate the impact of maturity on polyphenol transfers in pear juices.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals and standards**

Acetonitrile, dichloromethane and acetone were obtained from VWR (Leuven, Belgium). Methanol, acetic acid and hydrochloric acid, sodium tetraborate, sodium hydroxide and sodium hydrogen carbonate were from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium borohydride, N-methyl imidazole, Potassium hydroxide, 3-phenylphenol, lignin, acetic anhydride, acetyl bromide, perchloric acid, chlorogenic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, quercetin, isorhamnetin, hydroxylamine hydrochloride and benzyl mercaptan were provided by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Sugar standards were from Fluka-Biochemica (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

### **2.2. Plant material**

Perry pear cultivars, ‘Plant de Blanc’ and ‘De Cloche’ were harvested in the experimental orchard of Institut Français des Productions Cidricoles IFPC (Sées, France) on September 16 and October 5, 2015, respectively. They were stored at 1°C until reaching the desired stage of maturity. ‘Plant de Blanc’ pears were stored until September 22, ‘De Cloche’ pears until October 8, 2015 to reach the ripe stage. The overripe stage was reached on October 21 for ‘Plant de Blanc’ pears, and on December 11, 2015 for ‘De Cloche’ fruits.

### 2.3. Preparation of samples

Juice preparation from ripe and overripe pears was carried out by IFPC (le Rheu, France). The sugars / acids ratio serves as an industrial indicator because the balance between sugars and organic acids influences the taste of some beverages (Alberti *et al.*, 2016; Pal & Sampath Kumar, 1995). It was used in our case as a ripening index. Sugars / acids ratio was determined as described by Le Bourvellec *et al.* (2015). Overripening was marked by an increase of sugars /acids ratio especially for ‘Plant De Blanc’ (Table 20). Pears were washed and then crushed under CO<sub>2</sub> atmosphere and with added sodium fluoride to prevent oxidation. Pears were pressed on a small laboratory high-pressure press (model HP5, 5 L, Hafico, Fischer and Co., Dusseldorf, Germany) for 15 min. The hydraulic pressure was set at  $4 \times 10^7$  Pa, corresponding to an effective pressure of  $234 \text{ N/m}^2$  on the plant material. For each cultivar and maturity 3 x 1 mL of juice was collected after pressing, freeze-dried and stored at -20°C until analysis. Pomace samples, collected under CO<sub>2</sub> atmosphere, were divided in two lots for polyphenols and cell walls analysis. Fresh fruits were cored and freeze dried in our laboratory (SQPOV, INRA, Avignon) and stored at -20°C.

**Table 20** : Sugar and acid composition of perry pear cultivars at ripe and overripe stage

		Glucose	Fructose	Sucrose	Citric Acid	Malic acid	Sugars/acids
<b>Plantde Blanc</b>	<b>Ripe</b>	15	27	9	15	96	0.5
	<b>Overripe</b>	22	41	10	17	90	0.7
<b>De Cloche</b>	<b>Ripe</b>	17	15	12	12	7	1.2
	<b>Overripe</b>	16	32	13	33	22	1.1

### 2.4. Analysis of phenolic compounds

Polyphenols were determined in fruit, juice and pomace at two maturity stage by high performance liquid chromatography (HPLC/ Diode Array Detection DAD) with or without thioacidolysis as described by Guyot *et al.* (2001) and Le Bourvellec *et al.* (2011).

### 2.5. Cell walls preparation and characterization

Alcohol Insoluble Solids (AIS) from fruit and pomace at the two maturity stages were prepared according to the methods of Renard (2005b); neutral sugars, galacturonic acid and methanol were determined as described in Renard and Ginies (2009). Lignin was analysed in AIS as described by Syros *et al.* (2004) with some modifications. Samples (10-15 mg) were

digested in 1 mL of buffer (250 mL/L acetyl bromide, 27 mL/L perchloric acid and 723 mL/L acetic acid). Then, samples were incubated for 30 min at 70°C. 10 µL for each sample were added to 570 µL of a solution of [172.4 mL/L of NaOH 2 mol/L and 827.6 mL/L of acetic acid] and 20 µL of 7.5 mol/L hydroxylamine hydrochloride to stop the reaction. The volume was corrected to 2 mL with acetic acid and the absorbance was read at 280 nm using a spectrophotometer V-730 (Jasco, Tokyo, Japan).

## 2.6. Statistics

Results are presented as mean values, and the reproducibility of the obtained results was expressed by pooled standard deviation (Pooled SD) (Box *et al.*, 1978). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed on perry pear fruit, juice and pomace polyphenol composition concerning ripeness using the Excel Stat package of Microsoft Excel.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Phenolic composition of perry pears, juice and pomace

The phenolic composition of fruits, juices and pomaces and their changes during overripening for ‘Plant De Blanc’ and ‘De Cloche’ cultivars are summarized in Table 21.

Procyanidins were the predominant phenolic class, with between 6 and 8 g/kg FW, higher than reported by Le Bourvellec *et al.* (2013) in William pears (dessert pears) and by Renard (2005a) in ‘Gieser Wildeman’ (cooking pears). Perry pear procyanidins had a high degree of polymerization (DP<sub>n</sub>=20 for ‘De Cloche’ and DP<sub>n</sub>=33 for ‘Plant de Blanc’ fruits), as reported by Guyot *et al.* (2002). The only flavan-3-ol monomers detected was (-)-epicatechin as observed by Le Bourvellec *et al.* (2013). Hydroxycinnamic acids were represented by 5-caffeoylquinic acid, which has been reported as the main hydroxycinnamic acid in pears (Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Le Bourvellec *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012; Yim & Nam, 2016). Flavonols, located in the peel, mainly quercetin and isorhamnetin glucosides, were present in low quantities < 40 mg/kg FW for both cultivars. No significant changes in polyphenols concentration, neither procyanidins nor flavonols, were detected during fruit overripening, irrespective of the cultivar.

Juice concentrations decreased almost by half for ‘De Cloche’ and slightly less for ‘Plant De Blanc’ after overripening. This decrease was mainly due to decrease in procyanidins, as observed by Guyot *et al.* (2002). Decrease of the degree of polymerization was observed for both cultivars. The reduction in 5’-caffeoylquinic acid was less marked than

for procyanidins. Flavonols concentrations in the juice for both cultivars were about 10 times lower than in the fruit, but were not affected by overripening.

In parallel, some polyphenols were retained in overripe pear pomace. Procyanidins, with lower  $DP_n$  than in fruit and juice, increased to  $> 10$  g/kg FW. The sum of flavonols was higher than in fruit and juice, between 48 mg/kg FW and 145 mg/kg FW for overripe 'De Cloche' and ripe 'Plant De Blanc' respectively, linked to the enrichment of pomace in peel and the low extractability of flavonols. 5-caffeolyquinic acid was present in higher amounts than fruit and juice (387-1610 mg/kg FW for overripe 'De Cloche' pomace and overripe 'Plant De Blanc' pomace respectively).

**Table 21** : Polyphenol compositions and concentrations in the fruits, pomaces (mg/kg of fresh weight FW) and in the juices (mg/L of fresh weight FW) of two perry pear cultivars.

Cultivars	Tissue	Maturity	EC	PCA	DPn	CQA	Flavonol	Total	
<b>Plant de Blanc</b>	Fruit	Ripe	30	7390	33	796	29	8240	
<b>Plant de Blanc</b>	Fruit	Overripe	26	8020	37	926	31	9000	
			<i>Pooled SD</i>	<i>1.2</i>	<i>352</i>	<i>1.0</i>	<i>24.68</i>	<i>5.7</i>	<i>378</i>
			<i>Significance</i>	*	<i>ns</i>	*	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Plant de Blanc</b>	Juice	Ripe	7	4060	44	624	2	4690	
<b>Plant de Blanc</b>	Juice	Overripe	n.d.	2780	38	573	2	3360	
			<i>Pooled SD</i>	<i>0.1</i>	<i>67.1</i>	<i>1.1</i>	<i>13.7</i>	<i>0.5</i>	<i>80.1</i>
			<i>Significance</i>	***	***	***	*	<i>ns</i>	***
<b>Plant de Blanc</b>	Pomace	Ripe	109	14000	28	1480	145	15600	
<b>Plant de Blanc</b>	Pomace	Overripe	110	16300	26	1610	136	18100	
			<i>Pooled SD</i>	<i>6.5</i>	<i>302</i>	<i>1.0</i>	<i>82.0</i>	<i>15.2</i>	<i>392</i>
			<i>Significance</i>	<i>ns</i>	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
<b>De Cloche</b>	Fruit	Ripe	60	6660	20	318	35	7080	
<b>De Cloche</b>	Fruit	Overripe	40	5880	21	289	31	6240	
			<i>Pooled SD</i>	<i>4.0</i>	<i>429</i>	<i>1.2</i>	<i>18.2</i>	<i>7.8</i>	<i>456</i>
			<i>Significance</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>De Cloche</b>	Juice	Ripe	21	2660	20	260	4	2940	
<b>De Cloche</b>	Juice	Overripe	16	1450	14	216	3	1690	
			<i>Pooled SD</i>	<i>0.4</i>	<i>167</i>	<i>0.4</i>	<i>25.8</i>	<i>0.2</i>	<i>192</i>
			<i>Significance</i>	***	***	***	*	<i>ns</i>	***
<b>De Cloche</b>	Pomace	Ripe	93	10700	13	500	66	11400	
<b>De Cloche</b>	Pomace	Overripe	93	12700	16	387	48	13300	
			<i>Pooled SD</i>	<i>4.4</i>	<i>200</i>	<i>0.3</i>	<i>30.3</i>	<i>5.0</i>	<i>175</i>
			<i>Significance</i>	<i>ns</i>	**	**	*	*	**

EC: (-)-epicatechin, PCA: procyanidins, DPn: average degree of polymerization of procyanidins, CQA: 5'-caffeoylquinic acid, Flavonol: total flavonols, Total: total polyphenols, n.d.: not detected, Pooled SD: pooled standard deviation, ns: not significant (P>0.05), \*\*\*: P < 0.0001, \*\*: P < 0.01, \*: P < 0.1.

### 3.2. Composition of alcohol insoluble solids (AIS)

Yields, carbohydrate compositions of AIS from fruits and pomaces at the two maturity stages are presented in Table 22.

Fruit AIS represented 43 to 48 g/kg fresh weight (FW) in ripe and overripe pears. Yields found here are relatively high than those found in other pear cultivars because cell walls are extracted from whole fruits but are comparable to those reported by Raffo *et al.* (2011) for ‘Bartlett’ pears. The AIS yields obtained by Le Bourvellec *et al.* (2013), Martin-Cabrejas *et al.* (1994a), Jermyn and Isherwood (1956) from the flesh of ‘William’, ‘Blanquille’ and ‘Conference’ pears were close to 30 g/kg and are relatively higher than yields obtained by Renard (2005a) for ‘Gieser Wildemann’ pears. The main sugars in the AIS of both pears cultivars at both maturity stages were glucose (192-284 mg/g) xylose (140- 176 mg /g) and galacturonic acid (108-118 mg/g). Arabinose and galactose were found in lower amounts (34-79 mg/g and 36-70 mg/g respectively), whereas rhamnose, fucose and mannose were minor compounds. The degree of methylation of pectin was >50. The composition is close to that reported by Martin-Cabrejas *et al.* (1994a) on ‘Banquille’ pears and by Renard (2005a) on ‘Gieser Wildemann’ pears. During AIS preparation, procyanidins bind spontaneously to cell walls by hydrogen-bonds and hydrophobic interactions (Renard *et al.*, 2001). There were high concentrations of retained procyanidins (20-43 mg/g) with high degree of polymerization varied between 41 and 65. Pear cell walls contained also high quantities of lignin (212-232 mg/g). The high concentrations of glucose, xylose and lignin reflected the presence of lignified cell walls rich in xylans and cellulose, typical of stone cells (Ben-Arie *et al.*, 1979; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). Le Bourvellec *et al.* (2013) detected more galacturonic acid and less xylose in the AIS from the flesh of ‘William’ pears.

The AIS contents of the remaining pomace varied from 162 g/kg FW to 220 g/kg FW and were 5 times higher than in pears, as observed for plum pomace by Kosmala *et al.* (2013). Accumulation of peel and seeds in the pomace further increased the AIS, as both contain more AIS than parenchyma, as reported e.g. for apples during processing into applesauce (Le Bourvellec *et al.*, 2011). The composition of pomace AIS was close to that of fruit, with slightly higher galacturonic acid and lower lignin and procyanidins.

