

Données nouvelles sur l'hypoderme et la pulpe des baies normales et des baies millerandées d'une variété de *Vitis vinifera* L., le Merlot noir

par

MONIQUE FOUGÈRE-RIFOT, H. S. PARK et J. BOUARD

Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université Bordeaux I, Talence, France

R é s u m é : De la baie juste nouée jusqu'au stade de la maturité, des changements importants interviennent au niveau des tissus de la paroi carpellaire: hypoderme et pulpe. Les cellules de l'hypoderme ont des parois épaisses et la plupart sont des cellules tanniques. Elles évoluent progressivement en cellules de pulpe, c'est-à-dire en cellules qui deviennent très grandes et non tanniques, et dont les parois s'amincissent considérablement. Les faisceaux vasculaires qui, en début d'évolution, sont situés au milieu de la paroi carpellaire deviennent par le grandissement de la baie des faisceaux périphériques. Ils finissent par être inclus dans la pulpe, et ne marquent donc plus la limite interne de l'hypoderme.

Les baies millerandées grandissent très peu et n'ont pas de pépins. Elles sont caractérisées aussi par l'absence d'individualisation d'une pellicule, l'absence de formation d'une pulpe typique, la répartition des tanins vacuolaires dans toute l'épaisseur de la paroi carpellaire et des faisceaux conducteurs qui ne grandissent pas.

Vitis vinifera L. var. Merlot noir berries. New aspects upon hypodermis and flesh of normal and shot berries

S u m m a r y : From the very young berry, just after ovary fertilization until the stage of maturity, major structural changes occur in the carpellar tissues: hypodermis and flesh (or pulp). Hypodermal cells have thick cell walls and most of them are tannin cells. They evolve gradually in cells of flesh, i. e., in cells which enlarge enormously and are devoid of tannins; their walls thin down considerably. At the beginning of evolution, vascular bundles are in the middle of carpel. During grape growth, vascular bundles become localized in the periphery of the berry. They finish by being included in the flesh, and therefore, they do not mark the internal boundary of the hypodermis.

Shot berries fail to grow and enlarge; they are seedless berries. They are also characterized by the absence of individualization of grape skin, the absence of formation of a typical flesh, the presence of vacuolar tannins in the carpels and no increase of vascular bundles.

K e y w o r d s : *Vitis vinifera*, berry, growth, structure, hypodermis, flesh, vacuolar tannins, morphology.

Introduction

Dans un précédent travail, nous avons décrit des anomalies qui peuvent survenir au cours des premiers stades du développement des ovaires et des ovules et entraîner la coulure, c'est-à-dire empêcher la formation des baies (FOUGÈRE-RIFOT et BOUARD 1992). Dans l'accident connu sous le nom de millerandage, la nouaison se produit, mais la croissance des baies est entravée (FOUGÈRE-RIFOT *et al.* 1994). Ces baies restent petites et dépourvues de pépins. Elles sont fréquentes, à Bordeaux, dans les grappes de Merlot noir et susceptibles d'entraîner une perte de production importante, ainsi qu'une modification de la composition des moûts (RABION *et al.* 1986). En outre, leur structure présente des particularités que nous n'avons pu interpréter qu'après avoir de développement des tissus des baies normales et, plus particulièrement, celui de l'hypoderme et de la pulpe. On considère généralement, à

la suite de BONNET (1903) et VIALA et VERMOREL (1910) que la limite entre ces deux tissus est marquée par les faisceaux libéro-ligneux superficiels et que l'hypoderme est constitué de plusieurs assises cellulaires (VIALA). Cependant, pour CONSIDINE et KNOX (1979), seule la première assise sous-épidermique constitue l'hypoderme, le reste de la paroi carpellaire constituant les mésocarpes externe et interne séparés par un réseau de faisceaux vasculaires.

Matériel et méthodes

A partir du 10 Juin et jusqu'à l'époque des vendanges (25 Septembre), des prélèvements de baies sur des grappes de *Vitis vinifera* L. var. Merlot ont été effectués régulièrement, toutes les semaines, dans une même parcelle du domaine viticole de Couhins (Centre INRA de Bordeaux).

Les échantillons ont été immédiatement disséqués sous une loupe binoculaire, puis fixés par une solution 0,1 M de glutaraldéhyde dans le tampon phosphates de Sørensen à pH 7,2, pendant 90 min à 4 °C. Après plusieurs lavages dans le même tampon, les objets ont été postfixés par une solution de tétroxyde d'osmium dans le même tampon et dans les mêmes conditions. Ils ont ensuite été rincés plusieurs fois et déshydratés par l'alcool éthylique, puis imprégnés et inclus dans une résine époxy (épon). Après polymérisation dans une étuve à 56 °C, ils ont été coupés à l'aide d'un ultramicrotome Reichert.

Les coupes semi-fines ont été soit colorées par le lugol et le bleu de toluidine, soit traitées par le test PAS qui permet de localiser les polysaccharides présentant des fonctions alcools primaires sur le cycle osidique. Ce test colore l'amidon et les polysaccharides pariétaux tels que les pectines, cellulose et hémicelluloses, mais la callose ne peut être mise en évidence par cette technique. Les tanins, du moins ceux qui subsistent après la double fixation aldéhyde-osmium, sont fortement colorés en bleu sombre par le bleu de toluidine et en gris-brun par le PAS. Quant aux parois cellulaires, elles sont bleu clair dans le premier cas et rouge vif dans le deuxième.

Les coupes fines ont été contrastées par le citrate de plomb et l'acétate d'uranyle (REYNOLDS 1963) et observées au Centre de Microscopie électronique de Bordeaux I (microscope JEOL 100S).

