

**THÈSE**

pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Oenologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 3 décembre 2010*

*Par Soizic LACAMPAGNE*

*Née le 17 avril 1981 à La Réole*

**Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule  
du raisin :**

**Etude de l'impact de l'organisation physico-chimique des  
parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du  
fruit et la typicité des raisins de Bordeaux.**

**Membres du Jury**

|                                                                        |                     |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| M. G. De Revel, Professeur à l'Université de Bordeaux 2 .....          | Président           |
| M. V. De Freitas, Professeur à l'Université de Porto.....              | Rapporteur          |
| M. A. Schubert, Professeur à l'Université de Turin.....                | Rapporteur          |
| M. P. Chaimbault, Professeur à l'Université de Metz.....               | Examineur           |
| M. A. Calas, Professeur à l'Université de Bordeaux 2 .....             | Examineur           |
| Mme. L. Gény-Denis, Maître de conférences à l'Université de Bordeaux 2 | Directrice de thèse |

*A ma grand-mère, Blanche Martin-Leguen,*

*« Chaque homme, quelque soit son âge, doit avoir un rêve aussi petit soit-il... Et il doit avoir  
à cœur de marcher vers se rêve » (M.Shiratori, 2010)*

# Remerciements

*Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Biochimie et de Physiologie de la Vigne de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux, sous la direction de Madame Laurence Gény, Maître de Conférences. Je tiens par ces quelques mots à la remercier profondément de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer cette thèse. Sa confiance et ses encouragements ont été déterminants dans l'accomplissement de ce travail ainsi que dans l'enthousiasme qui a guidé ces recherches. Au-delà de l'expérience professionnelle, son « coaching » m'a permis de relever des défis personnels, qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère et profonde reconnaissance.*

*Je remercie M. le Professeur B. Donèche, doyen de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux et directeur de l'équipe de Biochimie et de Physiologie de la Vigne de m'avoir accueillie au sein de cet établissement et de cette équipe.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.*

*Messieurs les Professeurs Victor De Freitas, de l'Université de Porto (Portugal) et Andrea Shubert, de l'Université de Turin (Italie) ont accepté d'être rapporteurs de ce travail. L'intérêt et la patience que vous avez portés à l'examen de ce travail ont permis une discussion très enrichissante. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie Monsieur André Calas, Professeur Emérite à l'Université Victor Ségalen de Bordeaux 2, d'avoir examiné ce travail. J'ai été très honorée de sa présence et je le remercie sincèrement de m'avoir fait partager sa grande expérience de «microscopiste».*

*Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Patrick Chaimbault de l'Université Paul Verlaine de Metz. Merci pour cette collaboration, ton implication dans ce projet particulier et d'avoir fait le lien entre les «physico-chimistes» et les biologistes!*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Gilles De Revel, Professeur à la Faculté d'Œnologie de Bordeaux qui a présidé ce jury. Merci pour vos conseils et merci de m'avoir initiée à l'utilisation du logiciel Fizz qui fut d'un grand secours dans la réalisation des analyses sensorielles.*

*Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier du Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux. Je remercie les responsables des Services Techniques : Madame Barthe et Monsieur Charlier, qui m'ont accordé leur confiance et permis de mener à bien ce travail dans de bonnes conditions matérielles.*

*Ce travail a pu se faire grâce à de précieuses collaborations. Je tiens en premier lieu à remercier le Bordeaux Imaging Center et plus précisément les pôles photoniques et électroniques. Merci à Laure, Sébastien, Christel et Philippe du pôle photonique, pour leur soutien technique, leurs précieux conseils et leur bonne humeur.*

*Mes mots ne seront pas assez forts pour témoigner de ma profonde reconnaissance et de mon amitié au personnel du pôle de microscopie électronique. Un grand merci à Etienne et ses techniciennes : Melina, Sabrina et Isabelle. Merci de m'avoir initiée aux joies de la microscopie électronique. Votre soutien scientifique, technique et moral ont été déterminants dans ce travail et resteront gravés dans ce manuscrit !*

*Je tiens à remercier le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie du Laser (« LSMCL » plus facile à écrire qu'à prononcer !) de l'Université Paul Verlaine de Metz, pour cette intéressante et enrichissante collaboration. Merci à Patrick, Vincent, Greg et Loïc de m'avoir initiée à la spectrométrie de masse et d'avoir accordé du temps à l'analyse de mes échantillons. Je remercie également le Professeur Muller d'avoir rendu possible cette collaboration et l'ensemble des doctorants et personnels du LSMCL pour leur chaleureux accueil.*

*Merci à l'équipe du réseau de maturité de la faculté d'œnologie de Bordeaux. Elodie, Nathalie, Annie, Laurence, Manu : j'ai adoré travailler avec vous. Merci pour ces moments de bonne humeur, votre sympathie et votre passion pour le pénétromètre!*

*Merci à Mr. François Redero de la société Thermofisher Scientific pour son efficacité dans les dépannages.*

*Merci à Marc Bonneau et Delphine Lapaillerie du Pôle protéomique de Bordeaux pour leur soutien scientifique et technique dans la validation des anticorps primaires.*

*La recherche étant avant tout un travail d'équipe, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire de Physiologie et de Biochimie de la Vigne. Merci à Céline, Greg P., Alvaro, Claudia.*

*Un merci particulier à Amélie et Audrey qui sont venues me prêter main forte pour les suivis d'activités des enzymes : merci pour nos papotages forts sympathiques autour du pelage des baies, pour vos conseils et votre expérience.*

*Merci à Christelle et Séverine dont les travaux ont donné naissance à ce sujet de thèse.*

*Merci Christelle d'avoir pris le temps de m'initier à la dégradation pariétale, je te remercie grandement pour tes conseils et d'avoir suivi ce travail malgré l'éloignement géographique.*

*Séverine, j'ai débuté mon travail au laboratoire dans le cadre de ta thèse : ta rigueur scientifique, ta motivation et ta persévérance m'ont encouragé et donné l'assurance pour percer les mystères de la LAR et de l'ANR. Je tiens également à remercier Carole, qui tout comme Séverine, a partagé ma paillasse et notre petit Gégé ! Je te fais confiance pour la suite et te donne rendez-vous dans un an pour la lecture de ton manuscrit... Séverine et Carole, plus que des collègues, vous êtes devenues des amies : merci pour tout et j'espère que nos groupes de parole continueront longtemps!*

*Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide précieuse d'Annie L'Hyvernay. Tu as été le « pilier » de ces trois années au laboratoire... Dans les bons comme dans les mauvais moments, tu étais là. Merci pour les heures passées devant les tubes, les heures passées à m'écouter, à me conseiller, merci pour ta sagesse et ton recul. Merci également pour les fous rires et tes récits d'aventure perso... Plus que trois ans avant ta retraite bien méritée... garde toujours ton téléphone allumé pour mes futurs étudiants !!! Merci pour tout.*

*Merci également aux stagiaires qui ont participé à ce travail : Vera, Laure et surtout Romain dit « Rominou ». Merci pour votre implication.*

*Je tiens également à remercier les personnes que j'ai pu rencontrer au cours de mes années de formation à la recherche. Merci aux personnes qui m'ont conforté dans la voie de la recherche : Denis Thiéry, Anne Xuereb, Michel Hernould, Christian Chevalier, Frédéric Gévaudant, Nathalie Gonzalez, Cécile Bres, Pierre, Martine, Elodie, Thomas...*

*Mes remerciements vont aussi à tous les étudiants, stagiaires, personnels administratifs et scientifiques de la Faculté d'œnologie que j'ai côtoyé au cours de ces quatre années de thèse et de master.*

*Parmi eux, je tiens à remercier sincèrement le personnel administratif et plus particulièrement Blanche, Manu et Patrick. Un merci particulier à Blanche qui m'a orientée vers le laboratoire de Laurence, le début de mon aventure à la fac d'oeno ! Le très populaire Manu qui fait des miracles dans la transcription des idées en animation et Patrick qui a toujours une solution pour réparer ce qui ne marche pas ! Merci à vous.*

*Merci aux collègues « jaunes et rouges » et plus particulièrement Cécile, Alex, les Philippes, Marina, Warren, Monique, Bénédicte P., Leila, Jiouly, Guillerm, Axel, Mickaël, Greg S., Bénédicte L., Julien, Isabelle, Maria S., Sophie, Guillaume, M.Claire, Laurent, Stéphanie, Davide, et les dissipés du hall techno... j'en oublie certainement, mais chaque personne rencontrés dans ces locaux restera dans mes souvenirs de thèse....*

*J'adresse mes remerciements particuliers à mes deux amies grecques : Kléo et Maria. Pour résumer : je sais pourquoi j'ai fait ma thèse à la Fac d'Oeno : c'était pour vous rencontrer ! Les filles, votre amitié, votre soutien et votre accent ont rendu ces trois années plus légères. « ευχαριστώ πολύ » à vous ainsi qu'à vos familles !!!*

*Un merci particulier à Mr Cedric Saucier pour ses encouragements pendant cette thèse et surtout pendant la rédaction. Merci pour les discussions « skype » qui m'ont évité une désocialisation totale durant l'été 2010 ! Bonne chance dans tes projets diverses et variés.*

*Enfin, je remercie ma famille et mes amis. En particulier :*

*Mes collègues de fac' : Marjo, Sam, Hervé, la Dako Team (Mulder, JB, Antoine, Jaco et Ben), Aurore, « Anne-So et la centrifugeuse ». Merci de m'avoir fait revivre et redonné l'envie d'aller au bout de mes rêves !!! Bonne chance à vous tous pour la suite !*

*Ma copine toulousaine Laure. Je te souhaite le meilleur pour la suite mais comme tu as déjà pris les devants, j'insiste ! Merci pour ton amitié et ta franchise, c'est une qualité rare, garde-la...*

*Sylvie, Rod&Co, Nono, Emma-Manu, Claire, Ralou et Chloé (c'est bientôt ton tour, courage !)...*

*Merci les cousins-cousines, les oncles et tantes pour votre soutien et la fierté que j'ai pu lire dans vos yeux ! Merci à Gaël et Yanik, pour votre soutien, votre écoute et votre « côté passionné », votre présence a été capitale ! Merci à mon parrain, Gaël, et ma marraine, Françoise, qui ont joué parfaitement leur rôle : mes parents ont fait le bon choix !*

*Merci à mes frères et ma sœur : Gwena, tu as toujours tenu le rôle de la grande sœur et tu m'as rappelé combien il était important d'être présent pour sa famille avec tes deux petites puces : Iris et Perle. Merci à vous 3 et à Full d'avoir vécu la soutenance jusqu'au bout ! Merci à Erwan, « le grand frère » à qui j'ai « pris la tête » pendant de nombreuses années mais ça valait le coup ! Merci à Béra, la belle-sœur-psy et à vos deux petitous : Ronan et Salomé. Enfin merci à Christo, le petit dernier, je crois en toi comme tu as cru en moi, tu vas y arriver, courage...*

*Un grand merci à mes parents pour m'avoir transmis toutes ces valeurs. Vous avez su nous donner la volonté d'accomplir nos rêves et je crois que vous avez gagné votre pari. Merci pour votre soutien, votre patience et merci à « maman » d'avoir passé toutes ces heures au téléphone !*

*Merci à Baptiste pour ton courage, ta patience et ton soutien... tu mérites une médaille en or!!!*

*Enfin, je remercie ma grand-mère, Blanche : on est allé jusqu'au bout ensemble. Ce travail est aussi le tien. Je terminerai par « ma phrase » : « Si les grand-mères n'existaient pas, il faudrait les inventer »...*

# Sommaire

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>                                                      | <b>1</b>  |
| <b>CHAPITRE PREMIER : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                          | <b>4</b>  |
| <b>I. Evolution de la pellicule au cours du développement de la baie</b> | <b>4</b>  |
| I.1 Rappel sur le développement de la baie de raisin                     | 4         |
| I.2 La pellicule de raisin : aspect histologiques et cytologiques        | 6         |
| I.3 La texture des baies                                                 | 8         |
| <b>II. Les parois cellulaires au cours de la maturation du fruit</b>     | <b>10</b> |
| II.1 L'évolution de l'ultrastructure pariétale                           | 10        |
| II.2 Structure et composition de la paroi cellulaire                     | 12        |
| II.2.a La cellulose                                                      | 13        |
| II.2.b L'hémicellulose                                                   | 13        |
| II.2.c Les polysaccharides pectiques                                     | 14        |
| II.3 Les enzymes impliquées dans l'évolution pariétale                   | 15        |
| II.3.a La pectine méthylestérase (PME)                                   | 15        |
| II.3.b La polygalacturonase (PG)                                         | 18        |
| <b>III. Les composés phénoliques du raisin</b>                           | <b>19</b> |
| III.1 Les composés non flavonoïdes                                       | 21        |
| III.1.a Les acides phénols                                               | 21        |
| III.1.b Les stilbènes                                                    | 21        |
| III.2 Les composés flavonoïdes                                           | 22        |
| III.2.a Les anthocyanes                                                  | 23        |
| III.2.b Les tannins du raisin                                            | 25        |
| III.3 Biosynthèse des composés phénoliques dans la pellicule du raisin   | 28        |
| III.3.a La voie des phénylpropanoïdes                                    | 28        |
| III.3.b Biosynthèse des tannins                                          | 31        |
| III.3.b.i La leucoanthocyanidine réductase (LAR)                         | 31        |
| III.3.b.ii L'anthocyanidine réductase (ANR)                              | 32        |
| III.3.c Régulation de la voie de biosynthèse                             | 34        |
| III.3.c.i Facteurs de transcriptions                                     | 34        |
| III.3.c.ii Régulateurs hormonaux : acide abscissique                     | 36        |
| III.3.d Transport des flavonoïdes                                        | 37        |
| <b>IV. Relation tannins/paroi cellulaire</b>                             | <b>41</b> |



|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES</b>                                          | <b>45</b> |
| <b>I. Matériel végétal</b>                                                         | <b>45</b> |
| I.1 Le réseau parcellaire                                                          | 45        |
| I.2 Les millésimes                                                                 | 47        |
| I.3 Les stades de prélèvements                                                     | 48        |
| I.4 Prélèvements des baies pour le suivi de maturité                               | 51        |
| I.5 Prélèvements des baies pour l'analyse génomique, protéique et chimique         | 51        |
| I.6 Prélèvements des baies pour l'étude microscopique                              | 52        |
| <b>II. Préparation du matériel végétal pour l'étude microscopique</b>              | <b>53</b> |
| II.1 Fixation chimique                                                             | 53        |
| II.2 Inclusion                                                                     | 54        |
| II.3 Coupes                                                                        | 54        |
| II.4 Contraste et observations des coupes pour la microscopie électronique         | 55        |
| <b>III. Paramètres de caractérisation des raisins</b>                              | <b>56</b> |
| III.1 Suivis de maturité technologique et phénolique                               | 56        |
| III.2 Analyse sensorielle                                                          | 56        |
| III.2.a Fiche de dégustation                                                       | 56        |
| III.2.b Constitution du panel de dégustateurs                                      | 59        |
| III.2.c Entraînement des dégustateurs                                              | 59        |
| III.2.d Protocole                                                                  | 60        |
| III.2.e Traitements des données                                                    | 60        |
| III.3 Mesures physiques de texture                                                 | 61        |
| III.3.a Mesures d'activité de l'eau libre                                          | 61        |
| III.3.b Mesures de pénétrométrie                                                   | 61        |
| III.4 Mesure de l'épaisseur des parois cellulaires                                 | 62        |
| <b>IV. Techniques utilisées pour l'étude des tannins</b>                           | <b>64</b> |
| IV.1 Extraction des tannins pelliculaires                                          | 64        |
| IV.2 Extraction des tannins pariétaux                                              | 65        |
| IV.2.a Obtention des fractions pariétales                                          | 65        |
| IV.2.b Digestion des fractions pariétales                                          | 67        |
| IV.2.c Extraction des tannins                                                      | 67        |
| IV.2.d Extractions des polysaccharides                                             | 68        |
| IV.2.e Dosage des polysaccharides                                                  | 69        |
| IV.3 Dosage des tannins                                                            | 69        |
| IV.3.a Dosage des tannins totaux                                                   | 69        |
| IV.3.b Etude de la composition phénolique fine                                     | 70        |
| IV.3.b.i Principe                                                                  | 70        |
| IV.3.b.ii Protocole                                                                | 71        |
| IV.3.b.iii Analyse chromatographique                                               | 71        |
| IV.3.b.iv Expression des résultats et méthode de calcul du degré de polymérisation | 73        |

|              |                                                                            |            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV.3.c       | Localisations des tannins dans les différents compartiments cellulaires    | 74         |
| IV.3.c.i     | Préparations des échantillons                                              | 74         |
| IV.3.c.ii    | Observations UV et épifluorescence                                         | 74         |
| IV.3.c.iii   | Observations en microscopie confocale                                      | 75         |
| <b>V.</b>    | <b>Préparation du matériel végétal pour l'étude génomique</b>              | <b>78</b>  |
| V.1          | Extraction des ARN totaux                                                  | 78         |
| V.2          | Elimination de l'ADN génomique des extraits d'ARN totaux                   | 79         |
| V.3          | Quantification et vérification de l'intégrité des ARN                      | 80         |
| V.3.a        | Estimation de la quantité et de la contamination des ARN                   | 80         |
| V.3.b        | Electrophorèse                                                             | 80         |
| V.4          | Synthèse des ADN complémentaires                                           | 80         |
| V.5          | Amplification des ADNc par PCR et analyse des amplifiats sur gel d'agarose | 81         |
| V.5.a        | Amplification par PCR                                                      | 81         |
| V.5.b        | Visualisation des amplifiats                                               | 82         |
| V.6          | Etude de l'expression par PCR quantitative en temps réel                   | 82         |
| V.7          | Définition des amorces et vérification de leur spécificité                 | 83         |
| <b>VI.</b>   | <b>Etude des activités enzymatiques</b>                                    | <b>85</b>  |
| VI.1         | Extraction enzymatique                                                     | 85         |
| VI.2         | Dosage de la pectine méthyl estérase (PME)                                 | 86         |
| VI.3         | Dosage de la leucoanthocyanidine réductase                                 | 86         |
| VI.4         | Dosage de l'anthocyanidine réductase                                       | 87         |
| <b>VII.</b>  | <b>Immunolocalisation des protéines étudiées.</b>                          | <b>89</b>  |
| VII.1        | Synthèse des anticorps                                                     | 89         |
| VII.1.a      | Enzymes de dégradation des parois cellulaires                              | 90         |
| VII.1.b      | Enzymes de la voie de biosynthèse des tannins                              | 94         |
| VII.2        | Vérification de la spécificité des anticorps primaires polyclonaux         | 97         |
| VII.2.a      | Matériel végétal                                                           | 97         |
| VII.2.b      | Extractions des protéines totales                                          | 97         |
| VII.2.c      | Western-blot                                                               | 99         |
| VII.2.c.i    | Protocole                                                                  | 99         |
| VII.2.c.ii   | Résultats                                                                  | 100        |
| VII.2.d      | Analyse LC-MS                                                              | 102        |
| VII.2.d.i    | Protocole                                                                  | 102        |
| VII.2.d.ii   | Résultats                                                                  | 102        |
| VII.3        | Immunomarquage en <i>post-embedding</i>                                    | 103        |
| VII.4        | Observations en microscopie en transmission                                | 104        |
| <b>VIII.</b> | <b>Techniques utilisées pour la cartographie de composants cellulaires</b> | <b>105</b> |
| VIII.1       | Echantillons analysés                                                      | 105        |
| VIII.2       | Imagerie par spectrométrie de masse (IMS)                                  | 106        |
| VIII.3       | Analyse en ESI-FTICRMS                                                     | 108        |

|            |                                         |            |
|------------|-----------------------------------------|------------|
| VIII.4     | Technique SIMS                          | 110        |
| <b>IX.</b> | <b>Analyse statistique</b>              | <b>111</b> |
| <b>X.</b>  | <b>Analyse et traitement des images</b> | <b>111</b> |

## **CHAPITRE 3 : LOCALISATION ET CARACTERISATION DES TANNINS DANS LA PELLICULE DU RAISIN**

|             |                                                                                        |            |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.</b>   | <b>Approche microscopique</b>                                                          | <b>114</b> |
| I.1         | Observations sous lumière UV                                                           | 114        |
| I.2         | Observations en épifluorescence                                                        | 116        |
| I.3         | Etude des tannins pelliculaires en microscopie confocale                               | 118        |
| I.3.a       | Localisation des tannins                                                               | 119        |
| I.3.b       | Estimation de la répartition des tannins dans les différents compartiments cellulaires | 121        |
| I.4         | Discussion                                                                             | 122        |
| <b>II.</b>  | <b>Etude des tannins pelliculaires par l'approche biochimique</b>                      | <b>124</b> |
| II.1        | Etude des teneurs totales en polysaccharides                                           | 125        |
| II.2        | Etudes des tannins                                                                     | 126        |
| II.2.a      | Teneurs                                                                                | 127        |
| II.2.b      | Degré de polymérisation moyen (DPm)                                                    | 130        |
| II.3        | Discussion                                                                             | 132        |
| <b>III.</b> | <b>Conclusion</b>                                                                      | <b>135</b> |