Overripening was marked by a clear loss (about 50 %) of arabinose and galactose for ‘De Cloche’ cultivar. This was in agreement with Ahmed and Labavitch (1980) on ‘Bartlett’



pears. Rhamnose, fucose and mannose did not vary during overripening, in accordance with previous work (Ahmed & Labavitch, 1980; Martin-Cabrejas *et al.*, 1994a). For both perry pear cultivars, a significant decrease of the total glucose amount was observed due to solubilization during ripening. An increase of xylose content was observed mainly for 'De Cloche' Cultivar. Lignin was found in higher amounts with ripening, consistent with the formation of lignified cell walls (Martin-Cabrejas *et al.*, 1994b). For pomace, changes in the sugars composition were not drastic and similar to those noted on fruit AIS. The amounts of bound procyanidins increased from ripe to overripe for both fruits and pomaces. Only highly polymerized procyanidins ( $DP_n > 40$  for 'De Cloche' and  $DP_n > 60$  for 'Plant De Blanc') were bound essentially in fruit AIS.

**Table 22 :** Yields (mg/g fresh weight) and carbohydrate compositions (mg/g dry weight) of alcohol soluble solids from fruits and pomaces for ‘Plant De Blanc’ and ‘De Cloche’ at two maturity stages.

Cultivar	Material	Maturity	Yields	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AUA	MeOH (DM)	Lig	PCA (DP <sub>n</sub> )
<b>Plant de Blanc</b>	Fruit	Ripe	46	5	2	57	161	7	25	284	108	11 (56)	212	20 (63)
		Overripe	43	6	2	56	173	7	24	194	118	11 (51)	232	43 (65)
	Pomace	Ripe	220	7	2	61	133	8	28	287	124	12 (54)	170	14 (31)
		Overripe	190	6	3	64	154	8	26	177	104	13 (65)	202	21 (39)
<b>De Cloche</b>	Fruit	Ripe	43	5	3	79	140	7	38	263	113	12 (57)	211	30 (48)
		Overripe	48	6	2	34	176	7	19	192	111	11 (55)	226	40 (41)
	Pomace	Ripe	209	7	2	70	161	6	35	233	120	13 (60)	167	14 (26)
		Overripe	162	7	2	36	172	7	19	178	120	13 (60)	237	27 (40)
<i>Pooled SD</i>			<i>3.5</i>	<i>0.5</i>	<i>0.1</i>	<i>2.2</i>	<i>7.4</i>	<i>0.3</i>	<i>1.4</i>	<i>9.7</i>	<i>5.8</i>	<i>0.5(3.5)</i>	<i>7.1</i>	<i>0.6(1.4)</i>

Rha : rhamnose, Fuc: fucose, Ara: arabinose, Xyl: xylose, Man: mannose, Gal: galactose, Glc: glucose, AUA: uronic acid, MeOH: methanol, DM: degree of methylation, Lig : lignin, PCA: procyanidins, DP<sub>n</sub>: degree of polymerization of procyanidins, Pooled SD: pooled standard deviation.

### **3.3. Impact of cell walls on procyanidins transfer on juice**

The lower quantities of phenolic compounds in juices compared to fruits could be explained by retention of phenolic compounds by cell wall polysaccharides (Alberti *et al.*, 2016; Le Bourvellec *et al.*, 2007), considering that mostly procyanidins remained in the pomace. Proanthocyanidins can be selectively adsorbed by cell wall polysaccharides. This has been reported for apple and grape (Bindon *et al.*, 2010b; Renard *et al.*, 2001; Ruiz-Garcia *et al.*, 2014) where procyanidins complexation with cell walls was found to be spontaneous and rapid (Renard *et al.*, 2001).

Three phenomena can explain increased binding of procyanidins to cell walls from overripe pears. First, the loss of arabinose and galactose indicated a loss of the pectin side chains. Watrelot *et al.* (2014) show that these pectin side chains have low affinity for procyanidins, hence their elimination and better access to pectin's rhamnogalacturonic backbone can contribute to increase affinity. Second, during overripening solubilization and loss of polysaccharides from cell wall might increase its porosity (Bindon *et al.*, 2014) so that more surface becomes available for binding of procyanidins. Thirdly, overripening seemed to promote interaction between pear procyanidins and cell walls. In over ripened fruit some membrane breakdown might start to occur, so that procyanidins might come in contact with cell walls prior to pressing.

## **4. Conclusion**

Overripening of perry pears was demonstrated to decrease the extraction of procyanidins to the juice in spite of constant concentration in the fruit. This indicates the use of overripe pears by the perry producers. The same mechanisms seem to be present in pears as in grape (for wine production) or apple (for cider production). This indicates a generic mechanism that can be used to manipulate bitterness and astringency of fruit juices and might be an alternative to fining.

## **5. Acknowledgements**

The authors thank “Institut Français des Productions Cidricoles” (Sées, France) for the supply of pears and juice production. We thank also Mrs Line Touloumet and Marielle Boge for their technical help. Marwa Brahem was supported by a PhD grant from the Ministry of Education and Scientific Research of Tunisia.



## *Chapitre 5*

**Localisation des procyanidines *in situ* dans les poires  
à poiré à deux stades de maturité**



## **Chapitre 5 : Localisation des procyanidines *in situ* dans les poires à poiré à deux stades de maturité**

### **Introduction à l'étude**

L'outil histologique a été utilisé pour visualiser *in situ* le comportement des procyanidines dans les poires à poiré mûres et surmatures et compléter les résultats obtenus par les différentes méthodes biochimiques. La localisation des procyanidines dans un fruit hétérogène comme la poire peut varier considérablement en fonction du tissu en question (cellules parenchymateuses et cellules pierreuses) mais aussi en fonction de l'évolution tissulaire avec la surmaturation. L'objectif de cette étude est de décrire l'évolution de ces composés phénoliques entre les deux stades de maturité étudiés et plus précisément leurs comportements vis-à-vis de la paroi végétale.

Le DMACA (diméthylaminocinnamaldehyde) a été utilisé sur fruit frais pour illustrer tout d'abord la distribution générale des procyanidines dans le parenchyme des poires à poiré mûres et surmatures. Ensuite, la microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines a été mise en œuvre pour visualiser la localisation des procyanidines au sein de la cellule végétale et plus précisément leur distribution par rapport à la paroi végétale.

Ce chapitre a fait l'objet d'un projet d'article :

- 🍏 **Titre :** *Localization of procyanidins in ripe and overripe perry pears by light and transmission electron microscopy*
  
- 🍏 **Auteurs :** *Marwa Brahem, Isabelle Bornard, Catherine M.G.C Renard, Carine Le Bourvellec*

## 1. Introduction

Proanthocyanidins, also known as condensed tannins, are oligomers and polymers of flavan-3-ol monomers as (-)-epicatechin, (+)-catechin, (+)-gallocatechin and (-)-epigallocatechin. They are present in many fruit, e.g. apple (Guyot *et al.*, 2002a; Le Bourvellec *et al.*, 2009; Renard *et al.*, 2007; Symoneaux *et al.*, 2014), grape (De Freitas *et al.*, 2000; Gagné *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2001), apricot (Ruiz *et al.*, 2005), peach (Ceccarelli *et al.*, 2016) and pear (Ferreira *et al.*, 2002; Kolniak-Ostek, 2016c; Le Bourvellec *et al.*, 2013). Among pear cultivars, perry pears are used only to make perry. Polyphenol profile of perry pear flesh is simple and composed of phenolic acids mainly hydroxycinnamic acids and flavan-3-ols. Perry pear flavan-3-ols are mainly highly polymerized procyanidins based on (-)-epicatechin structure (Brahem *et al.*, 2016; Brahem *et al.*, 2017b; Guyot *et al.*, 2002b). Procyanidins are characterized by their propensity to bind to cell walls and to salivary proteins contributing to the astringency of some beverage such as cider, wine and perry (Guyot *et al.*, 2002b; Renard *et al.*, 2001; Symoneaux *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2003).

Procyanidin concentration and subunit composition in different plant tissues are quantified by chemical methods notably HPLC-DAD (high performance liquid chromatography-Diode Array Detection) coupled to thioacidolysis reaction (Guyot *et al.*, 2001). Procyanidin distribution and localization can be revealed by histochemical methods. Vanillin and dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) are commonly applied to detect proanthocyanidins in fresh tissues (Abeynayake *et al.*, 2011; Brillouet *et al.*, 2013; Feucht *et al.*, 1986; Gardner, 1975; Hammouda *et al.*, 2014; Li *et al.*, 1996). Under acidic conditions, DMACA is recommended in plants with low concentrations of procyanidins because of its higher sensitivity than vanillin (Li *et al.*, 1996). The DMACA reagent stains procyanidins (blue color) by binding to meta-oriented dihydroxy or trihydroxy substituted benzene rings (McMurrough & McDowell, 1978). This reagent reacts only with the A ring of procyanidins (Hammouda *et al.*, 2014; McMurrough & McDowell, 1978) and revealed specific blue coloration as described in cherries (Nachit & Feucht, 1983), grapes (Cadot *et al.*, 2006), dates (Hammouda *et al.*, 2014) and some legumes (Abeynayake *et al.*, 2011; Li *et al.*, 1996).

Histochemical methods could be complemented by transmission electron microscopy (TEM). Polyphenols located within the vacuoles are enclosed by tonoplast and cytoplasmic lipid membranes, which are in turn encapsulated by plant cell wall. These polyphenols are not only present in free solution inside the vacuoles, but may be linked to the protein matrix

forming the vacuolar inclusions (Markham *et al.*, 2001). More recently, Brillouet *et al.* (2013) showed that procyanidins are polymerized in a new chloroplast derived-organelle, the tannosome. These are formed by pearling of the thylakoids into 30 nm spheres, which are then encapsulated in a tannosome shuttle formed by budding from the chloroplast and bound by a membrane resulting from the fusion of both chloroplast envelopes.

Procyanidins occurring in plant are not systematically associated with cell walls but some external factors could induce interactions between procyanidins and cell walls for example food processing (Le Bourvellec *et al.*, 2012) and environmental stress (pathogen attack) (Jiménez-Escrig, 2014). Overripening did not change chemical composition and chemical structure of procyanidins in perry pears as reported in our previous work (Brahem *et al.*, 2016) but it might modify their localization inside the vacuole so as to favor cell wall-procyanidin associations. The localization of procyanidins during fruit ripening is not well known, histochemical methods and transmission electron microscopy were used in this study to describe procyanidin evolutions in pear flesh between ripe and overripe stage.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Solvents and reagents**

4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) was provided by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol and hydrochloric acid were from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol was from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Uranyl acetate, glutaraldehyde, sodium cacodylate, osmium tetroxide, propylene oxide, Araldite Resin and toluidine blue were provided by Delta Microscopies (Maressac, France).

### **2.2. Plant Materials**

Ripe and overripe 'De Cloche' perry pears (*Pyrus communis* L.) were harvested in the orchard of Mr Aubry (Clécy, France). Maturity stages were described by Brahem *et al.* (2017a).

### **2.3. DMACA preparation**

Thick flesh sections from ripe and overripe pears were incubated for 20 min at 4°C with DMACA (3 g/L) in a mixture of DMACA methanol / 6 mol/L HCl (1/1: mL/mL). Rinsing was carried out by several times in deionized water to remove excess reagent.



Procyanidin- containing cells stained blue and observations were made by light microscopy (Hammouda *et al.*, 2014; Li *et al.*, 1996).

## **2.4. Transmission electron microscopy (TEM)**

Small cubes of pear flesh (1 mm<sup>3</sup>) were cut from fresh pear flesh (with or without skin) and fixed for 1.5 h at room temperature with 25 mL glutaraldehyde in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer (pH 7.2). Blocks were rinsed 3 times (30 min) with sodium cacodylate 0.1 mol/L and then post-fixed for 1 hour at room temperature with 20 g/L osmium tetroxide (Os O<sub>4</sub>) in deionized water. After being post-fixed, blocks were dehydrated by increasing concentrations of ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%). Ethanol was then replaced with propylene oxide and samples were progressively infiltrated with araldite resin (GY 502). The infiltrated samples were polymerized for 48 h at 60 °C.

For light microscopy, semithin sections (1 µm) were obtained using an ultramicrotome (Leica microsystems, Leica, Germany) and stained with a solution of toluidine blue 10 g/L in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 25 g/L for histology. The observations were carried out using a light microscope Olympus BX60 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and images were taken using a color camera Jenoptik Progress (Jenoptik, Jena, Germany). Then, ultrathin sections (60-80 nm) contrasted with uranyl acetate 20 g/L and lead citrate. Samples were examined using a transmission electron microscopy TE Microscope CM10 (FEI-Philips, Eindhoven, Netherlands).

