

Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin

par

K. AMRANI JOUTEI¹⁾, Y. GLORIES¹⁾ et M. MERCIER²⁾

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

²⁾ Département de Biologie Cellulaire et Microscopie Électronique, Université de Bordeaux I, Bordeaux, France

R é s u m é : La localisation des tanins dans la pellicule de raisin a été étudiée en combinant les résultats obtenus par deux méthodes: observation microscopique (photonique et électronique à transmission), et analyse chimique de différentes fractions obtenues après isolement des cellules pelliculaires sous forme de protoplastes. Trois grands groupes de tanins ont ainsi été déterminées selon leur localisation: tanins libres dans le suc vacuolaire, visualisés sous forme de granules qui augmentent de taille au fur et à mesure que l'on se rapproche de la surface de la pellicule; des tanins liés ont été mis en évidence dans deux autres localisations: tanins liés aux polysaccharides des parois cellulaires par des liaisons osidiques et tanins liés avec les protéines constitutives de la face interne des membranes vacuolaires.

Localization of tannins in grape berry skins

S u m m a r y : The localization of tannins in grape berry skins has been studied by associating results obtained with two methods: light and transmission electron microscopy, and chemical analysis of the fractions obtained after isolation of cells as protoplasts. According to their location, three groups of tannins were determined. The first consists of free tannins in solution in the vacuolar sap (these tannins appear in the form of granules decreasing in size from the skin surface to the pulp). Two other groups are constituted by bound tannins: those bound to the proteins of the internal face of the tonoplast, and those bound to the cell wall polysaccharides by osidic bonds.

K e y w o r d s : tannins, localization, ultrastructure, microscopy, berry skin.

Introduction

La connaissance de la localisation et de l'état des tanins et des anthocyanes dans la baie est essentielle, d'une part pour mieux comprendre les réactions qui interviennent au cours de la maturation du raisin, d'autre part pour maîtriser, lors de la vinification, les phénomènes de diffusion de ces pigments. Nous entendons ici par *tanins*, les tanins condensés à base de flavanols (procyanidines) de la baie de raisin. Plusieurs études sur les tanins ont été réalisées, aussi bien en microscopie photonique qu'en microscopie électronique car diverses méthodes histochimiques permettent de révéler les composés phénoliques. En effet, le sulfate ferreux et le chlorure de fer donnent respectivement une coloration bleue et bleu-verte avec les tanins (JOHANNSENS 1940, REEVE 1959, MACE 1963). Une couleur rouge peut être obtenue avec le réactif nitreux (REEVE 1959 et 1968, MACE 1963, HALLOIN 1982 et STAFFORD *et al.* 1987). D'autres réactifs comme le diméthoxybenzaldehyde (MACE et HOWELL 1974), la vanilline-chlorhydrique (GARDNER 1975, RICKARD et GAHAN 1983) et le bleu de toluidine (FELKER *et al.* 1984) ont été également utilisés. Toutefois, seules les réactions avec les aldéhydes en milieu acide sont spécifiques des flavanols mais sont fugaces et les observations en microscopie optique sont limitées.

En microscopie électronique, BAUR et WALKINSHAW (1974), MUELLER et GREENWOOD (1978) ont assimilé des corps précipités par l'acide osmique à des tanins. L'acide osmique, utilisé comme contrastant de fond en microscopie électronique, n'est évidemment pas spécifique des composés phénoliques ; il réagit de la même façon avec tous les phénols et ne permet pas de mettre en évidence les procyanidines. Ce sont donc les recouvrements entre les résultats de plusieurs méthodes qui peuvent contribuer à constituer un solide faisceau de présomptions. Des travaux cytochimiques sur les composés phénoliques du raisin ont été réalisés notamment par CONSIDINE et KNOX (1979), BERNARD (1980), RAJAEI (1987). Mais on ne peut caractériser les flavanols avec certitude qu'*in vitro*, à l'aide d'une méthode chimique (BATE SMITH 1954, RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET 1966).