## **CHAPITRE 4 : ETUDE ET LOCALISATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES TANNINS PELLICULAIRES**

|            |                                                                                                                          |            |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I.</b>  | <b>Rappels bibliographiques</b>                                                                                          | <b>140</b> |
| <b>II.</b> | <b>Etude de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavanols dans la pellicule</b> | <b>141</b> |
| II.1       | La leucoanthocyanidine réductase (LAR)                                                                                   | 141        |
| II.1.a     | Etude de l'activité LAR                                                                                                  | 141        |
| II.1.b     | Etude de l'expression du gène <i>LAR</i>                                                                                 | 141        |
| II.2       | L'anthocyanidine réductase (ANR)                                                                                         | 143        |
| II.2.a     | Etude de l'activité ANR                                                                                                  | 143        |
| II.2.b     | Etude de l'expression du gène ANR                                                                                        | 145        |
| II.3       | Evolution des teneurs en flavanols dans la pellicule                                                                     | 145        |
| II.4       | Discussion                                                                                                               | 147        |
| II.4.a     | Teneurs en catéchine, expression et activité de la LAR                                                                   | 147        |
| II.4.b     | Teneurs en épicatechine, expression et activité de l'ANR                                                                 | 148        |

|                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>III. Localisation cellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavanols de la pellicule</b> | <b>149</b> |
| III.1 Localisation de la protéine LAR1                                                                       | 150        |
| III.2 Localisation de la protéine LAR2                                                                       | 150        |
| III.3 Localisation de la protéine ANR                                                                        | 155        |
| III.4 Discussion                                                                                             | 155        |

## **CHAPITRE 5 : ETUDE ET LOCALISATION DES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA REORGANISATION PARIETALE DE LA PELLICULE 161**

|                                                                                                                     |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I. Rappels bibliographiques</b>                                                                                  | <b>162</b> |
| <b>II. Etude microscopique de l’ultrastructure des parois cellulaires de la pellicule au cours du développement</b> | <b>164</b> |
| II.1 Evolution de l’épaisseur des parois radiales des pellicules                                                    | 165        |
| II.2 Evolution de l’épaisseur des parois tangentielles des pellicules                                               | 169        |
| II.3 Discussion                                                                                                     | 172        |
| <b>III. Etude de l’activité et de l’expression des enzymes de dégradation des parois cellulaires (PG et PME)</b>    | <b>175</b> |
| III.1 Activité PME                                                                                                  | 176        |
| III.2 Suivi de l’expression de VvPME                                                                                | 176        |
| III.3 Suivi de l’expression de VvPG1                                                                                | 178        |
| III.4 Discussion                                                                                                    | 178        |
| <b>IV. Localisation des enzymes PME et PG</b>                                                                       | <b>181</b> |
| IV.1 Localisation de la protéine PME                                                                                | 182        |
| IV.2 Localisation de la protéine PG                                                                                 | 182        |
| IV.3 Localisation des pectines diversement méthylées                                                                | 185        |
| IV.4 Discussion                                                                                                     | 185        |
| <b>V. Conclusions</b>                                                                                               | <b>191</b> |

## **CHAPITRE 6 : ETUDE DE LA TEXTURE DE LA PELLICULE DE LA BAIE DE RAISIN AU COURS DE LA MATURATION 193**

|                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------|------------|
| <b>I. Caractérisation du profil tannique de la pellicule</b> | <b>195</b> |
| I.1 Caractérisation chimique de la composante tannique       | 196        |
| I.1.a Cabernet sauvignon                                     | 196        |
| I.1.b Merlot                                                 | 197        |
| I.1.c Effet du millésime, du cépage et de la parcelle        | 198        |
| I.1.d Discussion                                             | 199        |
| I.2 Caractérisation sensorielle de la composante tannique    | 200        |
| I.3 Profil tannique chimique et sensoriel                    | 202        |
| I.4 Conclusion                                               | 204        |

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>II. Evaluation de la texture de la pellicule</b>                | <b>206</b> |
| II.1 Mesures physiques                                             | 207        |
| II.1.a Pénétrométrie                                               | 207        |
| II.1.b Aw                                                          | 209        |
| II.2 Analyse sensorielle                                           | 211        |
| II.3 Profil physique et sensoriel de la texture de la pellicule    | 214        |
| II.4 Conclusion                                                    | 217        |
| <b>III. Cartographie de composants pelliculaires</b>               | <b>218</b> |
| III.1 Analyse en ESI-FTICRMS                                       | 219        |
| III.1.a Extraits pariétaux                                         | 219        |
| III.1.b Extraits pelliculaires                                     | 221        |
| III.1.b.i Etude en mode négatif                                    | 222        |
| III.1.b.ii Etude en mode positif                                   | 225        |
| III.2 Analyse en Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS)         | 230        |
| III.3 Analyse par Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS) | 234        |
| <b>IV. CONCLUSION</b>                                              | <b>236</b> |
| <b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b>                       | <b>239</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>                                 | <b>251</b> |
| <b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b>                | <b>268</b> |

# Abréviations/ Symboles/ Unités

|                   |                                                                                         |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| ABA               | Acide Abscissique                                                                       |
| ACN               | Acétonitrile                                                                            |
| ACP               | Analyse à composante principale                                                         |
| ADN               | Acide désoxyribonucléique                                                               |
| ADNc              | Synthèse d'ADN Complémentaire                                                           |
| AIA               | Acide indole acétique                                                                   |
| ANR               | Anthocyanidine Réductase                                                                |
| ANS               | Anthocyanidine synthase                                                                 |
| ARN               | Acide ribonucléique                                                                     |
| ARNm              | ARN messenger                                                                           |
| AT                | Acidité totale                                                                          |
| AVI               | Inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes                                        |
| Aw                | Water Availability                                                                      |
| BET               | Bromure d'Ethidium                                                                      |
| BLT               | Biltranslocase                                                                          |
| BSA               | Sérumalbumine bovine                                                                    |
| C4H               | Cinnamate 4-hydroxylase                                                                 |
| CaCl <sub>2</sub> | Chlorure de Calcium                                                                     |
| CHI               | Chalcone Isomérase                                                                      |
| CHS               | Chalcone Synthase                                                                       |
| CS                | Cabernet-sauvignon                                                                      |
| CTAB              | Bromure d'Hexadecyltriméthylammonium                                                    |
| Cut               | Cuticule                                                                                |
| Cyt               | Cytoplasme                                                                              |
| DEPC              | Diéthylpyrocarbonate                                                                    |
| DFR               | Dihydroflavonol 4-Réductase                                                             |
| DNase             | Désoxyribonucléase                                                                      |
| DPm               | Degré de Polymérisation Moyen                                                           |
| dNTP              | Désoxyribonucléotide triphosphate                                                       |
| DTT               | Dithiothréitol                                                                          |
| E                 | Epiderme                                                                                |
| EDTA              | Acide éthylène diamine-tétraacétique                                                    |
| EGTA              | Acide éthylèneglycol-bis-(2-aminoéthyléther) tétraacétique                              |
| EtOH              | Ethanol                                                                                 |
| ESI               | Source d'Ionisation l'Electrospray                                                      |
| EST               | Expressed sequence tag                                                                  |
| F                 | Structures fibrillaires                                                                 |
| F3H               | Flavanone 3-hydroxylase                                                                 |
| F3'H, F3'5'H      | NADPH-cytochrom P450-flavonoid 3'5'-hydroxylase                                         |
| FG                | Fermeture de grappe                                                                     |
| FP                | Fraction pariétale                                                                      |
| FTICR             | Résonance Cyclotronique d'Ion à Transformée de Fourier                                  |
| % galloylation    | pourcentage de galloylation                                                             |
| GRP               | Protéines Riches en Glycine                                                             |
| GST               | Glutathione S-Transferase                                                               |
| H1, H2, H3        | 1 <sup>ère</sup> , 2 <sup>ème</sup> , 3 <sup>ème</sup> assise cellulaire de l'hypoderme |
| HCl               | Acide chlorhydrique                                                                     |
| HEPES             | Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-I-pipérazineéthanesulfonide                                    |
| HG                | Homogalacturonane                                                                       |
| HPLC              | Chromatographie Liquide Haute Performance                                               |
| HRGP              | Glycoprotéines Riches en Hydroxyprolines                                                |
| IAA               | Alcool Isoamylique                                                                      |
| IB                | Tampon d'Incubation                                                                     |
| IM                | Indices de Maturité                                                                     |
| Int               | Stade Intermédiaire                                                                     |
| JAA               | Jours après anthèse                                                                     |
| KCl               | Chlorure de potassium                                                                   |

|                         |                                                                             |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| KHL                     | Hémocyanine                                                                 |
| LAR                     | Leucoanthocyanidine Réductase                                               |
| LDOX                    | Leucoanthocyanidine dioxygénase                                             |
| LiCl                    | Chlorure de Lithium                                                         |
| M                       | Maturité                                                                    |
| Mg <sup>2+</sup>        | Magnésium                                                                   |
| MgCl <sub>2</sub>       | Chlorure de magnésium                                                       |
| MF                      | Matière fraîche                                                             |
| Mit                     | Mitochondrie                                                                |
| Mp/MP                   | Membrane plasmique                                                          |
| MS                      | Spectromètre de masse                                                       |
| N <sub>2</sub>          | Diazote                                                                     |
| NaCl                    | Chlorure de sodium                                                          |
| NADPH                   | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate                                 |
| Ny                      | Noyau                                                                       |
| P                       | Paroi cellulaire                                                            |
| PA                      | Proanthocyanidines                                                          |
| PAE%                    | Pourcentage d'Anthocyanes Extractibles                                      |
| PAL                     | Phénylalanine Ammonialyase                                                  |
| PB                      | Tampon Phosphate                                                            |
| PCR                     | Polymerase Chain Reaction                                                   |
| PCut                    | Paroi cuticularisée                                                         |
| PEG                     | Polyéthylène Glycol                                                         |
| PEP                     | Phosphoénolpyruvate                                                         |
| PG                      | Polygalacturonase                                                           |
| PI                      | Plaste                                                                      |
| PLT                     | Progressive Lowering of Temperature                                         |
| PME                     | Pectine Méthylestérase                                                      |
| PRP                     | Protéines Riches en Proline                                                 |
| PSVs                    | Vacuoles de Stockage de Protéines                                           |
| PVCs                    | Structures Prévacuolaires                                                   |
| PVPP                    | Polyvinylpolypyrrolidone                                                    |
| RE                      | Réticulum Endoplasmique                                                     |
| RED                     | Réductase-Epimérase Déhydrogénase                                           |
| RG 1                    | Rhamnogalacturonane 1                                                       |
| RG 2                    | Rhamnogalacturonane 2                                                       |
| RNase                   | Ribonucléase                                                                |
| RPT                     | Richesse polyphénolique totale                                              |
| RT                      | Reverse transcription                                                       |
| SDS                     | Dodécylsulfate de sodium                                                    |
| SIMS                    | Spectométrie de Masse des Ions Secondaires                                  |
| STS                     | Stylbène synthase                                                           |
| SV                      | Stade vert                                                                  |
| T                       | Tannin                                                                      |
| TAE                     | Tris-acétate-EDTA                                                           |
| Tm                      | Température de fusion                                                       |
| UA                      | Unités arbitraires                                                          |
| UFGT                    | UDG-glucose : flavonoid-3-O-glycosyltransferase                             |
| UV                      | Ultra violet                                                                |
| V1, V10, V50, V80, V100 | Stades 1% véraison, 10% véraison, 50% véraison, 80% véraison, 100% véraison |
| Vac                     | Vacuole                                                                     |
| Ves                     | Vésicule                                                                    |
| XET                     | Xyloglucan Endo Trans-glycosylases                                          |

# Liste des Figures

**Figure 1** : Courbe de développement de la baie de raisin (d'après Coombe, 1973).

**Figure 2** : Représentation schématique de la structure d'une baie de raisin (d'après Coombe, 1987).

**Figure 3** : Représentation schématique des parois cellulaires d'une cellule végétale (d'après Detrimont et Klein, 2001).

**Figure 4** : Modèle d'arrangement de la paroi primaire et représentation des structures des principaux polysaccharides qui la constituent, d'après Vorwerck *et al.* (2004).

**Figure 5** : Déméthylation des pectines par la PME.

**Figure 6** : Hypothèse sur l'excrétion de la PME dans l'apoplasme et sur sa maturation, d'après Micheli *et al.* (2001).

**Figure 7** : Structure chimique de base des stilbènes

**Figure 8** : Structure chimique de base des composés flavonoïdes.

**Figure 9** : Structure chimique de base des anthocyanidines.

**Figure 10** : Structure chimique des flavan-3-ols (**A**) et de l'acide gallique (**B**).

**Figure 11** : Structure chimique des tannins condensés.

**Figure 12** : Voie de biosynthèse simplifiée des composés phénoliques (d'après GénY (1997) et Marles *et al.* (2003))

**Figure 13** : Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR).

**Figure 14** : Réaction catalysée par l'anthocyanidine réductase (ANR).

**Figure 15** : Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des vésicules membranaires, d'après Zhao et Dixon (2009).

**Figure 16** : Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des transporteurs membranaires, d'après Braidot *et al.* (2008).

**Figure 17** : Carte de localisation des différentes parcelles du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux.

**Figure 18** : Evolution de l'Indice de maturité dans les parcelles 1 à 7 du 20 août au 24 septembre 2007.

**Figure 19** : Analyse sensorielle des baies de raisin. Fiche de dégustation 2008 et 2009.

**Figure 20** : Photo AW-mètre (Labmaster, Novasima).

**Figure 21** : Photo du Pénéfel DFT 14, Digital Firmness Tester (Agrotechnologie).

**Figure 22** : Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin, sections pariétales mesurées.

**Figure 23** : Extraction des composés phénoliques d'après Revilla *et al.*, 1998.

**Figure 24** : Principe schématique du fractionnement tissulaire des pellicules permettant l'obtention des fractions pariétales, d'après GénY *et al.* (2003).

**Figure 25** : Extraction des différents polysaccharides sur la fraction pariétale des pellicules de raisins d'après Saulnier, 1987.

**Figure 26** : Dosage des tannins adapté de la méthode de Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1966).

**Figure 27** : Principe de la réaction de phloroglucinolyse.



**Figure 28 :** Exemple de chromatogramme obtenu sur un échantillon d'extrait de tannins de pellicules de baies de raisin après réaction de phloroglucinolyse.

**Figure 29 :** Spectres d'émission des principales sources d'autofluorescence des racines et des feuilles après excitation avec des sources laser standard de microscope confocal, à 9 longueurs d'onde différentes.

**Figure 30 :** Spectres d'émission d'autofluorescence des poudres commerciales de tannins pelliculaires (A) et de la pellicule de baie de raisin (B) après excitation avec une source laser à argon à 488 nm de microscope confocal.

**Figure 31 :** Principe de la mesure d'intensité de l'autofluorescence des tannins pelliculaires à partir du signal digital reconstitué par le logiciel leica du microscope confocal SP2

**Figure 32 :** Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine PME1 dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.

**Figure 33 :** Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine PG1 dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.

**Figure 34 :** Blasts des peptides antigéniques dirigé contre les protéines LAR1 (A) et LAR2 (B) dans la banque *Vitis vinifera* et alignements de séquences des protéines reconnues à 100% par les peptides antigéniques.

**Figure 35 :** Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine ANR dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.

**Figure 36 :** Western-blot sur protéines extraites de pellicules de baies de Cabernet-sauvignon au stade récolte.

**Figure 37 :** Western-blot sur protéines extraites de fleurs, ligne 2, et de pellicules de baies, lignes 3 et 4 de Cabernet-sauvignon au stade fermeture de grappe.

**Figure 38 :** Alignement des séquences protéiques des deux protéines reconnues par l'anticorps dirigé contre la protéine PME.

**Figure 39 :** Orientation des coupes de pellicules de baies de raisin pour la cartographie des composants tissulaires par Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS).

**Figure 40 :** Schéma de principe d'une expérience d'imagerie par spectrométrie de masse (IMS).

**Figure 41 :** Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol.

**Figure 42 :** Autofluorescence des tannins (jaune à orange) sous lumière UV dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : (A) fermeture de grappe, (B) 80% véraison et (C) récolte.

**Figure 43 :** Autofluorescence des tannins (vert) en épifluorescence (lumière bleue) dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : (A) fermeture de grappe, (B) 80% véraison et (C) récolte.

**Figure 44 :** Reconstruction en 3D de l'autofluorescence des tannins en microscopie confocale à balayage dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : (A) fermeture de grappe, (B) 80% véraison et (C) récolte.

**Figure 45 :** Répartition de l'autofluorescence (en %) des tannins pelliculaires dans les vacuoles et dans les parois cellulaires, à différents stades de développement de la baie de raisin : FG, fermeture de grappe (2008) : FG, fermeture de grappe ; 80% V, 80% véraison et M, maturité.

**Figure 46 :** Teneurs (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de fraction pariétale) en polysaccharides extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité des fractions pariétales témoins et digérées, aux différents stades étudiés du développement de la baie : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 47 :** Teneurs en tannins solubles (en  $\text{mg.g}^{-1}$ ) des fractions pariétales témoins et digérées par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 48 :** Teneurs en tannins issus de la fraction pariétale (en  $\text{mg.g}^{-1}$ ), extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité, des polysaccharides de la fraction pariétale témoin et digérée par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 49 :** Degré de Polymérisation moyen (DPM) des tannins des fractions pariétales témoins et digérées par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 50 :** Degré de Polymérisation moyen (DPM) des tannins extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité, des polysaccharides de la fraction pariétale témoin et digérée par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 51 :** Evolution de l'**activité LAR**, exprimée en  $\text{nkat.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF) et de l'**expression de VvLAR1 et VvLAR2**, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 52 :** évolution de l'**activité ANR**, exprimée en  $\text{nkat.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF) et de l'**expression de VvANR**, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 53 :** Teneurs en catéchine et épicatechine, exprimées en  $\text{mg.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF), dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 54 :** Localisation de la protéine LAR1, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**, **B**) fermeture de grappe, (**C**, **D**, **E**) 80% véraison et (**E**, **G**) maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine LAR1.

**Figure 55 :** Localisation de la protéine LAR2, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**, **C**, **D**) 80% véraison et (**E**, **F**) maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine LAR2.

**Figure 56 :** Localisation de la protéine ANR, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**) 80% véraison et (**C**) maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine ANR.

**Figure 57 :** Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des vésicules membranaires, d'après Zhao et Dixon (2009) et localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

**Figure 58 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin, sections pariétales mesurées.

**Figure 59 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin. Mesures de l'épaisseur des parois cellulaires ( $\mu\text{m}$ ) radiales, aux différents stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 80%, 80% véraison ; Int3, véraison + 15 jours ; R, récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 60 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin. Mesures de l'épaisseur des parois cellulaires ( $\mu\text{m}$ ) tangentielles, aux différents stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 80%, 80% véraison ; Int3, véraison + 15 jours ; R, récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009.

**Figure 61 :** Evolution de l'ultrastructure des pellicules de baies de Cabernet-sauvignon, en microscopie électronique en transmission, à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**, **C**) 80% véraison et (**D**) récolte.

**Figure 62 :** évolution de l'**activité PME**, exprimée en  $\text{nkat.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF) et de l'**expression de VvPME et VvPG1**, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 63 :** Localisation de la protéine PME, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**, **B**, **C**, **D**) fermeture de grappe, (**E**, **F**, **G**, **H**) fin véraison et (**I**, **J**) récolte.

**Figure 64 :** Localisation des pectines faiblement méthylées par l'anticorps JIM5, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**, **C**) fin véraison et (**D**) récolte.

**Figure 65 :** Localisation des pectines fortement méthylées par l'anticorps JIM7, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**, **B**, **C**) fin véraison et (**D**, **E**) récolte.

**Figure 66** : Localisation de la protéine PG, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A, B, C, D**) fermeture de grappe, (**E, F, G**) fin véraison et (**H, I**) récolte.

**Figure 67** : Teneurs en tannins (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF)), Degré de Polymérisation moyen (DPM) et pourcentage de galloylation (% galloylation) des pellicules des baies issues des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2008 et 2009.

**Figure 68** : Teneurs en tannins (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF)), Degré de Polymérisation moyen (DPM) et pourcentage de galloylation (% galloylation) des pellicules des baies issues des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Merlot, au cours de leur développement en 2008 et 2009.

**Figure 69** : Evaluation sensorielle des critères tanniques (Astringence et Amertume) des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 (Cabernet-sauvignon et Merlot) au cours de la maturation du raisin en 2008 et 2009.

**Figure 70** : Représentation ACP des individus (80% V, 100%V, Int1, Int2, Int3, Int4 et R pour les 6 parcelles étudiées : 3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M) et des variables (Intensité tannique, diminution de l'astringence, diminution de l'amertume, DPM et pourcentage de galloylation) en 2008 et 2009.

**Figure 71** : Forces de pénétration de la pellicule exprimées en kg. Les mesures ont été réalisées sur les pellicules de raisin des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon et Merlot, au cours de la maturation de la baie de raisin en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 72** : Mesure de l'activité de l'eau libre ( $A_w$ ) à la surface des pellicules des baies au cours du développement du raisin des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon et Merlot en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 73** : Evaluation sensorielle des critères de texture (Aptitude à l'écrasement, à l'égrénage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) des pellicules des parcelles 3, 4 et 5, de cépage Cabernet-sauvignon, au cours de la maturation du raisin en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 74** : Evaluation sensorielle des critères de texture (Aptitude à l'écrasement, à l'égrénage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) des pellicules des parcelles 3, 4 et 5, de cépage Merlot, au cours de la maturation du raisin en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 75** : Représentation ACP des individus (80% V, 100%V, Int1, Int2, Int3, Int4 et R pour les 6 parcelles étudiées : 3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M) et des variables (Aptitude à l'écrasement, Aptitude à l'égrénage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) en 2007, 2008 et 2009.

**Figure 76** : Spectre du culot de la fraction pariétale digérée des pellicules de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon au stade 80% véraison en 2008.

**Figure 77** : Structure de l'acide p-coumaroyl shikimique.

**Figure 78** : Voie de biosynthèse des flavonoïdes d'après Kegg Compounds. Identification d'un précurseur : l'acide p-coumaroyl shikimique.

**Figure 79** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2009.

**Figure 80** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade 80% véraison pour le millésime 2009.

**Figure 81** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2009.

**Figure 82** : Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2008.

**Figure 83** : Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade 80% véraison pour le millésime 2008.

**Figure 84** : Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade récolte pour le millésime 2008.

**Figure 85** : Spectre ESI-FTICR MS/MS positif de l'ion  $m/z$  871.

**Figure 86 :** Schéma du mécanisme de fragmentation de la phéophytine. La charge est placée de manière arbitraire, elle est délocalisée autour de la structure porphyrine.