Résultats et discussion

1 - L'hypoderme et le parenchyme interne de la paroi carpellaire juste après la nouaison (Fig. 1 et 2): Après la fécondation l'ovaire s'arrondit et, sur une coupe transversale, une très jeune baie de diamètre inférieur à 2 mm apparaît constituée d'une paroi carpellaire prolongée par la columelle, cloison partageant le centre de la baie en deux loges carpellaires biovulées.

La paroi carpellaire est nettement formée de deux zones concentriques emboîtées, d'égale épaisseur (ca. 150 µm chacune) délimitées sur coupe par un cercle de faisceaux vasculaires. La zone externe comprend deux tissus: l'épiderme et l'hypoderme. La zone la plus profonde forme le parenchyme interne de la paroi carpellaire (Fig. 1).

L'épiderme ne comporte qu'une seule assise de cellules régulières, isodiamétriques, surmontée de la cuticule et des écailles de cires épicuticulaires (BESSIS 1972); chaque cellule renferme quelques petites vacuoles à tanins (Fig. 1 et 2).

L'hypoderme est d'abord formé d'environ 10 assises de cellules. Ce nombre passera à environ 15 en 4 jours. Ces cellules sont isodiamétriques, légèrement plus grandes que les cellules épidermiques (15 µm environ), jointives, sans méats, à parois rigides, polysaccharidiques (PAS positives). La plupart renferment une unique et immense vacuole tannique (Fig. 1).

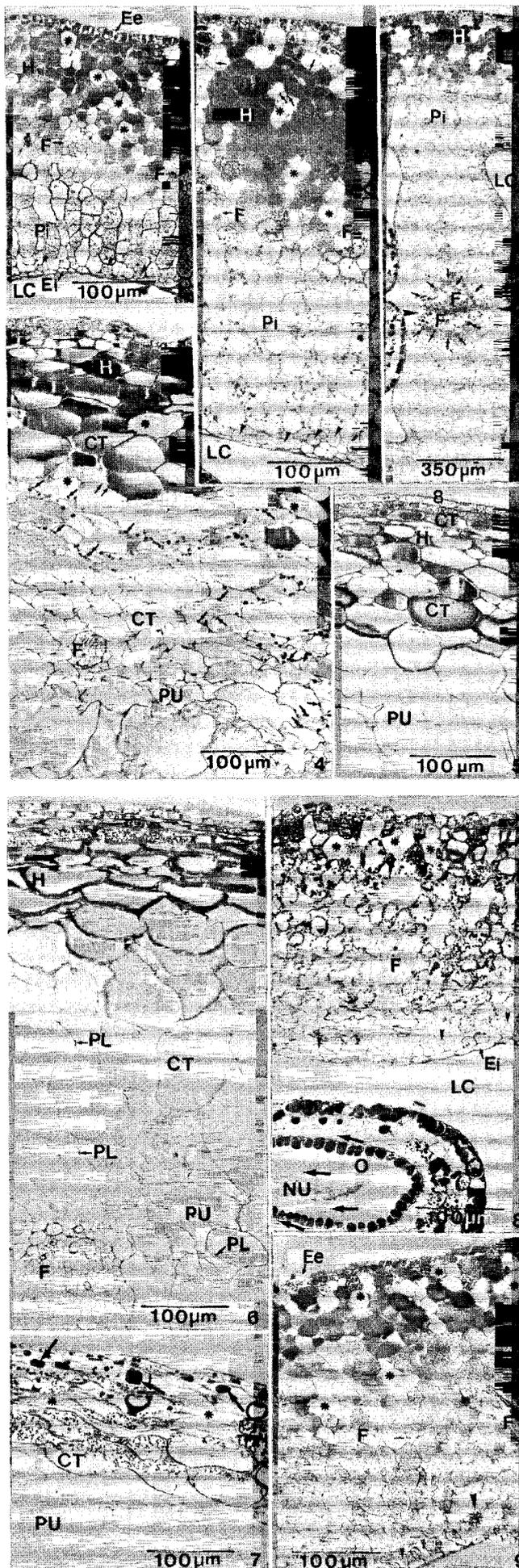
Sur les coupes observées après la double fixation glutaraldéhydrique et osmique, les tanins sont sous forme

Fig. 1-5: 1 - Coupe transversale dans une baie immédiatement après la nouaison. La paroi mesure environ 300 µm d'épaisseur et est partagée en deux par un cercle de faisceaux vasculaires. A l'extérieur, l'hypoderme est formé de cellules riches en tanins vacuolaires, tandis que vers l'intérieur, les cellules du parenchyme interne possèdent des tanins plus dispersés. Remarquer les plages de cellules sans tanins (astérisques) et les macles d'oxalate de calcium (têtes de flèches) dans l'assise cellulaire située sous l'épiderme interne. 2 - Coupe transversale dans une baie nouée prélevée 4 d après celle de la Fig. 1. Comparer les deux tissus séparés par le cercle de faisceaux conducteurs avec ceux de la Fig. 1; remarquer notamment, les changements apparus au niveau des tanins du parenchyme interne et dans la taille des cellules. Des amyloplastés sont présents (flèches). 3 - Coupe transversale au niveau de la columelle dans une baie nouée. Les faisceaux vasculaires columellaires sont cernés par deux demi-manchons de cellules tanniques (flèches). 4 - Coupe transversale dans une baie en croissance. Les cellules tanniques sont concentrées en périphérie. Les faisceaux conducteurs sont au milieu de cellules de pulpe. Remarquer la localisation des amyloplastés (flèches) dans des plages de cellules sans tanins et dans quelques cellules tanniques ainsi que dans des cellules de la pulpe la plus externe. 5 - Coupe transversale dans une baie à l'époque de la véraison. Les cellules d'hypoderme les plus externes s'aplatissent et les tanins vacuolaires sont moins abondants que dans le stade précédent. L'amidon des plastés a disparu.

