

Evolution des polyosides des parois cellulaires au cours du développement du raisin

par

C. CHARDONNET¹⁾, H. GOMEZ²⁾ et B. DONÈCHE¹⁾

¹⁾ Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, Talence, France

²⁾ Laboratoire d'Histologie - Embryologie, Université de Bordeaux II, Bordeaux, France

R é s u m é : La composition en polyosides pariétaux des baies de raisin a été étudiée de la floraison à la maturité chez deux cépages bordelais, le Cabernet-Sauvignon et la Muscadelle. Les techniques histochimiques et densitométriques utilisées ont permis de suivre l'évolution de trois zones distinctes: la zone pelliculaire la plus externe, la zone pelliculaire sous-jacente et la pulpe. Au cours du développement des baies, les teneurs de la majorité des polyosides pariétaux diminuent, particulièrement chez la Muscadelle. Ce phénomène ne concerne pas la cellulose du tissu pelliculaire dont le taux reste constant lors de la maturation. Chez les deux cépages, les parois cellulaires de la pellicule sont toujours plus riches en polyosides que celles de la pulpe. A maturité, la proportion de pectines pariétales au niveau de la pellicule est plus importante chez le Cabernet Sauvignon.

Evolution of cell wall polyosides during grape berry growth and ripening

S u m m a r y : The content of cell wall polyosides of grape berries has been studied in two Bordeaux vine cultivars, Cabernet Sauvignon and Muscadelle. Three different zones were determined by histochemical and densitometric technics: external part of the skin, skin underlying cells and flesh. Their changes in polyosides have been followed from flowering to maturity. During the growth of the berries, the level of the cell wall polyosides decreases particularly in Muscadelle variety, whereas during ripening the berry skin cellulose levels remains constant. In the two cultivars, the cell walls of the skin are always richer than the flesh ones. At maturity, there are more pectins in the cell walls of the skin of Cabernet Sauvignon berries.

K e y w o r d s : cell wall, berry, ripening, cellulose, pectins.

Introduction

Le développement et la maturation des fruits s'accompagnent de nombreux changements biochimiques et physiques. Parmi ces modifications, leur ramollissement est un des aspects les plus remarquables. C'est un des problèmes majeurs de la sensibilité des fruits aux parasites et de leur stockage après récolte. La texture du fruit est déterminée en partie par la turgescence des cellules et surtout par la composition des parois cellulaires (BARTLEY et KNEE 1982). Le ramollissement est une conséquence de la dégradation des parois. De nombreuses études ont été consacrées à ce phénomène, plus particulièrement en relation avec le métabolisme des polyosides pectiques (PILNIK et VORAGEN 1970; LABAVITCH 1981; DEY et BRINSON 1984). Ainsi dans le cas du raisin, SAULNIER (1987) a étudié la structure des substances pectiques de la pulpe et leur évolution au cours de la maturation. Dans la majeure partie de ces travaux, l'étude des principaux constituants de la paroi cellulaire est réalisée par extraction sélective à l'aide de différents solvants sur la baie entière ou sur pulpe et pellicule séparées. Mais peu de renseignements sont apportés sur la localisation précise des différents constituants.

Les techniques histochimiques développées par JONA

et collaborateurs (JONA et FOA 1977, 1979) permettent de quantifier les différents polyosides pariétaux par extractions séquentielles et colorations successives en visualisant leur distribution dans le fruit. Appliquées au raisin, ces techniques leur ont permis de suivre l'évolution de la teneur en polyosides pariétaux au cours du développement (JONA et BOTTA 1988) et de la maturation de deux variétés de vigne italiennes (JONA *et al.* 1983). Mais la méthode spectrophotométrique utilisée oblige à prendre en considération la baie de raisin dans sa globalité.

Le présent travail concerne l'évolution de la composition en polyosides des parois au cours du développement du raisin chez deux cépages très différents du vignoble bordelais: la Muscadelle, cépage blanc particulièrement sensible à *Botrytis cinerea* et le Cabernet Sauvignon, cépage rouge plus résistant. La répartition des polyosides entre pulpe et pellicule a également pu être effectuée par analyse densitométrique des coupes de raisin après traitement.

Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée en 1991 sur des baies de Cabernet Sauvignon et de Muscadelle greffés sur Fercal, cultivés sur une parcelle de sol de graves appartenant au domaine expérimental de Couhins (I.N.R.A., France). 10

baies de même taille ont été prélevées avec leur pédicelle tous les 10-12 d. Au laboratoire, elles ont été lavées à l'eau ultra-pure puis essuyées. Après pesée et mesure exacte du diamètre, les baies ont été divisées en 2 parties dans le sens de la longueur à l'aide d'un scapel et les pépins ont été éliminés. Les méthodes décrites par JONA et FOA (1977) adaptées de JENSEN (1962) ont été utilisées pour le traitement des baies puis des coupes minces.

Les baies ont été fixées au F.A.A. (formaline commerciale contenant 40 % de formaldéhyde; acide acétique glacial; éthanol 50 %) pendant 4 h, déshydratées avec du TBA (méthyl-2 propanol-2) à concentrations croissantes puis incluses dans de la paraffine. Des coupes de 10 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome puis fixées sur lame. Après passage dans du xylène pour les déparaffiner, les coupes ont subi successivement les traitements suivants :

(a) témoin (pas de traitement), polyosides totaux; (b) extraction des pectines totales par incubation des coupes dans une solution de pectinase à pH 4 pendant 24 h à 30 °C suivi de 2 h d'incubation dans une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % à 40 °C; (c) extraction des hémicelluloses par incubation dans une solution de NaOH à 4 % pendant 12 h à température ambiante; (d) extraction des polyosides non cellulosiques par incubation dans une solution de NaOH à 17,5 % pendant 12 h à température ambiante.

Une température de 40 °C lors de l'incubation dans l'oxalate d'ammonium a été utilisée car à la température de 90 °C préconisée par JONA et BOTTA (1988) on a observé une perte totale des coupes fixées sur lame. Un contrôle a été effectué concernant l'efficacité du traitement d'extraction des pectines à 40 °C par coloration des coupes, avant et après extraction au Ruthenium Red. Les coupes qui avaient subi l'extraction présentaient une très faible coloration caractéristique des substances pectiques, indiquant que l'extraction faite à 40 °C était suffisante.

Ces traitements ont été effectués sur des séries de 10 lames, à raison de 2 coupes par lames. Après le traitement b, une lame est mise de côté; après le traitement c, 2 lames et après le traitement d, 6 lames. Ce choix a été déterminé par la difficulté d'obtenir des coupes intactes après traitement au NaOH à 17,5 %, bien que toutes les précautions préconisées par JENSEN (1962) aient été

respectées (recouvrement des coupes par de l'éthyl cellulose; élimination délicate des solutions de NaOH; séchage des lames avant toute manipulation...). L'ensemble des coupes a ensuite été hydraté, coloré au P.A.S. (Periodic Acid Schiff), déshydraté puis monté au DePex (agent de montage).

Les mesures ont été réalisées par densitométrie à 600 nm. La hauteur des pics obtenus, correspondant à une intensité d'absorbance a été utilisée comme unité arbitraire pour déterminer les teneurs en polyosides. Les quantités respectives en pectines, hémicelluloses et polyosides non cellulosiques ont été obtenues par différence des valeurs mesurées entre deux traitements d'extraction successifs.

Pour chaque échantillon et chaque traitement, 4 coupes microscopiques ont été analysées. Les résultats présentés dans ce travail sont la moyenne statistique des différentes déterminations. Pour l'estimation des proportions de polyosides dans les différentes parties de la baie, nous avons multiplié ces valeurs par l'épaisseur de tissu correspondant avant de calculer les pourcentages respectifs (Tab. 2).

Résultats et discussion

Les densitogrammes obtenus montrent clairement que 3 parties sont à considérer dans l'analyse d'une section de baie. Le premier et le dernier pic d'absorption obtenus, appelés P1 et P4, caractérisent le tissu le plus périphérique de la baie traversé par le faisceau lumineux du densitomètre. Les pics P2 et P3 constituent les tissus sous-jacents de la zone P1/P4 et entre les zones P1/P2 et P3/P4 on trouve l'ensemble de la pulpe. L'examen de pellicules, isolées des pulpes montre que les zones P1/P4 et P2/P3 représentent la pellicule. En effet JONA et FOA (1979) ont montré que la pellicule est constituée d'un épiderme d'une à deux couches de cellules (assimilable à la zone P1/P4) et d'une assise sous-jacente de 4 - 8 couches de cellules selon les cépages (décrite ici comme zone P2/P3).