**Figure 87 :** Spectre ESI-FTICRMS mode positif stade récolte du millésime 2008.

**Figure 88 :** Images optiques des pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (**A**), 80% véraison (**B**) et récolte (**C**) en 2008.

**Figure 89 :** Images de la répartition de l'ion  $m/z$  38,9 ou potassium dans les pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (**A**), 80% véraison (**B**) et récolte (**C**) en 2008.

**Figure 90 :** Images de la répartition de l'ion  $m/z$  219 ou glucose dans les pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (**A**), 80% véraison (**B**) et récolte (**C**) en 2008.

**Figure 91 :** Répartition de l'ion  $m/z$  248,2 dans la pellicule au stade 80% véraison.

**Figure 92 :** Spectre issu de la zone d'intérêt.

**Figure 93 :** Images de la répartition des ions positifs sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008. **A** : total des ions positifs ; **B** :  $\text{Na}^+$  ; **C** :  $\text{Ca}^+$  ; **D** :  $\text{K}^+$  ; **E** :  $\text{Mg}^+$ .

**Figure 94 :** Images de la répartition des ions négatifs sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008. **A** : total des ions négatifs ; **B** :  $\text{O}^-$  ; **C** :  $\text{OH}^-$ .

**Figure 95 :** Images de la répartition des acides palmitique et stéarique sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008.

**Figure 96 :** Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des vésicules membranaires, d'après Zhao et Dixon (2009) et localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

**Figure 97 :** Représentation ACP des individus (3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M en 2007, 2008 et 2009) et des variables (D<sub>Pm</sub>, Pénétrromètre et A<sub>w</sub>) en 2007, 2008 et 2009.

# Liste des Tableaux

**Tableau I** : Caractéristiques des parcelles du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux. <http://www.bordeauxraisins.fr>

**Tableau II** : Caractéristiques des millésimes étudiés : 2007, 2008 et 2009.

**Tableau III** : Dates de prélèvements des baies de Cabernet-sauvignon du réseau parcellaire.

**Tableau IV** : Dates de prélèvements des baies de Merlot du réseau parcellaire.

**Tableau V** : Composition du panel de dégustateurs pour les millésimes 2007, 2008 et 2009.

**Tableau VI** : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel.

**Tableau VII** : Caractéristiques des protéines étudiées en immunomarquage.

**Tableau VIII** : Séquence des peptides immunogènes dirigés contre les protéines PME, PG, LAR1, LAR2 et ANR.

**Tableau IX** : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la localisation des protéines PME, PG, LAR1, LAR2 et ANR.

**Tableau X** : Epaisseur moyenne des parois cellulaires, en  $\mu\text{m}$ , des quatre premières assises cellulaires de la pellicule à différents stades de développement pour le millésime 2008 : fermeture de grappe (FG), 80% véraison et récolte.

**Tableau XI** : Epaisseur moyenne des parois cellulaires, en  $\mu\text{m}$ , des quatre premières assises cellulaires de la pellicule à différents stades de développement pour le millésime 2009 : fermeture de grappe (FG), 80% véraison, 100% véraison et Récolte.

**Tableau XII** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2008 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XIII** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2009 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XIV** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2008 et 2009 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XV** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2008 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XVI** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2009 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XVII** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2008 et 2009 au seuil  $\alpha = 0,005$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XVIII** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation chimique de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XIX** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation sensorielle de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XX** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation physique par le pénétromètre de la texture des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XXI** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation physique par la mesure de l'Aw de la texture des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XXII** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation chimique de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

**Tableau XXIII** : Espèces identifiées pour le millésime 2008.

**Tableau XXIV** : Espèces identifiées pour le millésime 2009.

# Introduction

---

La production des vins rouges de qualité constitue un enjeu économique important pour toutes les régions viticoles. Elle est directement liée à la qualité de la matière première, le raisin, qui doit contenir des teneurs suffisantes en composés d'intérêt œnologique (arômes et composés phénoliques) facilement extractibles.

Ces composés d'intérêt sont synthétisés dans la baie au cours de son développement et accumulés dans la pellicule lors de la maturation. Durant cette étape, la baie de raisin connaît de nombreux changements physiologiques tels que des grandissements cellulaires, une accumulation de sucres et d'eau dans les vacuoles de la pulpe et des modifications importantes des constituants pariétaux conduisant au ramollissement du fruit et à une augmentation de sa sensibilité vis-à-vis des agents pathogènes.

La texture de la pellicule du raisin représente une part importante des caractéristiques organoleptiques pouvant orienter le choix des pratiques de vinification. Ainsi, la nature et la proportion des molécules extraites lors des vinifications sont variables du fait de la texture de la pellicule mais aussi de leur localisation, de leur liaison avec les composés pariétaux et de leur solubilité. La sélectivité de l'extraction sera donc fonction de la capacité que l'on aura à atteindre les composés souhaités là où ils se trouvent. Ces variations d'extraction peuvent dépendre de plusieurs facteurs comme le cépage, les conditions climatiques, les pratiques culturales modifiant le microclimat au niveau des raisins et les traitements post-récolte.

Actuellement les méthodes de détermination de la qualité du fruit n'intègrent pas les paramètres de texture permettant de définir la fermeté de la pellicule. Or, il est probable que l'extractibilité des tannins pendant la vinification et leur perception sensorielle soient en relation avec les paramètres de texture de la baie de raisin et en particulier des propriétés mécaniques de la pellicule.

Ce projet vise d'une part à mieux caractériser la texture de la baie et d'autre part à identifier les organisations et les structures cellulaires, pariétales et moléculaires déterminant celle-ci. Les données nouvelles obtenues permettront alors de relier les capacités d'extractibilité des tannins à des perceptions sensorielles mais également d'optimiser à terme, les méthodes d'analyses et d'extraction de ces composés. A plus long terme, ces travaux devraient aboutir à la validation d'outils instrumentaux qui pourraient permettre de comprendre à partir de quel moment les évolutions microscopiques, macroscopiques et biochimiques qui interviennent au cours de la maturation pelliculaire se répercutent sur la perception sensorielle de la texture de la pellicule.

Depuis plusieurs années, la caractérisation de la pellicule et de sa maturité est un des principaux axes d'étude du laboratoire. Ainsi, les travaux de Christelle Deytieux (2005) ont montré que le métabolisme et la physiologie de la pellicule étaient différents de celui de la pulpe. L'approche protéomique a permis de mettre en évidence des modifications importantes dans la pellicule à partir de la véraison notamment concernant la dégradation des parois et la biosynthèse des composés phénoliques (Deytieux *et al.*, 2008). Dernièrement, les travaux de Séverine Gagné (2007) ont permis d'identifier de manière précise la composition en tannins des différents compartiments cellulaires et d'étudier leur évolution (Gagné *et al.*, 2006).

L'objectif du travail présenté ici est donc d'approfondir notre connaissance sur la localisation, la biosynthèse et la structure chimique des tannins du tissu pelliculaire mais également de comprendre comment ils sont organisés dans le maillage pariétal pour mieux appréhender les conséquences des mécanismes d'évolution des parois sur l'organisation et l'agencement de ces molécules. Enfin, l'estimation d'une possible adéquation entre l'état de dégradation pelliculaire et le niveau de diffusion des tannins par une approche physique et sensorielle permettra de mieux caractériser la texture de la baie et ainsi d'évaluer la qualité du fruit au moment de la vendange.



La première partie de ce mémoire est une étude bibliographique synthétisant les connaissances actuelles sur la pellicule de la baie de raisin, la structure et l'évolution des parois cellulaires au cours du développement du fruit ainsi que sur les composés phénoliques et leur biosynthèse. Elle est suivie de la description des matériels et des méthodes utilisés au cours de l'étude.

La seconde partie rapporte en 4 chapitres les résultats obtenus. Dans un premier temps, la localisation des tannins, leur caractérisation et leur agencement au sein des parois cellulaires au cours de la maturation de la pellicule du raisin est présentée.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à leur biosynthèse en étudiant l'activité, l'expression et la localisation des deux dernières enzymes connues de la voie des phénylpropanoïdes : la leucoanthocyanidine réductase et l'anthocyanidine réductase.

Par la suite, une étude complète a été menée sur l'évolution de l'ultrastructure des parois cellulaires et sur les mécanismes impliqués dans la réorganisation pariétale de la pellicule. Comme pour les tannins, l'activité, l'expression et la localisation de deux enzymes pectolytiques, la pectine méthyl estérase et la polygalacturonase, ont été précisées.

Enfin, nous avons étudié la texture de la pellicule de la baie de raisin au cours de la maturation par une double approche, sensorielle et analytique, avec pour objectif de vérifier si les évolutions microscopiques, macroscopiques et biochimiques qui intervenaient au cours de la maturation pelliculaire pouvaient se répercuter sur la perception sensorielle de la texture de la pellicule. Cette approche nous a également permis d'évaluer divers outils de mesure susceptibles à terme d'être utilisés par les viticulteurs.

Ce travail a été mené sur des raisins cultivés en plein champs dans les diverses zones de la région bordelaise et deux cépages, le Cabernet-sauvignon et le Merlot, ont été choisis.

# Chapitre premier : Etude bibliographique

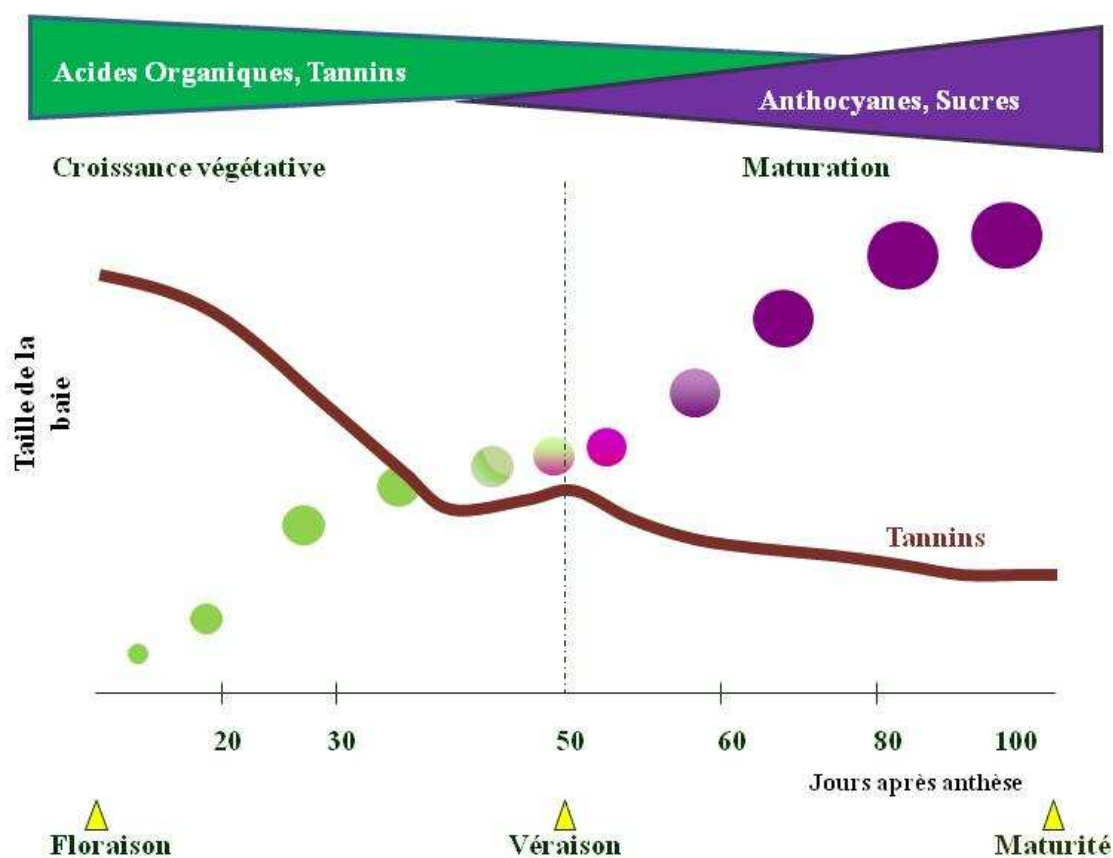
---

## I. Evolution de la pellicule au cours du développement de la baie

### I.1 Rappel sur le développement de la baie de raisin

La baie de raisin est un fruit charnu dont le développement suit une courbe en double sigmoïde (Coombe, 1973), permettant de définir deux phases de croissance active (Staudt *et al.*, 1986) (Figure 1).

La première sigmoïde correspond à la formation et à la croissance végétative de la baie. Les teneurs élevées en acides désoxyribonucléiques (ADN) des jeunes baies caractérisent cette période de croissance active qui s'explique par des divisions cellulaires intenses (le pic de division ayant lieu 8 jours après floraison) qui cessent 30 à 40 jours après la floraison dans la pellicule (Jona et Botta, 1988). L'activité photosynthétique intense favorise la croissance cellulaire, la synthèse et l'accumulation d'acides organiques (tartrique et malique), d'acides aminés mais aussi d'acides hydroxycinnamiques et de tannins principalement dans la pellicule et les pépins. L'eau et les minéraux sont importés par le xylème et le saccharose, transportés par la sève phloémienne, et métabolisés pour assurer le fonctionnement cellulaire. La fin de la période de croissance végétative se caractérise par un ralentissement de la croissance et le diamètre des baies évolue peu. La taille finale des baies est déterminée dès la formation celle-ci et est influencée par de nombreux facteurs internes et externes comme : le nombre de pépins (Coombe, 1973), l'approvisionnement en carbone (Coombe, 1962 ; Kliewer, 1970), les paramètres climatiques (température, ensoleillement, eau) (Mc Carthy, 1999), et l'équilibre hormonal (Broquedis *et al.*, 1987 ; Chervin *et al.*, 2004).



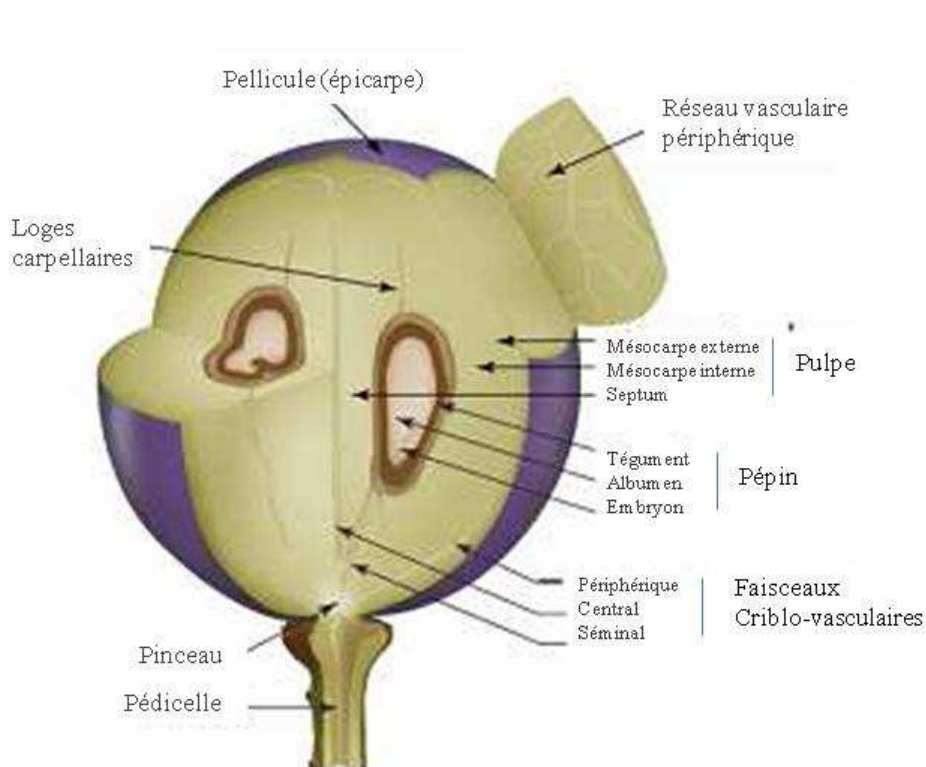
**Figure 1** : Courbe de développement de la baie de raisin (d'après Coombe, 1973).

La seconde phase de développement est dénommée phase de maturation. Elle débute par la véraison, période durant laquelle les concentrations en solutés (notamment en acides tartrique et malique) sont maximales et l'accumulation des sucres et des anthocyanes débute (Boss *et al.*, 1996a). La durée de cette phase est liée au déclenchement de la maturation, et non à la taille des baies. Cette seconde phase résulte de grandissements cellulaires liés à une accumulation de sucres et d'eau apportés par la sève phloémienne vers les cellules de la pulpe. Durant cette période, le volume, le poids et le diamètre de la baie vont fortement augmenter. Le métabolisme de la baie change : elle s'enrichit en sucres, en composés aromatiques et en composés colorés (anthocyanes). La croissance du fruit serait autorisée par un relâchement des parois cellulaires au niveau de la pulpe, dans un premier temps, puis au niveau de la pellicule. La baie connaît un ramollissement qui pourrait être lié de la perte de cohésion pariétale des cellules de la pulpe (perte de polysaccharides et de tannins).

## I.2 La pellicule de raisin : aspect histologiques et cytologiques

Anatomiquement, la baie de raisin est composée du péricarpe (partie charnue) et de pépins (Figure 2). Le péricarpe se compose de trois tissus distincts :

- ~ L'épicarpe ou la pellicule,
- ~ Le mésocarpe ou pulpe, constitué de 25 à 30 assises cellulaires,
- ~ L'endocarpe constitué d'une fine couche de cellules en contact avec les pépins.



**Figure 2** : Représentation schématique de la structure d'une baie de raisin (d'après Coombe, 1987).

L'épicarpe ou la pellicule est un tissu essentiel de la baie de raisin. L'épicarpe est la partie la plus externe du fruit, elle représente 5 à 18% du poids total de la baie et constitue la barrière entre le milieu extérieur et l'intérieur de la baie. Elle est également le lieu de synthèse et d'accumulation d'une majorité des composés d'intérêt œnologique.

L'épicarpe est composé de la cuticule, de l'épiderme et de l'hypoderme.

La cuticule est la partie externe de la baie directement en contact avec les agents extérieurs et joue ainsi un rôle important dans la défense de la plante. La cuticule est un

« revêtement cireux », translucide et acellulaire, constituée à 65% d'acides polyhydroxyliques mais aussi d'acides gras (3%) dont l'acide oléique (Holoway et Baker, 1970). La formation de la cuticule débute trois semaines avant l'anthèse au niveau des ovaires des fleurs, par le développement d'arêtes de cuticule à la périphérie de chaque cellule épidermique. Lors de l'anthèse, les arêtes cuticulaires se séparent et s'aplatissent pour former, à maturité, une couche mince, continue et relativement lisse. Epaisse à la véraison, elle s'amincit progressivement lors de la phase de maturation. Hardie *et al.*, en 1996, ont montré par autofluorescence que la cuticule se divisait en trois zones : des cires épicuticulaires à la surface de la baie, une zone de faible fluorescence et une zone de grande intensité en contact avec les parois externes des cellules de l'épiderme favorisant les échanges paroi-cuticule dénommée « paroi cuticularisée » (Considine et Knox, 1979). L'autofluorescence de la cuticule est liée à ses teneurs en acides phénoliques (acides férulique et p-coumarique).

L'épiderme est constitué d'une seule couche de cellules cubiques qui s'allongent lors de la seconde phase de croissance active permettant ainsi un relâchement de la paroi et une augmentation de sa déformabilité et de son élasticité.

L'hypoderme est composé de 10 à 15 couches de cellules dont les dernières assises peuvent se différencier en cellules de pulpe après véraison (Fougères-Rifot *et al.*, 1996).

Une étude ultrastructurale de la pellicule de baie de raisin a été menée par Hardie en 1996. Avant la véraison, les parois cellulaires de l'épiderme et de l'hypoderme sont fines (1,5  $\mu\text{m}$ ). Dans les cellules, les vacuoles sont nombreuses et contiennent pour la plupart des composés phénoliques. Les organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les appareils de Golgi, ainsi que les chloroplastes sont nombreux et à proximité du noyau. A véraison et après celle-ci, les parois cellulaires sont plus épaisses (3  $\mu\text{m}$ ). Les vacuoles sont fragmentées, les plastes contiennent de nombreux thylacoïdes, le réticulum endoplasmique est moins développé et les mitochondries sont plus petites. Ces observations révèlent une activité métabolique forte essentiellement avant la véraison.

Plus récemment, Amrani Joutei et Glories ont montré en 1994 que les polyphénols s'accumulaient dans l'épiderme ainsi que dans les quatre couches de cellules hypodermiques qui le bordent, puis évoluaient en tannins et en anthocyanes. Au niveau cellulaire, les tannins

peuvent être libres dans le suc vacuolaire, liés aux protéines et aux polysaccharides des membranes vacuolaires mais également liés aux parois et plus spécifiquement aux polysaccharides pariétaux.

Les teneurs en sucre de la pellicule restent faibles par rapport aux cellules de la pulpe mais les teneurs en acides organiques sont élevées (acide citrique, malique, tartrique).

Au cours du développement, la pellicule de raisin va subir des modifications structurales mais aussi chimiques lui permettant de résister à la pression mécanique exercée par l'expansion des cellules de la pulpe, de résister aux attaques d'agents pathogènes et aux conditions climatiques. De plus, à maturité, la pellicule de la baie de raisin a accumulé en quantité des composés d'intérêt œnologique (arômes, tannins et anthocyanes) qui déterminent la qualité de la baie et du vin par la suite.