←: amyloplaste C: cuticule CT: cellule tannique E: épiderme Ee: épiderme externe de la baie Ei: épiderme interne de la baie (= épiderme des loges carpellaires) F: faisceaux vasculaire H: hypoderme LC: loge carpellaire <: macle d'oxalate de calcium N: noyau cellulaire n: nucléole NU: nucelle O: ovule (ou pépin) P: paroi cellulaire Pi: parenchyme interne de la baie *: plage de cellules sans tanins PL: plaste sans amidon PU: pulpe T: tonoplaste VT: vacuole tannique ZN: zone de nécrose cellulaire.

1 - A berry in cross section, just after fruit is set. The fruit wall measures approximately 300 µm thickness and is divided in two by a circle of vascular bundles. Under epidermis, hypodermis is constituted by cells which contain important vacuolar tannins, while more deeply, inner parenchyma cells possess more dispersed tannins. Note: areas of cells without tannins (asterisks) and druses of calcium oxalate (heads of arrows) in the cellular layer situated under inner epidermis. 2 - Cross section of a young berry after fruit is set. This berry was taken 4 d after that of Fig. 1. Compare the two tissues which are separated by the circle of vascular bundles with those seen on Fig. 1; changes appeared in the tannins of the inner parenchyma and in the size of cells. Amyloplasts are present (arrows). 3 - Septum in cross section in a berry after fruit is set. Vascular bundles of the septum are surrounded by two half muffs of tannin cells (arrows). 4 - Cross section of a berry in growth. Tannin cells are concentrated in the periphery. Vascular bundles are in the middle of fleshy cells. Note: the location of amyloplasts (arrows) in areas of tanninless cells and in some tannin cells as well in cells of the most outer flesh. 5 - Cross section of a berry at the time of veraison. Most of the outer hypodermis cells flatten and vacuolar tannins are less abundant than in the preceding stage. Starch has disappeared from plastids.

←: amyloplast C: cuticle CT: tannin cell E: epidermis Ee: outer epidermis of the berry Ei: inner epidermis of the berry (= inner epidermis of carpels) F: vascular bundle H: hypodermis LC: carpellar space <: druse of calcium oxalate N: cell nucleus n: nucleolus NU: nucellus O: ovule (or seed or pip) P: cell wall Pi: inner parenchyma *: area of tanninless cell PL: starchless plastid PU: pulp (= flesh) T: tonoplast VT: tannin vacuole ZN: area of cell necrosis.



de granules, le plus souvent très nombreux et très fins, agglutinés et enfermés dans la vacuole. La concentration en tanins décroît nettement de l'extérieur vers l'intérieur de l'hypoderme (Fig. 1 et 2). D'autres cellules totalement dépourvues de tanins sont regroupées en plages (Fig. 1 et 2, astérisques) qui constituent un réseau irrégulier et anastomosé.

Immédiatement après la fécondation, les cellules de l'hypoderme, qu'elles soient tanniques ou non tanniques, sont presque toutes dépourvues d'amyloplastes (Fig. 1); l'amidon apparaît en quelques jours et, lorsque la baie est nouée, la plupart des cellules de l'hypoderme, avec ou sans tanins, renferment des amyloplastes PAS positifs (Fig. 2, flèches).

Fig. 6-9: 6 - Coupe transversale dans une baie à l'époque de la véraison. L'opposition entre les cellules de l'hypoderme et celles de la pulpe est très nette. La couche d'hypoderme devient de plus en plus mince; les cellules s'aplatissent dans le sens tangentiel tandis que les cellules les plus profondes évoluent en cellules de pulpe; les faisceaux vasculaires sont dans la pulpe. 7 - Coupe transversale dans une baie à maturité. Les cellules de l'hypoderme poursuivent leur aplatissage et renferment de moins en moins de tanins vacuolaires. Il subsiste des plages de cellules sans tanins (astérisques). 8 - Coupe transversale dans une baie millerandée à l'époque de la véraison. Remarquer: l'épaisseur modeste de la paroi carpellaire comparée à celle de la baie juste nouée de la Fig. 1 au même grandissement; la répartition des tanins vacuolaires dans l'ensemble de la paroi carpellaire; l'absence d'une pulpe typique (déjà normalement formée au même stade: voir Fig. 6 au même grandissement); les restes des ovules non évolués en pépins: nucelle racorni et téguments ovulaires décollés du nucelle et décollés entre eux (cf. FOUGÈRE-RIFOT *et al.* 1993 b). 9 - Coupe transversale dans une baie millerandée à maturité. La paroi carpellaire a peu grandi; les tanins vacuolaires sont présents dans toute l'épaisseur de la paroi carpellaire. Il subsiste des plages de cellules sans tanins (astérisques); les macles d'oxalate de calcium sont présents (têtes de flèches) mais moins nombreux que dans une baie normale. Des dégâts cellulaires sont à noter (grande tête de flèche). - Abréviations et symboles voir Fig. 1-5.