1. Evolution des différents polyosides : Fig. 1 montre que le développement du raisin et sa maturation s'accompagnent d'une diminution globale de la somme des polyosides pariétaux. Ce phénomène est

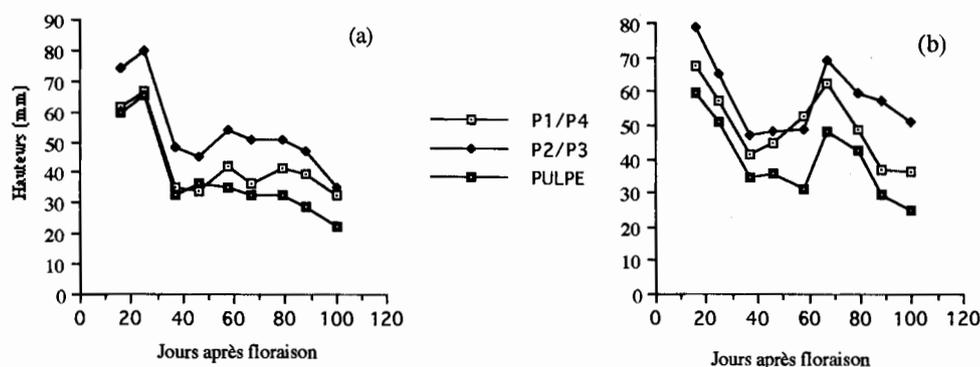


Fig. 1: Evolution des polyosides pariétaux totaux des baies de Muscadelle (a) et de Cabernet Sauvignon (b) au cours de leur développement.

Evolution of total cell wall polyosides during berry development of Muscadelle (a) and Cabernet Sauvignon (b).

particulièrement net dans le cas de la Muscadelle. Chez le Cabernet Sauvignon, la véraison est suivie d'une courte période d'accumulation de polyosides. Dans les deux cas, les parois cellulaires des zones pelliculaires restent plus riches en polyosides que celles de la pulpe.

La teneur en cellulose des parois cellulaires chute fortement en début de développement, vraisemblablement en raison de la multiplication cellulaire intense (Fig.2). A partir de la véraison, la richesse en cellulose des cellules de la pellicule reste relativement constante tandis que les parois cellulaires de la pulpe s'appauvrissent en ce polyoside, surtout chez la Muscadelle.

L'évolution des pectines pariétales est plus complexe (Fig.3). Comme pour la cellulose, le début de croissance du fruit s'accompagne d'une diminution de la teneur en pectines des parois. Puis on assiste pendant la véraison à une accumulation de pectines pariétales, particulièrement importante au niveau des cellules de la pulpe. La maturation est caractérisée par la diminution des pectines pariétales dont l'intensité est en relation avec la richesse en pectines des parois au moment de la véraison.

De nombreux auteurs ont montré qu'au cours de la maturation des fruits, les pectines pariétales sont transformées en pectines solubles sous l'action de différentes activités enzymatiques (SAWAMURA *et al.* 1978; BARTLEY *et al.* 1982). Ces modifications entraînent la perte de rigidité des fruits (FILS-LYACON et BURET 1990). Mais

les différences de teneurs en pectines pariétales sont trop faibles, notamment dans les zones pelliculaires, pour expliquer à elles-seules les variations dans la texture des baies des deux cépages.

L'accumulation des hémicelluloses au niveau des parois cellulaires se produit en 2 phases, avant et après véraison (Fig. 4) vraisemblablement en relation avec le grandissement cellulaire. En fin de maturation, les teneurs en hémicelluloses pariétales diminuent fortement pour atteindre de très faibles valeurs à la maturité.

L'évolution des polyosides résiduels non cellulosiques est très irrégulière mais leurs teneurs sont le plus souvent très faibles, surtout à maturité. Pour les 2 cépages, c'est la zone pelliculaire interne (P2/P3) qui est le plus riche en ces polyosides en début de maturation.