### **I.3 La texture des baies**

La texture de la baie et l'extractibilité des composés d'intérêt œnologique sont étroitement liées. Or à ce jour, peu d'études ont permis de définir les propriétés mécaniques de la pellicule. Par contre, sur d'autres fruits (pomme, tomate, kiwi) la texture est une mesure couramment utilisée pour définir leur maturité, leur aptitude à la conservation ou à la transformation et pour apprécier leur qualité (Zude *et al.*, 2005 ; Camps *et al.*, 2005).

Les principaux outils utilisés permettent d'étudier la compression du fruit et de mesurer la déformabilité de celui-ci. A notre connaissance, 3 types d'outils sont couramment décrits.

Le premier outil est une machine universelle de texture de type MTS, Synergie qui mesure la compression ; les baies sont placées en position équatoriale entre deux plateaux et compressées à hauteur de 20% et à une vitesse de 50 mm.min<sup>-1</sup>. Les courbes de pression en fonction de la déformation sont analysées à partir de 8 paramètres : la pression associée à la première compression (P1), la pression associée à la seconde compression (P2), le travail associé à P1 et à P2, la pente de la première compression et de la deuxième compression, la cohésion et le caractère gommeux. L'expression des résultats en pression permet de s'affranchir du diamètre du fruit. Cet outil utilisé sur la pomme par Méhinagic *et al.* en 2003 et 2004 a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'évolution de la texture du fruit,

la composition chimique et l'évaluation sensorielle. En 2001, l'équipe de Grotte *et al.*, puis en 2007, celle de Le Moigne *et al.* ont utilisé cet appareil pour étudier la baie de raisin. Les paramètres de première compression sont apparus très pertinents pour suivre l'évolution des propriétés texturales au cours de la maturation, en lien avec les descripteurs sensoriels, et les paramètres de deuxième compression ont permis de discriminer fortement le type de parcelle. Cependant, les textures sont différentes en fonction des années mais aussi des stades ; ainsi, à l'approche de la date de vendange, les textures se ressemblent et deviennent peu différenciables par cette méthode.

La seconde méthode couramment décrite consiste en la déstructuration mécanique du tissu et en l'analyse de la structure des parois. Elle a été développée par l'équipe de Devaux (2005) et appliquée sur le péricarpe de tomate. Cet appareil (Instron, 1122), composé d'une plaque fixe et d'un piston à moteur (vitesse :  $20 \text{ mm.min}^{-1}$ ), déstructure par compression un disque de péricarpe découpé préalablement. C'est la force de compression nécessaire à la déstructuration de la paroi qui est mesurée et les fragments générés sont analysés par microscopie photonique en lumière blanche. Les résultats obtenus dans cette étude ont permis d'établir de fortes corrélations entre les forces nécessaires à la fragmentation du péricarpe, la structure cellulaire et le caractère farineux du fruit mais n'ont pas été jugés suffisants pour prédire la texture du fruit perçue en bouche.

Enfin, la troisième catégorie d'outil mesurant la texture du fruit est le pénétromètre. Cette technique a été utilisée par Méhinagic *et al.*, en 2003, sur la pomme. Une sonde cylindrique (diamètre : 4 mm), de type convexe, perfore les pommes pelées. Deux perforations de 10 mm sont réalisées à chacune des extrémités du fruit avec une vitesse de  $50 \text{ mm.min}^{-1}$ . Sept paramètres sont mesurés : la force de pénétration, la force de rupture des chairs, la pente de la courbe force/déformation, la déformation associée avec la force de pénétration, le travail associé à la force de pénétration ainsi que celui associé à la force de rupture des chairs et enfin la force limite de compression de la chair. Les résultats obtenus par cette équipe avec le pénétromètre corrèlent fortement avec les critères sensoriels concernant la texture du fruit. Cependant, leurs mesures ne corrèlent pas avec les descripteurs aromatiques et de saveur, pourtant il existe bien un lien entre la texture (structure cellulaire, cohésion et teneur en eau) et certains critères sensoriels comme le goût et les arômes. De plus, il est à

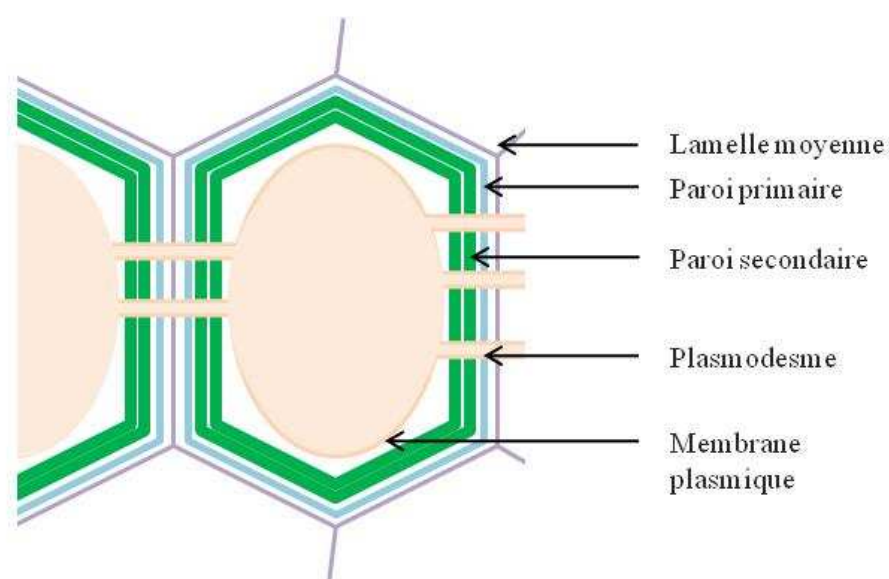
noter que cette étude a été réalisée sur pomme pelée donc seule la texture de la chair du fruit a été mesurée et non son péricarpe.

## II. Les parois cellulaires au cours de la maturation du fruit

La maturation des fruits charnus s'accompagne de nombreux changements physiologiques aussi bien au niveau de la texture de la pellicule que de la composition des parois cellulaires. Ces changements se traduisent par le ramollissement du fruit, lié à la dégradation des parois cellulaires (Brummell *et al.*, 2004) et entraînent une augmentation de la sensibilité aux agents pathogènes.

### II.1 L'évolution de l'ultrastructure pariétale

La paroi cellulaire est un réseau fibrillaire relativement rigide englobant la cellule végétale (Figure 3), formée d'une paroi primaire et parfois d'une paroi secondaire.



**Figure 3** : Représentation schématique des parois cellulaires d'une cellule végétale (d'après Detrimont et Klein, 2001).

La paroi cellulaire primaire est un organelle essentiel et doit être suffisamment rigide pour donner la structure, la taille et la forme à la cellule. Elle joue un rôle important dans la croissance des plantes, la différenciation cellulaire et la communication intercellulaire par



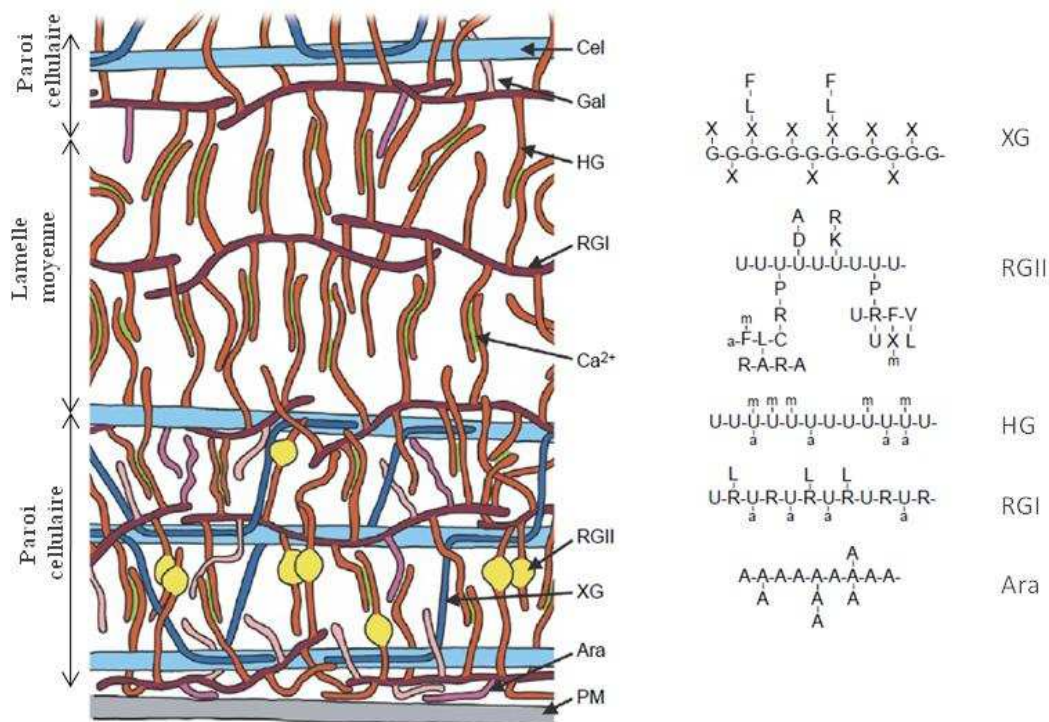
l'intermédiaire des plasmodesmes (Robarts et Lucas, 1990). Elle protège également les cellules des chocs osmotiques en résistant à la pression de turgescence et son intégrité est déterminante dans les processus d'infections par les agents pathogènes (Carpita *et al.*, 1993). La paroi cellulaire secondaire est déposée après l'expansion cellulaire et diffère de la paroi primaire à la fois dans sa composition chimique et son architecture (Mc Cann et Roberts, 1990).

La paroi n'est pas une structure statique mais contient beaucoup d'enzymes capables de modifier les polysaccharides constituant cette matrice (Fry, 1995). Par conséquent, la composition et la structure de la paroi cellulaire changent continuellement pendant le développement de la cellule végétale impliquant une série coordonnée de processus biochimiques comme la biosynthèse des composants de la paroi cellulaire pendant la phase de croissance de la cellule puis leur dégradation ou leur réarrangement pendant la phase de maturation du fruit (Goulao, 2008).

Pendant la phase de croissance, l'épaisseur des parois cellulaires de l'épiderme externe augmente et les parois des cellules hypodermiques externes s'épaississent considérablement (Hardie *et al.*, 1996). Au début de la véraison, le ramollissement des pellicules de raisin est dû à l'hydratation et au gonflement des parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques tandis que la dégradation de la lamelle moyenne dans les assises cellulaires sous-jacentes crée un mouvement d'« ondulation » de la paroi cellulaire (Rajei, 1987 ; Huang *et al.*, 2005). Certaines cellules hypodermiques de ces assises évoluent en cellules de la pulpe au cours du développement de la baie de raisin. De nombreux travaux (Fougère-Rifot *et al.*, 1996 ; Ollat *et al.*, 2002 ; Huang *et al.*, 2005 ), décrivent l'évolution des parois cellulaires en deux phases : dans un premier temps, les parois des cellules hypodermiques perdent leurs polysaccharides mais maintiennent leur épaisseur, puis dans un second temps, les parois s'affinent pour devenir aussi fines que les parois des cellules de la pulpe. Ces changements structurels, comme pour les autres fruits charnus, seraient liés à l'action des enzymes de dégradation des parois cellulaires.

## II.2 Structure et composition de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est constituée d'un réseau complexe de macromolécules constitutives (Figure 4). Les microfibrilles de cellulose dont le positionnement est maintenu par les hemicelluloses constituent la trame rigide de la paroi. Un réseau de pectines consolide ce maillage et influence, par leurs propriétés ioniques, l'activité des enzymes pariétales. La paroi cellulaire est également riche en matériel non polysaccharidique composé de protéines structurales et de protéines à activité biologique (enzymes pectolytiques).



Le modèle de l'organisation des polysaccharides comprend les microfibrilles de cellulose (Cel); les hémicelluloses : xyloglucane (XG), rhamnogalacturonanes (RG) I et II, homogalacturonane (HG), arabinanes (Ara), galactanes (Gal); les ions calcium et la membrane plasmique est symbolisée ainsi : PM.

Les symboles utilisés dans le modèle des structures : a, acétate ; A, L-arabinose ; C, acide acétique ; D, acide D-3-deoxy lyxo-2-heptulopyranosylque ; F, fucose ; G, glucose ; K, acide 3-deoxy manno-octulosique ; L, galactose ; m, méthyl ; P, apiose ; R, rhamnose ; U, acide galacturonique ; V, acide glucuronique ; X, xylose.

Les protéines structurales sont subdivisées en trois classes : les glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRGP) impliquées dans l'intégrité structurale et la croissance, les protéines riches en glycine (GRP) participant également à la structure pariétale et les protéines riches en proline (PRP) participant à l'élongation pariétale (Showalter, 1993).

Comme pour la plupart des végétaux, la paroi cellulaire des baies de raisin est composée de 90% de polysaccharides et 10% de protéines (Nunan *et al.*, 1997). Elle contient également d'autres éléments tels que le calcium, qui en plus de son rôle dans la signalisation cellulaire et de ses rôles physiologiques, intervient dans la cohésion des parois en se liant aux polysaccharides pectiques. Les parois sont alors plus rigides et moins accessibles aux enzymes pectolytiques, en particulier celles produites par les pathogènes. A maturité, le calcium migre de la pulpe vers la pellicule et la majeure partie de cet élément se situe dans les fractions pariétales (Chardonney, 1994). Au contraire les cellules de la pulpe sont riches en potassium intracellulaire et les teneurs en calcium pariétal sont faibles.

### **II.2.a La cellulose**

La cellulose, de par son rôle de trame rigide, est le constituant polysaccharidique majeur : 25% de la paroi cellulaire. La cellulose est un polymère monotone formé de chaînes linéaires non ramifiées d'unités  $\beta$ -D-glucopyranosides liées en position (1 $\rightarrow$ 4). Les fibrilles de cellulose sont synthétisées au niveau de la membrane plasmique par le complexe de la cellulose synthase. Les molécules de cellulose sont formées par addition de glucose et des liaisons hydrogènes intra- et inter-chaînes formant un réseau de microfibrilles rigides, insolubles et cristallines. Les microfibrilles de cellulose se positionnent ensuite par rapport au réseau cellulosique déjà en place dans la paroi.

La chimie et la structure de la cellulose expliquent son rôle de trame rigide de la paroi et sa flexibilité s'explique par le degré de liberté au niveau de chaque liaison hydrogène. Le ramollissement du fruit lors de la maturation ne semble pas être lié aux changements structuraux de la cellulose mais à une dégradation des composants non cellulosiques conduisant à une perte d'organisation du réseau fibrillaire (Gross et Wallner, 1979 ; Ahmed et Labavitch, 1978).

### **II.2.b L'hémicellulose**

Les hémicelluloses sont une large famille de polysaccharides dont la diversité s'observe au niveau des sucres constitutifs mais également dans la nature des liaisons qui interviennent dans la structure. Les hémicelluloses synthétisées dans les vésicules golgiennes et exportées dans la paroi par exocytose, sont majoritairement des xyloglucanes. Il s'agit

d'hétéropolymères avec une structure répétée de glucoses liés en  $\beta$ -1,4 et de courtes chaînes latérales de xylose, de galactose et de fucose. La conformation de la chaîne principale de ce polymère serait responsable des liaisons hydrogènes avec les microfibrilles de cellulose mais la présence des chaînes latérales empêcherait la formation de fibrilles d'hémicellulose. Les xyloglucanes jouent un rôle fondamental dans le maintien de la trame cellulosique de la paroi.

Au cours de la maturation des fruits, des enzymes spécifiques telles que les endoglucanases, les xyloglucan endotransglycosidases et les expansines contribuent à la dépolymérisation des xyloglucanes (Brummell et Harpster, 2001). Cette dépolymérisation est plus ou moins marquée en fonction des fruits. Chez la fraise, les hémicelluloses se dépolymérisent de façon significative, avec une réduction de leur masse molaire (Huber, 1984 ; Rosli *et al.*, 2004). Au contraire, chez la tomate (Tong et Gross, 1988) ou le melon (Ross *et al.*, 1993), très peu de variations du poids moléculaire de ces composés ont été notées au cours de la maturation.

### II.2.c Les polysaccharides pectiques

Les pectines sont une famille d'oligosaccharides et de polysaccharides très complexes et diversifiés dans leur structure fine (Ridley *et al.*, 2001) et dont la chaîne principale est constituée d'acide  $\alpha$ -D-galactopyranosyluronic ou acide galacturonique. Les trois classes de pectines les plus connues sont les homogalacturonanes et les rhamnogalacturonanes I et II. Les homogalacturonanes (HG) sont les polymères les plus simples, constitués d'une chaîne polygalacturonique non ramifiée généralement intercalée dans des zones rhamnogalacturoniques. Le rhamnogalacturonane I (RG I) est composé d'un squelette  $\alpha$ -L-rhamnose alterné avec l'acide  $\alpha$ -D-galacturonique et ramifié principalement par des chaînes latérales de galactanes et d'arabinanes. Le rhamnogalacturonane II (RG II) contient un squelette homogalacturonique constitué de 8 à 10 résidus substitués par 4 chaînes latérales (Vidal *et al.*, 2000) contenant 11 oses différents dont certains sont rares comme le  $\beta$ -D-apiofuranose, le 2-O- $\alpha$ -L-méthylfucose ou le 2-O- $\alpha$ -D-méthylxylose (Darvill *et al.*, 1978). La structure de base des pectines serait le RG I sur laquelle les chaînes HG et RG II seraient liées de manière covalente (Vincken *et al.*, 2003).

Les pectines sont synthétisées dans l'appareil de Golgi puis exportées dans l'espace périplasmique par exocytose. Au cours de la maturation, les polysaccharides pectiques

subissent de nombreuses modifications. Les modifications les plus importantes concernent la solubilisation des pectines (Gross, 1984 ; Carrington *et al.*, 1993 ; Redgwell *et al.*, 1997) qui serait liée à la dépolymérisation des polysaccharides : l'augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase entrainerait la perte des unités galactoses des chaînes latérales (Barnavon *et al.*, 2000). L'étude de Huang (2005), portant sur l'évolution des parois de la pellicule de raisin, décrit une augmentation de la fraction soluble parallèlement à une diminution des hémicelluloses, de la cellulose et des pectines insolubles suggérant une hydrolyse des polysaccharides structuraux de la paroi cellulaire des pellicules de raisin.

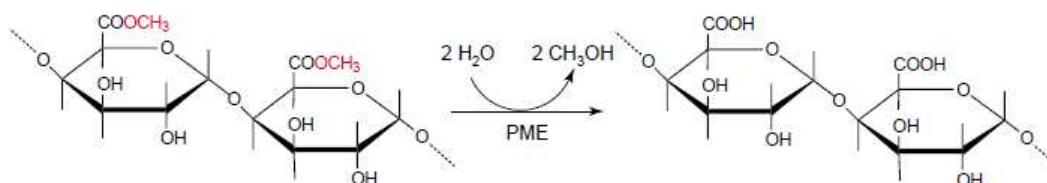
Le second phénomène majeur de modification des polysaccharides pectiques concerne leur degré de méthylestérification. Les pectines sont synthétisées puis transportées vers le périplasme avec un degré de méthylation élevé (Liners et Van Cutsen, 1992 ; Willats, 2001). Au cours de la maturation de la baie de raisin, la déméthyl-estérification des pectines a lieu *in muro* par la pectine méthylestérase (PME) (Barnavon *et al.*, 2001). La diminution du degré de méthylation semble augmenter les zones de jonctions des chaînes homogalacturoniques par la formation d'interactions de type « *egg box* » avec les ions calcium (Rees, 1982). Le degré de méthylation modulant l'accessibilité des pectines apparaît réguler l'activité d'enzymes impliquées dans le ramollissement du fruit comme, par exemple, l'activité polygalacturonase.

### **II.3 Les enzymes impliquées dans l'évolution pariétale**

De nombreuses enzymes pectolytiques participent à l'évolution structurale de la paroi telles que des polygalacturonases (PG), des pectines méthyl-estérases (PME), ou des xyloglucan endo trans-glycosylases (XET). L'extractibilité et la diffusion des tannins dans le vin lors des étapes de vinification, dépendent en grande partie de l'état de dégradation des parois cellulaires de la pellicule par ces enzymes.

#### **II.3.a La pectine méthylestérase (PME)**

La PME (EC 3.1.1.11) catalyse l'hydrolyse des groupements méthylesters en C<sub>6</sub> des acides galacturoniques présents dans la lamelle moyenne et les parois primaires des végétaux supérieurs (Figure 5). Selon le pH, le degré de méthylestérification initial des pectines, la concentration en ions calcium, l'équilibre hormonal et la présence d'inhibiteurs, la PME peut agir sur les pectines linéairement ou aléatoirement (Micheli, 2001).



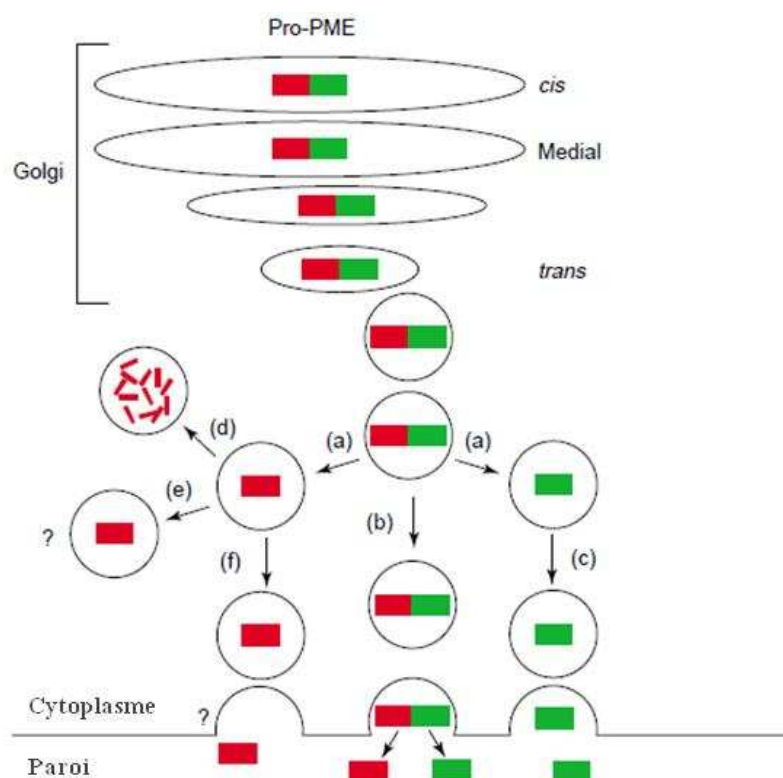
**Figure 5 :** Déméthylation des pectines par la PME.