6 - Cross section of a berry at the time of veraison. A clear-cut opposition is seen between hypodermal cells and those of the flesh. Hypodermal layer becomes more and more thin; cells flatten tangentialwise while the deepest cells evolve in fleshy cells; vascular bundles are located in the flesh. 7 - Mature berry in cross section. Hypodermal cells continue their flattening and contain fewer and fewer vacuolar tannins. It subsists areas of tanninless cells (asterisks). 8 - Cross section of a shot berry at the time of veraison. Note: the thinnest of the carpellar wall compared to that of the just set berry as seen in the Fig. 1, at the same magnification; the distribution of the vacuolar tannins in the whole carpellar wall; the absence of a typical flesh (in the ordinary course, the flesh is already formed: see Fig. 6, at the same magnification); the remains of the ovules which are not developed into seeds: stunted nucellus and ovular integuments unstuck from nucellus and unstuck between them (cf. FOUGÈRE-RIFOT *et al.* 1973 b). 9 - Cross section of a mature berry. The carpellar wall has grown little; vacuolar tannins are present in all its thickness. It subsists areas of cells without tannins (asterisks); druses of calcium oxalate are present (arrowheads) but they are less numerous than in a normal berry. Cellular damages are to be noted (great arrowhead). - Abbreviations and symbols see Fig. 1-5.

Du côté interne, l'hypoderme se termine, sur les coupes, par un cercle d'environ 30 petits faisceaux conducteurs assez régulièrement disposés (Fig. 1 et 2).

Le parenchyme interne, occupe toute la partie interne de la paroi carpellaire, située à l'intérieur du cercle des faisceaux conducteurs; il est constitué de cellules sans amyloplastés et dont les parois et l'agencement ressemblent à ceux de l'hypoderme. Ses cellules sont nettement plus pauvres en tanins vacuolaires que celles de l'hypoderme, et les tanins se présentent sous forme de gros granules de plus en plus gros avec le temps (Comparer les Fig. 1 et 2).

La dernière assise cellulaire (épiderme interne ou épiderme des loges carpellaires) est formée de cellules plates, non tanniques, à cuticule épaisse. Des macles en oursin d'oxalate de calcium caractérisent les cellules de l'assise sous-épidermique (Fig. 1 et 2, têtes de flèches).

La paroi carpellaire grandit très vite: en 4 jours, son épaisseur passe de 300 (Fig. 1) à 500 μm (Fig. 2).

Le parenchyme interne de la paroi carpellaire se poursuit dans la columelle (Fig. 3). Cette dernière, composée de deux demi-cloisons qui s'affrontent (grande tête de flèche) dans l'axe de la jeune baie au niveau d'un complexe de faisceaux conducteurs, a la même organisation cellulaire que le parenchyme interne; elle est formée de cellule jointives, sans amyloplastés, pauvres en tanins, sauf dans l'axe de la baie où des cellules tanniques sont rassemblées en deux demi-manchons autour des faisceaux conducteurs columellaires.

Les deux loges carpellaires contiennent chacune deux ovules dont l'insertion est située à la base des loges et la vascularisation assurée par un faisceau funiculaire dérivé des faisceaux conducteurs columellaires. A ce stade du développement, la baie ne comporte généralement plus qu'un ou deux ovules sains fécondés aptes à évoluer en pépins, les autres sont en cours de dégénérescence plus ou moins avancée (BOUARD 1978; FOUGÈRE-RIFOT et BOUARD 1992; FOUGÈRE-RIFOT *et al.* 1993 a).

Au total, la paroi carpellaire de la baie juste nouée comprend deux tissus concentriques nettement séparés par une trentaine de faisceaux vasculaires. Les tanins sont rassemblés dans les tissus les plus externes, épiderme et surtout hypoderme. La région la plus interne de la paroi ainsi que la columelle sont des parenchymes nettement plus pauvres en tanins.

2 - L'hypoderme et la pulpe pendant la phase de croissance de la baie (Fig 4): La phase de croissance s'étend de la nouaison à la véraison, c'est-à-dire environ du 15 Juin au 15 Août. La croissance de la baie est très rapide: le diamètre de la jeune baie passe progressivement de 1 ou 2 mm après la nouaison à, parfois, 14 mm au début de la véraison. Cette croissance s'accompagne de bouleversements internes décelables à l'échelle cellulaire et de transformations plus spectaculaires, notamment la formation d'une pulpe emballant les faisceaux conducteurs.

La paroi carpellaire accentue sa différenciation; les phénomènes les plus importants concernent l'hypoderme.

L'hypoderme devient une strate de 15-20 cellules légèrement aplaties dans le sens tangentiel, plus grandes que les cellules épidermiques (environ 50 à 100 μm de long), jointives, sans méats, à parois épaissies et rigides. Les tanins vacuolaires sont à l'état soit de granules très nombreux et très fins (Fig. 12), soit de granules beaucoup plus gros (Fig. 13). Comme pour le stade précédent, la teneur en tanins décroît de l'extérieur de la baie vers la zone des faisceaux vasculaires (Fig. 4).

Alors que le nombre de cellules séparant l'épiderme externe du cercle de faisceaux conducteurs augmente légèrement et que la taille des cellules augmente considérablement, le nombre de cellules tanniques ne cesse de diminuer et passe de 12 à 15 après la nouaison à 6 ou 8 en fin de croissance.

Comme pour le stade précédent, il existe des plages de cellules sans tanins mais, seules les cellules les plus profondes contiennent encore des amyloplastés, les plus proches de l'épiderme en étant dépourvues (Fig. 4).

