

Relation entre la teneur en calcium et la résistance à la digestion enzymatique du tissu pelliculaire au cours de la maturation du raisin

par

C. CHARDONNET et B. DONÈCHE

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

R é s u m é : L'évolution du calcium au cours du développement et de la maturation du raisin est irrégulière. Les modifications de la teneur en calcium des fractions pariétales a des conséquences importantes sur les tissus de la baie, principalement sur le tissu pelliculaire dont l'évolution détermine le comportement de la baie face à une agression par un parasite tel que *Botrytis cinerea*. L'étude de la digestion enzymatique des pellicules de baies de différents cépages au cours de la maturation du raisin révèle que les pellicules les plus résistantes sont celles dont les teneurs en calcium pariétal sont les plus importantes. Plus précisément, la cohésion des parois cellulaires de la pellicule résulte essentiellement de l'état de complexation des substances pectiques chélatables par le calcium.

Relation between calcium content and resistance to enzymatic digestion of the skin during grape ripening

S u m m a r y : The evolution of calcium during grape berry development and ripening is irregular. The changes in calcium content of cell wall will have important consequences, mainly on the skin which is responsible for the berry reaction during attack by pathogenic fungus like *Botrytis cinerea*. Our study about the evolution of the susceptibility to enzymatic digestion of berry skin from different cultivars during ripening reveals that the more important the cell wall calcium content, the less susceptible is the skin. Precisely, cell wall cohesion of the skin tissue results in the chelation state of the pectic substances.

K e y w o r d s : berry, skin, calcium, pectic substances, enzymatic digestion.

Introduction

La maturation des fruits, comme la sénescence des tissus végétaux en général, est étroitement liée aux variations de la concentration en calcium (FERGUSON 1984). Ainsi, l'initiation du processus de maturation chez la tomate correspond à une diminution de la richesse en calcium, notamment au niveau pariétal (RIGNEY et WILLS 1981).

Dès 1959, BONASTRE signalait que l'évolution du calcium au cours de la maturation du raisin est irrégulière. Les travaux ultérieurs ont confirmé ces premières observations. Ainsi, HRAZDINA *et al.* (1984) ont constaté une diminution importante de la teneur en calcium au cours de la maturation chez le cépage hybride de Chaunac, tandis que POSSNER et KLIEWER (1985) ont observé que la concentration en calcium restait relativement constante pendant la maturation des raisins de cépage Chardonnay. La richesse en calcium varie fortement selon les cépages et les conditions climatiques (SCHALLER *et al.* 1992). Dans une étude précédente, DONÈCHE et CHARDONNET (1992) ont montré que la maturation du raisin s'accompagne également d'une migration du calcium de la pulpe vers la pellicule.

Selon DEMARTY *et al.* (1984), 60 % du calcium contenu dans le tissu végétal est localisé dans les parois cellulaires où il est retenu par interactions électrostatiques avec les

groupements carboxyles des composés pectiques mais également avec les groupements hydroxyles d'autres polysides (WUYTACK et GILLET 1978). Cette participation du calcium dans la cohésion des parois cellulaires végétales par complexation avec les substances pectiques a été clairement établie (CLELAND et RAYLE 1977). Le changement de texture du fruit observé en cours de maturation est essentiellement dû à une désorganisation des parois cellulaires résultant en grande partie d'une modification des composés pariétaux, hémicelluloses et surtout substances pectiques (POOVAIAH *et al.* 1988). Ce phénomène est la conséquence de l'action de plusieurs activités enzymatiques produites par le fruit mûrissant telles que la pectinéméthylestérase et les polygalacturonases (SUWWAN et POOVAIAH 1978; DELLA PENNA *et al.* 1990). Selon JONA *et al.* (1983), l'activité de la polygalacturonase serait grandement facilitée par la disparition du calcium.

La pellicule du raisin constitue un élément déterminant dans la résistance aux attaques de parasites. Le champignon pathogène *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise du raisin, produit les enzymes nécessaires à la lyse des parois cellulaires (HEALE 1985). L'objet de notre étude est de déterminer s'il existe une relation entre la teneur en calcium pariétal du tissu pelliculaire et sa résistance à la digestion enzymatique.

Matériels et méthodes

Des prélèvements de raisins ont été réalisés en 1992 et 1993 sur les principaux cépages du vignoble Bordelais (Cabernet-Sauvignon, Merlot, Muscadelle, Sauvignon et Sémillon) implantés dans différentes parcelles de l'appellation Graves (France). Des lots de 10 baies de même taille (diamètre mesuré à l'aide d'un pied à coulisse) ont été prélevées régulièrement avec leur pédicelle. Au laboratoire, elles sont rincées à l'eau ultrapure. Les pellicules sont ensuite séparées des pulpes, soigneusement lavées puis essuyées.