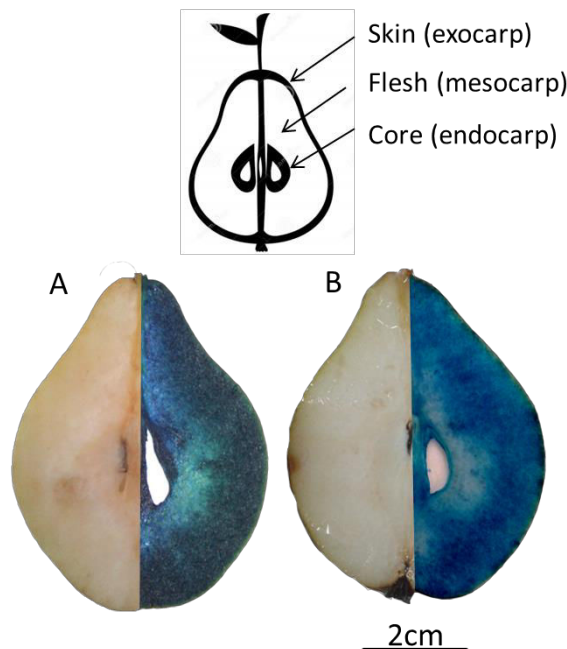
## **3. Results and discussions**

### **3.1. Procyanidins localization by light microscopy coupled to DMACA staining**

The blue coloration due to DMACA-procyanidin reaction seemed to fill almost completely the intracellular area suggesting the massive presence of these phenolic compounds in perry pear vacuoles for ripe (Figure 45A) and overripe (Figure 45B) fruits.

The staining of procyanidins was not equally distributed in the pear tissue and two main distinct zones were clearly observable at both maturity stages. Longitudinal (Figure 45) and transverse sections (data not shown) revealed that only the core of the fruit (endocarp) seemed devoid of procyanidins. The core of ‘De Cloche’ perry pear was very rich in stone cells as reported in other pear cultivars (Tao *et al.*, 2009). In fact, pear flesh is characterized by the deposition of large numbers of stone cell aggregates responsible for pear gritty texture. Stone cells are initially differentiated among parenchyma cells approximately after

flowering (Sterling, 1954) or during flowering (Dibuz, 1997). They are a type of sclerenchyma cell formed by the secondary thickening of cell walls, followed by the deposition of lignin on the primary walls of parenchyma cells (Cai *et al.* 2010). The development of stone cells is closely related to the synthesis, transfer and deposition of lignin environmental conditions during fruit evolution (Yan *et al.*, 2014). However, the distribution of stone cell clusters is highly dependent to the cultivar. Choi and Lee (2013) report that stone cells appear more concentrated close to epidermis in ‘Niitaka’ pears whereas in ‘Bartlett’ stone cells become increasingly infrequent with increased proximity to the epidermis. The absence of the blue color in perry pear core might be explained either by the absence of procyanidins or by the fact that the stone cells are strongly lignified and limit the DAMCA penetration.



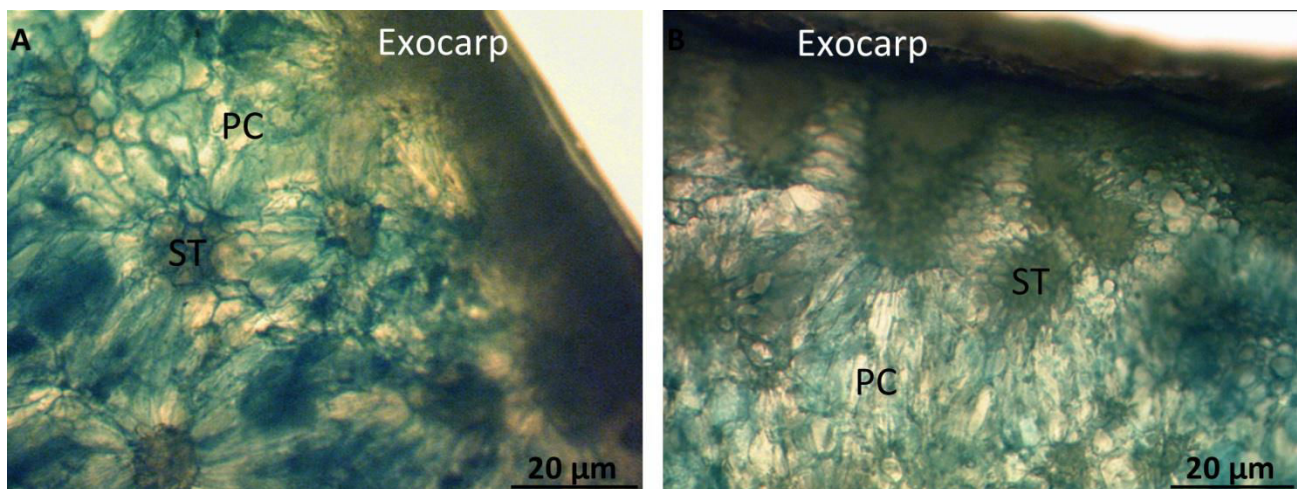
**Figure 45** : Specific localization of procyanidins in perry pear flesh with DAMCA. A) Longitudinal section of pear flesh before (on the left) and after DAMCA staining (on the right) at ripe stage. B) Longitudinal section of pear flesh before (on the left) and after DAMCA staining (on the right) at overripe stage.

Light microscopy observations (Figure 46) revealed that perry pear mesocarp was rich in procyanidins which were located in large parenchyma cells. No coloration could be observed in pear exocarp. This result was in contradiction with our previous data showing

that procyanidins were more concentrated in the skin than in the flesh. These results suggested that stone cells aggregates also present in pear skin might limit DMACA reaction.

DMACA staining allowed the visualization of vacuolar procyanidins in specific tissues and cell types. However, DMACA staining does not permit to distinguish between flavan-3-ol monomers (catechins) and polymers (procyanidins) (Abeynayake *et al.*, 2011; Brillouet *et al.*, 2013; Feucht *et al.*, 1986; Hammouda *et al.*, 2014). Nevertheless, it is likely that those flavonols mainly correspond to highly polymerized procyanidins as procyanidin concentrations are an order of magnitude high that monomeric flavan-3-ols in ‘De Cloche’ pears (Brahem *et al.* 2017b).

No visual difference in procyanidin distribution between ripe and overripe pears was shown by DMACA staining and the observed difference in color intensity was probably due to the different thicknesses between the two sections and not to the procyanidins changes at the overripe stage (sections Figure 45A and 46A were thicker than in Figure 45B and 46B).

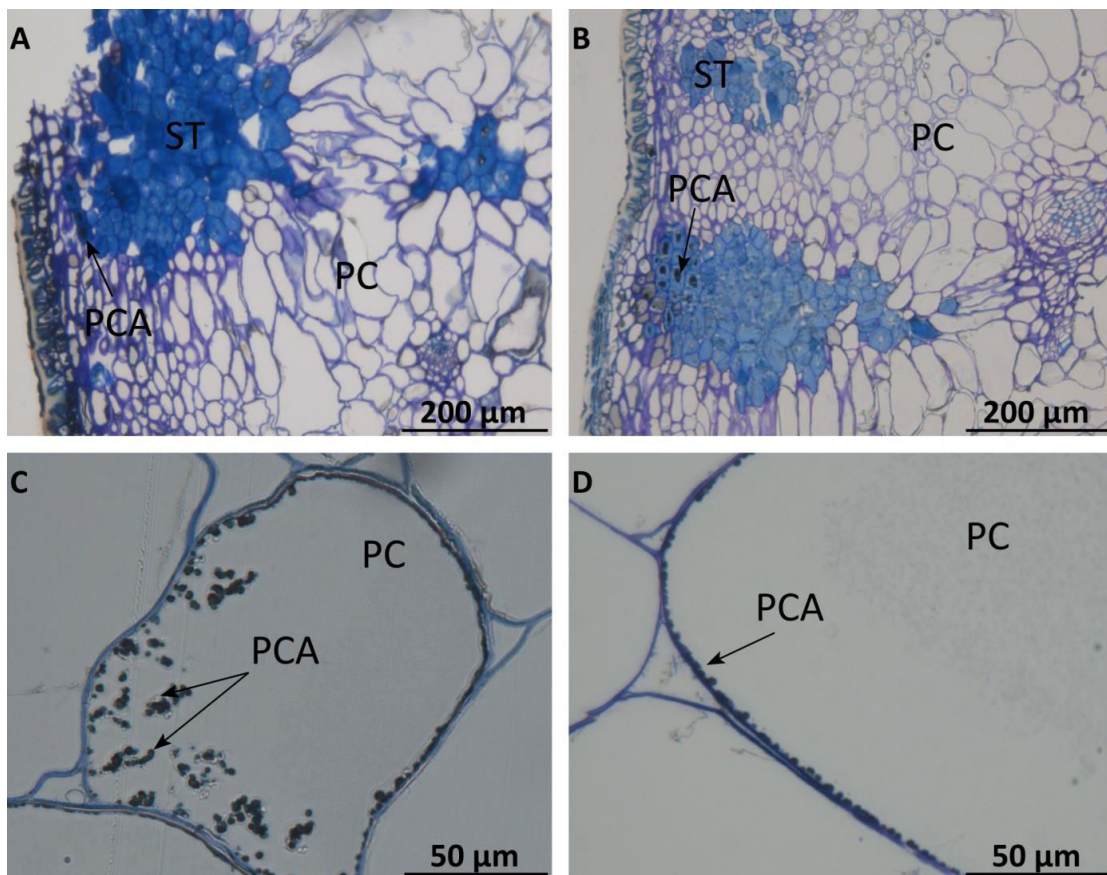


**Figure 46 :** Procyanidins localization with DMACA staining. Light micrographs of ripe (A) and overripe (B) perry pears. ST: stone cells, PC: parenchyma cells

### 3.2. Procyanidins localization by transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was used to visualize procyanidin localization at the subcellular scale. Sections were contrasted with toluidine blue, a general purpose alkaline aniline, commonly recommended for superior photographic documentation of vacuolar polyphenol deposition in semithin sections of glycol-methacrylate-embedded plant tissue (Gutmann, 1995). Sections contrasted with toluidine blue allowed the localization of cells

which contained procyanidins that will be observed by transmission electron microscopy (Figure 48). Light microscopy revealed the presence of some procyanidins in stone cells and differences in distribution depending on cell type. Procyanidins were observed embedded within the lignified stone cells and were related to thickening of secondary cells walls as reported by Choi and Lee (2013) in European and Asian pears cultivars (Figure 47A, 47B). However, in parenchyma cells, procyanidins appeared to be dispersed in the vacuole as uniformly stained deposits. Procyanidin dispersion, especially in parenchyma cells, varied depending on maturity stage (Figures 47C, 47D).



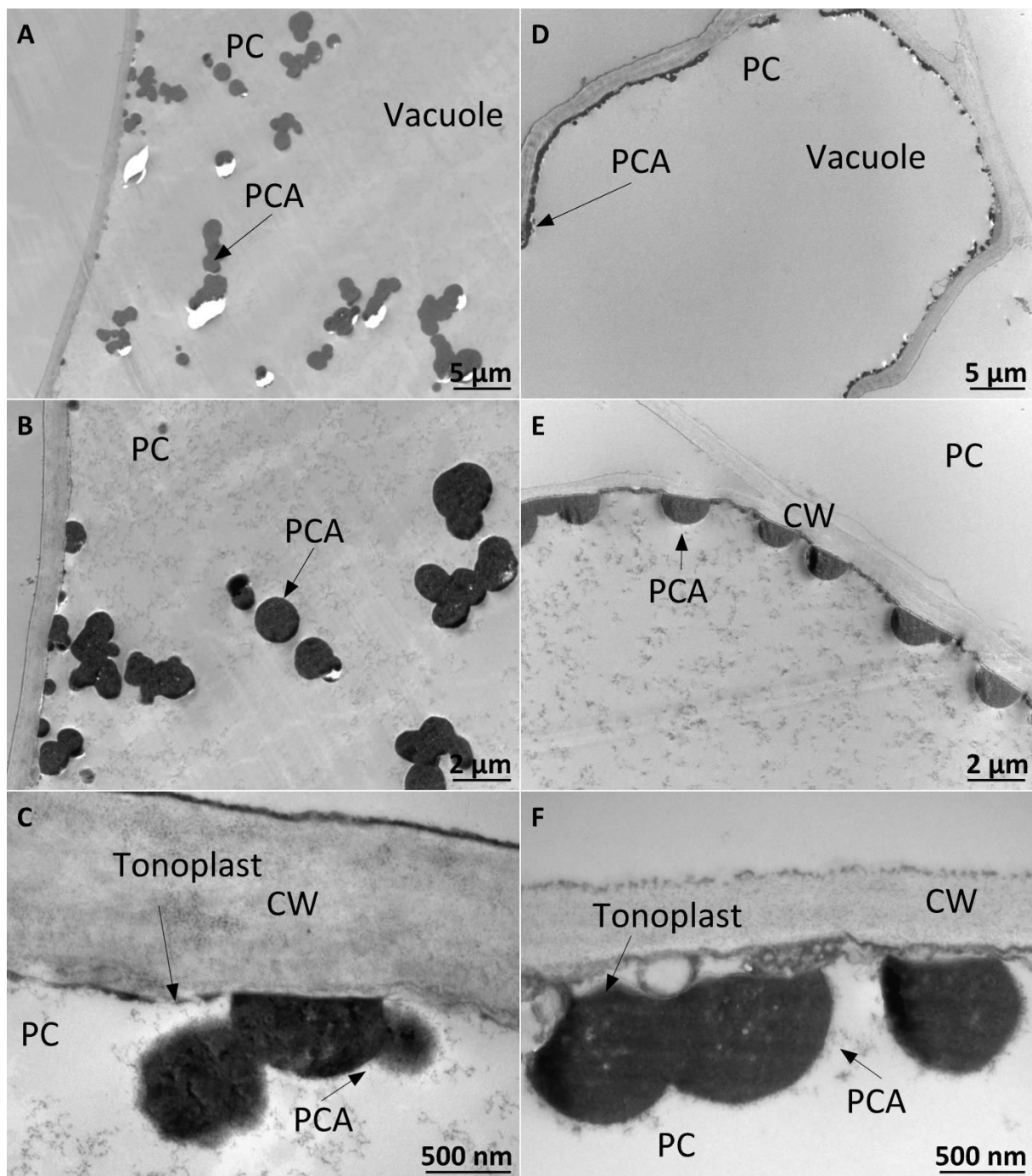
**Figure 47 :** Light micrographs of semi thin sections contrasted with toluidine blue from ripe (A, C) and overripe pear flesh (B, D) use to locate procyanidins before transmission electron microscopy. ST: stone cells, PC: parenchyma cells, PCA: procyanidins.