Dans le présent article, nous étudions la localisation des procyanidines dans la pellicule, dans un premier temps *in situ* par microscopies photonique et électronique à transmission; mais les localisations ainsi suggérées peuvent être discutées pour les raisons déjà mentionnées. C'est la raison pour laquelle dans un deuxième temps, l'identification des procyanidines a été confirmée par voie chimique, dans les cellules et dans les parois squelettiques préalablement séparées par isolement des protoplastes.

Matériel et méthodes

Microscopie électronique à transmission et microscopie photonique: Des fragments de pellicule sont fixés pendant 2 h à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon de SORENSEN 0,1 M à pH 7,2 (phosphates monopotassique et disodique); les pièces sont ensuite rincées plusieurs fois dans le même tampon, postfixées 2 h à 4 °C dans une solution de tétraoxyde d'osmium à 0,1 %, et rincées à nouveau plusieurs fois dans le tampon. Elles sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol présentant des concentrations croissantes de 40 à 95 % vol. jusqu'à trois bains d'éthanol absolu. Après passage intermédiaire par l'oxyde de propylène, elles sont enfin incluses dans une résine époxyde (Epon 812).

Des coupes ultraminces contrastées par l'acétate duranyle et le citrate de plomb sont recueillies et observées avec un microscope électronique JEOL 1200EX. Des coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine pour la microscopie photonique.

Isolement des protoplastes: L'isolement des protoplastes de la pellicule de raisin de différents cépages, notamment du Merlot et du Cabernet franc, est réalisé selon la méthode de WAGNER et SIEGELMAN (1975) modifiée comme suit (AMRANI JOUTEI 1993): le sorbitol joue le rôle d'osmoticum à une concentration de 1,4 M dans le milieu d'incubation. Des rinçages ayant pour but d'éliminer la totalité des composés phénoliques provenant des lésions de la pellicule sont réalisés plusieurs fois dans le milieu qui sert également de plasmolyseur.

Cette opération permet d'obtenir d'une part les protoplastes ainsi que divers débris en suspension, d'autre part un milieu liquide où sont solubilisés les constituants polysaccharidiques des parois cellulaires.

Détection des procyanidines dans les protoplastes: Les protoplastes rincés dans le milieu plasmolyseur, sont immergés dans 1 ml d'eau distillée pendant 10 min. Les cellules éclatées, sont reprises 4 fois puis laissées au repos 2-3 h dans l'eau distillée pour séparer les membranes du contenu cellulaire en solution (cytoplasme et suc vacuolaire). Les membranes cellulaires et vacuolaires de couleur blanchâtre récupérées après centrifugation, sont ensuite transférées dans un tube à hydrolyse où l'on ajoute 1 ml de la solution butanol-1-HCl (v/v : 1/1) contenant 150 mg/l de FeSO₄. Le fer joue le rôle de catalyseur d'oxydation. Le tube est alors porté au bain marie à 100 °C pendant 30 min (BATE SMITH 1954).

L'eau qui a servi à faire éclater et à rincer les protoplastes (contenant cytoplasme et suc vacuolaire) est récupérée et hydrolysée de la même manière.

Détection des procyanidines dans le milieu d'incubation (parois): La technique mise en œuvre (POMPEI *et al.* 1971) fait intervenir les propriétés adsorbantes des composés phénoliques sur la polyvinylpyrrolidone (PVPP). Les polyphénols sont

fixés préférentiellement sur ces adsorbants, tandis que les sucres, les substances minérales, les protéines (enzymes) et les divers constituants non retenus, sont éliminés par lavage à l'eau. Dans un tube à essai, on pipette 20 ml de la solution enzymatique qui est à l'origine de la digestion des parois, préalablement filtrée sur du papier filtre du type WHATMAN n° 1 pour éliminer les gros fragments qui n'ont pas été digérés et pour éviter tout éclatement des cellules incomplètement isolées de leurs parois, et on ajoute 0,2 g de PVPP au filtrat. Après avoir soumis la suspension à une agitation mécanique de 10 min, le produit adsorbant est facilement séparé par centrifugation (5000 g pendant 10 min). Le culot est rincé 2-3 fois à l'eau distillée puis transféré dans un tube à hydrolyse où on ajoute 20 ml de la solution butanol-1-HCl (v/v : 1/1) contenant 150 mg/l de sulfate de fer (FeSO₄). Le tube est porté 30 min au bain marie à 100 °C.