La double origine des cellules de la pulpe et les transformations de cellules d'hypoderme en cellules de pulpe: Les assises les plus internes de l'hypoderme évoluent lentement: les parois cellulaires s'amincissent, deviennent souples mais restent polysaccharidiques: les cellules perdent progressivement les attributs caractéristiques des cellules d'hypoderme, c'est-à-dire des parois épaisses et des vacuoles tanniques dans la plupart des cellules, pour ressembler de plus en plus à celles de la pulpe qui se constitue à partir du parenchyme interne. De ce fait, les faisceaux conducteurs ne constituent plus la limite interne de l'hypoderme, mais sont intégrés dans un tissu dont les cellules deviennent pendant la croissance de la baie des cellules de pulpe. Près des faisceaux, des amyloplastés (PAS positifs) sont encore présents essentiellement dans les cellules sans tanins (Fig. 4, flèches). Pour différents auteurs, amidon et tanins ne sont pas compatibles dans une même cellule (SORAUER 1915; MOLISCH 1921; DEBRAUX 1951), cependant, dans les stades jeunes de la baie et jusqu'à la fin de sa croissance, cette "incompatibilité" ne paraît pas être une règle absolue (Fig. 4).

Le parenchyme interne, situé à l'intérieur du cercle des faisceaux vasculaires, évolue en pulpe. Le nombre des cellules augmente. La pulpe devient un tissu composé de grandes cellules (100 à 200 μm), largement vacuolisées, sans tanins et dépourvues d'amyloplastés, aux parois remarquablement fines et souples. A proximité des loges carpellaires, les cellules atteignent 300 ou 400 μm . L'épiderme interne s'aplatit et est toujours souligné par les cellules à macle d'oxalate de calcium de l'assise sous-épidermique.

Au total, durant la phase de croissance de la baie de Merlot, il se produit un grandissement de la baie dû en grande partie au grandissement cellulaire et pour une part plus modeste à la multiplication cellulaire. Les points essentiels sont la réduction du nombre des cellules tanniques et surtout la formation d'une pulpe aux dépens des couches profondes de l'hypoderme et du parenchyme

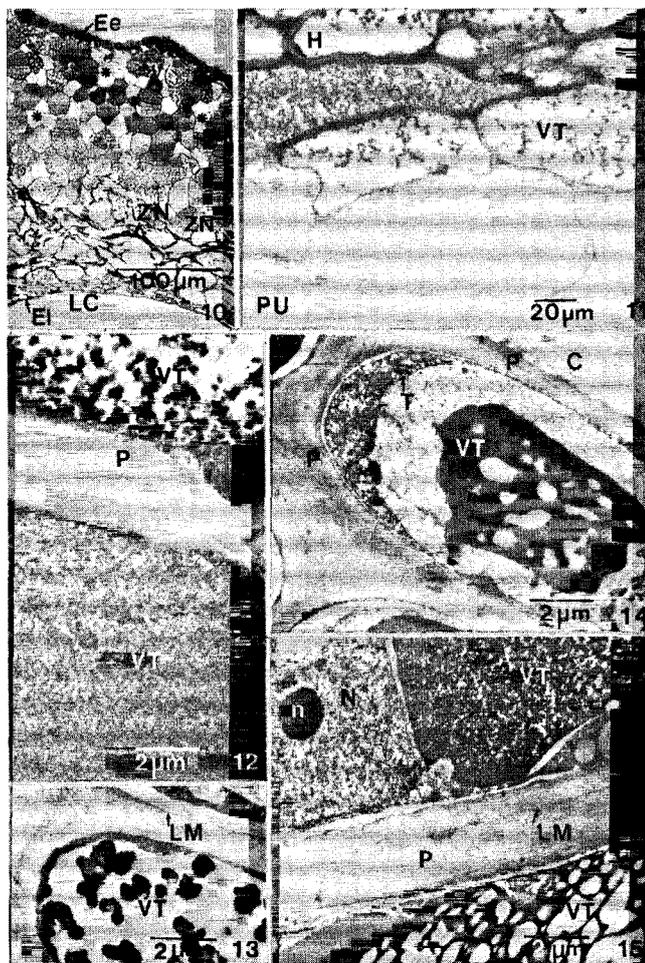


Fig. 10-15: **10** - Coupe transversale dans une baie millerandée à l'époque de la maturité. Remarquer la présence d'importantes zones de nécroses cellulaires entraînant des tassements tissulaires. Des plages de cellules sans tanins (astérisques) sont toujours présentes ainsi que les macles d'oxalate de calcium (têtes de flèches). **11** - Coupe transversale dans une baie à développement normal à l'époque de la véraison. Zone de passage progressif des caractères de cellules d'hypoderme à ceux de cellules de pulpe: les parois cellulaires sont de plus en plus minces et les tanins vacuolaires de plus en plus fins jusqu'à finir par disparaître. **12** et **13** - Microscopie Electronique à Transmission (MET). Coupes transversales dans une baie en phase de croissance. Les cellules de l'hypoderme ont d'énormes vacuoles tanniques d'aspect très différent d'une cellule à l'autre. Les parois cellulaires sont particulièrement épaisses. **14** - MET. Coupe transversale dans une baie proche de la maturité. Secteur de cellule épidermique dont les tanins forment d'énormes agrégats au sein des vacuoles. Les parois cellulaires sont très épaisses. **15** - MET. Coupe transversale dans une baie proche de la maturité. Certaines cellules ont une charge tannique très importante; les tanins vacuolaires présentent des aspects différents d'une cellule à l'autre. Les cellules sont encore vivantes (membranes nucléaires apparentes) mais présentent des signes de vieillissement (cytoplasme sombre et organites parfois difficiles à identifier). - Abréviations et symboles voir Fig. 1-5.

10 - Cross section of a shot berry at the time of maturity. Note: the presence of a great number of necrosis cells which entail crushing of tissues. Areas of cells without tannins (asterisks) are always present as well as druses of calcium oxalate (arrowheads). **11** - Cross section of a berry which has a normal development at the time of the veraison. Area where the cells possess hypoder-

interne de la paroi carpellaire; de ce fait, les faisceaux conducteurs finissent par être situés dans la pulpe. A partir de ce stade, il paraît possible de définir cytologiquement la pellicule d'une baie comme constituée par les tissus les plus externes formés de cellules aux parois épaisses (épiderme et restes d'hypoderme) par opposition aux cellules de pulpe aux parois devenues fines.