Electron dense precipitates were visible mainly in the vacuoles of very large parenchyma cells after treatment of samples by osmium tetroxide. Perry pear procyanidins were present as extremely dense granular units. The form and dimensions of procyanidins deposits were highly variable. Procyanidins have been detected in transmission electron microscopy as entirely osmiophilic spheres without apparent internal structural and they were indifferently described as vacuolar aggregates, accretions or tannins vesicles (Lees *et al.*,

1995; Parham & Kaustinen, 1977; Rao, 1988). Recently, the localization of procyanidins in chlorophyllous tissues of tracheophyte species was investigated (Brillouet, 2015; Brillouet *et al.*, 2014; Brillouet *et al.*, 2013) suggesting that procyanidins are polymerized in a new chloroplast-derived organelle, names the tannosome as observed in grape and in dates (Brillouet *et al.*, 2014; Hammouda *et al.*, 2014).

Overripening seemed to change the dispersion of procyanidins accretions in parenchyma cells. At the ripe stage, the vacuolar procyanidin accretions remained free and dispersed inside the vacuole, although some were associated to the tonoplast (Figure 48A, B, C). However, at the overripe stage the vacuolar procyanidins seemed to migrate to the tonoplast, the membrane that separates the cytoplasm from the vacuole lumen (Zhang *et al.*, 2015), and forming a continuous deposit extremely dense to electrons (Figure 48 D, E, F). No procyanidins localized in cell walls were detected, contrary to those reported by Amrani and Mercierz (1994) in grape, who detected the presence of three types of condensed tannins differentially located in grape berry : free tannins in the vacuole, tannins linked to the proteins at the internal face of the tonoplast and tannins linked to the cell walls. The binding between condensed tannins and the tonoplast could be explained by the high affinity of these molecules for proteins, in particular proteins from the tonoplast (Amrani & Mercierz, 1994), or to fusion of the tannosome membranes with the tonoplast.

Nevertheless, as showing in our previous studies, overripening promoted cell wall-procyanidin interactions and procyanidin concentrations in pear juice from overripe fruit was lower than juice from ripe fruit. Whereas, fruit procyanidin concentrations were the same. Highly polymerized procyanidins remained adsorbed to cell walls (Brahem *et al.*, 2016). This phenomenon was explained by cell wall modifications at overripe stage where the degradation of pectic side chains facilitates procyanidin access to cell walls. The particular behavior of procyanidins in overripe pears which were specifically organized near to cell walls, might promoted their adsorption cell walls-procyanidins when cells will be disrupted during fruit senescence or processing but more investigations should be done in particular about the choice of maturity stage. As perspectives of this works, different stage of ripening fruits could be observed in order to better understand structure and localization of the procyanidin pool in the fruit during growing and maturation.



**Figure 48 :** Transmission electron micrographs from ripe (A, B, C) and overripe pear flesh (D ,E, F) observed at different magnification. ST: stone cells, PC: parenchyma cells, PCA: procyanidins, CW: cell walls.

#### 4. Conclusion

The combination of different methods used in this work to characterize perry pear procyanidins showed that maturity stage affected only their localization within the vacuole of parenchyma cells mostly located in fruit mesocarp. These results are consistent with our

quantitative characterization in which no difference of procyanidin compositions was detected between ripe and overripe stage. However, the specifically organization of perry pear procyanidins in overripe pears might promote their interaction with cell wall when the tonoplast will be breakdown at later ripening stage or during processing.

## **5. Acknowledgments**

The authors thank Régis Aubry (Clécy, France) for the supply of pears. Marwa Brahem was supported by a PhD grant from the Ministry of Education and Scientific Research of Tunisia



## *Conclusions & perspectives*





## Conclusions & perspectives

La paroi et les procyanidines, initialement localisées dans deux compartiments différents, peuvent interagir suite à une déstructuration des tissus. L'association entre les procyanidines et les parois joue un rôle essentiel dans la régulation du pool phénolique de certains produits alimentaires ainsi que de leurs caractéristiques organoleptiques (Renard *et al.*, 2001).

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est de justifier l'utilisation empirique des poires surmatures par les producteurs de poiré et d'étudier l'impact de l'état de maturité des fruits sur la quantité de procyanidines disponibles dans les produits alimentaires (cas du jus de poire). La maturité pourrait intervenir en modifiant la structure et/ou la composition de la paroi végétale et/ou celles des procyanidines et par conséquent modifier les caractéristiques de l'association paroi-procyanidines.

Pour répondre à cet objectif il a fallu :

- 1) caractériser la composition phénolique des poires à poiré et la comparer avec d'autres variétés de poires à la fois dans l'épiderme et le parenchyme.
- 2) extraire et caractériser les procyanidines en prenant comme modèle d'étude la variété 'De Cloche' à deux stades de maturité : fruits mûrs et fruits surmatures.
- 3) extraire et caractériser la paroi végétale de la même variété, aux mêmes stades de maturité et à partir des tissus caractéristiques de la poire à savoir le parenchyme, les cellules parenchymateuses, les cellules pierreuses et l'épiderme.
- 4) mettre en interactions les procyanidines et la paroi végétale en suspension modèle afin d'évaluer l'effet de l'état de maturité et du type de paroi sur les caractéristiques de l'association procyanidines-parois. Pour ce faire, différentes méthodes complémentaires ont été utilisées : les isothermes de Langmuir et la calorimétrie à titration isotherme
- 5) valider les résultats obtenus sur un modèle réel : pressage de jus de poires à deux stades de maturité.
- 6) localiser les procyanidines dans le parenchyme des poires mûres et surmatures.

🍏 L'analyse phénolique de plusieurs variétés de poires, a montré que ce fruit est riche en polyphénols et particulièrement en procyanidines. La plupart des travaux antérieurs ont négligé la présence de ces composés du fait de la non utilisation de méthodes de dosage spécifiques (Amiot *et al.*, 1992; Cui *et al.*, 2005; Galvis Sánchez *et al.*, 2003; Lin & Harnly, 2008). Les teneurs en procyanidines peuvent être remarquablement élevées, notamment dans les poires à poiré, et atteindre des concentrations de l'ordre de 8 g/kg MF dans le parenchyme ou dans l'épiderme. Les procyanidines de poires sont essentiellement constituées de (-)-épicatechine comme les procyanidines de pommes (Guyot *et al.*, 2002a). Les procyanidines de poires à poiré sont aussi caractérisées par un degré de polymérisation élevé, notamment dans le parenchyme, pouvant atteindre 58 ('Plant De Blanc'). Le profil phénolique des poires à poiré renferme des acides phénoliques représentés principalement par les acides hydroxycinnamiques (acide 5'-cafféoylquinique) et des flavonols qui sont concentrés dans l'épiderme.

🍏 Les procyanidines extraites et purifiées à partir de la variété 'De Cloche' à deux stades de maturité distincts (poires mûrs et poires surmatures) ne montrent pas de différences de composition. Leur degré de polymérisation et la distribution de leurs masses molaires restent stables entre ces deux stades de maturité. Ainsi, la surmaturation des poires (après 10 jours de stockage) n'a pas d'impact sur les procyanidines, contrairement à ce qui a été observé sur des extraits hydro-acétoniques de la variété de pomme 'Avrolles'. Le degré de polymérisation de leurs procyanidines a diminué légèrement après 6 semaine de stockage ce qui se traduit sur les chromatogrammes de distribution de la masse molaire par une perte de la fraction hautement polymérisée (Le Bourvellec *et al.*, 2006).

🍏 La paroi des poires présente plus de variabilité et d'hétérogénéité. Ceci est en premier lieu lié à l'hétérogénéité intrinsèque de la chair du fruit qui est constituée de deux types de cellules : les cellules parenchymateuses et les cellules pierreuses. Les parois ont été extraites à partir des divers tissus, parenchyme total, cellules pierreuses, cellules parenchymateuses et épiderme, des poires mûres et des poires surmatures afin de caractériser leur composition et l'impact de la maturité. Ainsi, les parois des cellules parenchymateuses ainsi que du parenchyme total sont plutôt riches en acide galacturonique, arabinose, rhamnose, galactose et par conséquent en composé pectiques. Les parois des cellules pierreuses et de l'épiderme sont quant à elles riches en glucose, xylose, lignine et donc en hémicelluloses et cellulose.

Des extractions séquentielles des polysides pariétaux (pectines, hémicelluloses et cellulose) ont été ensuite réalisées dans le but d'étudier l'évolution de la paroi de poires avec la surmaturation. Le stade de maturité (la surmaturation) a principalement un impact sur la structure des pectines, les fractions hémicellulosiques et cellulosiques semblent moins affectées par la surmaturation. Dans les fruits surmatures, le rapport (arabinose + galactose)/rhamnose diminue significativement indiquant la dégradation des chaînes latérales pectiques principalement dans le parenchyme et les cellules parenchymateuses. De plus, la surface spécifique des parois varie considérablement en fonction du stade de maturité et de type de paroi. Les surfaces spécifiques des parois de l'épiderme et de cellules parenchymateuses restent stables lors de la surmaturation alors qu'une augmentation a été notée dans le cas des parois du parenchyme total. En revanche, la surface spécifique des parois de cellules pierreuses a diminué fortement dans les fruits surmatures probablement en raison d'une lignification des tissus.

***Ainsi, la surmaturation a modifié la paroi végétale mais pas les procyanidines. Les changements susceptibles de se produire au cours de la formation du complexe procyanidines-parois pourraient donc être liés à l'évolution de la paroi végétale.***

🍏 En suspension modèle, les interactions entre les parois et les procyanidines varient en fonction du type parois et du stade de maturité. La quantité de procyanidines fixées sur la paroi augmente dans l'ordre suivant : cellules parenchymateuses > parenchyme totale > cellules pierreuses > épiderme. Ce résultat est dû à la richesse des parois des cellules parenchymateuses et du parenchyme en composés pectiques. Il a également été montré que la modification de la paroi par une extraction sélective des pectines de pommes hautement méthylées (Le Bourvellec *et al.*, 2012) ou par un traitement enzymatique (Renard *et al.*, 2001) ou par une extraction de la fraction pectique des parois de raisins par un agent chélatant (Ruiz-Garcia *et al.*, 2014) diminue l'adsorption des proanthocyanidines par la paroi. Néanmoins, une forte capacité de liaison de la fraction hémicellulosique demeure, bien qu'inférieure à celle observée lorsque les pectines sont présentes (Le Bourvellec *et al.* 2012, Ruiz-Garcia *et al.*, 2014). De même, l'utilisation d'isothermes d'adsorption avec des polysides modèles indique que l'affinité des procyanidines est la plus forte vis-à-vis des pectines, suivie par les xyloglucanes et est la plus faible pour la cellulose (Le Bourvellec & Renard, 2005). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Watrelot *et al.*, 2013 qui ont montré que les associations les plus fortes sont obtenues entre les procyanidines et les pectines les plus méthylées (DM des parois des poires >76). Outre l'impact du type de parois,

il a été montré que ces dernières sont sélectives pour les procyanidines hautement polymérisées comme déjà montré (Bindon & Kennedy, 2011; Le Bourvellec *et al.*, 2005; Le Bourvellec *et al.*, 2004a; Le Bourvellec & Renard, 2005; Renard *et al.*, 2001; Watrelot *et al.*, 2013).