Dans les trois types d'analyse ci-dessus, la présence de tanins se traduit par l'apparition d'une coloration rouge présentant un maximum d'absorption à 550 nm. La densité optique est mesurée sous 1 cm de parcours optique.

Détermination de la nature des liaisons tanins-parois cellulaires: L'éthanol, qui solubilise les composés phénoliques libres, précipite les polysaccharides; nous avons tenté de mettre en évidence la présence éventuelle de tanins liés à des glucides par hydrolyse enzymatique des précipités éthanoliques.

100 ml d'un extrait brut pelliculaire sont mis en présence de 900 ml d'éthanol à 95 % vol. dans le but de précipiter le complexe tanins-polysaccharides. Une extraction à l'acétate d'éthyle permet de vérifier que ce dernier est dépourvu de procyanidines libres. Il est repris avec 100 ml d'une solution tampon acétate (0,1 M à pH 5) puis incubé en présence de 1% de tannase (extraite d'*Aspergillus oryzae*, et contenant principalement des activités β -glucosidases et β -galactosidases) pendant trois heures à 37 °C. La solution enzymée est ensuite reprise trois fois avec de l'acétate d'éthyle en vue d'extraire d'éventuelles procyanidines. Après évaporation de la phase organique, le culot est solubilisé dans 10 ml d'un mélange H₂O-éthanol (v/v : 1/1). Cette solution est dosée par la méthode chimique de BATE SMITH (1954), et les différents constituants sont identifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) selon la méthode de DOURNEL (1985). L'identification des pics est établie par comparaison des temps de rétention de procyanidines pures synthétisées à l'Institut d'Oenologie de l'Université de Bordeaux 2 (B1, B2 selon la méthode de MICHAUD *et al.* 1973, B3 et B4 selon la méthode de GEISSMAN et YOSHIMURA 1966, EASTMOND 1974).

Résultats

Observation en microscopie photonique de coupes de pellicule de baies du cépage Chardonnay: Elle montre que la pellicule de raisin, colorée à l'aide du bleu de toluidine, est constituée par deux types de cellules: des cellules à

précipité granuleux, ou *cellules tannifères* (RAJAEI 1987) alternent avec des amas dispersés de cellules dépourvues de précipités. Dans les cellules tannifères, les composés phénoliques apparaissent sous différentes formes: précipités grossièrement et finement granuleux, et présentant des couleurs plus ou moins intenses (Fig. 1). Ces précipités apparaissent parfois localisés vers la périphérie cellulaire.

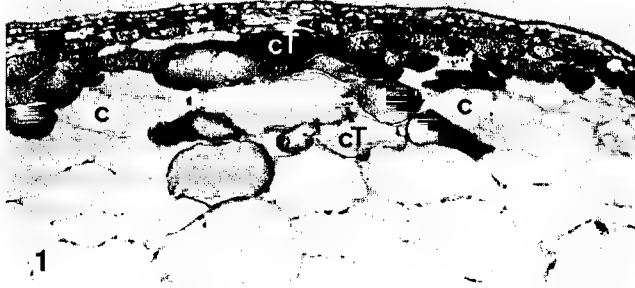


Fig. 1: Coupe de pellicule de baie de raisin colorée au bleu de toluidine, montrant des cellules tannifères (cT) et des cellules dépourvues de précipités (c) ; microscopie photonique (x 170).