3 - L'hypoderme et la pulpe à l'époque de la véraison (Fig. 5 et 6): Après le 15 Août, la croissance de la baie est presque terminée et les raisins acquièrent progressivement leur couleur.

Les évolutions amorcées pendant les semaines de croissance vont s'accroître pendant la véraison. Le fait le plus remarquable est la régression progressive des tanins vacuolaires des cellules les plus externes de la baie et la diminution de l'importance de l'hypoderme par rapport à la taille de la baie. Ainsi, le rapport entre l'épaisseur de l'hypoderme et l'épaisseur totale de la baie passe environ de 1/8 à l'époque de la nouaison à 1/100 en fin de véraison.

L'hypoderme est soumis à deux régressions concomitantes qui se conjuguent et concourent à réduire l'épaisseur de ce tissu; d'une part, les assises les plus externes subissent un aplatissement tangentiel de plus en plus marqué (Fig. 6) et d'autre part, la charge tannique de chaque cellule de l'hypoderme baisse; la teneur en tanins devient très faible, voire nulle dans certaines cellules en fin de véraison. Il en résulte une réduction du nombre des cellules tanniques (Fig. 5).

Par ailleurs, les parois cellulaires s'amenuisent graduellement. Cet amincissement progresse de l'intérieur vers l'extérieur de la strate hypodermique, et, à l'échelle de chaque cellule, l'amincissement progresse dans le même sens. Ainsi, les disparités de la paroi qui existent sur le pourtour d'une cellule située à la limite de l'hypoderme et de la pulpe sont remarquables: la paroi située du côté interne de la baie est nettement plus fine que celle du côté externe et les parois latérales ont des épaisseurs intermédiaires (Fig. 11 et 6). La nature et les réarrangements des constituants pariétaux au cours de l'évolution du péricarpe des baies de raisin ont été analysés par CONSIDINE et KNOX (1979) et RAJAEI (1987).

Ainsi, graduellement, les cellules de l'hypoderme accentuent leurs transformations; elles perdent une très

mal cell characters which become progressively fleshy cell characters: cell walls become thinner and thinner and vacuolar tannins thinner and thinner until they finish by disappearing. **12** and **13** - Transmission Electron Microscopy (TEM). Cross section of a berry in phase of growth. Hypodermal cells have huge tannin vacuoles; these vacuoles have very different aspects from one cell to one another. Cellular walls are particularly thick. **14** - TEM. Cross section of a berry near maturity. Sector of epidermal cell whose tannins form huge aggregates inside vacuoles. Cellular walls are very thick. **15** - TEM. Cross section of a berry near maturity. Some cells have a large quantify of tannins; vacuolar tannins present different aspects from one cell to one another. Cells are alive again (apparent nuclear membranes) but show signs of aging (cytoplasm is dark and cell organelles are sometimes very difficult to know.). - Abbreviations and symbols see Fig. 1-5.

grande partie des polysaccharides pariétaux ainsi que la plupart des tanins vacuolaires et deviennent des cellules de pulpe. En outre, les amyloplastes sont de plus en plus rares.

La pulpe est constituée de grandes cellules (certaines dépassent 400 μm), agencées en jeu de patience, aux parois minces et souples, dépourvues de tanins et d'amyloplastes. Les faisceaux vasculaires, de plus en plus enfoncés au sein de la pulpe, ne servent plus de limite à l'hypoderme ou à la pellicule. A l'époque de la véraison, la pulpe est le résultat de l'évolution de deux tissus: les cellules du parenchyme interne de la paroi carpellaire et les cellules de l'hypoderme profond qui se sont transformées. Ces phénomènes déjà amorcés pendant la croissance ne font que s'amplifier.

Au total, le changement de couleur de la baie s'accompagne de la perte de plus en plus importante des tanins vacuolaires, ou plus exactement de leur transformation en anthocyanes, et de la prééminence de la pulpe au détriment de l'hypoderme.

4 - L'hypoderme et la pulpe pendant la période de maturation et à maturité (Fig. 7): Pendant la maturation des baies, les transformations amorcées pendant leur croissance ne font que s'intensifier.

L'hypoderme: Les cellules les plus externes de la baie, celles de l'épiderme et des premières assises de l'hypoderme poursuivent et accentuent leur aplatissement (Fig. 7). Ainsi, la pellicule réduite à l'épiderme et à l'hypoderme est devenue très mince (ca. 100 à 150 μm). L'épaisseur de cette couche ne cesse de diminuer et n'est plus que de 4 ou 5 cellules à maturité. De plus, les vacuoles à tanins changent d'aspect: les granules deviennent plus gros et moins nombreux, formant parfois un agrégat massif (Fig. 7, flèches et Fig. 14). La charge tannique de certaines cellules baisse régulièrement et, à maturité, les vacuoles ne contiennent plus que quelques gros granules de tanins tandis que quelques autres conservent une teneur tannique importante (Fig. 15). Cependant, il subsiste des plages sans tanins (Fig. 7, astérisques). Les cellules d'hypoderme qui persistent jusqu'à la maturité conservent les caractères propres à ce tissu en particulier, l'épaisseur appréciable des parois. La nature et l'épaisseur de ces parois sont identiques à celles d'un collenchyme selon CONSIDINE et KNOX (1979).

La pulpe: La baie achève sa croissance et atteint 15 à 17 mm à maturité complète. Les cellules de pulpe continuent de grandir. Leurs parois s'amincissent encore; elles sont souples et de plus en plus pauvres en polysaccharides. Les faisceaux conducteurs ont une section plus importante que dans les stades précédents, mais leur nombre reste constant.