L'utilisation d'isothermes d'adsorption et de la calorimétrie à titration isotherme permet d'investiguer de manière plus approfondie les interactions entre les parois et les procyanidines. Les isothermes d'adsorption montrent d'une part que la quantité de procyanidines fixées sur les parois augmente avec leur concentration en solution et d'autre part, que la constante d'affinité ( $K_L$ ) ainsi que la quantité de procyanidines fixées  $N_{max}$  varient avec la surmaturation. L'affinité la plus élevée est enregistrée pour les parois des cellules parenchymateuses et du parenchyme total. Ainsi, l'élimination des chaînes latérales pectiques, les chaînes d'arabinanes et de galactanes, connues comme limitant l'adsorption des procyanidines (Watrelot *et al.*, 2014), au cours de la surmaturation favorise les interactions entre les procyanidines et les parois.

L'expression des constantes de Langmuir en fonction de la surface spécifique de la paroi permet de mettre en évidence que l'association entre les parois et les procyanidines est un phénomène complexe régulé à la fois par la composition chimique mais également par l'aspect physique de la paroi. Une partie de procyanidines fixées sur la paroi peut ne pas être liée directement à cette dernière mais à d'autres procyanidines du fait de leur capacité d'auto-association. Ce phénomène est principalement observé dans le cas des parois de cellules pierreuses où la réduction de la surface spécifique est accompagnée par une augmentation significative de la quantité de procyanidines adsorbées.

La calorimétrie à titration isotherme (ITC) permet d'obtenir des informations complémentaires sur la constante d'affinité et notamment sur la contribution enthalpique et entropique de l'association parois-procyanidines. Bien que les affinités soient en limite de sensibilité pour cette méthode, l'ITC a confirmé la présence de fortes affinités entre les parois des cellules parenchymateuses et du parenchyme total vis-à-vis des procyanidines. Les associations établies entre les parois de l'épiderme et des cellules pierreuses avec les procyanidines ne sont pas exploitables en terme de chaleur dégagée ce qui pourrait être dû à la faible affinité de ces parois vis-à-vis des procyanidines. L'association entre les parois et les procyanidines est régit principalement dans le cas des fruits mûrs par des liaisons hydrogènes. Cependant, dans le cas des parois des cellules parenchymateuses extraites à partir de fruits

surmaturation, l'interaction est dominée par des interactions hydrophobes (une entropie positive). On peut supposer que l'élimination des chaînes latérales pectiques lors de la surmaturation permettrait un accès plus facile aux groupements méthyles des pectines responsables de ces interactions hydrophobes (WatreLOT *et al.*, 2013). Ainsi la surmaturation des fruits modifierait le caractère hydrophile/hydrophobe des parois.

🍏 Le pressage de poires à poiré par l'Institut Français des Productions Cidricoles sous conditions non oxydantes, a montré que la concentration en procyanidines dans le jus dépend fortement du stade de maturité des fruits. Ainsi, des teneurs plus faibles en procyanidines dans le jus sont obtenues lorsque les fruits sont surmatures. Le transfert des procyanidines apparaît donc limité par la formation spontanée d'adduits non covalents entre ces composés et la paroi végétale lorsque les fruits sont surmatures. En revanche, les teneurs en acides phénoliques et en flavonols des jus ne varient pas au cours de la surmaturation.

Cette complexation est favorisée principalement par l'évolution de la paroi à la surmaturation mais elle pourrait être déjà initiée dans le fruit en raison d'une rupture de la membrane vacuolaire provoquée par la surmaturation.

🍏 Pour valider cette hypothèse, des observations en microscopie électronique ont été réalisées. Il apparaît ainsi que les procyanidines sont localisées dans la vacuole et ne sont pas liées à la paroi comme dans le cas des raisins (Armani & Mercierz, 1994). Au cours de la surmaturation du fruit, une migration des procyanidines, initialement dispersées dans la vacuole, vers la membrane vacuolaire est observée. Cette proximité physique entre les procyanidines et la paroi végétale pourrait faciliter leur mise en contact au cours de la déstructuration du fruit lors de la mise en place de procédés de transformation.

🍏 Finalement, ces résultats apportent des explications aux observations empiriques des transformateurs de poires à poiré qui effectuent traditionnellement le pressage des fruits lorsque ces derniers ont atteint un stade de maturité avancé (poires blettes). Les jus sont par conséquent moins concentrés en procyanidines ce qui permet de minimiser les problèmes liés à l'astringence excessive et l'instabilité colloïdale du poiré au cours du stockage. Le producteur de poiré a donc la possibilité de contrôler la teneur en polyphénols dans les jus en contrôlant l'état de maturation des fruits.

🍏 Néanmoins des analyses complémentaires s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre l'évolution de certaines caractéristiques (la porosité et l'évolution de la membrane vacuolaire) qui semblent avoir un rôle important dans l'établissement des associations entre les procyanidines et les parois. La variation de la porosité pourrait être contrôlée en prenant si possible des stades de maturité encore plus avancés ou plus variables, exemple des poires vertes, des poires mûres et des poires surmatures. L'utilisation de la calorimétrie à titration isotherme sur des parois ayant différentes surfaces spécifiques pourrait être utile pour la détermination du mécanisme d'association parois-procyandines au cours du développement du fruit.

🍏 La microscopie semble être un outil complémentaire pour ce genre d'analyse en la combinant à d'autres techniques comme l'immunomarquage des pectines pour établir si l'association entre les procyanidines et les pectines pourrait avoir lieu *in situ* au moment de la surmaturation et afin de mieux localiser les procyanidines liées à la paroi. Un marquage spécifique des chaînes latérales d'arabinanes et de galactanes, connues comme facteur limitant des interactions parois-procyanidines, pourrait être aussi appliqué si possible pour localiser leur disposition en fonction de la surmaturation.

L'application de la microscopie sur des coupes plus fines obtenues à partir d'autres fruits ayant une structure plus homogène (cas des pommes à cidres par exemple) permettrait la possibilité d'observer le comportement des procyanidines vis-à-vis de la paroi végétale. Ces observations pourraient être appliquées au cours du développement du fruit et à la maturation de manière à observer d'une manière générale l'évolution du pool phénolique du fruit en complémentarité aux dosages biochimiques.



## *Références bibliographiques*



## Références bibliographiques

Abeynayake, S. W., Panter, S., Mouradov, A., & Spangenberg, G. (2011). A high-resolution method for the localization of proanthocyanidins in plant tissues. *Plant Methods*, 7(1), 13.

Abu-Reidah, I. M., Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Arráez-Román, D., & Segura-Carretero, A. (2015). HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*, 166, 179-191.

Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.-A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigné, C., & Rémésy, C. (2002). The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition*, 132(7), 1962-1968.

AGREST. (2016). <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/saa2016sdT6bspca.pdf> (25/11/2016).

AGRIMER. (2016). <http://www.franceagrimer.fr/content/download/12350/86804/file/BILAN%20CAMPAGNE%20POIRE%20v%20finale.pdf> (25/11/2016).

Ahmed, A. E., & Labavitch, J. M. (1980). Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit I. Cell wall changes in ripening Bartlett pears. *Plant Physiology* 65(5), 1009-1013.

Alberti, A., dos Santos, T. P. M., Zielinski, A. A. F., dos Santos, C. M. E., Braga, C. M., Demiate, I. M., & Nogueira, A. (2016). Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 436-443.

Alcalde-Eon, C., García-Estévez, I., Ferreras-Charro, R., Rivas-Gonzalo, J., Ferrer-Gallego, R., & Escribano-Bailón, M. (2014). Adding oenological tannin vs. overripe grapes: Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 34(1), 99-113.

Almeida, D., Gomes, M., & Pintado, M. (2009). Polysaccharide composition of dietary fiber and cell walls from Rocha pear at two ripening stages. *III International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables-FAVHEALTH 2009* (Vol. 1040, pp. 23-29): Acta Hort.

Amiot, M., Aubert, S., & Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple and pear cultivars at maturity. *Physiological Basis of Postharvest Technologies*, 67-69.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. Y., & Oleszek, W. (1995). Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1132-1137.

Amrani, J., & Mercierz, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, 33, 133-138.



- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. New York: CRC Press. 1199 pp.
- Andreotti, C., Costa, G., & Treutter, D. (2006). Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and the environment. *Scientia Horticulturae*, 109(2), 130-137.
- Appeldoorn, M. M., Vincken, J.-P., Aura, A.-M., Hollman, P. C., & Gruppen, H. (2009). Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3, 4-dihydroxyphenyl) acetic acid and 5-(3, 4-dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1084-1092.
- Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 79-104.
- Aura, A. M., Mattila, I., Hyötyläinen, T., Gopalacharyulu, P., Cheynier, V., Souquet, J.-M., Bes, M., Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Orešič, M. (2013). Characterization of microbial metabolism of Syrah grape products in an *in vitro* colon model using targeted and non-targeted analytical approaches. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 833-846.
- Bar-Peled, M., Urbanowicz, B. R., & O'Neill, M. A. (2012). The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II—insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Current Challenges in Plant Cell Walls*, 3(92), 85-96.
- Barnell, H., & Barnell, E. (1945). Studies in Tropical Fruits: XVI. The Distribution of Tannins within the Banana and the Changes in their Condition and Amount during Ripening. *Annals of Botany*, 9(33), 77-99.
- Baron-Epel, O., Gharyal, P. K., & Schindler, M. (1988). Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta*, 175(3), 389-395.
- Barroca, M. J., Guiné, R. P. F., Pinto, A., Gonçalves, F. M., & Ferreira, D. M. S. (2006). Chemical and microbiological characterization of portuguese varieties of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 84(2), 109-113.
- Barros, L., Dueñas, M., Pinela, J., Carvalho, A. M., Buelga, C. S., & Ferreira, I. C. (2012). Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(3), 229-234.
- Bartley, I. M., & Knee, M. (1982). The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chemistry*, 9(1), 47-58.
- Bate-Smith, E. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 58(371), 95-173.
- Batisse, C., Fils-Lycaon, B., & Buret, M. (1994). Pectin changes in ripening cherry fruit. *Journal of Food Science*, 59(2), 389-393.
- Bautista-Ortín, A. B., Ben Abdallah, R., Castro-López, L. d. R., Jiménez-Martínez, M. D., & Gómez-Plaza, E. (2016). Technological implications of modifying the extent of cell Wall-

- proanthocyanidin interactions using enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), 123.
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, 152, 558-565.
- Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M. G. C., & Aura, A.-M. (2008). Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition*, 47(8), 442-452.
- Ben-Arie, R., Kislev, N., & Frenkel, C. (1979). Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiology* 64(2), 197-202.
- Bertrand, D., Courcoux, P., Autran, J. C., Meritan, R., & Robert, P. (1990). Stepwise canonical discriminant analysis of continuous digitalized signals: Application to chromatograms of wheat proteins. *Journal of Chemometrics*, 4(6), 413-427.
- Bindon, K., Kassara, S., & Smith, P. (2017). Towards a model of grape tannin extraction under wine-like conditions: the role of suspended mesocarp material and anthocyanin concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(1), 22-32.
- Bindon, K. A., Bacic, A., & Kennedy, J. A. (2012). Tissue-specific and developmental modifications of grape cell walls influence the adsorption of proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9249-9260.
- Bindon, K. A., & Kennedy, J. A. (2011). Ripening-Induced Changes in Grape Skin Proanthocyanidins Modify Their Interaction with Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2696-2707.
- Bindon, K. A., Madani, S. H., Pendleton, P., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2014). Factors affecting skin tannin extractability in ripening grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(5), 1130-1141.
- Bindon, K. A., & Smith, P. A. (2013). Comparison of the affinity and selectivity of insoluble fibres and commercial proteins for wine proanthocyanidins. *Food Chemistry*, 136(2), 917-928.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., Holt, H., & Kennedy, J. A. (2010a). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 2. Implications for vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10736-10746.
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010b). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2520-2528.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 484-489.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519-546.

- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452.
- Box, G. E., Hunter, W. G., & Hunter, J. S. (1978). *Statistics for experimenters, an introduction to design, data analysis and model building*. USA, John Wiley & Sons. 352pp.
- Brahem, M., Eder, S., Renard, C. M. G. C., Loonis, M., & Le Bourvellec, C. (2016). Effect of maturity on the phenolic compositions of pear juice and cell wall effects on procyanidins transfer. *LWT-Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.09.009>  
(in press).
- Brahem, M., Renard, C. M., Gouble, B., Bureau, S., & Le Bourvellec, C. (2017a). Characterization of tissue specific differences in cell wall polysaccharides of ripe and overripe pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 156, 152-164.
- Brahem, M., Renard, C. M. G. C., Eder, S., Loonis, M., Ouni, R., Mars, M., & Le Bourvellec, C. (2017b). Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Research International*.
- Brillouet, J.-M. (2015). On the role of chloroplasts in the polymerization of tannins in Tracheophyta: a monograph. *American Journal of Plant Sciences*, 6(09), 1401.
- Brillouet, J.-M., Romieu, C., Lartaud, M., Jublanc, E., Torregrosa, L., & Cazevieille, C. (2014). Formation of vacuolar tannin deposits in the chlorophyllous organs of Tracheophyta: from shuttles to accretions. *Protoplasma*, 251(6), 1387-1393.
- Brillouet, J.-M., Romieu, C., Schoefs, B., Solymosi, K., Cheynier, V., Fulcrand, H., Verdeil, J.-L., & Conéjéro, G. (2013). The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of botany*, mct168.
- Brini, W., Mars, M., & Hormaza, J. I. (2008). Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 115(4), 337-341.
- Brown, R. M., Saxena, I. M., & Kudlicka, K. (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*, 1(5), 149-156.
- Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103-119.
- Brummell, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitch, J. M. (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany*, 55(405), 2029-2039.
- Bujor, O.-C., Le Bourvellec, C., Volf, I., Popa, V. I., & Dufour, C. (2016). Seasonal variations of the phenolic constituents in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves, stems and fruits, and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 213, 58-68.
- Bureau, S., Ścibisz, I., Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. (2012). Effect of sample preparation on the measurement of sugars, organic acids, and polyphenols in apple fruit by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3551-3563.