Section of berry skin stained with toluidine blue, showing cells with tannic precipitates (cT) and cells without (c) ; light microscopy (x 170).

Localisation des tanins à l'aide de la microscopie électronique à transmission de coupes de pellicule: Des précipités denses aux électrons sont visibles dans les vacuoles des cellules de la pellicule après traitement des échantillons par le tétrahydroborane. Ces précipités se présentent sous forme de granules de tailles différentes suivant les cellules, suggérant la présence d'un gradient centrifuge dans la baie: la taille des granules augmente (jusqu'à $0,5 \mu\text{m}$ de diamètre environ) et leur nombre diminue au fur et à mesure que l'on considère des cellules de plus en plus proches de l'épiderme (Fig. 2) ; les vacuoles des cellules épidermiques contiennent également des précipités (Fig. 3). De plus, au niveau sous-épidermique, on peut parfois observer dès la nouaison un réseau dense constitué par la coalescence en réseau de nombreux granules de $0,3$ à $0,5 \mu\text{m}$ (Fig. 4).

Des précipités en contact étroit avec la face interne du tonoplaste sont observés dès le stade nouaison (Fig. 5). Ils se présentent le plus souvent sous la forme d'un dépôt continu (Fig. 5), parfois, sous forme d'unités granulaires distinctes (Fig. 6). Le traitement aux ultra-sons à une intensité capable de provoquer la rupture de la paroi cellulaire, n'entraîne ni perturbation de la position des précipités ni leur séparation du tonoplaste (Fig. 7). Cela laisse supposer l'existence d'une liaison spécifique et relativement forte entre ces précipités et le tonoplaste.

Localisation des procyanidines de la pellicule par la méthode chimique: La présence de procyanidines dans différentes parties de la pellicule a été mise en évidence par la méthode chimique.

(1) Dans les cellules: le spectre d'absorption (Fig. 8) de la fraction [eau distillée + cytoplasme + suc vacuolaire]

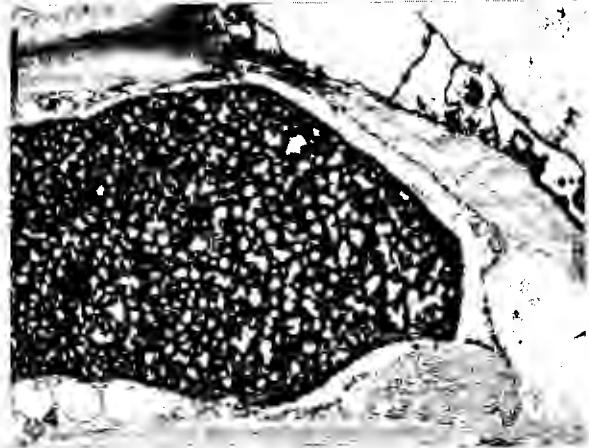
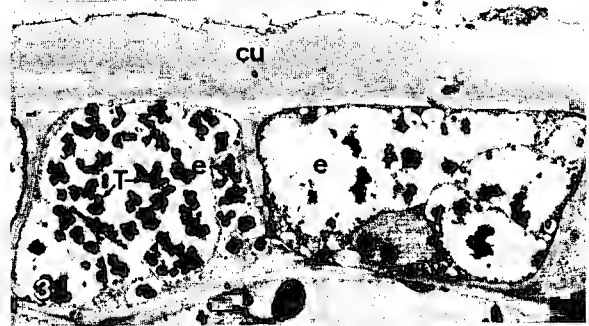
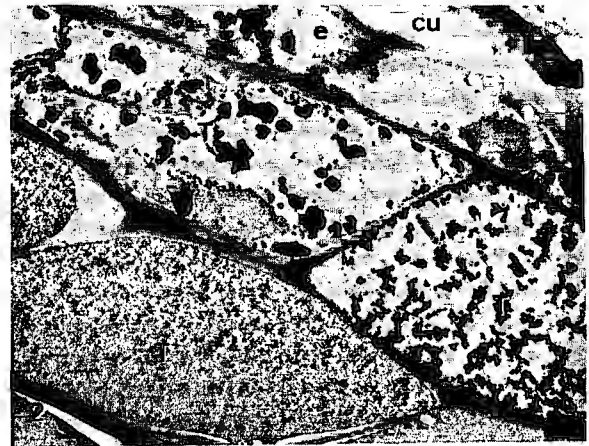