Extraction et dosage du calcium pariétal: Après pesée, les pellicules sont broyées à l'aide d'un potter et les broyats sont repris dans de l'eau ultrapure. Trois lavages du culot à l'eau ultrapure sont ensuite effectués par centrifugations successives (9000 r.p.m.; 15 min). Le culot final est déshydraté puis minéralisé par passage au four pendant 1 h à 250 °C, 1 h à 350 °C et enfin 4 h à 500 °C. Les cendres blanches obtenues sont ensuite reprises par 5 ml d'acide nitrique à 10 % puis filtrées. Le volume final est ajusté à 50 ml pour un échantillon initial de 10 baies. Le dosage du calcium est réalisé par chromatographie ionique selon les conditions suivantes: colonne de silice greffée avec des groupements d'acide sulfonique; élution avec une solution contenant 0,5 M d'acide oxalique, 1 M d'éthylène diamine et 10 % d'acétone (v/v); débit de 1,5 ml/min; détection réalisée par conductivité.

Mesure de la résistance à la digestion enzymatique: Des disques de pellicule de 0,4 cm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce et mis à incuber sous agitation, à l'obscurité, dans une solution aqueuse contenant: 10 % de mannitol, 2 % de cellulase et 0,1 % de pectolyase. Le pH de cette solution est ajusté à 5,5 avec HCl. Ce mélange enzymatique estensemencé avec du matériel frais à raison de 30 % (poids/volume). Le nombre de protoplastes et de cellules est déterminé par observation microscopique après 8 h d'incubation.

Pour chaque cépage, cette expérience a été renouvelée avec une préparation enzymatique de *Botrytis cinerea*, souche C77 4 appartenant à la collection de l'Institut d'Oenologie (Bordeaux, France) et cultivée sur le milieu préconisé par DRAWERT et KREFFT (1978). Les enzymes exocellulaires ont été extraites et purifiées selon la méthode décrite par TOUZANI (1993). Les conditions d'incubation sont identiques à celles précédemment décrites. L'extrait enzymatique de *B. cinerea* a été dilué de façon à obtenir une activité cellulase équivalente à la préparation commerciale, sans tenir compte des autres activités enzymatiques présentes dans cet extrait.

Extraction et dosage des substances pectiques: Le matériel insoluble à l'alcool est préparé à partir des pellicules de raisin selon la méthode de MOURGUES (1983). Les quatre fractions pectiques sont extraites de ce matériel par la technique décrite

par BARBIER et THIBAUT (1982), adaptée au raisin par SAULNIER (1987). Le dosage est réalisé selon la méthode spectrophotométrique de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973).

Résultats et discussion

Une première étude a été réalisée au cours de la maturation en 1992 sur des raisins des différents cépages étudiés parvenus au même stade de maturité. Elle nous a permis de comparer l'efficacité des enzymes commerciales, classiquement utilisées pour la digestion des tissus végétaux, et d'un extrait enzymatique renfermant les principales enzymes exocellulaires de *B. cinerea*.

L'incubation de disques de pellicules en présence d'enzymes digestives dans un milieu isotonique pendant 8 h se traduit par la libération dans le milieu réactionnel de cellules dissociées dont un certain pourcentage conduit à des protoplastes (Tab. 1). Les résultats montrent que les pellicules des différents cépages présentent des sensibilités différentes à la digestion enzymatique, pour un stade de maturité identique. De façon générale, les cépages blancs choisis sont plus sensibles à cette digestion que les cépages noirs. Le nombre de cellules libérées est important et la majeure partie de ces cellules donnent ultérieurement des protoplastes. Inversement, la digestion des pellicules de cépages noirs libère peu de cellules. Le pourcentage de protoplastes issus de ces cellules reste faible, même sous l'action du pool enzymatique de *B. cinerea*.