- Cadot, Y., Miñana-Castelló, M. T., & Chevalier, M. (2006). Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9206-9215.
- Cai, Y., Li, G., Nie, J., Lin, Y., Nie, F., Zhang, J., & Xu, Y. (2010). Study of the structure and biosynthetic pathway of lignin in stone cells of pear. *Scientia Horticulturae*, 125(3), 374-379.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., & Delmer, D. P. (1979). Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, 205(4411), 1144-1147.
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8936-8944.
- Ceccarelli, D., Simeone, A. M., Nota, P., Piazza, M. G., Fideghelli, C., & Caboni, E. (2016). Phenolic compounds (hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols, flavonols) profile in fruit of Italian peach varieties. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-6.
- Chanforan, C., Loonis, M., Mora, N., Caris-Veyrat, C., & Dufour, C. (2012). The impact of industrial processing on health-beneficial tomato microconstituents. *Food Chemistry*, 134(4), 1786-1795.
- Chen, J., Wang, Z., Wu, J., Wang, Q., & Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chemistry*, 104(1), 268-275.
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Cheyrier, V., Owe, C., & Rigaud, J. (1988). Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science*, 53(6), 1729-1732.
- Choi, J.-H., Choi, J.-J., Hong, K.-H., Kim, W.-S., & Lee, S.-H. (2007). Cultivar differences of stone cells in pear flesh and their effects on fruit quality. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 48(1), 27-31.
- Choi, J.-H., & Lee, S.-H. (2013). Distribution of stone cell in Asian, Chinese, and European pear fruit and its morphological changes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86(1), 185-189.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1118-1125.

- Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1998). Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 37(3), 241-248.
- Coimbra, M. A., Barros, A., Rutledge, D. N., & Delgadillo, I. (1999). FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. *Carbohydrate Research*, 317(1), 145-154.
- Collin, S., & Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Paris: Éd. Tec & Doc. 337pp.
- Cordella, C. B. Y., & Bertrand, D. (2014). SAISIR: a new general chemometric toolbox. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54, 75-82.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850-861.
- Crookes, P. R., & Grierson, D. (1983). Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiology*, 72(4), 1088-1093.
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467.
- CTIFL. (2016). <http://www.ctifl.fr/Pages/Activites/FicheProgramme> (30/11/2016). France
- Cui, T., Nakamura, K., Ma, L., Li, J.-Z., & Kayahara, H. (2005). Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 3882-3887.
- De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., & Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 445-459.
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81(4), 503-509.
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.
- De Freitas, V. A., Glories, Y., & Monique, A. (2000). Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 397-403.
- De Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331-5337.
- De Vries, J., Den Uijl, C., Voragen, A., Rombouts, F., & Pilnik, W. (1983). Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 3(3), 193-205.

- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*(14), 1818-1892.
- Del Río, J. C., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Ibarra, D., Santos, J. I., Jiménez-Barbero, J., Zhang, L., & Martínez, Á. T. (2008). Highly Acylated (Acetylated and/or *p*-Coumaroylated) Native Lignins from Diverse Herbaceous Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(20), 9525-9534.
- Del Rocío Castro-López, L., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., & Bautista-Ortín, A. B. (2016). Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin–cell wall adsorption–desorption phenomena. *Food Chemistry*, *196*, 526-532.
- Dibuz, E. (1997). Sclereid formation in the flowers and fruits of pears. *VII International Symposium on Pear Growing 475* (pp. 317-326).
- Dick, A. J., & Labavitch, J. M. (1989). Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit IV. Characterization of the pectic polysaccharides solubilized during softening of Bartlett pear fruit. *Plant Physiology*, *89*(4), 1394-1400.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.
- Durkee, A., Johnston, F., Thivierge, P., & Poapst, P. (1968). Arbutin and a related glucoside in immature pear fruit. *Journal of Food Science*, *33*(5), 461-463.
- Edelmann, A., Diewok, J., Schuster, K. C., & Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(3), 1139-1145.
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(12), 2512-2518.
- Englyst, H., Wiggins, H., & Cummings, J. (1982). Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, *107*(1272), 307-318.
- Es-Safi, N.-E., Guyot, S., & Ducrot, P.-H. (2006). NMR, ESI/MS, and MALDI-TOF/MS analysis of pear juice polymeric proanthocyanidins with potent free radical scavenging activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(19), 6969-6977.
- Escarpa, A., & Gonzalez, M. (2000). Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars. *Chromatographia*, *51*(1-2), 37-43.
- FAOSTAT. (2016). <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC> (13/07/2017).
- Fasoli, M., Dell'Anna, R., Dal Santo, S., Balestrini, R., Sanson, A., Pezzotti, M., Monti, F., & Zenoni, S. (2016). Pectins, Hemicelluloses and Celluloses Show Specific Dynamics in the

Internal and External Surfaces of Grape Berry Skin During Ripening. *Plant and Cell Physiology*, pcw080.

Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., & Rosselló, C. (1998). Developmental and ripening-related effects on the cell wall of apricot (*Prunus armeniaca*) fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 487-493.

Fernandez de Simon, B., Perez-Ilzarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C., & Estrella, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1531-1535.

Fernández, K., & Agosin, E. (2007). Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7294-7300.

Ferreira, D., Barros, A., Coimbra, M., & Delgadillo, I. (2001). Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun-dried pear. *Carbohydrate Polymers*, 45(2), 175-182.

Ferreira, D., da Silva, J. A. L., Pinto, G., Santos, C., Delgadillo, I., & Coimbra, M. A. (2008). Effect of sun-drying on microstructure and texture of S. Bartolomeu pears (*Pyrus communis* L.). *European Food Research and Technology*, 226(6), 1545-1552.

Ferreira, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, C. M. G. C., & Coimbra, M. A. (2002). Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4537-4544.

Feucht, W., Schmid, P., & Christ, E. (1986). Distribution of flavanols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology*, 125(1-2), 1-8.

Fischer, M., Arrigoni, E., & Amadò, R. (1994). Changes in the pectic substances of apples during development and postharvest ripening. Part 2: Analysis of the pectic fractions. *Carbohydrate Polymers*, 25(3), 167-175.

Fischer, R. L., & Bennett, A. B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 42(1), 675-703.

Foo, L. Y. (1981). Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry*, 20(6), 1397-1402.

Foo, L. Y., & Lu, Y. (1999). Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry*, 64(4), 511-518.

Fragoso, S., Acena, L., Guasch, J., Mestres, M., & Busto, O. (2011). Quantification of phenolic compounds during red winemaking using FT-MIR spectroscopy and PLS-regression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10795-10802.

Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 490-495.

- Fry, S. C. (1988). *The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis*. New York: Longman Group Limited. 333pp.
- Gagné, S., Saucier, C., & Gény, L. (2006). Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9465-9471.
- Galvis Sánchez, A. C., Gil-Izquierdo, A., & Gil, M. I. (2003). Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(10), 995-1003.
- Gardner, R. (1975). Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology*, 50(5), 315-317.
- Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., & Glories, Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8051-8054.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- GIFruits. (2016). <http://gifruits.com/?p=2053&lang=fr> (25/11/2016).
- Gille, S., & Pauly, M. (2012). O-acetylation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 3, 9.
- Gómez-Plaza, E., Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Muñoz, R. (2017). Effect of elicitors on the evolution of grape phenolic compounds during the ripening period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 977-983.
- Goulao, L., & Oliveira, C. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 4-25.
- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Mérillon, J., & Ramawat, K. G. (2012). Secondary metabolites and plant defence. *Plant Defence: Biological Control* (pp. 109-138): Springer Netherlands. .
- Guerrero, R. I. F., Smith, P., & Bindon, K. A. (2013). Application of insoluble fibers in the fining of wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(18), 4424-4432.
- Gutmann, M. (1995). Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy*, 179(3), 277-281.
- Guyot, S., Doco, T., Souquet, J.-M., Moutounet, M., & Drilleau, J.-F. (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44(2), 351-357.
- Guyot, S., Le Bourvellec, C., Marnet, N., & Drilleau, J.-F. (2002a). Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *LWT-Food Science and Technology*, 35(3), 289-291.



Guyot, S., Marnet, N., & Drilleau, J.-F. (2001). Thiolysis-HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 14-20.

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). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1698-1705.

Guyot, S., Marnet, N., Le Bourvellec, C., & Drilleau, J.-F. (2002b). Highly polymerised procyanidins in fruits and juices of perry pear (*Pyrus communis*) varieties. *Polyphenols Communications 2002*, 463-464.

Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., & Drilleau, J.-F. (2003). Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6240-6247.

Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1981). The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4494-4497.

Hamauzu, Y., Yasui, H., Inno, T., Kume, C., & Omanyuda, M. (2005). Phenolic profile, antioxidant property, and anti-influenza viral activity of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and apple (*Malus domestica* Mill.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 928-934.

Hammouda, H., Alvarado, C., Bouchet, B., Kalthoum-Chérif, J., Trabelsi-Ayadi, M., & Guyot, S. (2014). Tissue and Cellular Localization of Tannins in Tunisian Dates (*Phoenix dactylifera* L.) by Light and Transmission Electron Microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6650-6654.

Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 173-188.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Hart, D. A., & Kindel, P. K. (1970). Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of *Lemna minor*. *Biochemical Journal*, 116(4), 569-579.

Hart, J. H. (1981). Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 19(1), 437-458.

Haslam, E. (1998). *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge: Cambridge University Press. 412 pp.

Hayashi, T. (1989). Xyloglucans in the primary cell wall. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1), 139-168.

Hemingway, R. W. (1989). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. *Chemistry and significance of condensed tannins* (pp. 83-107). New York: Springer USA.

- Heredia-Guerrero, J. A., Benítez, J. J., Domínguez, E., Bayer, I. S., Cingolani, R., Athanassioua, A., & Herediac, A. (2016). Infrared spectroscopy as a tool to study plant cuticles. *Spectroscopy Europe*, 28(2), 10-13.
- Herrmann, K. (1976). Flavonols and flavones in food plants. *International Journal of Food Science & Technology*, 11(5), 433-448.
- Hiwasa, K., Nakano, R., Hashimoto, A., Matsuzaki, M., Murayama, H., Inaba, A., & Kubo, Y. (2004). European, Chinese and Japanese pear fruits exhibit differential softening characteristics during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2281-2290.
- Hopkins, W. G. (2003). *Physiologie végétale*. Bruxelles: De Boeck Supérieur. 495pp.
- Houben, K., Jolie, R. P., Fraeye, I., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2011). Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1105-1111.
- Hu, Z.-M., Zhou, Q., Lei, T.-C., Ding, S.-F., & Xu, S.-Z. (2009). Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of Dermatological Science*, 55(3), 179-184.
- Hudina, M., & Stampar, F. (2005). The correlation of the pear (*Pyrus communis* L.) cv. 'Williams' yield quality to the foliar nutrition and water regime. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85(2), 179-185.
- Hudina, M., & Štampar, F. (2000). Sugars and organic acids contents of European *Pyrus communis* L. and Asian *Pyrus serotina* r Rehd. pear cultivars. *Acta alimentaria*, 29(3), 217-230.
- Huisman, M. M., Brüll, L. P., Thomas-Oates, J. E., Haverkamp, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. (2001). The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*, 330(1), 103-114.
- IFPC. (2016). <http://www.ifpc.eu/>.
- Jackson, J. E. (2003). *The biology of apples and pears*. New York: Cambridge University Press. 485 pp.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jensen, J. S., Egebo, M., & Meyer, A. S. (2008). Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3493-3499.
- Jermyn, M., & Isherwood, F. (1956). Changes in the cell wall of the pear during ripening. *Biochemical Journal*, 64(1), 123.