Plusieurs études ont montré l'appartenance de la PME à une famille multigénique (Richards *et al.*, 1996 ; Micheli *et al.*, 1998) et l'étude du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier près de 67 gènes codant pour la protéine PME (Kaul *et al.*, 2000). Les gènes *pme* codent pour une pré-pro-protéine possédant une séquence d'adressage pour le réticulum endoplasmique. La pro-région située en N-terminal présente des homologies de séquence avec la protéine inhibitrice des PME, la PME1. Les isoformes contenant ce domaine ont été classées comme appartenant aux PME de type I tandis que celles de type II en sont exemptes (Micheli, 2001). Les travaux de Bosch, en 2005, ont attribué ce domaine à l'adressage subcellulaire de la protéine mais aussi à une fonction inhibitrice. En effet, la pro-PME est sécrétée dans l'apoplasme via l'appareil de Golgi et la pro-région régulerait la libération des PME matures de l'appareil de Golgi (Wolf *et al.*, 2009), (Figure 6).

Dans la paroi de la cellule, la déméthylestérification linéaire libère des groupements carboxyles qui interagissent avec les ions calcium et créent un gel pectique entraînant une rigidification de la structure. Au contraire, la déméthylestérification aléatoire libère des sites d'action d'endopolygalacturonases qui hydrolysent les chaînes d'acides galacturoniques et contribuent au ramollissement.

Une étude de transgénèse (Vicenzi *et al.*, 2005) a montré que la surexpression d'inhibiteur de PME endogènes chez *Arabidopsis thaliana* qui empêche la déméthylestérification des pectines, augmentait la résistance à *Botrytis cinerea*. Les auteurs

supposent que l'activité PME favoriserait l'action de polygalacturonases fongiques sur les pectines et concluent que la PME pourrait être impliquée dans la sensibilisation aux pathogènes.



**Figure 6 :** Hypothèse sur l'excrétion de la PME dans l'apoplasme et sur sa maturation, d'après Micheli *et al.* (2001).

Le clivage de la pro-région (rouge) de la protéine mature (vert) intervient soit avant soit après l'excrétion de la PME dans l'apoplasme (a, c). Dans le premier cas, la pro-région est soit dégradée (d), soit joue un rôle non déterminé dans la cellule (e) ou dans l'apoplasme (f).

Le transcrit d'un gène *pme* a été identifié dans la pellicule de Cabernet-sauvignon et ce gène s'exprime de la fermeture de grappe à la maturité avec une augmentation de l'expression à maturité (Deytieux *et al.*, 2008).

L'activité PME a été détectée par différents auteurs dans tous les tissus de la baie : les pellicules de Muscat Gordo Blanco (Nunan *et al.*, 2001) à tous les stades de développement, le péricarpe de l'Ugni blanc (Barnavon *et al.*, 2001), la pulpe et la pellicule de Cabernet-sauvignon (Deytieux, 2005 ; Deytieux *et al.*, 2008). Chez le Cabernet-sauvignon, cette activité

chute fortement à la véraison dans les deux tissus, puis augmente à nouveau. A maturité, l'activité PME est maximale dans la pellicule et minimale dans la pulpe.

Son expression tout au long du développement et la diminution constante du degré de méthylestérification des pectines insolubles étayent l'hypothèse de l'implication de la PME dans la maturation de la baie de raisin (Barnavon *et al.*, 2001).

### II.3.b La polygalacturonase (PG)

Les polygalacturonases (PG) sont une des familles les plus étudiées dans le ramollissement du fruit lors de la maturation. Les PG sont des glycosidases qui hydrolysent la liaison glycosidique en  $\alpha$ -(1→4) entre des résidus d'acide galacturonique non estérifié et notamment dans les chaînes homogalacturoniques.

On distingue deux types d'activités : les exo-polygalacturonases et les endo-polygalacturonases. Les exo-PG ou galacturonan  $\alpha$ -1,4-galacturonidases catalysent l'hydrolyse d'acides galacturoniques situés aux extrémités non réductrices des chaînes d'acides galacturoniques, libérant des unités monogalacturonates. Les endo-PG catalysent l'hydrolyse des chaînes d'acides polygalacturoniques et libèrent ainsi de courts fragments d'acides oligogalacturoniques. L'hydrolyse se produit de façon aléatoire au niveau des liaisons entre les résidus galacturoniques.

Le calcium est un inhibiteur de l'activité polygalacturonase. En effet, *in vivo*, la liaison du calcium aux pectines pariétales limite l'accès de la PG à son substrat (Buescher *et al.*, 1981 ; Chun *et al.*, 1998) mais la présence d'agent chélateur tel que l'EDTA permet de lever cette inhibition. De plus, *in vivo*, la pectine méthylestérase (PME) catalyse la rupture de la liaison ester des groupes carboxyles méthylés des résidus galacturoniques. D'après Fisher et Bennet (1991), l'action de la PME serait préalable à celle de la PG en rendant le substrat de cette dernière plus accessible. Ainsi, l'activité PG serait dépendante du degré de méthylestérification des pectines et d'autant plus forte que le degré de méthylation est faible.

L'ensemble des études relatives à la PG semble montrer qu'il existe une famille multigénique de PG chez les plantes. L'arbre phylogénétique, non exhaustif, élaboré à partir



des alignements de séquences de gènes codant pour la PG chez 28 espèces végétales est composé de 4 branches (Deytieux *et al.*, 2008).

La première branche, dénommée groupe B, regroupe différentes PG impliquées dans les processus de maturation et de ramollissement des fruits (Wang *et al.*, 2000) ainsi que dans des zones d'abscission et possède un peptide signal qui pourrait jouer un rôle dans le transport cellulaire (Dal Degan *et al.*, 2001). Le gène VvPG1 des baies de raisin appartient à ce premier groupe.

Les gènes VvPG2 et VvPG3 appartiennent au groupe E. Cette branche regroupe un ensemble de gènes dont la spécificité d'expression n'a pas été clairement définie. En effet, de nombreux gènes appartiennent à l'espèce *Glycine max* et ont été isolés à partir de racines. Ces gènes seraient exprimés en réponse à des attaques d'agents pathogènes (Mahalingam *et al.*, 1999).

Le troisième groupe, PG A, correspond à un ensemble de gènes exprimés dans les fruits climactériques et plus particulièrement chez la tomate selon l'étude de Hadfield *et al.* (1998).

Le dernier groupe, PG C, regroupe des PG exprimées dans les anthères des fleurs d'*Arabidopsis thaliana* et de maïs ainsi que dans le pollen de tabac.

Chez le raisin, les résultats des études concernant l'activité de la protéine PG sont très variables. En effet, Cabanne et Donèche (2001) ont montré une activité polygalacturonase croissante au cours de la maturation de la baie du raisin de cépage Sauvignon alors que Nunan *et al.* (2001) et Deytieux *et al.*, (2008) n'ont pas détecté d'activité.

Concernant l'expression des gènes *pg*, Deytieux *et al.* (2008) ont caractérisé l'expression des transcrits *Vvpg1* et *Vvpg2* dans la pellicule de baie de raisin du cépage Cabernet-sauvignon. *pg1* est temporellement exprimé avec le déclenchement de la véraison alors que *pg2* est exprimé uniquement au stade fermeture de grappe et un peu avant la récolte. Leur appartenance à deux groupes distincts souligne que ces deux protéines sont impliquées, si elles sont traduites, dans des mécanismes physiologiques différents : *pg1* dans l'expansion pariétale et *pg2* dans la signalisation cellulaire grâce à la libération de résidus d'acide polygalacturonique, éliciteurs.

### III. Les composés phénoliques du raisin

Les composés phénoliques ou polyphénols sont largement présents dans le règne végétal (pommes, pêches, thé, cacao, raisins...) et dans les produits qui en dérivent (cidre, thé, chocolat, vins...). Dans la nature, plus de cent mille composés sont présents et près de deux cents sont connus dans le raisin. Dans le vin, les composés phénoliques proviennent principalement de la pellicule et des pépins de la baie de raisin. Les teneurs en tannins des vins rouges varient entre 1 et 4 g.l<sup>-1</sup> tandis que dans les vins blancs secs, leur concentration est comprise entre 100 et 300 mg.l<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Ces différences sont essentiellement liées à la nature du cépage, au terroir, aux conditions climatiques ainsi qu'aux conditions de vinification.

Au niveau de la plante, ces métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes de défense en réponse aux attaques pathogènes. En effet, certains composés amers ou astringents, limitent la palatabilité et la digestibilité de certaines plantes alors que d'autres sont synthétisés de manière accrue avec par exemple des phénomènes de lignification des parois dans le but de limiter la progression des pathogènes. Les tannins par leur complexation avec les polysaccharides pariétaux renforcent la structure des parois cellulaires. Les polyphénols peuvent également, par leur couleur, jouer un rôle dans les mécanismes de pollinisation.

Les polyphénols présentent également des propriétés biologiques intéressantes. Leurs activités anti-oxydantes, anti-cancérigènes, anti-inflammatoires et anti-virales sont largement étudiées en cosmétologie ou pharmacologie.

Enfin, les composés phénoliques jouent un rôle important en œnologie. Les composés de type anthocyanes contribuent à la couleur, alors que les tannins participent aux effets sensoriels tels que l'astringence ou l'amertume. L'étude de ces molécules est donc importante dans différents domaines comme l'œnologie mais aussi en santé humaine (Yadav *et al.*, 2009).

Les polyphénols de la vigne sont répartis en deux groupes : le groupe des flavonoïdes et le groupe des non flavonoïdes.

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base en C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) correspondant à la structure d'un composé de base appelé 2-phényl-benzopyrane. Le groupe des flavonoïdes, le plus important, comprend :

- les anthocyanidines (cyanidine, delphinidine,...) constitutives des anthocyanes,
- les flavanols (catéchine, épicatechine... dont les polymères constituent les tannins),
- les flavonols (kaempférol, quercétol,...).

Le second groupe, les non flavonoïdes, réunit :

- les acides phénols (benzoïques, hydroxycinnamiques),
- les stilbènes (resvératrol, picéïde) de structure  $C_6-C_2-C_6$ ,
- les lignines.

### **III.1 Les composés non flavonoïdes**

#### **III.1.a Les acides phénols**

Les composés non flavonoïdes majoritaires du raisin sont les acides hydroxycinnamiques caractérisés par un squelette carboné en  $C_6-C_3$ . Ils incluent l'acide *para*-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide sinapique.

Du fait de leur toxicité potentielle pour les cellules végétales, ils sont souvent complexés à diverses molécules. Ainsi, on les trouve dans les vacuoles des cellules de la pulpe ou de la pellicule sous forme d'esters tartriques (Ribéreau-Gayon, 1965), mais ils peuvent également se lier aux sucres, aux acides organiques ou aux polysaccharides pariétaux (Weidner *et al.*, 2000) ainsi qu'aux polyamines (Geny *et al.*, 1997).

Leurs rôles dans les plantes sont divers. Ils sont aussi bien impliqués dans les processus physiologiques tels que la germination, la floraison ou la croissance (Weidner *et al.*, 1996) que dans la régulation de la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Loake *et al.*, 1991 ; Blount *et al.*, 2000) ou bien encore dans la coloration des pellicules de raisin.

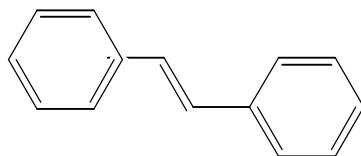
Concernant les acides benzoïques, ils possèdent un squelette carboné en  $C_6-C_1$ . Ils existent sous forme libre ou estérifiée par des flavanols. Dans le raisin, l'acide gallique est le plus abondant au niveau des pépins (Chira *et al.*, 2008).

#### **III.1.b Les stilbènes**

Les stilbènes possèdent deux cycles benzéniques reliés par une double liaison formant un système conjugué de type  $C_6-C_2-C_6$  (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), (Figure 7).

La résonance des électrons sur l'ensemble de la molécule leur confère une grande réactivité. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol (Jeandet *et al.*, 2002), son dérivé glycosylé (le picéide) et les dimères resvératrol *trans*-deshydrodimère et l' $\epsilon$ -viniférine (Waterhouse et Lamuela-Raventos, 1994).

Les quantités de *trans*-resvératrol sont importantes dans les pellicules de raisin ( $20 \mu\text{g.g}^{-1}$  à maturité) et de par les propriétés anti-pathogéniques, les teneurs en stilbènes sont encore est plus élevées dans les baie botrytisées (Borie *et al.*, 2004).

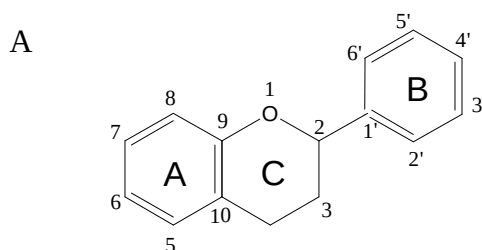


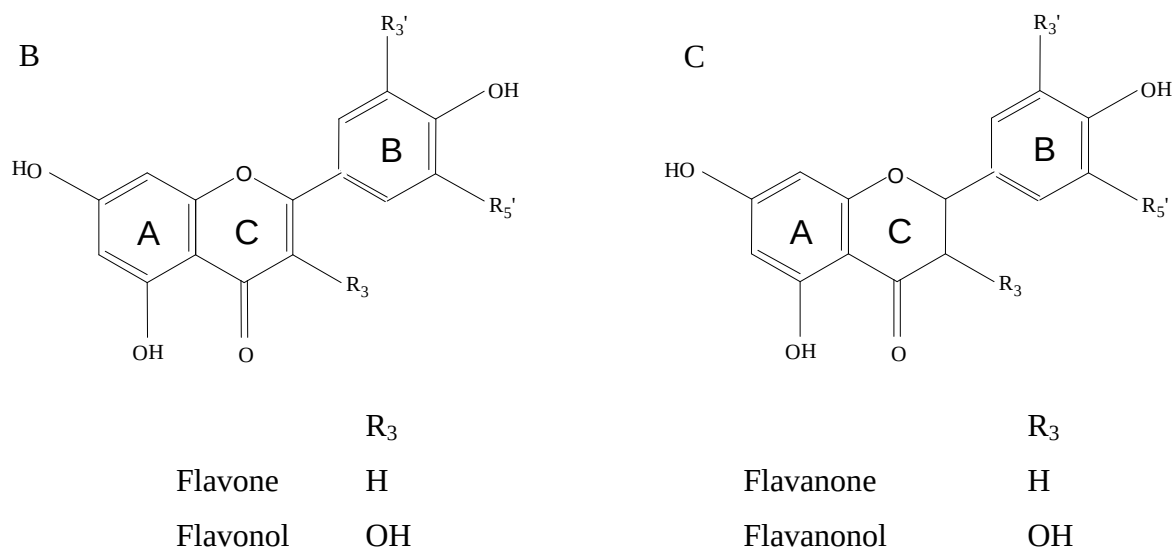
**Figure 7 :** Structure chimique de base des stilbènes

### III.2 Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes possèdent une structure de base commune constituée par 15 atomes de carbones organisés en  $C_6-C_3-C_6$  : deux cycles benzéniques sont reliés par un hétérocycle oxygéné pour former une unité flavane (Figure 8).

Le cycle A ( $C_6$ ) est appelé cycle phloroglucinol. Le cycle B ( $C_6$ ) est appelé cycle catéchol si un atome d'hydrogène est en position 5' ou est nommé cycle pyrogalloyl, s'il s'agit d'un groupement hydroxyl. Le cycle C ( $C_3$ ) est un cycle pyrane.

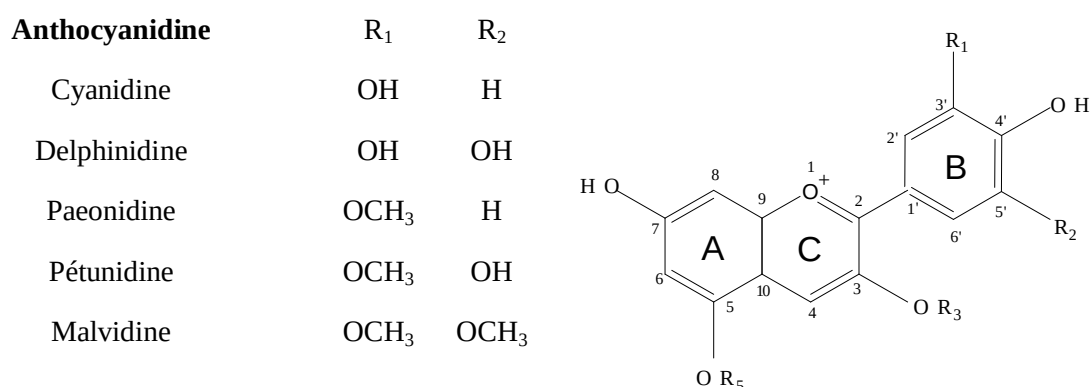




**Figure 8 :** Structure chimique des composés flavonoïdes. (A) Structure chimique de base des composés flavonoïdes, (B) Structure chimique de base des flavones et des flavonols, (C) Structure chimique de base des flavanones et des flavanonols.

### III.2.a Les anthocyanes

Les anthocyanes sont les pigments rouges du raisin. Leur structure de base est constituée de deux cycles benzéniques reliés par un ion flavylum généralement glycosylé en C<sub>3</sub> (Figure 9). Les cinq anthocyanidines, aglycones, rencontrées dans le genre *Vitis* sont la malvidine, la paeonidine, la delphinidine, la pétunidine et la cyanidine se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation du cycle B. L'aglycone est le groupement chromophore du pigment. Les anthocyanines sont estérifiées par des sucres en position R<sub>3</sub> ou R<sub>5</sub>, ces sucres étant eux-mêmes estérifiés en position 5 par des acides aliphatiques (acide acétique) ou aromatiques (acide *para*-coumarique ou caféique). La glycosylation et la méthylation participent à la stabilisation des anthocyanes en les protégeant de l'oxydation.



**Figure 9 :** Structure chimique de base des anthocyanidines.

L'oxygène chargé positivement du noyau flavylium explique la présence de quatre formes en équilibre en milieu aqueux. Le pH est donc un élément déterminant dans la couleur et l'intensité des anthocyanes.

Dans les raisins de *Vitis vinifera* et dans les vins produits à partir de cette espèce, seules les anthocyanines monoglucosides et les anthocyanines monoglucosides acylées sont retrouvées. Des anthocyanes diglucosides sont présentes chez *Vitis* américains et asiatiques.

Les anthocyanes sont présentes dans les vacuoles des cellules de la pellicule, ainsi que dans les cellules de la pulpe pour les cépages teinturiers. Leur accumulation débute trois semaines avant le changement de couleur (Darné, 1991), et leurs teneurs augmentent très significativement à partir de la véraison. Une stabilisation, voire une légère diminution des teneurs est observée à maturité. Au cours de la vinification, elles sont plus ou moins facilement extraites par la macération pré-fermentaire et la fermentation alcoolique en fonction de la composition en pectines, en cellulose et en glucanes des parois cellulaires de la pellicule (Ortega-Regules *et al.*, 2006).

Les anthocyanes peuvent interagir avec d'autres composés flavonoïdes dans la vacuole et ensuite dans le vin. Ce phénomène de co-pigmentation intermoléculaire est essentiel à la modulation et à la stabilisation de la couleur.

La teinte des baies et son intensité dépend du niveau de maturité (Perez-Magarino et Gonzalez-San Jose, 2006). Les teneurs sont modulées par de nombreux facteurs comme le stress hydrique (Roby *et al.*, 2004 ; Koundouras *et al.*, 2007), la température (Mori *et al.*, 2005), les apports en nutriments et les régulateurs de croissance (Pirie et Mullins, 1976 ; Hiratsuka *et al.*, 2001a ; Delgado *et al.*, 2004). Le terroir et le cépage ont longtemps été considérés comme les facteurs déterminants la composition en anthocyanes (Vivas de Gaulejac *et al.*, 2001) mais les travaux de Mori *et al.* (2007) montrent qu'elle est aussi dépendante des conditions climatiques, les anthocyanes les plus stables étant conservées au cours de la maturation.