Tableau 1

Comparaison de l'efficacité des enzymes exocellulaires de *Botrytis cinerea* et des enzymes commerciales pour la digestion des pellicules de raisin en cours de maturation (1992)

Comparison between effectiveness of *Botrytis cinerea* exocellular enzymes and commercial enzymes in digestion of skin berry of ripening grape (1992)

Cépages	Enzymes de <i>B. cinerea</i>		Enzymes commerciales	
	Cellules libérées (10 ³ /gMF)	%Protoplastes formés	Cellules libérées (10 ³ /gMF)	%Protoplastes formés
Cab. Sauv.	69	58	47	21
Merlot	83	55	20	60
Muscadelle	130	100	140	100
Sauvignon	250	100	80	100
Sémillon	230	100	140	50

Pourtant, l'extrait enzymatique fongique a une très grande activité lytique, conduisant à la désagrégation du tissu pelliculaire. Il s'agit en effet d'un mélange très complexe de nombreuses activités enzymatiques telles que la pectinéméthylestérase, l'endopolygalacturonase, la protéase acide, le complexe cellulastique... (TOUZANI *et al.* 1994), ce qui explique que le nombre de cellules libérées sous l'action du pool enzymatique fongique est plus important, particulièrement chez les cépages blancs étudiés.

L'étude de la sensibilité pelliculaire à la digestion enzymatique a été renouvelée en 1993 en suivant son évolution au cours de la maturation. Seule la préparation classique d'enzymes commerciales a été utilisée. Les résultats regroupés dans Tab. 2 montrent que les pellicules de Cabernet-Sauvignon et de Merlot présentent au cours de la maturation en 1993 une plus grande sensibilité à la digestion enzymatique. La quantité de cellules libérées est globalement 2 à 4 fois plus importante qu'en 1992. Cependant, la proportion de protoplastes formés reste très faible, de l'ordre de 15 %. De façon générale, la maturation se traduit chez ces deux cépages par une légère augmentation de la sensibilité à la digestion enzymatique.

On retrouve chez les cépages blancs la même différence de sensibilité entre les deux millésimes (Tab. 2). Le nombre

Tableau 2

Evolution de la sensibilité à la digestion enzymatique des pellicules des baies de cépages noirs (Cabernet-Sauvignon, Merlot) et blancs au cours de la maturation (1993)

Evolution of susceptibility to enzymatic digestion of grape skin of red and white cultivars during ripening (1993)

Cépages	Dates de prélèvement	Cellules libérées	%Protoplastes formés
Cabernet Sauvignon	30 Août	100	Traces
	07 Sep	130	15
	13 Sep	100	30
	20 Sep	120	17
Merlot	25 Août	70	traces
	01 Sep	100	22
	08 Sep	100	20
	15 Sep	130	15
	20 Sep	90	22
Muscadelle	30 Août	210	9
	07 Sep	230	19
	13 Sep	470	11
	20 Sep	370	8
Sauvignon	25 Août	180	11
	01 Sep	180	9
	08 Sep	200	20
	15 Sep	230	13
Sémillon	25 Août	120	67
	01 Sep	225	13
	08 Sep	225	27
	15 Sep	260	15
	20 Sep	480	11

de cellules libérées par digestion augmente fortement en cours de maturation. Cette évolution est particulièrement importante dans le cas des cépages Muscadelle et Sémillon. La formation de protoplastes reste cependant limitée.

La résistance ou la sensibilité d'un tissu végétal à la digestion enzymatique *in vitro* ou à l'infection par un para-

site n'est pas due à un paramètre particulier mais à un ensemble complexe de différents mécanismes et les sites d'intervention sont multiples. Cependant, de nombreux travaux ont montré que l'action des enzymes pectinolytiques est prépondérante dans la lyse des parois cellulaires (ENGLISH *et al.* 1972; URBANEK et ZALEWSKA-SOBCZAK 1975; VERHOEFF et LIEM 1978; BARTHE 1984). Les substances pectiques sont surtout localisées dans la lamelle moyenne et leur dégradation se traduit d'abord par la désagrégation du tissu et par la libération de cellules isolées. La lyse complète des parois conduisant aux protoplastes, fait appel à d'autres activités enzymatiques et l'extrait de *B. cinerea* est particulièrement actif dans cette digestion.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du calcium dans la cohésion des parois cellulaires et nous avons cherché à savoir si les variations dans la teneur en calcium pariétal pouvait expliquer, au moins en partie, les différences observées dans le comportement des pellicules des cépages que nous avons étudiés. La Figure montre qu'il existe une relation entre la résistance à la digestion enzymatique et la teneur en calcium pariétal. Les pellicules dont les parois sont les plus riches en ce cation sont les plus résistantes à la digestion enzymatique. Ce phénomène apparent masque une relation beaucoup plus complexe. En effet, les deux cépages noirs présentent la plus grande résistance mais les parois des cellules pelliculaires du cépage Merlot nécessitent des teneurs en calcium plus importantes par rapport à celles du Cabernet Sauvignon pour posséder une résistance identique.