- Jiménez-Escrig, A. (2014). Dietary Fiber and Its Polyphenol Cotravelers in Healthy Eating: Seeking the Key Component in Apple Fruit. *Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition* (pp. 31-44): CRC Press.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., & Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195-203.
- Kačuráková, M., & Wilson, R. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44(4), 291-303.
- Kalisz, S., Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2015). Increased content of phenolic compounds in pear leaves after infection by the pear rust pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 113-119.
- Kärkäs, M. D., Matsuura, B. S., Monos, T. M., Magallanes, G., & Stephenson, C. R. (2016). Transition-metal catalyzed valorization of lignin: the key to a sustainable carbon-neutral future. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(6), 1853-1914.
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5348-5355.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740-1746.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77-85.
- Kennedy, J. A., & Taylor, A. W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 995(1), 99-107.
- Kolniak-Ostek, J. (2016a). Chemical composition and antioxidant capacity of different anatomical parts of pear (*Pyrus communis* L.). *Food Chemistry*, 203, 491-497.
- Kolniak-Ostek, J. (2016b). Content of bioactive compounds and antioxidant capacity in skin tissues of pear. *Journal of Functional Foods*, 23, 40-51.
- Kolniak-Ostek, J. (2016c). Identification and quantification of polyphenolic compounds in ten pear cultivars by UPLC-PDA-Q/TOF-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 65-77.
- Kosmala, M., Milala, J., Kołodziejczyk, K., Markowski, J., Mieszczakowska, M., Ginies, C., & Renard, C. M. G. C. (2009). Characterization of cell wall polysaccharides of cherry (*Prunus cerasus* var. Schattenmorelle) fruit and pomace. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 279-285.
- Kosmala, M., Milala, J., Kołodziejczyk, K., Markowski, J., Zbrzeźniak, M., & Renard, C. M. G. C. (2013). Dietary fiber and cell wall polysaccharides from plum (*Prunus domestica* L.) fruit, juice and pomace: Comparison of composition and functional properties for three plum varieties. *Food Research International*, 54(2), 1787-1794.

Kroon-Batenburg, L., & Kroon, J. (1997). The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate Journal*, 14(5), 677-690.

Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit-and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176, 82-90.

Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361-1403.

Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1725(1), 10-18.

Le Bourvellec, C., Bouzerzour, K., Ginies, C., Regis, S., Plé, Y., & Renard, C. M. G. C. (2011). Phenolic and polysaccharidic composition of applesauce is close to that of apple flesh. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4), 537-547.

Le Bourvellec, C., Bureau, S., Renard, C. M. G. C., Plenet, D., Gautier, H., Touloumet, L., Girard, T., & Simon, S. (2015). Cultivar and Year Rather than Agricultural Practices Affect Primary and Secondary Metabolites in Apple Fruit. *PLoS one*, 10(11), e0141916.

Le Bourvellec, C., Gouble, B., Bureau, S., Loonis, M., Plé, Y., & Renard, C. M. G. C. (2013). Pink Discoloration of Canned Pears: Role of Procyanidin Chemical Depolymerization and Procyanidin/Cell Wall Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(27), 6679-6692.

Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. C. (2004a). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material: Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1672(3), 192-202.

Le Bourvellec, C., Guyot, S., & Renard, C. M. G. C. (2009). Interactions between apple (*Malus x domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 75(2), 251-261.

Le Bourvellec, C., Le Quéré, J.-M., & Renard, C. M. G. C. (2007). Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: studies in model suspensions and application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7896-7904.

Le Bourvellec, C., Le Quéré, J.-M., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., & Guyot, S. (2004b). Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 122-130.

Le Bourvellec, C., Picot, M., & Renard, C. (2006). Size-exclusion chromatography of procyanidins: Comparison between apple and grape procyanidins and application to the characterization of fractions of high degrees of polymerization. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 33-43.

- Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1725(1), 1-9.
- Le Bourvellec, C., Watrelot, A. A., Ginies, C., Imberty, A., & Renard, C. M. G. C. (2012). Impact of Processing on the Noncovalent Interactions between Procyanidin and Apple Cell Wall. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(37), 9484-9494.
- Le Goff, A., Renard, C. M. G. C., Bonnin, E., & Thibault, J. F. (2001). Extraction, purification and chemical characterisation of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 325-334.
- Lea, A. G., & Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478-483.
- Lea, A. G., & Timberlake, C. F. (1974). The phenolics of ciders. 1. Procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(12), 1537-1545.
- Lea, A. G., & Timberlake, C. F. (1978). The phenolics of ciders: Effect of processing conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 484-492.
- Lee, C. B., & Lawless, H. T. (1991). Time-course of astringent sensations. *Chemical Senses*, 16(3), 225-238.
- Lees, G. L., Suttill, N. H., Wall, K. M., & Beveridge, T. H. (1995). Localization of condensed tannins in apple fruit peel, pulp, and seeds. *Canadian Journal of Botany*, 73(12), 1897-1904.
- Li, S., Bindon, K. A., Bastian, S. E. P., Jiranek, V., & Wilkinson, K. L. (2017). Use of Winemaking Supplements to Modify the Composition and Sensory Properties of Shiraz Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(7), 1353-1364.
- Li, X., Wang, T., Zhou, B., Gao, W., Cao, J., & Huang, L. (2014). Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp.). *Food Chemistry*, 152, 531-538.
- Li, X., Zhang, J.-Y., Gao, W.-Y., Wang, Y., Wang, H.-Y., Cao, J.-G., & Huang, L.-Q. (2012). Chemical composition and anti-inflammatory and antioxidant activities of eight pear cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8738-8744.
- Li, Y. G., Tanner, G., & Larkin, P. (1996). The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 89-101.
- Lin, L.-Z., & Harnly, J. M. (2008). Phenolic compounds and chromatographic profiles of pear skins (*Pyrus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9094-9101.
- Liu, D., Martinez-Sanz, M., Lopez-Sanchez, P., Gilbert, E. P., & Gidley, M. J. (2017). Adsorption behaviour of polyphenols on cellulose is affected by processing history. *Food Hydrocolloids*, 63, 496-507.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

- Marcelin, O., Saulnier, L., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1993a). Reexamination of composition and physico-chemical characteristics of water-soluble pectic substances from guava (*Psidium guajava* L.). *Carbohydrate Research*, 242, 315-321.
- Marcelin, O., Williams, P., & Brillouet, J.-M. (1993b). Isolation and characterisation of the two main cell-wall types from guava (*Psidium guajava* L.) pulp. *Carbohydrate Research*, 240, 233-243.
- Margalef, M., Pons, Z., Muguerza, B. a., & Arola-Arnal, A. (2014). A Rapid Method to Determine Colonic Microbial Metabolites Derived from Grape Flavanols in Rat Plasma by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7698-7706.
- Markham, K. R., Gould, K. S., & Ryan, K. G. (2001). Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. *Phytochemistry*, 58(3), 403-413.
- Martin-Cabrejas, M. A., Waldron, K. W., & Selvendran, R. R. (1994a). Cell Wall Changes in Spanish Pear During Ripening. *Journal of Plant Physiology*, 144(4), 541-548.
- Martin-Cabrejas, M. A., Waldron, K. W., Selvendran, R. R., Parker, M. L., & Moates, G. K. (1994b). Ripening related changes in the cell walls of Spanish pear (*Pyrus communis*). *Physiologia Plantarum*, 91(4), 671-679.
- Maury, C., Sarni-Manchado, P., Poinssaut, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2016). Influence of polysaccharides and glycerol on proanthocyanidin precipitation by protein fining agents. *Food Hydrocolloids*, 60, 598-605.
- McCartney, L., Ormerod, A. P., Gidley, M. J., & Knox, J. P. (2000). Temporal and spatial regulation of pectic (1→4)-β-D-galactan in cell walls of developing pea cotyledons: implications for mechanical properties. *The Plant Journal*, 22(2), 105-113.
- McKee, L. H., & Latner, T. (2000). Underutilized sources of dietary fiber: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(4), 285-304.
- McManus, J. P., Davis, K. G., Beart, J. E., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(9), 1429-1438.
- McMurrough, I., & McDowell, J. (1978). Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Analytical Biochemistry*, 91(1), 92-100.
- McNeil, M., Darvill, A. G., Fry, S. C., & Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625-663.
- Mihalev, K., Schieber, A., Mollov, P., & Carle, R. (2004). Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(24), 7306-7310.

- Mosel, H. D., & Herrmann, K. (1974). Changes in catechins and hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(3), 251-256.
- Murayama, H., Katsumata, T., Endou, H., Fukushima, T., & Sakurai, N. (2006). Effect of storage period on the molecular-mass distribution profile of pectic and hemicellulosic polysaccharides in pears. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 141-148.
- Nachit, M., & Feucht, W. (1983). Inheritance of phenolic compounds, indoles and growth vigour in *Prunus* crosses (Cherries). *Zeitschrift fur Pflanzenzuchtung= Journal of Plant Breeding*.
- Ncube, E. N., Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A., & Madala, N. E. (2014). Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 66.
- Neves, A. C., Spranger, M. I., Zhao, Y., Leandro, M. C., & Sun, B. (2010). Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics, and antioxidant activity of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11775-11782.
- O'Neill, M. A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1996). Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester in vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22923-22930.
- O'sullivan, A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4(3), 173-207.
- Oleszek, W., Amiot, M. J., & Aubert, S. Y. (1994). Identification of some phenolics in pear fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(6), 1261-1265.
- Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H. A., & Voragen, A. G. (1996). Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp. *Carbohydrate Research*, 288, 143-153.
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(3), 420-428.
- Oszmiański, J., & Wojdyło, A. (2014). Influence of cherry leaf-spot on changes in the content of phenolic compounds in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, 28-34.
- Oszmianski, J., Wolniak, M., Wojdyło, A., & Wawer, I. (2007). Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 573-579.

- Öztürk, A., Demirsoy, L., Demirsoy, H., Asan, A., & Gül, O. (2015). Phenolic compounds and chemical characteristics of pears (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, 18(3), 536-546.
- Pacifico, S., Gallicchio, M., Fiorentino, A., Fischer, A., Meyer, U., & Stintzing, F. C. (2012). Antioxidant properties and cytotoxic effects on human cancer cell lines of aqueous fermented and lipophilic quince (*Cydonia oblonga* Mill.) preparations. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4130-4135.
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarar, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. (2012a). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues—Part 2: Phenolic acids. *Food Chemistry*, 135(4), 2287-2292.
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabarar, D., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2012b). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134(1), 155-161.
- Pal, D., & Sampath Kumar, P. (1995). Changes in the physico-chemical and biochemical compositions of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits during growth, development and ripening. *Journal of Horticultural Science*, 70(4), 569-572.
- Parham, R., & Kaustinen, H. (1977). On the site of tannin synthesis in plant cells. *Botanical Gazette*, 138(4), 465-467.
- Passos, C. P., Cardoso, S. M., Barros, A. S., Silva, C. M., & Coimbra, M. A. (2010). Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerisation. *Analytica Chimica Acta*, 661(2), 143-149.
- Pawar, P. M. A., Derba-Maceluch, M., Chong, S. L., Gómez, L. D., Miedes, E., Banasiak, A., Ratke, C., Gaertner, C., Mouille, G., & McQueen-Mason, S. J. (2016). Expression of fungal acetyl xylan esterase in *Arabidopsis thaliana* improves saccharification of stem lignocellulose. *Plant Biotechnology Journal*, 14(1), 387-397.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123-1128.
- Pérez-Cano, F. J., Massot-Cladera, M., Franch, À., Castellote, C., & Castell, M. (2013). The effects of cocoa on the immune system. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 71.
- Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26(02), 118-129.
- Pérez-Jiménez, J., & Torres, J. L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 12713-12724.
- Perez, S. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1-2), 109-121.



- Pérez, S., Mazeau, K., & du Penhoat, C. H. (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1), 37-55.
- Phan, A. D. T., D'Arcy, B. R., & Gidley, M. J. (2016). Polyphenol–cellulose interactions: effects of pH, temperature and salt. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(1), 203-211.
- Phan, A. D. T., Netzel, G., Wang, D., Flanagan, B. M., D'Arcy, B. R., & Gidley, M. J. (2015). Binding of dietary polyphenols to cellulose: Structural and nutritional aspects. *Food Chemistry*, 171, 388-396.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., & Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 87-91.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36(3), 781-784.
- Qin, G., Tao, S., Cao, Y., Wu, J., Zhang, H., Huang, W., & Zhang, S. (2012). Evaluation of the volatile profile of 33 *Pyrus ussuriensis* cultivars by HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 134(4), 2367-2382.
- Raffo, M. D., Ponce, N. M. A., Sozzi, G. O., Vicente, A. R., & Stortz, C. A. (2011). Compositional Changes in 'Bartlett' Pear (*Pyrus communis* L.) Cell Wall Polysaccharides As Affected by Sunlight Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12155-12162.
- Ralet, M.-C., Dronnet, V., Buchholt, H. C., & Thibault, J.-F. (2001). Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. *Carbohydrate Research*, 336(2), 117-125.
- Rao, K. (1988). Fine structural details of tannin accumulations in non-dividing cambial cells. *Annals of Botany*, 62(6), 575-581.
- Rees, D. (1982). Polysaccharide conformation in solutions and gels—recent results on pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2(4), 254-263.
- Renard, C. M. G. C. (2005a). Effects of conventional boiling on the polyphenols and cell walls of pears. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 310-318.
- Renard, C. M. G. C. (2005b). Variability in cell wall preparations: quantification and comparison of common methods. *Carbohydrate Polymers*, 60(4), 515-522.
- Renard, C. M. G. C., Baron, A., Guyot, S., & Drilleau, J.-F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29(2), 115-125.