Au total, la teneur en tanins vacuolaires de l'ensemble de la baie a encore diminué et la pellicule n'a plus qu'une importance relative très faible par rapport à la taille d'une baie à développement normal. La pellicule est formée par l'épiderme (ou épicarpe du fruit) et par l'hypoderme qui subsiste, c'est-à-dire la partie la plus

externe et très mince du fruit, tandis que la pulpe constitue la plus grande partie de la baie. Ainsi, la paroi carpellaire devenue le péricarpe est essentiellement formée par la pulpe. Un ou deux ovules seulement ont évolué en pépins.

5 - Les particularités des baies millerandées (Fig. 8, 9 et 10): La croissance des baies est très modeste. Selon les cas, leur taille passe de 1 ou 2 mm à 3 ou 4, parfois 5, à l'époque de la maturité contre 15 à 17 mm pour une baie à développement normal. Aucun pépin viable ne se développe mais on trouve les restes rabougris et desséchés des ovules. La paroi carpellaire ou péricarpe présente un certain nombre de particularités ou d'anomalies concernant:

L'hypoderme, les cellules à tanins et l'absence de pulpe: Les anomalies les plus marquantes du développement concernent l'accroissement du nombre des cellules renfermant des tanins et l'absence de formation d'une pulpe: de la nouaison à la véraison, les cellules de l'hypoderme interne, à proximité des faisceaux vasculaires, ne perdent pas leur faible charge tannique, mais au contraire, de nombreuses cellules acquièrent des tanins vacuolaires (Fig. 8). De plus, les cellules situées à l'intérieur du cercle des faisceaux conducteurs ne se transforment pas en cellules de pulpe, mais à l'inverse, progressivement, elles deviennent identiques aux cellules de l'hypoderme: leur teneur en tanins augmente lentement et, à maturité, la plupart des cellules de la paroi carpellaire possèdent des tanins (Fig. 9). Cependant, la teneur en tanins des cellules internes reste plus faible; la charge tannique des cellules décroît régulièrement de l'extérieur vers l'épiderme des loges carpellaires. Comme dans des baies normales, il subsiste des plages de cellules non tanniques (Fig. 9, astérisques).

Les faisceaux vasculaires périphériques: Comme dans un développement normal, ca. 30 faisceaux conducteurs formés très tôt, avant la nouaison, assurent la vascularisation périphérique de la baie; ces faisceaux demeurent peu différenciés, restent petits et comparables à ceux du stade nouaison.

Les parois cellulaires: Aucun changement marquant n'apparaît dans l'épaisseur, la structure ou la composition des parois cellulaires au cours du développement de la baie; les parois restent identiques et comparables à celles d'un ovaire immédiatement après la fécondation. De ce fait, il n'est pas possible de délimiter la pellicule et la pulpe, ni par la nature des parois cellulaires, ni par la teneur en tanins vacuolaires, ni par la situation des faisceaux conducteurs.

La morphologie et l'agencement cellulaires: La morphologie générale des cellules reste la même; aucun grandissement cellulaire significatif n'a lieu; aucun aplatissement tangentiel ne se produit. De ce fait, l'épaisseur de la paroi carpellaire d'une baie millerandée à l'époque de la véraison est comparable à celle d'un ovaire immédiatement après la fécondation (Comparer les Fig. 1 et 8). Le nombre des cellules est légèrement plus faible. A titre d'exemple, dans une baie millerandée, le nombre de cellules situées entre l'épiderme externe et les faisceaux

conducteurs et comptées le long d'un rayon passe de 12 à 15 au stade nouaison à 9 ou 10 à la véraison, et même parfois, à 5 ou 9 cellules seulement à la maturité. En fait, cette réduction est, peut-être, le résultat de nécroses cellulaires très localisées qui entraînent des zones de tassement cellulaire dans les parois carpellaires (Fig. 10). La destruction des enclaves vacuolaires, avec ou sans tanins, engendre la lyse cellulaire et des nécroses tissulaires plus ou moins importantes. FELKER *et al.* (1984) signalent des localisations extra-vacuolaires de tanins dans les cellules de la chalaze de certains mutants d'*Hordeum* entraînant la dégénérescence cellulaire et un arrêt des apports de sève, ce qui a des conséquences sur la taille des grains d'orge.

Les loges carpellaires : Comme dans les baies à développement normal, les loges sont délimitées par un épiderme d'aspect sain, souligné par l'assise de cellules à macule d'oxalate de calcium du côté de la paroi carpellaire et normalement sans oxalate du côté de la columelle (Fig. 8 et 9, têtes de flèches). Dans les baies millerandées, aucun ovule ne se transforme en pépin, et, au fil des semaines, les ovules se dessèchent et se rabougrissent; la plupart apparaissent vides: les téguments ovulaires sont nécrosés et le nucelle réduit à quelques cellules racornies (Fig. 8).

A u t o t a l, les baies millerandées ne sont pas simplement remarquables par leur taille réduite et l'absence de pépins, (les restes raccornis des quatre ovules subsistent), mais aussi, par l'absence d'une pulpe aux caractères cytologiques bien définis (grandes cellules aux parois minces et souples, vacuoles immenses et sans tanins), par l'absence de pellicule typique, par la répartition des cellules à tanins vacuolaires dans tous les tissus de la baie millerandée avec une concentration plus forte en périphérie et, par la présence de faisceaux conducteurs qui restent de petite taille entraînant une réduction sensible des débits de sève dans la baie.