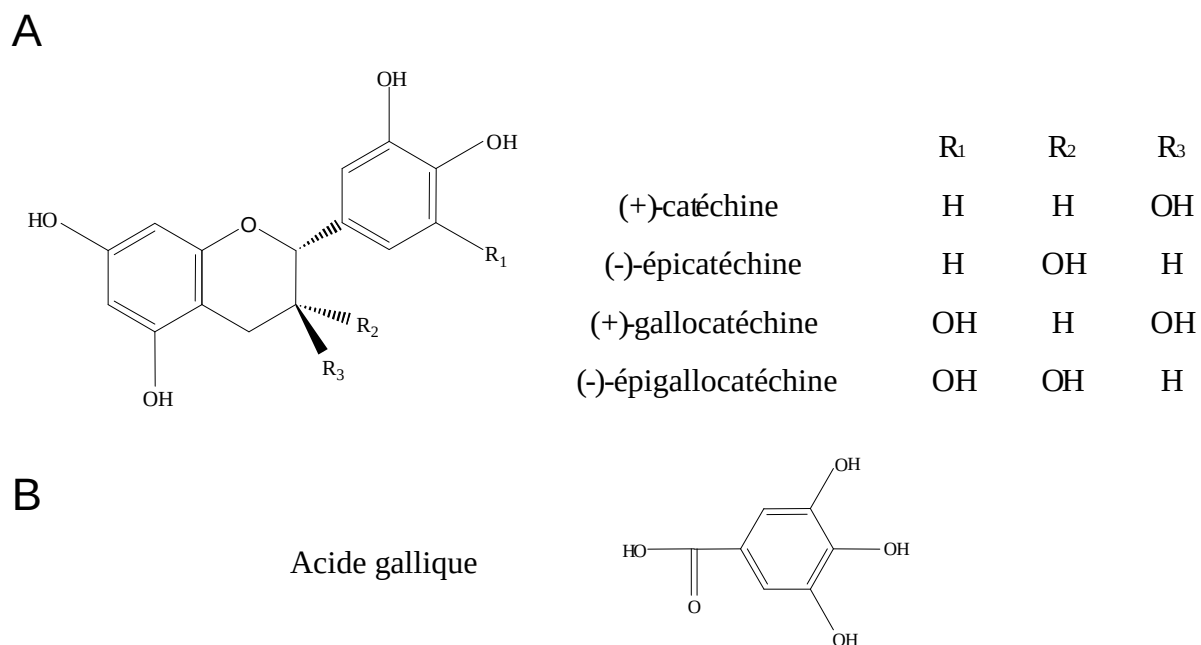
Au cours du vieillissement des vins, les anthocyanes libres se condensent directement ou indirectement avec les tannins pour former des oligomères. Elles peuvent également se polymériser indirectement entre elles (Atanasova *et al.*, 2002).

Des études récentes rapportent également la formation dans les vins de nouveaux pigments, les pyranoanthocyanes (Bakker et Timberlake, 1997). Ces molécules ont la structure d'une anthocyane dont le groupement hydroxyle du carbone 5 et le carbone 4 sont reliés par une molécule à liaison éthylénique (acide pyruvique par exemple). Elles déplacent la couleur des vins vers l'orange mais cet effet peut être contrebalancé par de fortes teneurs en acides hydroxycinnamiques (Morata *et al.*, 2007).

### **III.2.b Les tannins du raisin**

Les tannins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau (Bate-Smith, 1954), résultant de la polymérisation de molécules élémentaires possédant des fonctions phénols telles que la catéchine et l'épicatéchine. Ils sont caractérisés par leur capacité à interagir avec

les protéines. On distingue plusieurs familles qui diffèrent par la nature des molécules élémentaires (Figure 10).



**Figure 10** : Structure chimique des flavan-3-ols (**A**) et de l'acide gallique (**B**).

Le raisin contient des tannins condensés provenant des parties solides du raisin : la pellicule et les pépins, qui sont la principale source en quantité, ainsi que la rafle. Ils sont extraits au cours de la macération et leur concentration dans les vins dépend de la nature du cépage, du terroir, des conditions de vinification ainsi que des conditions climatiques. Le vin contient aussi des tannins hydrolysables venant essentiellement de la barrique.

Les tannins condensés, également nommés proanthocyanidines ou encore tannins catéchiques, sont issus de la polymérisation d'unités flavanes correspondant à un squelette de quinze carbones organisés en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> comme décrit précédemment.

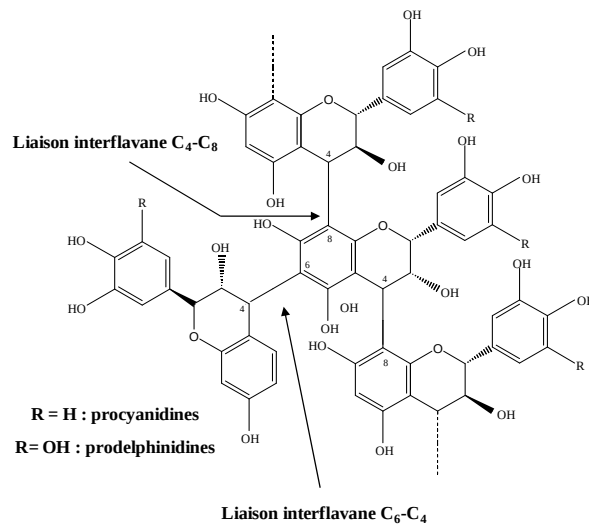
Les cinq principaux monomères du raisin sont :

- (+)-catéchine
- (-)-épicatéchine
- (+)-gallocatéchine



- (-)-épigallocatechine
- (-)-épicatechine-3-O-gallate.

On parle d'oligomères lorsque 3 à 10 sous-unités flavanols sont reliées entre elles par des liaisons C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> et/ou C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> (Figure 11). Au-delà de 10 unités flavanols, ce sont des polymères. Les procyanidines peuvent être linéaires (liaisons interflavanes C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>) ou branchées (liaisons à la fois C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> et C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>).



**Figure 11 :** Structure chimique des tannins condensés.

Les monomères les plus rencontrés sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatechine, ils sont présents à la fois dans les pépins et dans la pellicule. Ces monomères peuvent exister en tant que tels ou s'associer en dimères, en oligomères constitués de deux à dix monomères et en polymères, dont le poids moléculaire varie entre 500 et 20000 Da (Haslam *et al.*, 1980). En fonction de la composition en monomères, on divise alors les tannins en deux classes :

- ~ les procyanidines, qui sont des polymères de (+)-catéchine et de (-)-épicatechine,
- ~ les prodelphinidines, qui sont des polymères de (+)-gallocatechine et de (-)-épigallocatechine.

La condensation des flavanols est réalisée entre une unité flavanol électrophile (en position 4) et une unité flavanol nucléophile (positions 6 et 8), ce qui conduit à la formation de liaisons interflavanes de type C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> et surtout C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>.

Dans la pellicule, les tannins peuvent être libres dans la vacuole ou liés. Dans ce cas, ils seraient associés à des protéines ou des polysaccharides au niveau des membranes vacuolaires ou des parois, ce qui limiterait leur extractibilité et leur réactivité (Amrani Joutei *et al.*, 1994). Gagné, en 2006, a montré que seuls 10% des tannins totaux sont associés aux parois, la majorité des tannins pelliculaires semblerait donc être localisés dans le compartiment intracellulaire. De plus quelle que soit leur localisation, la composition reste constante au cours du développement, seules les unités terminales des polymères diffèrent entre les fractions pariétale et cellulaire, ce qui expliquerait des interactions différentes (Gagné *et al.*, 2007). Le degré de polymérisation des tannins pariétaux étant supérieur à celui des tannins intracellulaires, favorisant les interactions tannins-protéines augmentant la perception d'astringence (Lea et Arnold, 1978). L'extractibilité dépendant de l'état d'avancement de la dégradation du tissu pelliculaire, l'évolution de la pellicule au cours de la maturation doit moduler leur possibilité d'extraction et constitue donc un facteur essentiel de la qualité des tannins.

Les tannins jouent un rôle important en œnologie pour la qualité et les caractéristiques organoleptiques des vins (couleur, saveur, astringence et amertume). Leur réactivité est à l'origine de l'évolution constante de leurs structures au cours de la maturation du raisin, de la vinification et du vieillissement. En effet, au cours du vieillissement, les tannins réagissent entre eux ou avec d'autres composés phénoliques présents dans le vin, tels que les ellagitannins et les anthocyanes : ces réactions ont une incidence sur la couleur et les caractéristiques organoleptiques des vins (Glories, 1978 ; Haslam, 1980).

### **III.3 Biosynthèse des composés phénoliques dans la pellicule du raisin**

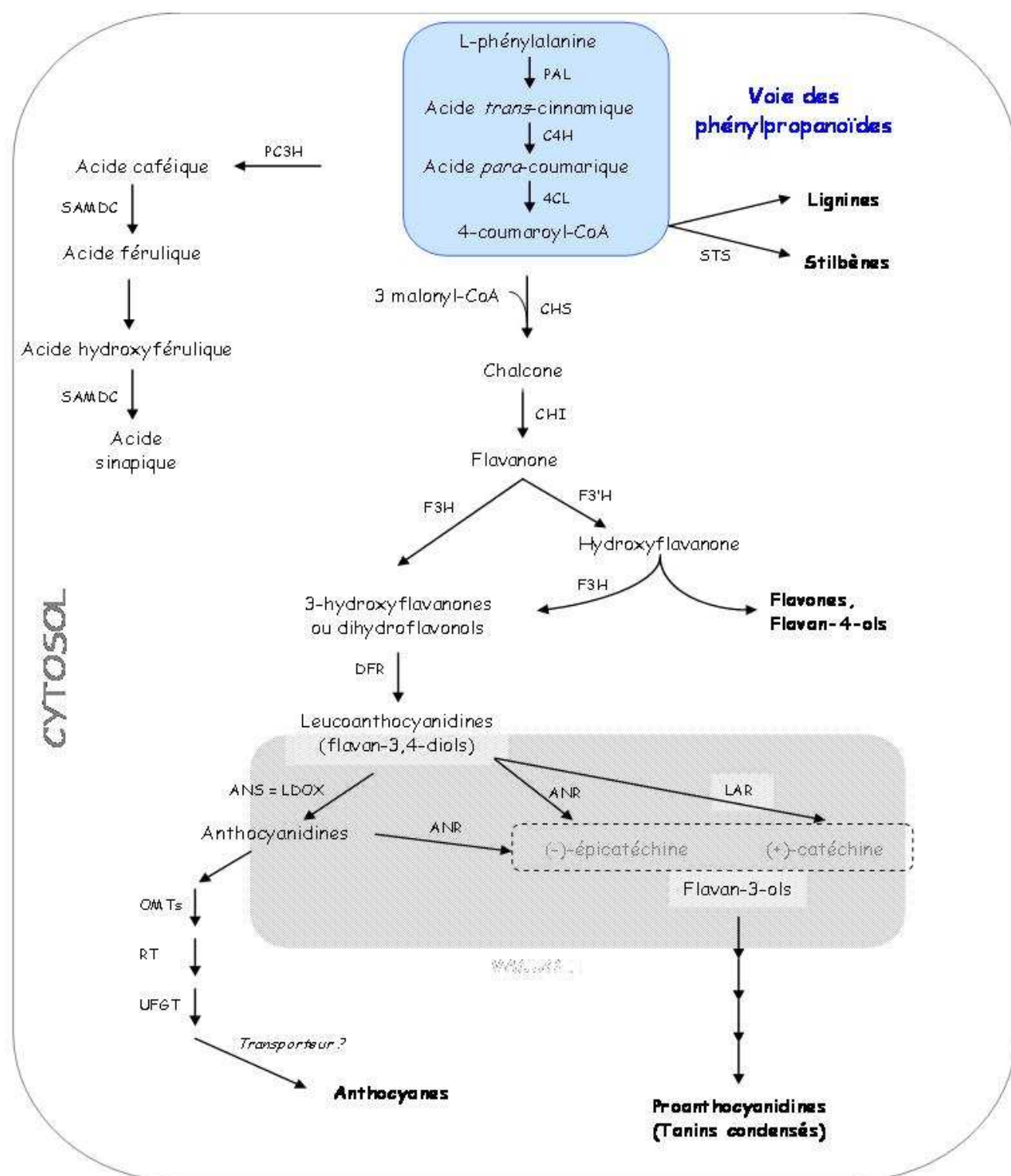
#### **III.3.a La voie des phénylpropanoïdes**

La voie métabolique de biosynthèse des polyphénols, comme celle des autres métabolites secondaires, est très complexe : elle comprend de nombreuses enzymes et possède plusieurs ramifications, ce qui aboutit à la formation de nombreux métabolites apparentés et certaines étapes, les dernières en particulier, ne sont pas clairement caractérisées. Les enzymes de cette voie sont soit constitutives soit inductibles. La régulation de cette voie est donc soumise à des signaux exogènes tels que la température, la lumière, différents stress et des éliciteurs provenant de la paroi des microorganismes pathogènes (Xie et Dixon, 2005) ou des signaux endogènes comme les phytohormones (auxines, éthylène, acide abscissique) (Gagné *et al.*, 2006b).

Les polyphénols sont issus de deux voies du métabolisme primaire : la voie de l'acétate et celle du shikimate (Figure 12).

L'acétyl-CoA, voie de l'acétate, provient essentiellement de la glycolyse où sous l'action de l'acétyl-CoA-carboxylase il est transformé en malonyl-CoA. L'acide shikimique, voie du shikimate, est issu du phosphoénolpyruvate (PEP) (produit final de la glycolyse) et du D-érythrose-4-phosphate issu de la voie des pentoses phosphates ou du cycle de Calvin via une aldolase, une cyclisation et une réduction. L'apport de PEP donne naissance à l'acide chorismique qui conduit à la phénylalanine. La phénylalanine ammonialyase (PAL) permet d'obtenir l'acide cinnamique qui deviendra acide p-coumarique après action de la cinnamate 4-hydroxylase. La réaction du malonyl-CoA et du p-coumaryl-CoA par la stilbène synthase permet d'obtenir les stilbènes et les flavonoïdes par la chalcone synthase.

Les précurseurs des tannins sont formés via la chalcone synthase à partir de la voie des phénylpropanoïdes. La dihydroflavonol 4-réductase (DFR) agit sur la dihydroflavonols comme la dihydroquercétine pour donner les leucoanthocyanidines. Deux voies permettent d'accéder aux monomères principaux des tannins : la leucoanthocyanidine réductase (LAR) qui catalyse la réaction de la formation des catéchines et l'anthocyanidine réductase (ANR) qui produit l'épicatéchine. Cette synthèse est cytoplasmique tandis que la polymérisation des monomères, dont le mécanisme (chimique ou enzymatique) n'est pas connu, serait vacuolaire.



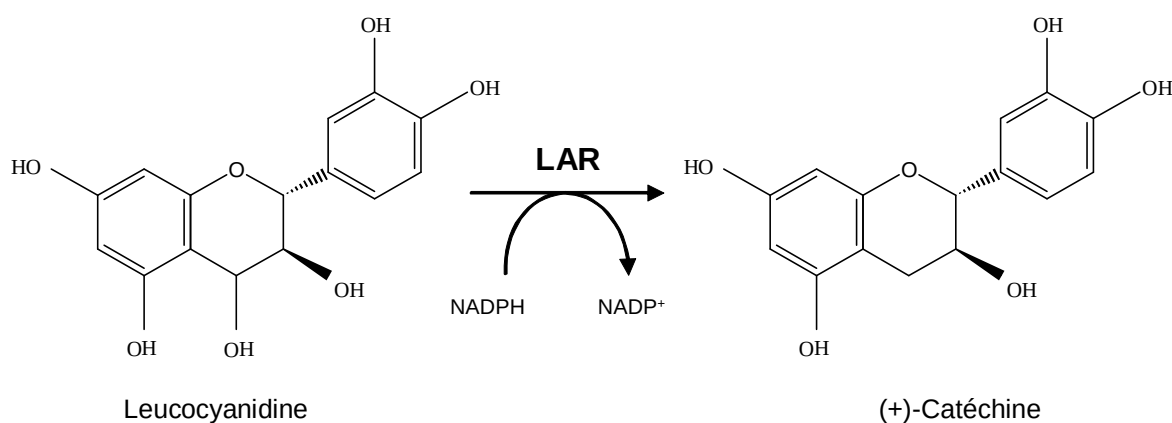
**Figure 12 :** Voie de biosynthèse simplifiée des composés phénoliques (d'après Gény (1997) et Marles *et al.* (2003))

ANR : anthocyanidine réductase ; ANS : anthocyanine synthase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; CHI : chalcone isomérase ; CHS : chalcone synthase ; DFR : dihydroflavonol réductase ; F3H : flavanone 3- $\beta$ -hydroxylase, F3'H : NADPH-cytochrome P450-flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; GST : glutathion-S-transférase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; OMT : O-méthyltransférase ; PAL : Phénylalanine ammonialyase ; RT : rhamnosyl transférase ; SAMDC : S-adénosyl-méthionine décarboxylase ; STS : stilbène synthase ; UFGT : UDG-glucose: flavonoïde-3-O-glycosyltransférase.

### III.3.b Biosynthèse des tannins

#### III.3.b.i La leucoanthocyanidine réductase (LAR)

La LAR catalyse la réduction de la leucoanthocyanidine (2,3-trans-3,4-cis-leucocyanidine) en leucocyanidine avec comme cofacteur le NADPH (Figure 13). Son substrat préférentiel est la leucoanthocyanidine qui permet la synthèse de (+)-catéchine, mais elle peut également utiliser d'autres isomères du cycle B comme la leucopelargonidine et la leucodelphinidine, et ainsi produire l'afzéléchine et la gallocatéchine. Les substrats de l'anthocyanidine reductase (ANR) (pelargonidine, cyanidine et delphinidine) sont des inhibiteurs potentiels de la LAR (Tanner *et al.*, 2003).



**Figure 13 :** Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR).

L'étude de la LAR, après clonage et purification, chez le théier et plus précisément dans les feuilles de *Desmodium uncinatum* (Jacq.) DC par l'équipe de Tanner en 2003 a montré que cette enzyme était un monomère de 42.7 kDa constitué de 382 acides aminés, avec une forte activité de synthèse de catéchine.

La séquence déduite a montré un lien étroit avec le groupe des isoflavones réductases (IFR), enzymes communes des plantes appartenant à la famille des protéines Reductase-épimérase Déhydrogénase (RED). La LAR possède une extension de 65 acides aminés à

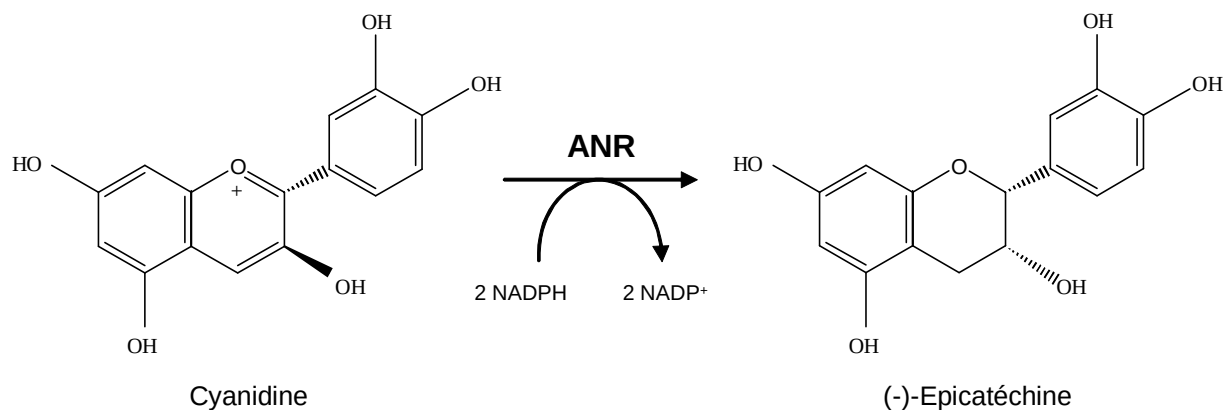
l'extrémité C terminale par comparaison aux isoflavones réductases homologues mais la fonction de cette séquence demeure inconnue. Comme les enzymes de la famille des RED, la séquence de la LAR possède un motif riche en glycine interagissant avec le pyrophosphate du NADP. En se basant sur l'homologie de séquence, il semblerait que l'Arg44 interagisse avec le 2'-phosphate du NADPH ce qui contribuerait à une affinité de la LAR, pour ce co-facteur, 100 fois plus importante que pour le NADH.

Chez la vigne, la séquence nucléotidique de la LAR a été obtenue par comparaison des EST de *Vitis vinifera* avec les EST de banque de *Desmodium* ainsi qu'à celles des autres plantes. Les EST similaires à la LAR de *Desmodium* ont été identifiées, assemblées en contigs et traduites dans le but d'étudier la phylogénie des différentes LAR, ANR, IFR protéines et des DFR du règne végétal (Bogs *et al.*, 2005). Deux isoformes de la LAR ont été isolées et clonées chez *Vitis vinifera*, *VvLAR1* et *VvLAR2*. L'étude de l'expression de ces deux gènes par PCR en temps réel a révélé des profils différents et notamment des expressions-tissus spécifiques. Ainsi *VvLAR1* apparaît être spécifique des pépins, avec une forte expression deux semaines après floraison, tandis que l'expression reste faible dans la pellicule des baies et dans les feuilles. *VvLAR2* est aussi fortement exprimé dans les pépins avec un maximum durant la véraison. Les transcrits de ce gène sont aussi détectés dans les fleurs, la pellicule, et les feuilles mais à un faible niveau (Bogs *et al.*, 2005). Ces travaux ont montré que chez la vigne, la LAR contribue à la synthèse des proanthocyanidines dans chacun des tissus ou organes étudiés (Gagné *et al.*, 2009 ; Lacampagne *et al.*, 2010).

### III.3.b.ii L'anthocyanidine réductase (ANR)

La deuxième enzyme connue permettant la synthèse des monomères de tannins est l'anthocyanidine réductase (ANR).

L'anthocyanidine réductase, a été purifiée et étudiée par Xie *et al.*, en 2003 et 2004, chez *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* mais aussi dans les feuilles de théier *Camellia sinensis* L. (Punyasiri *et al.*, 2004). Le gène BANYULS, *AtANR*, code pour cette enzyme qui catalyse la réaction de réduction des anthocyanidines en 2,3-cis-flavan-3-ols (comme la (-)-épicatéchine), (Figure 14).



**Figure 14 :** Réaction catalysée par l’anthocyanidine réductase (ANR).

Comme la LAR, l’ANR appartient à la famille des réductases-épimérase déhydrogénases (RED), et nécessite comme co-facteur le NADPH (Devic *et al.*, 1999 ; Tanner *et al.*, 2003 ; Xie *et al.*, 2004).