2. Variation de composition des parois cellulaires: Après avoir vérifié que la somme des différents polyosides était voisine de la teneur mesurée en polyosides totaux, nous avons déterminé pour chaque cépage étudié les proportions respectives des principaux polyosides pariétaux dans les différents tissus de la baie. Seuls, 3 stades caractéristiques (début de croissance, véraison et maturité) sont représentés ici (Tab. 1). Il faut d'abord constater que la composition des parois cellulaires est très variable d'un cépage à l'autre. Ces variations sont surtout marquées au niveau de la pulpe. Ainsi,

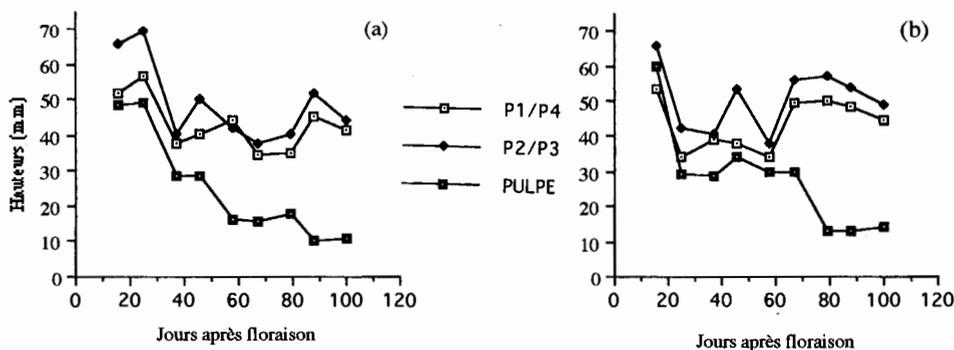


Fig. 2: Evolution des teneurs en cellulose des parois cellulaires des baies de Muscadelle (a) et de Cabernet Sauvignon (b) au cours de leur développement.

Evolution of cellulose cell wall content during berry development of Muscadelle (a) and Cabernet Sauvignon (b).

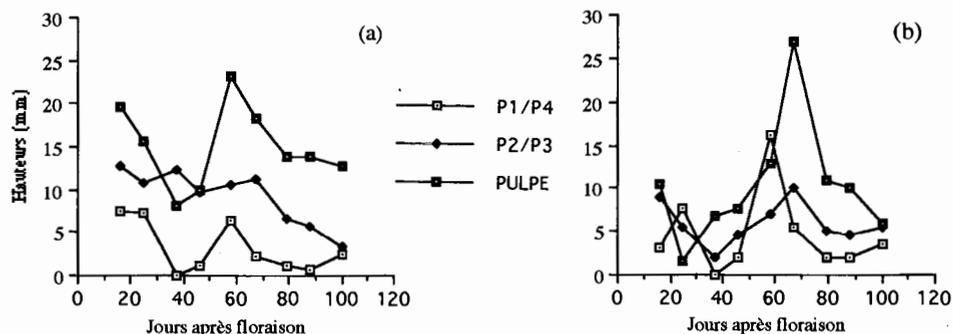


Fig.3: Evolution des teneurs en pectines pariétales des baies de Muscadelle (a) et de Cabernet Sauvignon (b) au cours de leur développement.

Evolution of pectin cell wall content during berry development of Muscadelle (a) and Cabernet Sauvignon (b).

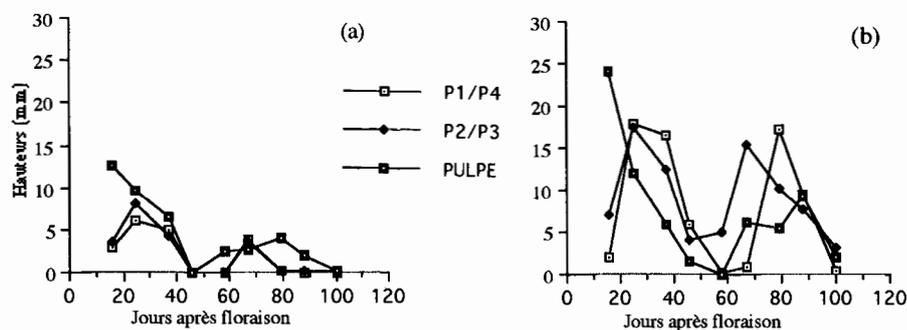


Fig.4: Evolution des teneurs en hémicelluloses pariétales des baies de Muscadelle (a) et de Cabernet Sauvignon (b) au cours de leur développement.

Evolution of hemicelluloses cell wall content during berry development of Muscadelle (a) and Cabernet Sauvignon (b).