Fig. 2: Gradient des tanins intravacuolaires à travers la pellicule: dans les cellules de plus en plus proches de la surface, les précipités tanniques (T) sont constitués de grains de moins en moins nombreux et de plus en plus gros. e: cellules épidermiques; cu: cuticule (x 3400).

Fig. 3: Cellules de la couche épidermique (e) contenant des précipités tanniques intravacuolaires (T). cu: cuticule (x 3800).
Fig. 4: Cellule dont la vacuole contient des tanins (T) précipités sous forme de réseau dense (x 5600).

Les Figs. 2 à 4 ont été obtenues en microscopie électronique à transmission.

Fig. 2: Gradient of intravacuolar tannins through the berry skin: in the cells closer to the surface, the tannic precipitates (T) consist of less numerous and bigger granules. e: epidermal cells; cu: cuticle (x 3400).

Fig. 3: Epidermal cells (e) containing intravacuolar tannin precipitates (T). cu: cuticle (x 3800).

Fig. 4: Cell showing a vacuole with tannins (T) precipitated as a dense network. (x 5600).

Figs. 2 to 4 were obtained by transmission electron microscopy.



Fig. 5: Couche continue de tanins (T) liés à la face interne du tonoplaste (t). p: plasmalemma (x 5700).

Fig. 6: Tanins (T) liés à la face interne du tonoplaste (t) sous forme d'unités granulaires. p: plasmalemma (x 3400).

Fig. 7: Couche continue de tanins (T) liés à la face interne du tonoplaste après action des ultra-sons; la paroi (P) est altérée (la lamelle moyenne en particulier a disparu), mais la liaison des tanins au tonoplaste reste intacte (x 3200).

Les Figs. 5 à 7 ont été obtenues en microscopie électronique à transmission.

Fig. 5: Continuous layer of tannins (T) bound to the internal face of the tonoplast (t). p: plasmalemma (x 5700).

Fig. 6: Tannins (T) seen as granular units bound to the internal face of the tonoplast (t). p: plasmalemma (x 3400).

Fig. 7: Continuous layer of tannins (T) bound to the internal face of the tonoplast after ultrasonic action. The cell wall (P) is injured (the middle lamella has disappeared) but the binding of tannins to the tonoplast remains undamaged. (x 3200).

Figs. 5 to 7 were obtained by transmission electron microscopy.

chauffée en milieu acide révèle la présence d'anthocyanes provenant de la transformation des procyanidines à l'état libre dans les vacuoles en anthocyanidines (les protoplastes de raisin rouges présentent déjà une coloration rouge, qui est intensifiée par le chauffage en milieu acide). Le culot des membranes provenant des protoplastes éclatés, traité dans les mêmes conditions, conduit à un résultat identique;

cela montre la présence de tanins condensés certainement liés aux membranes.

(2) Dans les parois cellulaires, le même traitement, appliqué au PVPP qui a adsorbé les composés phénoliques provenant du milieu de digestion enzymatique, fournit également un spectre identique à celui de la Fig. 8, attestant la présence de procyanidines. La contamination du milieu d'incubation par des tanins provenant de l'éclatement accidentel de certains protoplastes est à exclure puisque la libération dans le milieu de ces molécules est toujours accompagnée par celle des anthocyanes, or le spectre en milieu acide de cet extrait n'a jamais montré de maximum à 520 nm.