Conclusions

Les méthodes utilisées dans ce travail ne permettent pas de suivre les transformations biochimiques et le devenir des tanins vacuolaires; les pigments anthocyaniques ne peuvent apparaître sur les coupes après les fixateurs utilisés. Selon MOSKOWITZ et HRAZDINA (1981), la couleur des baies parvenues à maturité est due à la présence exclusive de très fortes concentrations d'anthocyanes vacuolaires dans les premières assises cellulaires du fruit où les vacuoles ont un pH particulièrement acide (2,7 environ), mais la présence et les effets d'autres constituants vacuolaires sont discutés.

Les transformations de l'hypoderme débutent pendant la croissance de la baie à développement normal; progressivement, les cellules de l'hypoderme profond se métamorphosent en cellules de pulpe. De ce fait, les faisceaux vasculaires situés en bordure de l'hypoderme, au stade nouaison, deviennent des faisceaux de pulpe pendant la croissance du fruit, et l'origine de la pulpe apparaît double (hypoderme profond dénaturé et parenchyme interne dilaté).

À l'inverse, les baies millerandées acquièrent des tanins dans pratiquement toutes les cellules de la paroi carpellaire: il ne se forme donc pas une pellicule et une pulpe. Cet accident morphologique apparaît, entre autres, comme la traduction d'un accident physiologique du métabolisme cellulaire des tanins.

Il est intéressant de noter et de comparer l'impact de la teneur en tanins vacuolaires dans les deux grands accidents du développement que subissent les gynécées des fleurs de vigne. Dans les baies millerandées, un excès de tanins vacuolaires affecte tous les tissus des baies alors que, à l'inverse, un déficit net et précoce est un indicateur de la coulure (FOUGÈRE-RIFOT *et al.* 1993 b et c).

Références

- BESSIS, R.; 1972: Etude de l'évolution des caractères morphologiques des cires cuticulaires au cours de la vie du fruit de la vigne. C. R. Acad. Sc., Paris, **274**, 1911-1914.
- BONNET, A.; 1903: Recherches sur la structure du grain de raisin. Ann. Ecole Natl. Agric., Montpellier, Nouv. Sér. III, 58-102.
- BOUARD, J.; 1978: Possibilités de développement des ovules et qualité des pépins de raisin en fonction du rang des grappes sur les sarments. 2^{ème} Symp. Intern. Amélior. Vigne, Bordeaux, 14-18 juin, 1977, 59-67. INRA, Paris.
- CONSIDINE, J. A.; KNOX, R. B.; 1979: Development and histochemistry of the cells, cell walls, and cuticle of the dermal system of fruit of the grape, *Vitis vinifera* L. Protoplasma **99**, 347-365.
- DEBRAUX, G.; 1951: La feuille isolée en survie. Son application à l'étude de quelques problèmes de morphogenèse et d'histogenèse. Thèse Doctorat ès Sciences, Univ. Poitiers, France.
- FELKER, F. C.; PETERSON, D. M.; NELSON, O. E.; 1984: Development of tannin vacuoles in chalaza and seed coat of barley in relation to early chalaza necrosis in the *seg1* mutant. Planta **161**, 540-549.
- FOUGÈRE-RIFOT, M.; BOUARD, J.; 1992: Evolution de l'ovaire en rapport avec la coulure chez deux variétés de *Vitis vinifera* L., le Merlot et le Chardonnay. INRA-VITI 92, De la Vigne au Vin: les Actualités de la Recherche, 22-26.
- ; BENHARBIT EL ALAMI, N.; BOUARD, J.; BRUN, O.; 1993 a: Les aléas du développement des ovaires et des ovules de *Vitis vinifera* L. var. Chardonnay. O.I.L.B., Lutte intégrée en viticulture. INRA Bordeaux, 2-5 mars, 1993.
- ; DELAVAL, J. J.; BENHARBIT EL ALAMI, N.; BOUARD, J.; BRUN, O.; 1993 b: Importance des tanins vacuolaires dans le développement des ovaires et des ovules de la vigne. *Vitis* **32**, 127-136.
- ; BENHARBIT EL ALAMI, N.; BRUN, O.; BOUARD, J.; 1993 c: Relations entre le développement défectueux des ovaires et l'involution des ovules chez *Vitis vinifera* L. var. Chardonnay. J. Intern. Sci. Vigne Vin, **27**, 99-112.
- ; PARK, H. S.; BOUARD, J.; 1994: Les baies millerandées du Merlot noir. INRA-VITI 94, De la Vigne au Vin: les Actualités de la Recherche, 30-34.
- MOLISCH, H.; 1921: Microchemie der Pflanze. Jena.
- MOSKOWITZ, A. H.; HRAZDINA, G.; 1981: Vacuolar contents of fruit sub-epidermal cells from *Vitis* species. Plant Physiol. **68**, 686-692.
- RABION, P.; BOIDRON, J. N.; BOUARD, J.; 1986: Influence du millerandage sur la composition des moûts du Merlot. 3^{ème} Symp. Intern. Physiol. Vigne, Bordeaux, 24-27 juin 1986, 119-124. O.I.V., Paris.
- RAJAEI, H.; 1987: Changements cytochimique et ultrastructuraux des parois cellulaires de la pellicule du raisin, *Vitis vinifera*, durant la croissance et la maturation de la baie. Can. J. Bot. **65**, 1343-1355.
- REYNOLDS, E. S.; 1963: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208-212.
- SORAUER, P.; 1915: Neue Theorie des Gummiflusses. Z. Pflanzenkrankh. **25** (cité par G. DEBRAUX).
- VIALA, P.; VERMOREL, V.; 1910: Traité Général de Viticulture. Ampélographie. T. I. Masson, Paris.