L’ANR est capable de réduire plusieurs substrats : cyanidine, pelargonidine, delphinidine, avec des efficacités variables en fonction des espèces. Néanmoins, chez *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*, l’ANR présente les mêmes constantes de réaction pour la cyanidine, ce qui laisse penser que celle-ci est le substrat majeur *in vivo*. Différents tests réalisés par Xie *et al.* (2003), ont mis en évidence des substances inhibitrices de l’ANR comme le Na<sup>+</sup>, la quercétine mais aussi la catéchine et la dihydroquercétine qui ont un effet négatif sur l’*AtANR*.

De la même façon que pour la LAR, Bogs *et al.* (2005) ont identifié le gène chez la vigne. Issue du génome de Syrah, *VvANR* présente 66% d’identité nucléotidique avec *AtBANYULS* (ou *AtANR*) et 83% de similarité de la séquence d’acides aminés de la région codante. Contrairement à la LAR, un seul gène *VvANR* similaire à *Arabidopsis* (Devic *et al.*, 1999) et à *Medicago* (Xie *et al.*, 2003) a été détecté.

Chez *Arabidopsis*, le gène *BANYULS* codant pour l’ANR s’exprime dans la couche endothéliale du manteau de la graine en développement (Devic *et al.*, 1999), tandis que chez *Medicago*, l’expression est aussi détectée dans les bourgeons floraux à des taux plus faibles que dans la feuille (Xie *et al.*, 2003). L’homologue chez la vigne, *VvANR*, est exprimé à des

niveaux équivalents dans les feuilles et dans les fleurs mais aussi dans la pellicule et dans les pépins en développement. Tous ces tissus présentent des teneurs significatives en proanthocyanidines (PA) basées sur des sous unités d'épicatéchine, avec une taille ainsi qu'une composition en PA variant en fonction des tissus. Ceci confirme que, chez la vigne, l'ANR est bien impliquée dans la synthèse des PA (Gagné *et al.*, 2009).

### III.3.c Régulation de la voie de biosynthèse

#### III.3.c.i Facteurs de transcriptions

La régulation de la voie de biosynthèse des proanthocyanidines a été étudiée chez de nombreuses espèces comme le maïs (*Zea mays*), la gueule de loup (*Antirrhinum majus*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), la pomme (*Malus domestica*) et la vigne (*Vitis vinifera*) (Mol *et al.*, 1998 ; Allan *et al.*, 2008). Les gènes de la voie de biosynthèse des PA sont soumis à un contrôle transcriptionnel assuré par trois types de complexes : les facteurs de transcription de type MYC (codant pour des protéines de type hélice-boucle-hélice, bHLH), les facteurs de transcriptions MYB et les protéines de type WD40 (Marles *et al.*, 2003). Les gènes *Myc*, de la même façon que les gènes *Myb*, régulent fortement la biosynthèse des PA et des anthocyanes (Nesi *et al.*, 2000 ; Ramsay *et al.*, 2003). Concernant les protéines de type WD40, Walker *et al.* (1999) ont démontré leur implication dans l'accumulation des anthocyanes et des PA. Gonzalez *et al.* (2008) ont mis en évidence, chez *Arabidopsis thaliana*, l'implication de complexes ternaires formés des protéines MYB et MYC, MYB-BHLH-WDR (MBW), possédant des domaines WD répétés, riches en résidus tryptophane et acide aspartique. Par exemple, le complexe TT2 (MYB), TT8 (MYC) et TTG1 (protéine possédant des domaines WD) active directement l'expression du gène *AtBAN* codant pour l'anthocyanidine réductase (Baudry *et al.*, 2004). Récemment, Hichri *et al.* (2010), ont montré que le facteur de transcription *VvMYC1* interagissait physiquement avec les facteurs *VvMYB* pour induire les promoteurs de la voie de biosynthèse des PA et anthocyanidines.

Néanmoins, jusqu'à présent, une seule classe de régulateurs des gènes de la voie de biosynthèse a été réellement identifiée chez la vigne. Il s'agit de la famille des MYB. En effet, les facteurs de transcription MYB constituent une famille de protéines possédant un domaine conservé de liaison à l'ADN qui leur permet de moduler (activer ou réprimer) l'expression de certains gènes. Ils possèdent un domaine de fixation à l'ADN en N-terminal et un domaine de régulation de la transcription vers l'extrémité C-terminale. Les domaines MYB de liaison à



l'ADN sont composés d'une à trois répétitions imparfaites d'environ 50 acides aminés, similaires, nommées R1, R2 et R3 et formant trois hélices  $\alpha$ , la dernière hélice de chaque répétition interagissant avec l'ADN. Une autre spécificité des protéines MYB est la présence, dans chaque motif R, de trois résidus tryptophane espacés régulièrement de 18 à 21 résidus et très conservés, probablement destinés à stabiliser l'interaction protéine / ADN. Chez les plantes, on trouve essentiellement des régulateurs appartenant à la sous-famille MYB R2R3 impliqués dans la régulation du métabolisme des composés phénoliques (*Arabidopsis thaliana*, *Petunia hybrida*, *Anthirrhinum majus*...). Le séquençage complet du génome de la vigne a permis à Matus *et al.* en 2008, de décrire et de classer 108 membres de la sous-famille MYB R2R3 en fonction de leur similarité avec les gènes orthologues d'*Arabidopsis thaliana*.

Chez la Vigne, différents gènes Myb ont été identifiés comme régulateurs de la synthèse des flavonoïdes :

- les facteurs VvMYB5a et VvMYB5b (Deluc *et al.*, 2006 et 2008) qui activent de manière générale la voie des flavonoïdes mais qui sont principalement exprimés au cours de la première phase de croissance active, phase pendant laquelle sont synthétisés les tannins.
- le facteur VvMYBPA1 qui est détecté dans les fleurs, les pellicules et les pépins, avec un profil d'accumulation similaire à l'accumulation des tannins (Bogs *et al.*, 2007).
- les facteurs VvMYBA1 et VvMYBA2 qui sont spécifiques de la synthèse des anthocyanes (Kobayashi *et al.*, 2002) et exprimés à partir de la véraison, leur action étant favorisée par la lumière (Mori *et al.*, 2007) et l'acide abscissique (Jeong *et al.*, 2004).

Les travaux menés précédemment au laboratoire sur les facteurs de régulation, VvMYB5a et VvMYBPA1, ont permis de confirmer leur spécificité envers les gènes de la LAR et l'ANR (Gagné *et al.*, 2009) puisque les profils d'expression de ces facteurs de transcription sont corrélés à ceux de VvLAR1, VvLAR2 et VvANR.

### III.3.c.ii Régulateurs hormonaux : acide abscissique

L'acide abscissique (ABA) est une phytohormone impliquée dans de nombreux processus physiologiques (fermeture des stomates, maintien de la dormance des pépins, floraison, photosynthèse, maturation des fruits non-climactériques) qui a été très largement étudiée (Zeevaart et Creelman, 1988). Chez les fruits non-climactériques, comme le raisin, l'ABA endogène augmente considérablement durant la période de véraison (Broquedis, 1987 ; Gagné *et al.*, 2006b ; Deytieux, 2005) suggérant un possible rôle dans le déclenchement de la maturation. De nombreux travaux ont également montré l'effet positif de cette hormone sur le développement de la couleur des baies (Katao *et al.*, 1982 ; Matsushima *et al.*, 1989 ; Han *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 1998 ; Esteban *et al.*, 2001 ; Hiratsuka *et al.*, 2001 ; Ban *et al.*, 2003 ; Jiang et Joyce, 2003 ; Jeong *et al.*, 2004 ; De La Hera Orts *et al.*, 2005 ; Gagné *et al.*, 2006b ; Peppi *et al.*, 2006). L'application exogène d'ABA sur des grappes de raisin n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation de la teneur en anthocyanes des pellicules (Hiratsuka *et al.*, 2001 ; Peppi *et al.*, 2006) mais permet une coloration précoce des grappes traitées par comparaison aux non traitées (Gagné *et al.*, 2006). Ce phénomène s'explique par une augmentation de l'expression de l'*UFGT* (UDP-glucose :flavonoid-3-O-glycosyltransferase codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des anthocyanes) et du gène *VvMYBA1*, facteur de transcription régulant la voie de biosynthèse des anthocyanes. L'ABA active également les gènes codant pour les enzymes du début de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, commune à la biosynthèse des PA et des anthocyanes : la PAL (phénylalanine ammonia-lyase), la CHI (chalcone isomérase) et la CHS (chalcone synthase) (Jeong *et al.*, 2004 ; Fujita *et al.*, 2007). Une étude précédente, menée au laboratoire, a montré que l'application exogène d'ABA sur les baies de raisin affecte les teneurs en tannins des baies vertes sans modifier leur composition (Lacampagne *et al.*, 2010). Ces résultats s'expliquent par une diminution des activités LAR et ANR et la répression de l'expression des gènes correspondants quelques jours après traitement. Durant la véraison et comme pour les anthocyanes, l'ABA possède un effet positif sur la biosynthèse des tannins. Un tel traitement affecte également l'expression des facteurs de transcription *VvMyb5a* et *VvMybPA* suggérant la co-régulation de la LAR et l'ANR par l'ABA (Lacampagne *et al.*, 2010).

### III.3.d Transport des flavonoïdes

Les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes seraient localisées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) et organisées en complexes multi-enzymatiques associés aux enzymes du cytochrome P450 dont la cinnamate 4-hydroxylase, la flavonoïde 3'-hydroxylase et la flavonoïde 3',5'-hydroxylase (Winkel *et al.*, 2004 ; Jorgensen *et al.*, 2005). L'assemblage de ces complexes à la surface du RE serait assuré par des interactions protéines-protéines (Winkel *et al.*, 2004). Cette localisation permettrait de faciliter l'acheminement des flavonoïdes vers leurs lieux de stockage (vacuole, membrane plasmique, paroi cellulaire), par un transport membranaire (Amrani-Joutei, 1993).

Certaines enzymes de la voie de biosynthèse des tannins ont également été co-localisées dans le noyau et au niveau du tonoplaste (Winkel *et al.*, 2004 ; Saslowsky *et al.*, 2005). Cette diversité dans la localisation des complexes enzymatiques faciliterait l'acheminement ou le décalage de la biosynthèse des tannins en réponse à des exigences physiologiques de la plante (Winkel *et al.*, 2004 ; Jorgensen *et al.*, 2005).

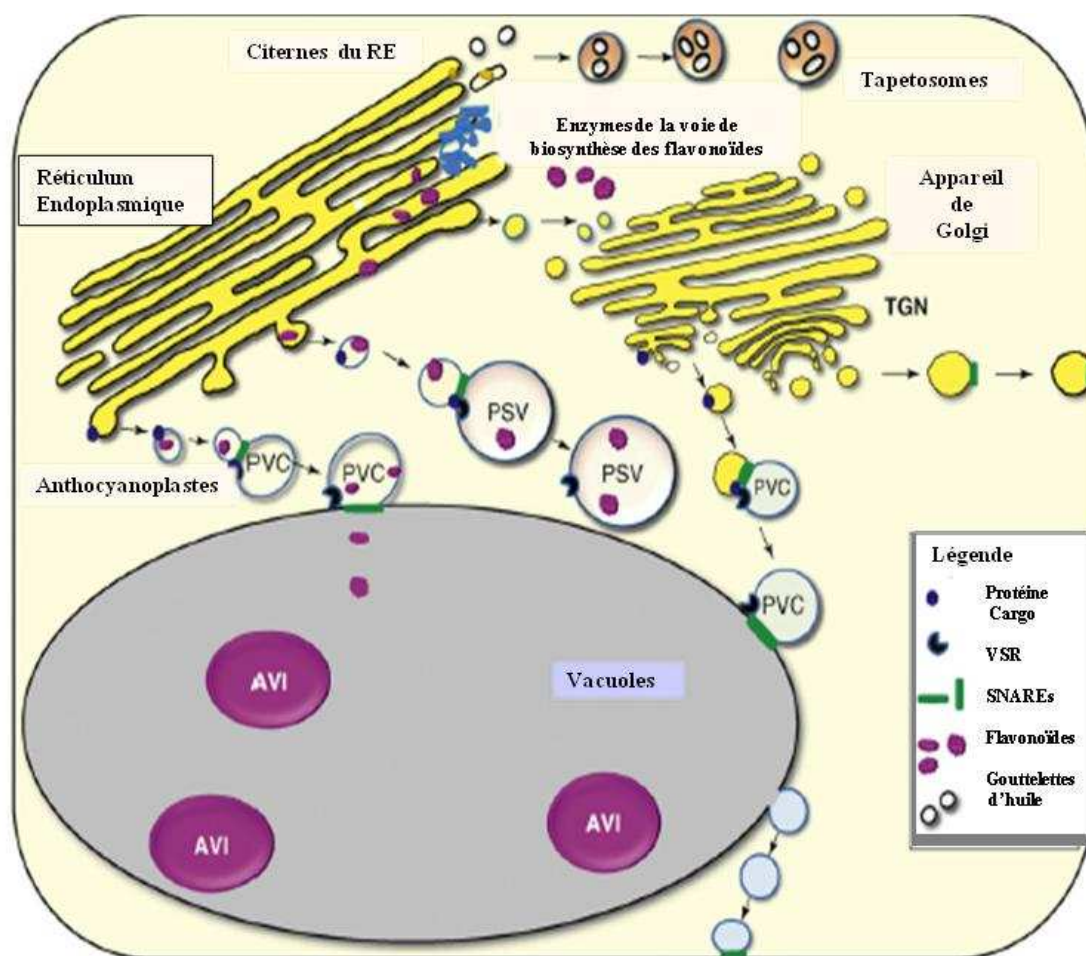
Les flavonoïdes possèdent de nombreuses fonctions physiologiques comme par exemple un rôle de protection contre les UV et sont par conséquent localisés dans de nombreux compartiments cellulaires dont le cytosol, les vacuoles, le RE, les chloroplastes, le noyau mais aussi dans de petites vésicules ainsi que dans l'espace extracellulaire. La plupart des flavonoïdes sont conjugués (anthocyanes, flavonols et flavones glycosides) et sont principalement localisés dans les vacuoles (Winkel-Shirley, 2001 ; Dixon *et al.*, 2005 ; Lepiniec *et al.*, 2006). En effet, le pH et la présence de co-pigments dans la vacuole détermine les colorations des tissus (fleurs, pellicules...). La vacuole est également le site de biosynthèse de dérivés flavonoïdes tels que les PA. Ainsi, la catéchine et l'épicatéchine, dans de nombreuses espèces, sont glycosylées puis transportées dans la vacuole où elles sont polymérisées en PA puis les PA sont exportés dans l'apoplaste (Dixon *et al.*, 2005).

La localisation hétérogène des flavonoïdes dans les cellules végétales associée à une biosynthèse au niveau de la face cytosolique du RE implique un système de transport complexe des molécules vers leurs sites de stockage. Le transport de ces métabolites secondaires repose sur l'hypothèse de deux mécanismes synergiques : le transport par des

vésicules membranaires (Figure 15) et le transport par des transporteurs membranaires (Figure 16), (Zhao et Dixon, 2009).

La première hypothèse (Figure 15) repose sur les observations en microscopie du trafic des anthocyanes (Markham *et al.*, 2000 ; Grotewold, 2004 ; Braidot *et al.*, 2008).

Les études réalisées sur des cultures de cellules de vigne ont permis de localiser les anthocyanes dans des vésicules cytoplasmiques appelées anthocyanoplastes au niveau des protoplastes (Calderon *et al.*, 1993). Or, d'après Conn *et al.* (2003), dans les vacuoles ces structures sont absentes, les anthocyanes étant alors localisées dans des inclusions vacuolaires (AVIs), dépourvues de membrane et associées à des protéines ou des substances membranaires (Markham *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2006). Selon les observations de Zhang *et al.* (2006), les anthocyanoplastes, après leur synthèse au niveau du RE, s'associeraient à des structures prévacuolaires (PVCs) pour être transportés dans la vacuole puis fusionneraient avec les AVIs. Les vésicules contenant les anthocyanes pourraient également fusionner avec des vacuoles de stockage de protéines (PSVs) ou être transportées via le système *trans*-golgien sans emprunter la voie vésiculaire RE-vacuole (Poutska *et al.*, 2007). Abrahams *et al.* ont démontré en 2002, que les PA pourraient être transportées et fusionnées à la vacuole par un système de vésicules prévacuolaires similaire. Le transport vésiculaire nécessite des protéines ou des séquences d'adressage de type GTPases, SNARE, récepteurs vacuolaires pour permettre l'adressage, la fusion et le recyclage des vésicules (Molendijk *et al.*, 2004 ; Da Silva *et al.*, 2006 ; Lipka *et al.*, 2007).

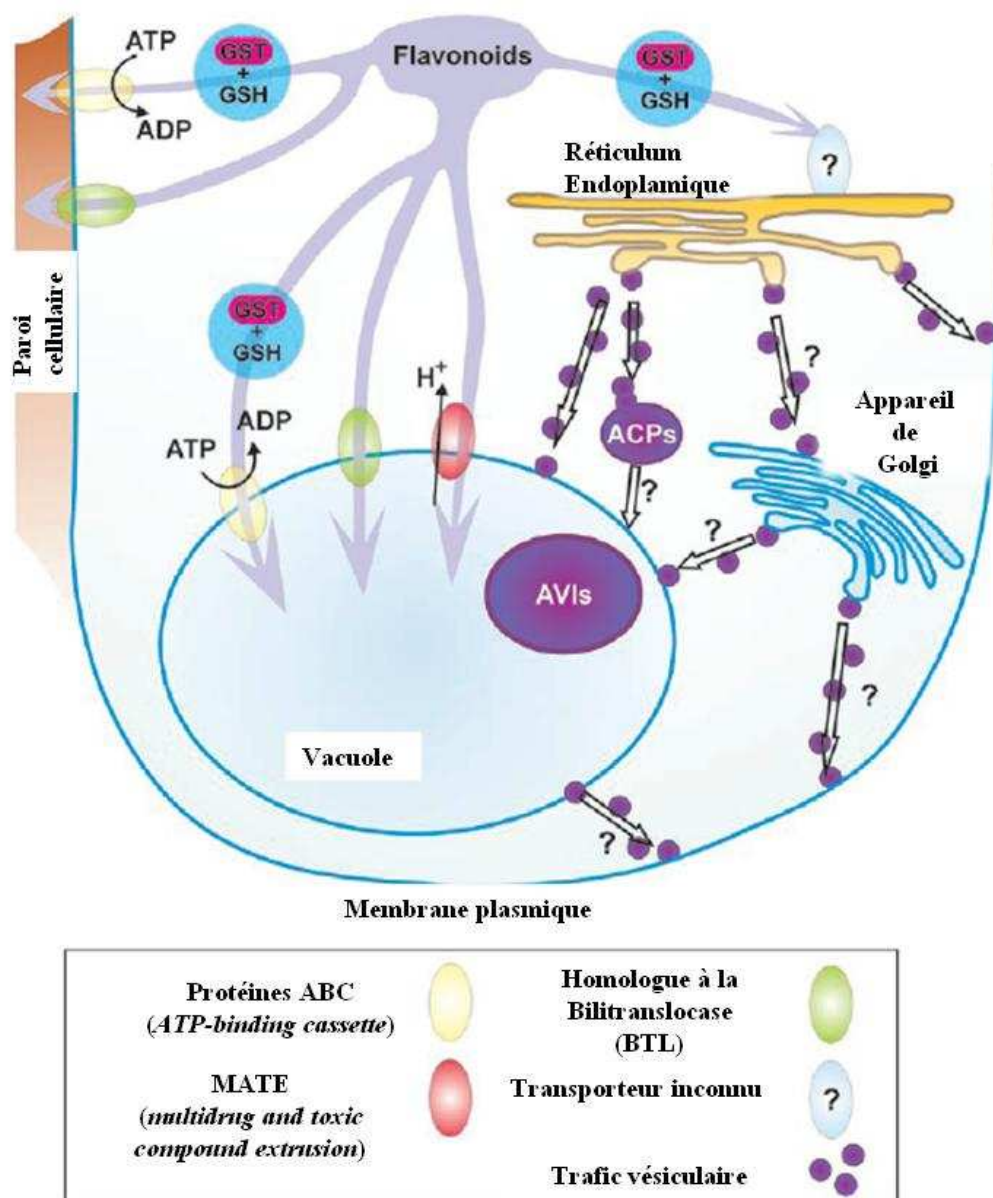


**Figure 15** : Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des vésicules membranaires, d'après Zhao et Dixon (2009).

*AVI* : inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes ; *PVC* : Structures prévacuolaires ; *PSV* : vacuoles de stockage de protéines ; *TGN* : réseau trans-golgien.

La seconde hypothèse (Figure 16) concernant le transport des flavonoïdes repose sur des transporteurs membranaires. En effet, une fois synthétisés, les flavonoïdes vont subir différentes modifications telles que des glycosylations, acylations ou méthylations et être pris en charge par différents transporteurs jusqu'à la vacuole. La glutathione S-transferase (GST) semble être impliquée dans ce transport. Plusieurs études ont montré l'implication des GST dans l'accumulation des anthocyanes (Kitamura *et al.*, 2004 ; Peel *et al.*, 2009). La GST serait capable de se lier aux anthocyanes et PA pour former des complexes GST-anthocyanes ou GST-flavonols protégeant les flavonoïdes de l'oxydation et les guidant vers la vacuole (Mueller *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, le mutant GST, *tt19*, est déficient dans le transport des flavonoïdes ainsi que dans l'accumulation des PA dans le pollen (Kitamura *et al.*, 2004). Smith *et al.*, en 2003, ont montré une possible association des complexe GST-

flavonol aux membranes chez le mutant *AtGSTF2* (*Arabidopsis thaliana*), confirmant la possible implication des GST dans le transport des flavonoïdes.



**Figure 16** : Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des transporteurs membranaires, d'après Braidot *et al.* (2008).

AVI : inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes ; ACP : Anthocyanoplastes ; GST : Glutathione S-transferase.