Le résultat de l'expérimentation destinée à montrer la liaison des tanins de la paroi avec les polysaccharides est

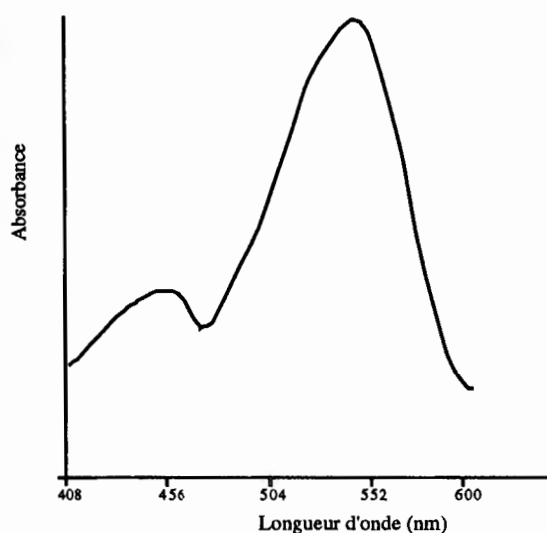


Fig. 8: Spectre d'absorption obtenu après hydrolyse acide de la solution enzymatique en milieu butanol-1-HCl.

Absorption spectrum obtained after acid hydrolysis of the enzymatic solution in butanol-1-HCl medium.

présenté dans la Fig. 9: la tannase utilisée permet de libérer, à partir du précipité tanins-polysaccharides, des acides benzoïques, des procyanidines dimères, de la (+) catéchine et de la (-) épicatechine identifiés par CLHP; la réaction de BATE SMITH (1954) appliquée à la même solution y confirme la présence de procyanidines par comparaison avec un témoin n'ayant pas subi l'action des enzymes.

Discussion et conclusion

Les observations microscopiques et les dosages chimiques mentionnés ci-dessus peuvent être rapprochés de façon à donner une idée précise de la localisation des tanins dans la pellicule des baies de raisin. Les précipités observés en microscopie photonique dans les cellules tannifères et les précipités denses aux électrons décrits en microscopie électronique traduisent très vraisemblablement la présence des mêmes substances dans les vacuoles, conformément aux observations de divers auteurs (BAUR

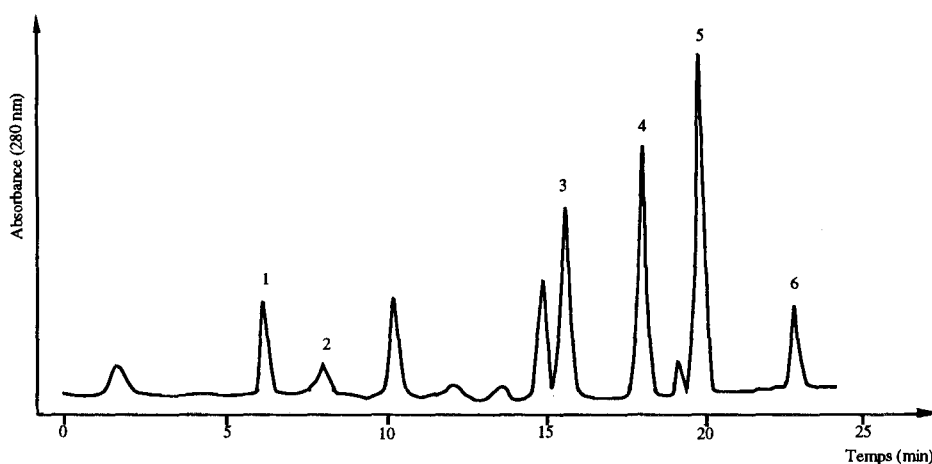


Fig. 9: Chromatographie liquide haute performance d'un précipité éthanolique d'extract brut de pellicule, hydrolysé à l'aide de la tannase: 1 = acide gallique; 2 = acide protocatéchique; 3 = procyanidine B₃; 4 = (+) catéchine et procyanidine B₁; 5 = procyanidine B₄; 6 = (-) épicatechine et procyanidine B₂.