Tableau 1

Variation de la composition des parois cellulaires des baies de Cabernet Sauvignon et de Muscadelle au cours de leur développement, exprimée en pourcentage des polysides totaux de chaque zone étudiée (P1/P4, P2/P3: voir "Résultats et discussion", 1er paragraphe)

Changes of cell wall composition in Cabernet Sauvignon and Muscadelle berries during their development, expressed as percentage of total polysides in each zone of the berry (P1/P4, P2/P3: see "Résultats et discussion", 1st para)

	Cabernet Sauvignon			Muscadelle		
	P1/P4	P2/P3	PULPE	P1/P4	P2/P3	PULPE
Début développement						
Pectines	5,2	9,6	11,2	11,8	15,3	24,2
Hémicelluloses	3,4	7,5	25,3	4,8	4,5	15,5
Composés NC	0,2	11,8	0,2	0,2	0,1	0,1
Cellulose	91,2	71,1	63,3	83,2	80,1	60,2
Véraison						
Pectines	28,9	10,6	30,1	12,4	17,9	38,4
Hémicelluloses	0,4	7,6	0,3	0,2	0,1	5,7
Composés NC	9,4	24,2	0,1	0,6	10,2	0,3
Cellulose	61,3	57,6	69,5	86,8	71,8	55,6
Maturité						
Pectines	7,1	9,1	26,1	5,7	6,9	48,9
Hémicelluloses	1,1	5,3	8,7	0,2	0,4	1,1
Composés NC	2,1	4,9	4,3	0,2	0,4	8,6
Cellulose	89,7	80,7	60,9	93,9	92,3	41,4

(NC: Non Cellulosiques; Non Cellulosic)

les parois cellulaires de la pulpe des baies à maturité est en majorité constituée de cellulose dans le cas du Cabernet Sauvignon alors que la proportion de pectines est plus importante chez la Muscadelle. Cette différence apparaît dès la véraison et n'évolue que faiblement pendant la maturation. Au niveau pelliculaire, les parois renferment une proportion importante de cellulose qui reste le plus souvent relativement constante tout au long du développement du fruit.

Les parois des cellules des zones internes de la baie sont les plus riches en hémicelluloses. Leurs proportions augmentent lorsque les parois s'appauvrissent en pectines, confirmant ainsi les observations faites par FOA *et al.* (1980)

et JONA *et al.* (1983) chez les cépages Barbera et Freisa. La présence d'autres polysides non cellulosiques est très aléatoire; il s'agirait surtout des fractions osidiques des glycoprotéines et de certains composés phénoliques pariétaux. En effet, JONA et FOA (1979) ont montré que chez certains cépages, aucun polyside non cellulosique ne peut être détecté.

3. Répartition des différents polysides dans la baie: A partir de la mesure d'épaisseur des différentes zones étudiées et en extrapolant au volume total de la baie, nous avons estimé les proportions de chaque polyside dans les différentes parties de la

baie. Comme précédemment, seuls les résultats correspondant aux stades caractéristiques du début de la croissance, de la véraison et de la maturité sont représentés dans Tab. 2. Tout au long du développement du raisin, la pulpe renferme la majeure partie des polyosides totaux. Ce résultat est directement lié au nombre de cellules et à la quantité de parois cellulaires. Ainsi la zone pelliculaire externe, la plus fine, représente une faible proportion de polyosides totaux de la baie. Le phénomène est identique pour les pectines et la cellulose, principaux constituants pariétaux. Malgré leur dégradation partielle, la proportion de pectines au niveau de la pulpe augmente au cours de la maturation au détriment des parois cellulaires de la zone pelliculaire.

On constate qu'à maturité, la pellicule des baies de Cabernet Sauvignon est plus riche en pectines insolubles que celle des baies de Muscadelle. En conséquence, le Cabernet Sauvignon possède une meilleure cohésion des parois cellulaires de la pellicule, constituant ainsi une barrière plus efficace contre les agressions extérieures. Ceci pourrait expliquer en partie la différence de sensibilité aux parasites existant entre les 2 cépages. Cependant il existe une grande variabilité, difficile à soupçonner à priori, des constituants cellulaires notamment au niveau des polyosides mineurs tels que les hémicelluloses. Ces recherches devront être poursuivies en analysant d'autres cépages et en étudiant l'effet des conditions climatiques et pédo-logiques.