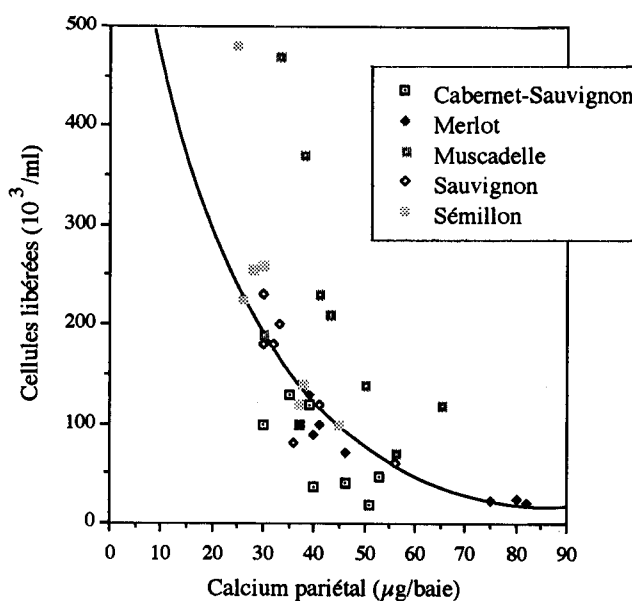


Figure: Relation entre la sensibilité à la digestion enzymatique et la teneur en calcium pariétal des pellicules de différents cépages au cours de la maturation en 1992 et 1993 (la courbe a été obtenue par extrapolation exponentielle à l'aide du logiciel Cricket Graph 1.3.2. L'équation de la courbe est: $y = 716,5 \cdot 10^{-0,0019x}$ avec un coefficient de corrélation de $R=0,76$).

Relation between susceptibility to enzymatic digestion and cell wall calcium content of skin tissue from different cultivars during ripening in 1992 and 1993 (the graph was obtained by exponential extrapolation with the Cricket Graph 1.3.2 software. The equation of regression line is: $y = 716.5 \cdot 10^{-0.0019x}$ with a correlation coefficient $R=0.76$).

La teneur en calcium pariétal ne suffit donc pas à expliquer à elle-seule les différences de sensibilité observée. Il est facile de concevoir que plus les parois sont riches en substances pectiques chélatables par ce cation, plus la teneur en calcium nécessaire à la cohésion pariétale doit être importante. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'à maturité, la pellicule de Merlot est particulièrement riche en substances pectiques solubilisées par l'oxalate d'ammonium (PSOX); ses parois en contiennent environ huit fois plus que celles du Cabernet Sauvignon (Tab. 3). Pour posséder une cohésion pariétale équivalente à celle du Cabernet Sauvignon, la pellicule de Merlot nécessite donc une plus grande richesse en calcium.

Tableau 3

Teneurs en substances pectiques solubilisées par l'oxalate d'ammonium des pellicules de Cabernet Sauvignon et de Merlot à maturité (1993)

Contents in pectic substances solubilized by ammonium oxalate of skin tissues of ripe Cabernet Sauvignon and Merlot berries (1993)

	Cabernet Sauvignon	Merlot
PSOX (µg/baie)	34	229
Re	6,7	1,7

Re = équivalents calcium pariétal / équivalents acides des acides galacturoniques de la fraction PSOX.

Re = cell wall calcium equivalents / galacturonic acid equivalents of PSOX fraction ratio.

La cohésion des parois cellulaires de la pellicule résulte en réalité de l'état de complexation des substances pectiques. Afin d'apprécier cet état, il est nécessaire de déterminer le rapport entre les équivalents en calcium pariétal et les équivalents acides de la fraction pectique PSOX. Pour obtenir une valeur élevée de ce rapport, c'est-à-dire pour conserver une architecture pariétale cohérente, il faut une teneur en calcium pariétal proportionnelle et largement supérieure à la teneur en substances pectiques solubilisées par un agent chélatant.

Ces observations doivent être vérifiées sur d'autres cépages et pour d'autres millésimes. La confirmation de cette hypothèse permettrait alors de disposer d'un paramètre précis pour juger de la résistance à la digestion enzymatique, et donc de la sensibilité aux champignons pathogènes d'un clone ou d'une variété donnée de vigne.