High performance liquid chromatography of an ethanolic precipitate of skin crude extract, hydrolysed with tannase: 1 = gallic acid; 2 = protocatechic acid; 3 = B₃ procyanidin; 4 = (+) catechin and B₁ procyanidin; 5 = B₄ procyanidin; 6 = (-) epicatechin and B₂ procyanidin.

et WALKINSHAW 1974, MUELLER et GREENWOOD 1978, CONSIDINE et KNOX 1979, FELKER *et al.* 1984). En outre, la méthode chimique montre que des tanins se trouvent d'une part dans la fraction contenant à la fois le cytoplasme et le suc vacuolaire, d'autre part dans la fraction membranes provenant des protoplastes.

En ce qui concerne la première de ces deux fractions, il paraît légitime d'identifier les précipités observés dans les vacuoles, aux tanins condensés dont l'existence est démontrée par la méthode chimique. D'autre part, la présence de tanins dans le cytoplasme est *a priori* à exclure car cela risquerait d'entraîner un blocage du métabolisme cellulaire ; ceci est confirmé par l'absence de précipité dans le cytoplasme.

La fraction membranes soumise à la méthode chimique révèle également la présence de tanins condensés. Cette fraction est constituée essentiellement par le plasmalemme et le tonoplaste. Or si en microscopie électronique aucun précipité n'a pu être observé au contact du plasmalemme, des précipités denses aux électrons, associés au tonoplaste sont fréquemment présents. Ces précipités correspondent donc aux tanins condensés révélés par l'analyse chimique. La liaison entre ces tanins et le tonoplaste est très forte, comme le montrent les tentatives infructueuses de dissociation par les ultra-sons ; la grande affinité des tanins pour les protéines en particulier celles du tonoplaste permet d'envisager une liaison de ces molécules avec la membrane. La plupart des organites intracellulaires et les membranes qui les constituent étant éliminés avec le cytoplasme dans la fraction précédente, il paraît exclu pour la raison de blocage du métabolisme déjà citée, que des tanins soient associés à ces membranes sur leur face hyaloplasmique, comme dans le cas du plasmalemme.

Les tanins de la paroi caractérisés par la méthode chimique, sont au moins pour certains d'entre eux, liés aux polysaccharides qui la constituent; les activités de la tannase

étant principalement des activités β -glucosidase et β -galactosidase, on peut supposer que les procyanidines sont liées à des molécules polysaccharidiques notamment par des liaisons β -glucose et β -galactose. Cela n'exclut ni la possibilité d'autres types de liaison, ni la possibilité de l'existence de petites molécules de procyanidines libres dans la paroi, non décelées au microscope électronique.

Compte tenu de la présence de procyanidines dans les parois cellulaires et de l'existence d'un gradient de condensation croissant vers l'épiderme à travers les cellules de la pellicule, on peut envisager une possible migration intercellulaire des tanins des couches profondes de la pellicule vers les couches externes. Cette hypothèse est en accord avec celle de DARNÉ (1991) selon laquelle les anthocyanes de la pellicule sont susceptibles de dériver des procyanidines des pépins.

En définitive, cette étude montre trois types de tanins localisés différemment dans la pellicule de la baie de raisin: il s'agit de tanins libres situés dans le suc vacuolaire et de tanins liés à la membrane vacuolaire et à la paroi cellulaire. Les caractéristiques de ces tanins interviennent sur leur extractibilité au cours de la vinification et sur les propriétés organoleptiques des vins. Les tanins liés sont en effet difficilement extractibles sans l'intervention d'enzymes appropriées (du raisin ou ajoutées). La macération, quand le raisin n'est pas mûr, favorise principalement la diffusion de petites molécules de tanins libres agressives vis à vis des protéines. Dans ce cas, l'utilisation d'enzymes pectolytiques au cours de la macération entraîne la destruction des parois cellulaires permettant la libération des tanins liés aux polysaccharides et aux membranes vacuolaires ainsi que des grosses molécules de tanins libres intravacuolaires plus ou moins agressives vis à vis des protéines; les vins ainsi obtenus sont moins astringents que les précédents. Dans le cas de bonne maturité, les enzymes du raisin permettent d'obtenir des résultats comparables.