Tableau 2

Evolution de la répartition des différents polyosides des baies de Cabernet Sauvignon et de Muscadelle au cours de leur développement, exprimée pour chaque polyoside en pourcentage par rapport à la baie entière (P1/P4, P2/P3: voir "Résultats et discussion", 1er paragraphe)

Evolution of the distribution of polyosides in Cabernet Sauvignon and Muscadelle berries during their development, expressed for each polyoside as percentage referring to the whole berry (P1/P4, P2/P3: see "Résultats et discussion", 1st para)

	Cabernet Sauvignon			Muscadelle		
	P1/P4	P2/P3	PULPE	P1/P4	P2/P3	PULPE
Début développement						
Polyosides totaux	14,9	27,7	57,4	17,7	26,5	55,8
Pectines	4,8	22,3	72,9	8,5	18,1	73,4
Hémicelluloses	1,7	9,4	88,9	6,2	9,4	84,4
Composés NC	0,8	91,8	7,4	17,9	22,8	59,3
Cellulose	12,5	24,9	62,6	17,9	27,9	54,2
Véraison						
Polyosides totaux	17,8	13,8	68,4	11,6	17,1	71,3
Pectines	15,1	5,5	79,4	3,3	6,5	90,2
Hémicelluloses	3,9	82,9	13,2	0,6	0,5	98,9
Composés NC	26,9	70,5	2,6	3,8	87,1	9,1
Cellulose	13,1	12,1	74,8	20,9	23,3	55,8
Maturité						
Polyosides totaux	9,8	19,3	70,9	12,6	11,1	76,3
Pectines	4,7	10,4	84,9	2,1	2,4	95,5
Hémicelluloses	1,9	17,4	80,7	3,4	5,8	90,8
Composés NC	6,6	26,8	66,6	0,5	0,8	98,7
Cellulose	17,2	26,5	56,3	23,9	21,3	54,8

(NC: Non Cellulosiques; Non Cellulosic)

Références

- BARTLEY, I. M.; KNEE, M.; 1982: The chemistry of textural changes in fruit ripening during storage. *Food Chem.* **9**, 47-58.
- ; --; CASIMIR, M. A.; 1982: Fruit softening. I. Changes in cell wall composition and endo-polygalacturonase in ripening pears. *J. Exp. Bot.* **33**, 1248-1255.
- DEY, P. M.; BRINSON, K.; 1984: Plant cell walls. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **42**, 265-382.
- FILS-LYACON, B.; BURET, M.; 1990: Loss of firmness and changes in pectic fractions during ripening and overripening of sweet cherry. *HortScience* **25**, 777-778.
- FOA, E.; JONA, R.; VALLANIA, R.; 1980: Histochemical effects of radiation on soft fruit cell walls. *Environ. Exp. Bot.* **20**, 47-54.
- JENSEN, W. A.; 1962: *Botanical Histochemistry*. Freeman and Co., San Francisco and London.
- JONA, R.; BOTTA R.; 1988: Fruit set and early berry development in two grapevine cultivars. *Israël J. Bot.* **37**, 203-216.
- ; FOA, E.; 1977: Histochemical determination of polysaccharides in fruit pulp cell walls. *Cytologia* **42**, 495-500.

- -; - -; 1979: Histochemical survey of cell wall polysaccharides of selected fruits. *Sci. Hort.* **10**, 141-147.
- -; VALLANIA, R.; ROSA, C.; 1983: Cell wall development in the berries of two grapevines. *Sci. Hort.* **20**, 169-178.
- LABAVITCH, J. M.; 1981: Cell wall turnover in plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 385-406.
- PILNICK, W.; VORAGEN, A. G. J.; 1970: Pectic substances and other uronides. In: Hulme A. C. (Ed.): *The Biochemistry of Fruits and their Products* - 1, 53-87. Academic Press, London.
- SAULNIER, L.; 1987: Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge). Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse.
- SAWAMURA, M.; KNEGT, E.; BRUINSMA, J.; 1978: Levels of endogenous ethylene, carbon dioxide and soluble pectin, and activities of pectin methylesterase and polygalacturonase in ripening tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* **19**, 1061-1069.

Remerciements

Nous adressons tous nos remerciements au Pr. J. M. MEUNIER du Laboratoire d'Histologie - Embryologie de l'Université de Bordeaux II pour sa collaboration.

Reçu le Novembre 2, 1993