Références

- BARBIER, M.; THIBAUT, J. F.; 1982: Pectic substances of cherry fruit. *Phytochemistry* **21**, 111-115.
- BARTHE, J. P.; 1984: La résistance du haricot à *Colletotrichum lindemuthianum* relevant du gène Cornell. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. Toulouse.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G.; 1973: New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**, 484-489.
- BONASTRE, J.; 1959: Contribution à l'étude des matières minérales des vins. Thèse Sciences, Bordeaux.
- CLELAND, R. E.; RAYLE, D. L.; 1977: Reevaluation of the role of calcium ions on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **60**, 709-712.
- DELLA PENNA, D.; LASHBROOK, C. C.; TOENJES, K.; GIOVANNONI, J. J.; FISCHER, R. L.; BENNET, A. B.; 1990: Polygalacturonase isoenzymes and pectin depolymerization in transgenic *rin* tomato fruit. *Plant Physiol.* **94**, 1882-1886.
- DEMARTY, M.; MORVAN, C.; THELLIER, M.; 1984: Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* **7**, 441-448.
- DONÈCHE, B.; CHARDONNET, C.; 1992: Evolution et localisation des principaux cations au cours du développement du raisin. *Vitis* **31**, 175-181.
- DRAWERT, F.; KREFFT, M.; 1978: Charakterisierung extrazellulärer Proteine und Enzyme aus Pektinkulturfiltraten von *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **7**, 887.
- ENGLISH, P. H.; MAGLOTHIN, A.; KEEGSTRA, K.; ALBERSHEIM, P.; 1972: A cell wall degrading endopolygalacturonase secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Physiol.* **49**, 293.
- FERGUSON, I. B.; 1984: Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant Cell Environ.* **7**, 477-489.
- HEALE, J. B.; 1985: The phytotoxicity of *Botrytis cinerea*. In: CAVALLERO, R. (Ed.): Proceedings of EC experts group meeting, 277-299. Balkema, Rotterdam.
- HRAZDINA, G.; PARSONS, G. F.; MATTICK, L. R.; 1984: Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Amer. J. Enol. Viticult.* **35**, 220-227.
- JONA, R.; VALLANIA, R.; ROSA, C.; 1983: Cell wall development in the berries of two grapevines. *Sci. Hort.* **20**, 169-178.
- MOURGUES, J.; 1983: Les substances pectiques et les polyosides neutres non cellulose des raisins, des moûts concentrés, des vins rouges jeunes et des marcs. Incidences technologiques. Thèse de Docteur-Ingénieur, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- POOVAIAH, B. W.; GLENN, G. M.; REDDY, A. S. N.; 1988: Calcium and fruit softening: physiology and biochemistry. *Hort. Rev.* **10**, 107-152.
- POSSNER, D. R. E.; KLIEWER, W. M.; 1985: The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* **24**, 229-240.
- RIGNEY, C. J.; WILLS, R. B. H.; 1981: Calcium movement, a regulating factor in the ripening of tomato fruit ripening. *HortScience* **16**, 550-551.
- SAULNIER, L.; 1987: Etude structurale des substances pectiques de la pulpe de raisin (Carignan rouge). Thèse de Doctorat de l'Université Paul Sabatier, Toulouse.
- SCHALLER, K.; LÖHNERTZ, O.; CHIKKASUBBANA, V.; 1992: Calcium absorption by grape berries of different cultivars during growth and development. *Wein-Wiss.* **47**, 62-65.
- SUWVAN, M. A.; POOVAIAH, B. W.; 1978: Association between elemental content and fruit ripening in *rin* and normal tomatoes. *Plant Physiol.* **61**, 883-885.
- TOUZANI, A.; 1993: Etude du complexe cellulase de *Botrytis cinerea* et des autres enzymes exocellulaires impliquées dans la dégradation des parois cellulaires de la pellicule du raisin. Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- ; MUNA, J. P.; DONÈCHE, B.; 1994: Effet du pool enzymatique de *Botrytis cinerea* sur les cellules de *Vitis vinifera*. Application à la pellicule du raisin. *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **28**, 19-31.
- URBANEK, H.; ZALEWSKA-SOBCZAK, J.; 1975: Characterization of polygalacturonases of *Botrytis cinerea* E-200. *Bull. Acad. Pol. Sci. cl II*, **XXIII**, 10, 669.
- VERHOEFF, K.; LIEM, J. I.; 1978: Presence of endo-polygalacturonase in conidia of *Botrytis cinerea* before and during germination. *Phytopathol. Z.* **91**, 110.
- WUYTACK, R.; GILLET, C.; 1978: Nature des liaisons de l'ion calcium dans la paroi de *Nitella flexilis*. *Can. J. Bot.* **56**, 1439-1443.

Reçu le 20 Février 1995