Références

- AMRANI JOUTEI, K.; 1993: Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin; étude de leur extractibilité. Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- BATE SMITH, E. C.; 1954: Leuco-anthocyanins I: Detection and identification of anthocyanidin formed from leuco-anthocyanidins in plant tissues. *Biochem. J.* **58**, 122-125.
- BAUR, P. S.; WALKINSHAW C. H.; 1974: Fine structure of tannin accumulations in callus cultures of *Pinus elliotii* (slash pine). *Can. J. Bot.* **52**, 615-619.
- BERNARD, A. C.; 1980: Contribution à l'étude de la biologie et des méristèmes des vitacées. Thèse d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- 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.
- DARNÉ, G.; 1991: Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. Thèse d'Etat, Université de Bordeaux I.
- DOURNEL, J. M.; 1985: Recherches sur les combinaisons anthocyanes-flavanols. Influence de ces réactions sur la couleur des vins rouges. Thèse doctorat, Université de Bordeaux II.
- EASTMOND, R.; 1974: The separation and identification of a dimer of catechin occurring in beer. *J. Inst. Brew.* **80**, 188-192.
- 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 chalazal necrosis in the seg 1 mutant. *Planta* **161**, 540-549.
- GARDNER, R. O.; 1975: Vanillin-hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technol.* **50**, 315-317.
- GEISSMAN, T. A.; YOSHIMURA, N. N.; 1966: Synthetic proanthocyanidin. *Tetrahedron Letter* **24**, 2669-2673.
- HALLOIN, J. M.; 1982: Localisation and changes in catechin and tannins during development and ripening of cottonseed. *New Phytol.* **90**, 651-657.
- JOHANSENS, D. A.; 1940: *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- MACE, M. E.; 1963: Histochemical localisation of phenol in healthy and diseased Banana roots. *Physiol. Plant.* **16**, 915-926.
- ; HOWELL, C. R.; 1974: Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedling. *Can. J. Bot.* **52**, 2423-2426.
- MICHAUD, J.; MASQUELIER, J.; ROUDGE, A. M.; 1973: Synthèse des pro-cyanidines naturelles. *Ann. Pharm. Franç.* **31**, 385-395.
- MUELLER, W.C.; GREENWOOD A. D.; 1978: The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. *J. Exp. Bot.* **29**, 757-764.
- POMPEI, C.; PERI, C.; MONTEODORO, G.; 1971: Le dosage des leucoanthocyanes dans les vins blancs. *Ann. Technol. Agric.* **20**, (1), 21-34.
- RAJEL, H.; 1987: Changements cytochimiques 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.
- REEVE, M. E.; 1959: Histological and histochemical changes in developing and ripening peaches. I. The catechol tannins. *Amer. J. Bot.* **46**, 210-217.
- ; 1968: Histochemical differentiation between tyrosine and chlorogenic acid in plant tissues. I. Nitrous acid reactions and methal chelation of nitrosotyrosine. *J. Histochem. Cytochem.* **16**, 191.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; STONESTREET, E.; 1966: Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Analyt.* **48**, (4), 188-196.
- RICKARD, J. E.; GAHAN, P. B.; 1983: The development of occlusions in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root xylem vessels. *Ann. Bot.* **52**, 811-821.
- STAFFORD, H. A.; LESTER, H. H.; WEIDER, R. M.; 1987: Histochemical assay of proanthocyanidin heterogeneity in cell cultures. *Plant. Sci.* **52**, 99-104.
- WAGNER, G. J.; SIEGELMAN, H. W.; 1975: Large scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science* **190**, 1298-1299.

Reçu le 10 Janvier 1994