- Renard, C. M. G. C., Crépeau, M. J., & Thibault, J. F. (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 566-574.
- Renard, C. M. G. C., Dupont, N., & Guillermin, P. (2007). Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry*, 68(8), 1128-1138.
- Renard, C. M. G. C., & Ginies, C. (2009). Comparison of the cell wall composition for flesh and skin from five different plums. *Food Chemistry*, 114(3), 1042-1049.
- Renard, C. M. G. C., & Jarvis, M. C. (1999). Acetylation and methylation of homogalacturonans 1: optimisation of the reaction and characterisation of the products. *Carbohydrate Polymers*, 39(3), 201-207.
- Renard, C. M. G. C., Le Quéré, J.-M., Bauduin, R., Symoneaux, R., Le Bourvellec, C., & Baron, A. (2011). Modulating polyphenolic composition and organoleptic properties of apple juices by manipulating the pressing conditions. *Food Chemistry*, 124(1), 117-125.
- Renard, C. M. G. C., Voragen, A. G. J., Thibault, J. F., & Pilnik, W. (1991). Studies on apple protopectin V: Structural studies on enzymatically extracted pectins. *Carbohydrate Polymers*, 16(2), 137-154.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 17-23.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., & Mérillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*, 29(11), 1317-1333.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.
- Ruiz-Garcia, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. (2014). Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 114, 102-114.
- Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., & Tomás-Barberán, F. A. (2005). Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9544-9552.
- Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L., & Millett, M. A. (1954). Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry Journal*, 37(8), 336-343.
- Sakamoto, T., & Sakai, T. (1995). Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. *Phytochemistry*, 39(4), 821-823.

- Salta, J., Martins, A., Santos, R.-G., Neng, N.-R., Nogueira, J.-M.-F., Justino, J., & Rauter, A.-P. (2010). Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 153-157.
- Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., & Drilleau, J.-F. (1999). Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4847-4853.
- Santos, J.-R. U., Bakry, F., & Brillouet, J.-M. (2010). A preliminary chemotaxonomic study on the condensed tannins of green banana flesh in the *Musa* genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 1010-1017.
- Saura-Calixto, F. (2010). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43-49.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Plant Biology*, 61(1), 263.
- Schieber, A., Keller, P., & Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910(2), 265-273.
- Schols, H. A., Bakx, E. J., Schipper, D., & Voragen, A. G. J. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279, 265-279.
- Schols, H. A., & Voragen, A. G. (1994). Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256(1), 83-95.
- Serra, A., Macia, A., Romero, M.-P., Valls, J., Bladé, C., Arola, L., & Motilva, M.-J. (2010). Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition*, 103(07), 944-952.
- Silva, G., Souza, T. M., Barbieri, R. L., & Costa de Oliveira, A. (2014). Origin, domestication, and dispersing of pear (*Pyrus* spp.). *Advances in Agriculture*, 2014.
- Simirgiotis, M. J., Quispe, C., Bórquez, J., Areche, C., & Sepúlveda, B. (2016). Fast Detection of Phenolic Compounds in Extracts of Easter Pears (*Pyrus communis*) from the Atacama Desert by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC–Q/Orbitrap/MS/MS). *Molecules*, 21(1), 92.
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Fujita, S., & Kojima, T. (2000). Relationship between the texture and pectin constituents of Japanese pear. *Journal of texture studies*, 31(6), 679-690.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Kwiecień, I., Gołdyn, A., & Pietraszek, J. (2017). HPLC-DAD analysis of arbutin produced from hydroquinone in a biotransformation process in *Origanum majorana* L. shoot culture. *Phytochemistry Letters*.

- Smith, P., McRae, J., & Bindon, K. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(S1), 601-614.
- Spanos, G. A., & Wrolstad, R. E. (1990). Influence of variety, maturity, processing and storage on the phenolic composition of pear juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 817-824.
- Sterling, C. (1954). Sclereid development and the texture of Bartlett pears. *Journal of Food Science*, 19(1-6), 433-443.
- Stumpf, W., Conn, P. M., & Preiss, J. (2012). *The biochemistry of plants: Carbohydrates*. London: Academic Press. 529 pp.
- Sugawara, T., & Igarashi, K. (2013). Variation in Polyphenol Components and Radical Scavenging Activity of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehder var. *culta* Rehder) during Fruit Maturation. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology*, 60(9), 516-520.
- Symoneaux, R., Chollet, S., Bauduin, R., Le Quéré, J., & Baron, A. (2014). Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 2): Degree of polymerization and interactions with the matrix components. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 28-34.
- Symoneaux, R., Chollet, S., Patron, C., Bauduin, R., Le Quéré, J.-M., & Baron, A. (2015). Prediction of sensory characteristics of cider according to their biochemical composition: Use of a central composite design and external validation by cider professionals. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 63-69.
- Syros, T., Yupsanis, T., Zafiriadis, H., & Economou, A. (2004). Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. *Journal of Plant Physiology* 161(1), 69-77.
- Szymanska-Chargot, M., Chylinska, M., Kruk, B., & Zdunek, A. (2015). Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. *Carbohydrate Polymers*, 115, 93-103.
- Taira, S., Ono, M., & Matsumoto, N. (1997). Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), 265-271.
- Tao, S., Khanizadeh, S., Zhang, H., & Zhang, S. (2009). Anatomy, ultrastructure and lignin distribution of stone cells in two *Pyrus* species. *Plant Science*, 176(3), 413-419.
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, M. (1997). Chemistry and uses of pectin—a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(1), 47-73.
- Thibault, J.-F., Renard, C. M., Axelos, M. A., Roger, P., & Crépeau, M.-J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238, 271-286.

- Thompson, R., Jacques, D., Haslam, E., & Tanner, R. (1972). Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1387-1399.
- Timberlake, C., & Bridle, P. (1971). The anthocyanins of apples and pears: the occurrence of acyl derivatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22(10), 509-513.
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., & Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347-6353.
- Turnbull, W. B., & Daranas, A. H. (2003). On the value of  $c$ : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14859-14866.
- Vance, C., Kirk, T., & Sherwood, R. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 18(1), 259-288.
- Vernhet, A., Pellerin, P., Prieur, C., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1996). Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 25-30.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209-217.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564-573.
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 315-323.
- Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G., & Visser, R. G. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132(4), 1781-1789.
- Watrelet, A. A., Le Bourvellec, C., Imbert, A., & Renard, C. M. G. C. (2013). Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules*, 14(3), 709-718.
- Watrelet, A. A., Le Bourvellec, C., Imbert, A., & Renard, C. M. G. C. (2014). Neutral sugar side chains of pectins limit interactions with procyanidins. *Carbohydrate Polymers*, 99, 527-536.

- Watrelot, A. A., Renard, C. M. G. C., & Le Bourvellec, C. (2015). Comparison of microcalorimetry and haze formation to quantify the association of B-type procyanidins to poly-L-proline and bovine serum albumin. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 376-382.
- Watrelot, A. A., Schulz, D. L., & Kennedy, J. A. (2017). Wine polysaccharides influence tannin-protein interactions. *Food Hydrocolloids*, *63*, 571-579.
- Watrelot, A. A., Tran, D. T., Buffeteau, T., Deffieux, D., Le Bourvellec, C., Quideau, S., & Renard, C. M. G. C. (2016). Immobilization of flavan-3-ols onto sensor chips to study their interactions with proteins and pectins by SPR. *Applied Surface Science*, *371*, 512-518.
- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, *104*(S3), S48-S66.
- Wong, D. (2008). Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *The Protein Journal*, *27*(1), 30-42.
- Wu, L., Melton, L. D., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2014). The batch adsorption of the epigallocatechin gallate onto apple pomace. *Food Chemistry*, *160*, 260-265.
- Yamaki, S., Machida, Y., & Kakiuchi, N. (1979). Changes in cell wall polysaccharides and monosaccharides during development and ripening of Japanese pear fruit. *Plant and Cell Physiology*, *20*(2), 311-321.
- Yan, C., Yin, M., Zhang, N., Jin, Q., Fang, Z., Lin, Y., & Cai, Y. (2014). Stone cell distribution and lignin structure in various pear varieties. *Scientia Horticulturae*, *174*, 142-150.
- Ye, J., Jin, J., Liang, H., Lu, J., Du, Y., Zheng, X., & Liang, Y. (2009). Using tea stalk lignocellulose as an adsorbent for separating decaffeinated tea catechins. *Bioresource Technology*, *100*(2), 622-628.
- Yim, S.-H., & Nam, S.-H. (2016). Physiochemical, nutritional and functional characterization of 10 different pear cultivars (*Pyrus* spp.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *89*.
- Yoshioka, H., Aoba, K., & Kashimura, Y. (1992). Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *117*(4), 600-606.
- Zhang, C., Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (2015). Molecular composition of plant vacuoles: important but less understood regulations and roles of tonoplast lipids. *Plants*, *4*(2), 320-333.
- Zhu, W., & Gao, J. (2008). The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *13*, 20-24.
- Zykwinska, A., Rondeau-Mouro, C., Garnier, C., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2006). Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *65*(4), 510-520.

## Abstract

In order to study overripening impact on cell wall–procyanidin interactions, perry pear cell walls and procyanidins were isolated and characterized at ripe and overripe stage. Their associations were quantified using Langmuir isotherms and isothermal titration calorimetry.

Perry pears were rich in procyanidins with high degree of polymerization and their constitutive units were mainly (-)-epicatechin. Cell walls isolated from the whole flesh and parenchyma cells were characterized by extremely methylated pectin and highly branched rhamnogalacturonans whereas cell walls from stone cells and skin were more lignified and rich in hemicelluloses.

Overripening did not modify procyanidin structure and molar mass distribution, but the distribution of the procyanidin-containing aggregates in the vacuoles was modified, from dispersed in ripe pears to close to the tonoplast in overripe pears. Between the ripe and overripe stage, pear cell walls lost pectic side chains, arabinans and galactan, mostly from cell walls isolated from parenchyma cells and the whole flesh.

The affinity between procyanidins and cell walls decreased as follows: parenchyma cells > flesh > stone cells > skin as reported by Langmuir isotherms. The amount of bound procyanidins increased at the overripe stage notably for the cell walls from stone cells and whole flesh. Isothermal titration calorimetry indicated that overripening induced the modification of cell wall binding mechanism especially for parenchyma cells where interactions were driven by hydrophobic interactions.

The increase of procyanidin binding capacity at the overripe stage was confirmed by juice pressing where overripe pear juices were poorer in procyanidins than ripe pear juices whereas fruit procyanidin contents did not change with overripening.

**Key words: *Pyrus communis* L., overripening, procyanidins, pectin, juice**

## Résumé

Afin d'étudier l'impact de la surmaturation des poires sur les interactions parois-procyanidines, les parois et les procyanidines ont été isolées et caractérisées à partir d'une variété de poire à poiré à deux stades de maturité : mûres et surmatures. Leurs associations ont été quantifiées par la méthode des isothermes de Langmuir et par calorimétrie à titration isotherme.

Les poires à poiré sont riches en procyanidines très polymérisées dont les unités constitutives sont principalement constituées de (-)-épicatéchine. Les parois du parenchyme et des cellules parenchymateuses sont principalement constituées de pectines hautement méthylées et ramifiées alors que les parois des cellules pierreuses et de l'épiderme sont plutôt lignifiées et riches en hémicelluloses.

La surmaturation n'induit pas de modification de la composition et ni de la distribution de la masse molaire des procyanidines. Par contre, la distribution des agrégats de procyanidines dans les vacuoles change, de dispersée (poires mûres) à adjacente au tonoplaste (poire surmatures). Entre le stade mûr et surmature, les parois de poire perdent des chaînes latérales pectiques, principalement les chaînes d'arabinanes et de galactanes des parois du parenchyme et des cellules parenchymateuses.

L'affinité des procyanidines vis-à-vis des parois diminue dans l'ordre suivant : cellules parenchymateuses > parenchyme > cellules pierreuses > épiderme d'après les isothermes de Langmuir. La quantité de procyanidines fixées sur les parois augmente avec la surmaturation surtout pour les parois de cellules pierreuses (et le parenchyme total). La calorimétrie à titration isotherme montre que la surmaturation induit également une modification du mécanisme de l'association parois-procyanidines en modifiant la balance hydrophile hydrophobe pour les cellules parenchymateuses.

L'augmentation de la capacité d'adsorption des parois vis-à-vis des procyanidines à la surmaturation a été confirmée par des pressages de jus. Les jus de poires mûres sont plus riches en procyanidines que le jus extraits à partir de poires surmatures alors que la concentration en procyanidines dans les fruits n'a pas changé.

**Mots clés : *Pyrus communis* L., surmaturation, procyanidines, pectine, jus**