Deux autres catégories de transporteurs semblent également être impliqués dans le transport des flavonoïdes : les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) et les transporteurs MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*). Les transporteurs ABC appartiennent à

une famille multigénique permettant le transport de substrat à travers les membranes en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (Sanchez-Fernandez *et al.*, 2001). Chez le maïs, la mutation du transporteur de type ABC, ZmMRP 3, a montré son implication dans l'accumulation des anthocyanes (Goodman *et al.*, 2003). Les transporteurs MATE, quant à eux, utilisent l'énergie des pompes à proton de type ATPases pour le transfert des molécules à travers la membrane plasmique ou vacuolaire. Le transporteur TT12 (*Arabidopsis thaliana*) et son orthologue chez *Medicago trunculata* MATE1 exprimés chez la levure, favorisent le transport de l'épicatéchine 3'-O-glucoside, défini comme précurseur dans la biosynthèse des PA (Zhao et Dixon, 2009).

La dernière catégorie de transporteurs impliqués dans l'acheminement des flavonoïdes concerne une protéine membranaire homologue des mammifères, la bilitranslocase (BLT) (Passamonti *et al.*, 2005). Les similitudes chimiques, moléculaires et cinétiques entre les BTL des mammifères et des plantes suggèrent un rôle dans la translocation et l'accumulation dans les baies de raisin (Braidot *et al.*, 2008). Les protéines BLT ont été trouvées dans les variétés rouges et blanches de raisin et sont localisées dans les pellicules des baies. De plus, le profil d'expression augmente de la véraison à la récolte des baies et leur inhibition par la quercétine suggère leur implication dans le transport des flavonoïdes (Braidot *et al.*, 2008).

#### IV. Relation tannins/paroi cellulaire

Dans la baie de raisin, le lieu de synthèse et d'accumulation des tannins est la pellicule. Ainsi, leur capacité à se lier aux parois cellulaires et la dégradation de celles-ci, semblent influencer leur extractibilité et leur diffusion dans le vin lors des étapes de vinification.

La rétention des polyphénols dans la paroi cellulaire dépend en grande partie de leur composition et de leur structure (conformation, flexibilité des chaînes polymériques, poids moléculaires, pourcentage de galloylation). La composition chimique des parois cellulaires ainsi que les modifications de leur structure influencent la complexation paroi-tannins (Vernhet *et al.*, 2002 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004). Les premiers travaux sur la complexation des polysaccharides et des tannins ont été réalisés sur la pomme en utilisant des solutions modèles de polysaccharides et des parois cellulaires ayant subi des traitements chimiques

(Renard *et al.*, 2001). Deux mécanismes d'association polysaccharides-tannins ont été proposés :

- Les interactions reposeraient sur des liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles des phénols et les atomes d'oxygènes des liaisons des sucres des chaînes polysaccharidiques de la paroi (De Freitas *et al.*, 2003 ; Le Bourvellec *et al.*, 2005b).
- La capacité des polysaccharides à former des structures secondaires permettrait d'encapsuler les polyphénols dans des cavités hydrophobes (Ficcaro *et al.*, 2002 ; Le Bourvellec *et al.*, 2005b).

L'affinité entre les polysaccharides et les tannins varie en fonction de la composition de la paroi. Ainsi, les études menées sur la pomme ont démontré que les PA avaient une affinité croissante pour la cellulose, les xyloglucanes et les pectines. La liaison des PA avec les polysaccharides augmente avec leur degré de polymérisation et leur teneur en (+)-catéchine. La diminution de la porosité des parois cellulaires par séchage montre une diminution de l'affinité entre ces deux partenaires (Le Bourvellec *et al.*, 2004, 2005a et b). Chez le raisin, Ortega-Regules *et al.*, en 2006, ont montré qu'il existait une forte relation entre la composition de la paroi cellulaire et l'extractibilité des anthocyanes : la composition en galactose, arabinose et cellulose ainsi que le degré de méthylation des pectines augmentent l'extractibilité des anthocyanes, ce qui peut être associé à l'épaisseur et à la densité des parois cellulaires lors de la maturation des raisins. De plus, Bindon *et al.*, en 2010, ont mis en évidence l'affinité des parois cellulaires pour les PA de haut poids moléculaire et de faible pourcentage de galloylation.

L'extractibilité des tannins est également influencée par différentes variables lors des processus d'extraction. Ainsi, l'augmentation de la température favorise l'extractibilité des polyphénols en augmentant leur solubilité et leur coefficient de diffusion (Pinelo *et al.*, 2006), mais l'instabilité des polyphénols limite la température d'extraction à 50°C (Cacace et Mazza, 2003). Cette extraction liquide-solide peut également être influencée par le type et la proportion de solvant utilisé. Pinelo *et al.*, en 2005, ont montré que le méthanol avait une capacité à extraire les polyphénols supérieure à l'éthanol et à l'eau et que les proportions de solvant étaient importantes pour éviter tout phénomène de saturation.



Lors des processus de vinification, les polysaccharides subissent des dégradations enzymatiques qui favorisent l'extraction des polyphénols (Meyer *et al.*, 1998). Ainsi, l'utilisation de pectinases durant l'étape de macération augmente la libération des anthocyanes de 40% dans les vins de Monastrell (Pardo *et al.*, 1999). Likewise *et al.*, en 2005, ont observé une augmentation significative des polyphénols totaux dans les mêmes vins après ajout de pectinases lors de la macération. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la dégradation naturelle des parois cellulaires de la pellicule de raisin au cours de la maturation serait un facteur essentiel à la compréhension des mécanismes d'extractibilité des tannins lors des processus de vinification.

Une étude précédente, réalisée au laboratoire (Lacampagne *et al.*, 2008), a permis de mettre en évidence un lien entre la dégradation pariétale, la composition tannique et la perception tannique. Les pellicules issues de deux millésimes aux conditions climatiques diverses, 2004 (températures estivales moyennes, sans déficit hydrique) et 2005 (été chaud et ensoleillé avec un déficit hydrique), présentent des caractéristiques sensorielles différentes : les pellicules du millésime 2004 sont épaisses et légèrement astringentes tandis que celles du millésime 2005 sont fines et décrites comme peu astringentes. Cette étude montre que les pellicules épaisses et peu astringentes possèdent des teneurs en tannins ainsi qu'un DPM supérieurs aux pellicules fines, qui elles, présentent un pourcentage d'extractibilité des anthocyanes et une activité de dégradation des parois (activité PME) élevés par comparaison au millésime 2004. Ainsi il apparaît dans cette étude que les pellicules perçues comme épaisses et astringentes ont des parois peu dégradées et riches en tannins relativement polymérisés. Au contraire, les pellicules dont l'activité PME a été importante présentent moins de tannins, eux même peu polymérisés, et sont décrites comme fines et non astringentes.

Actuellement, les phénomènes impliqués ne sont pas connus. Renard *et al.* (2001) ont montré que chez la pomme, la présence de polyphénols absorbés au niveau de la paroi cellulaire pouvait inhiber totalement l'activité de dégradation pectolytique et avait une influence sur les propriétés organoleptiques des jus (notamment astringence et amertume des fruits). Sanoner *et al.* ont montré en 1999, que les pommes issues de variétés riches en procyanidines polymérisées donnaient des jus faiblement concentrés en polyphénols. De plus,

Gagné *et al.*, en 2009, ont montré que la composition tannique était initiée dès la nouaison et que le DPM des tannins pariétaux des cellules de pellicule évoluait peu.

Ainsi, la faible dégradation pelliculaire pourrait être due à une inhibition des activités pectolytiques en raison de la polymérisation précoce des tannins.

Le Bourvellec *et al.* (2005) ont décrit des interactions non covalentes entre les procyanidines et le matériel pariétal chez la pomme et montré que plus le degré de polymérisation des tannins était important, plus ces derniers étaient retenus dans les parois. Riou *et al.*, en 2002, ont également observé que certaines fractions polysaccharidiques pouvaient modifier l'agrégation des tannins dans le modèle vin. Ainsi, le degré de dégradation pariétale plus ou moins important selon les millésimes influencerait les liaisons tannins/paroi, modulant ainsi l'extractibilité des composés d'intérêt et la perception sensorielle.

## Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

---

### I. Matériel végétal

#### I.1 Le réseau parcellaire

Les baies de raisin utilisées pour cette étude sont issues des 14 parcelles de référence du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux (Figure 17). L'ensemble de ces parcelles sont bien caractérisées (sol, climat, âge des vignes, porte-greffe...Tableau I) et le suivi de la maturation de leurs baies depuis plusieurs décennies a permis de constater des niveaux de maturation différents. Ces parcelles appartiennent à différentes appellations de la région bordelaise et pour chacune d'elles, deux cépages rouges de *Vitis vinifera* L. ont été étudiés : le Cabernet-sauvignon et le Merlot :

- Parcelle 1 (Médoc)
- Parcelle 2 (Médoc)
- Parcelle 3 (Graves)
- Parcelle 4 (Entre-Deux-Mers)
- Parcelle 5 (Libournais)
- Parcelle 6 (Libournais)
- Parcelle 7 (Blaye-Bourg).



**Figure 17** : Carte de localisation des différentes parcelles du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux.

**Tableau I** : Caractéristiques des parcelles du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux.  
<http://www.bordeauxraisins.fr>

\* 10 000/(Ecartement des rangs(m) x Ecartement des pieds(m)) = densité réelle sans prendre en compte les tournières

\*\* H = hauteur de feuillage après rognage (= hauteur de rognage - hauteur de tronc) ; E = Ecartement des rangs

\*\*\* BGS = Brunisol Gravelo Sableux

| Identification                               | Date de plantation | Cépage         | Porte greffe   | Densité /ha* | Orientation des rangs | Taille       | H/E** | Hauteur de rognage | Type de sol | Travail du sol       |
|----------------------------------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------|-----------------------|--------------|-------|--------------------|-------------|----------------------|
| <a href="#">Médoc / Parcelle 1</a>           |                    | Merlot         |                | 6410         | N/S                   | Guyot double | 0.62  | 1,20 m             | Planasol    | Désherbage mécanique |
|                                              |                    | Cabernet-sauv. |                | 9090         | N/S                   | Guyot double | 0.45  | 1,05 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
| <a href="#">Médoc / Parcelle 2</a>           | 1976               | Merlot         | 101 14 MG      | 6666         | NE/SO                 | Guyot double | 0.67  | 1,40 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
|                                              | 1962               | Cabernet-sauv. | 420A           | 6666         | E/O                   | Guyot double | 0.7   | 1,45 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
| <a href="#">Graves / Parcelle 3</a>          | 1989               | Merlot         | 3309C          | 7142         | N (NE)/S (SO)         | Guyot double | 0.61  | 1,30 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
|                                              | 1989               | Cabernet-sauv. | 3309C          | 7142         | N (NE)/S (SO)         | Guyot double | 0.57  | 1,30 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
| <a href="#">Entre-Deux-Mers / Parcelle 4</a> | 1981               | Merlot         | Riparia G de M | 4329         | E/O                   | Guyot double | 0.45  | 1,60 m             | Boulbènes   | Enherbé              |
|                                              | 1981               | Cabernet-sauv. | Riparia G de M | 5555         | N/S                   | Guyot double | 0.5   | 1,60 m             | Boulbènes   | Enherbé              |
| <a href="#">Libournais / Parcelle 5</a>      | 1974               | Merlot         | SO4            | 5555         | N/S                   | Guyot double | 0.57  | 1,35 m             | Rendosol    | Enherbé              |
|                                              | 1987               | Cabernet-sauv. | Fercal         | 6666         | N/S                   | Guyot double | 0.5   | 1,35 m             | Calcosol    | Enherbé              |
| <a href="#">Libournais / Parcelle 6</a>      | 1971               | Merlot         | 420A           | 6060         | E/O                   | Guyot double | 0.7   | 1,50 m             | Peyrosol    | Désherbage mécanique |
|                                              | 1948               | Cabernet-sauv. | 420A           | 6060         | E/O                   | Guyot double | 0.7   | 1,50 m             | BGS***      | Désherbage mécanique |
| <a href="#">Blaye-Bourq / Parcelle 7</a>     | 1979               | Merlot         | 420A           | 6493         | N/S                   | Guyot double | 0.68  | 1,50 m             | Brunisol    | Enherbé              |
|                                              | 1985               | Cabernet-sauv. | 3309C          | 4784         | N/S                   | Guyot double | 0.58  | 1,70 m             | Brunisol    | Enherbé              |

## I.2 Les millésimes

Les travaux présentés dans ce travail ont été réalisés sur des baies de raisin prélevées au cours des millésimes 2007, 2008 et 2009. Ces trois millésimes présentent des caractéristiques climatiques différentes résumées dans le Tableau II.

**Tableau II : Caractéristiques des millésimes étudiés : 2007, 2008 et 2009.**

|                 | Durée d'insolation (heures) |      |      |           | Température moyenne (°C) |      |      |           | Cumul de pluie (mm) |      |      |           |
|-----------------|-----------------------------|------|------|-----------|--------------------------|------|------|-----------|---------------------|------|------|-----------|
|                 | 2007                        | 2008 | 2009 | 1997-2006 | 2007                     | 2008 | 2009 | 1997-2006 | 2007                | 2008 | 2009 | 1997-2006 |
| Mai             | 177                         | 204  | 235  | 240       | 16.7                     | 17.0 | 17.2 | 17.0      | 142                 | 151  | 78   | 74        |
| Juin            | 225                         | 236  | 293  | 264       | 19.5                     | 20.5 | 20.3 | 20.5      | 65                  | 79   | 75   | 58        |
| Juillet         | 230                         | 268  | 263  | 270       | 19.8                     | 21.7 | 21.5 | 21.7      | 53                  | 20   | 47   | 54        |
| Août            | 231                         | 226  | 271  | 253       | 20.2                     | 22.3 | 22.3 | 22.3      | 118                 | 83   | 24   | 63        |
| Septembre       | 250                         | 219  | 244  | 214       | 17.5                     | 19.1 | 19.1 | 19.1      | 38                  | 66   | 48   | 77        |
| Octobre         | 189                         | 159  | 182  | 154       | 14.2                     | 15.7 | 15.8 | 15.7      | 31                  | 90   | 34   | 103       |
| Avril-septembre | 1331                        | 1334 | 1466 | 1435      | 18.3                     | 19   | 18.8 | 19        | 428                 | 476  | 388  | 421       |
| Année           | 2077                        | 2014 | 2095 | 2178      | 13.9                     | 14   | 15.1 | 14        | 821                 | 1012 | 614  | 975       |

Source : Météo France, Bordeaux raisins et Union Girondine.

En 2007, le printemps fut marqué par un mois d'avril très chaud suivi de fortes précipitations au cours de la première quinzaine de mai, entraînant une floraison précoce mais étalée dans le temps (2 semaines), conduisant à des phénomènes de coulure. L'été 2007 a été frais et instable (faible ensoleillement et pluies fréquentes) jusqu'à la fin du mois d'août, annulant l'avance considérable prise par la vigne en avril en ne permettant pas d'arrêter la croissance de la vigne et ainsi qu'une contrainte hydrique suffisante pour un grand millésime de rouge. Septembre et octobre furent très secs et permirent aux baies d'atteindre une maturation suffisante. (Union Girondine, 2008).

En 2008, après un hiver atypique (doux et sec les deux premiers mois puis frais et humide en mars) induisant une reprise lente de la végétation, le printemps fut humide induisant une floraison tardive et perturbée. En juin, le temps frais et humide a retardé la floraison (une quinzaine de jours). En juillet, le temps frais et sec a permis l'installation d'une brève contrainte hydrique juste avant la véraison, le moment le plus favorable. Le début du mois d'août, frais a permis d'observer une véraison tardive et longue, mais le temps sec, chaud et stable de la fin du mois a permis aux raisins de commencer leur maturation et de rattraper le retard observé avant la véraison. En septembre et octobre, un temps frais et sec a été propice à une lente maturation. (Union Girondine, 2009).

En 2009, après un hiver rigoureux, le début de printemps fut particulièrement humide avec des orages violents en mai puis une installation précoce de l'été pour une floraison dans d'excellentes conditions la première quinzaine de juin. En juin, le temps chaud, ensoleillé et peu perturbé a permis une floraison rapide et homogène. L'été fut chaud mais pas caniculaire avec des perturbations peu fréquentes mais positionnées en juillet et début août retardant l'installation durable de la contrainte hydrique. En septembre et octobre, le soleil, la chaleur et la sécheresse dominant permettant d'atteindre sereinement l'optimum de la maturité. (Union Girondine, 2010).

### **I.3 Les stades de prélèvements**

Les grappes ont été récoltées de manière homogène et aléatoire dans chaque parcelle. Les prélèvements hebdomadaires du stade fermeture de grappe au stade maturité (récolte) ont été réalisés au cours de trois millésimes et sont précisés dans les tableaux suivants (Tableaux III et IV).

Tableau III : Dates de prélèvements des baies de Cabernet-sauvignon du réseau parcellaire.

| Stade de développement          | Stade<br>phénologique <sup>1</sup> | 2007                    |                        |                           | 2008                   |                        |                        | 2009                   |                        |                        |
|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                                 |                                    | Date de<br>prélèvement  | Jours après<br>anthèse | Date de<br>prélèvement    | Date de<br>prélèvement | Jours après<br>anthèse | Date de<br>prélèvement | Date de<br>prélèvement | Jours après<br>anthèse | Date de<br>prélèvement |
| Fermeture de grappe             |                                    | -                       | -                      | 21 juillet                | -                      | 41                     | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Fermeture de grappe 2           |                                    | -                       | -                      | 29 juillet                | -                      | 49                     | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Stade vert                      |                                    | 24 juillet              | 45                     | 4 août                    | 20 juillet             | 54                     | 20 juillet             | 45                     | 45                     | 45                     |
| Début véraison                  |                                    | -                       | -                      | 11 août                   | 27 juillet             | 60                     | 27 juillet             | 52                     | 52                     | 52                     |
| 10 % véraison (V10)             |                                    | 30 juillet              | 52                     | 18 août                   | 3 août                 | 68                     | 3 août                 | 59                     | 59                     | 59                     |
| 50 % véraison (V50)             |                                    | 6 août                  | 61                     | -                         | 10 août                | -                      | 10 août                | 66                     | 66                     | 66                     |
| 80 % véraison (V80)             |                                    | 13 août                 | 68                     | 25 août                   | 17 août                | 75                     | 17 août                | 73                     | 73                     | 73                     |
| 100 % véraison (V)              |                                    | 20 août                 | 75                     | 1 <sup>er</sup> septembre | 24 août                | 82                     | 24 août                | 80                     | 80                     | 80                     |
| Stade intermédiaire 1<br>(Int1) |                                    | 27 août                 | 82                     | 8 septembre               | 31 août                | 89                     | 31 août                | 87                     | 87                     | 87                     |
| Stade intermédiaire 2<br>(Int2) |                                    | 3 septembre             | 89                     | 15 septembre              | 7 septembre            | 96                     | 7 septembre            | 94                     | 94                     | 94                     |
| Stade intermédiaire 3<br>(Int3) |                                    | 10 septembre            | 96                     | 22 septembre              | 14 septembre           | 103                    | 14 septembre           | 101                    | 101                    | 101                    |
| Stade intermédiaire 4<br>(Int4) |                                    | 17 septembre            | 103                    | -                         | -                      | -                      | -                      | -                      | -                      | -                      |
| Maturité                        |                                    | 24 septembre            | 110                    | 29 septembre              | 21 septembre           | 110                    | 21 septembre           | 108                    | 108                    | 108                    |
| Récolte                         |                                    | 1 <sup>er</sup> octobre | 117                    | 6 octobre                 | -                      | 117                    | -                      | -                      | -                      | -                      |

<sup>1</sup> Stades phénologiques définis par Eichhom et Lorenz (1977).

Tableau IV : Dates de prélèvements des baies de Merlot du réseau parcellaire.

| Stade de développement       | Stade phénologique <sup>1</sup> | 2007                |                     | 2008                      |                     | 2009                |                     |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                              |                                 | Date de prélèvement | Jours après anthèse | Date de prélèvement       | Jours après anthèse | Date de prélèvement | Jours après anthèse |
| Fermeture de grappe          |                                 | -                   | -                   | 21 juillet                | 41                  | -                   | -                   |
| Fermeture de grappe 2        |                                 | -                   | -                   | 29 juillet                | 49                  | -                   | -                   |
| Stade vert                   |                                 | 24 juillet          | 45                  | 4 août                    | 54                  | 20 juillet          | 45                  |
| Début véraison               |                                 | -                   | -                   | 11 août                   | 60                  | 27 juillet          | 52                  |
| 10 % véraison (V10)          |                                 | 30 juillet          | 52                  | 18 août                   | 68                  | -                   | -                   |
| 50 % véraison (V50)          |                                 | 6 août              | 61                  | -                         | -                   | 3 août              | 59                  |
| 80 % véraison (V80)          |                                 | 13 août             | 68                  | 25 août                   | 75                  | 10 août             | 66                  |
| 100 % véraison (V)           |                                 | 20 août             | 75                  | 1 <sup>er</sup> septembre | 82                  | 17 août             | 73                  |
| Stade intermédiaire 1 (Int1) |                                 | 27 août             | 82                  | 8 septembre               | 89                  | 24 août             | 80                  |
| Stade intermédiaire 2 (Int2) |                                 | 3 septembre         | 89                  | 15 septembre              | 96                  | 31 août             | 87                  |
| Stade intermédiaire 3 (Int3) |                                 | 10 septembre        | 96                  | 22 septembre              | 103                 | 7 septembre         | 94                  |
| Stade intermédiaire 4 (Int4) |                                 | 17 septembre        | 103                 | -                         | -                   | -                   | -                   |
| Maturité                     |                                 | 24 septembre        | 110                 | 29 septembre              | 110                 | 14 septembre        | 101                 |

<sup>1</sup> Stades phénologiques définis par Eichhorn et Lorenz (1977).



#### **I.4 Prélèvements des baies pour le suivi de maturité**

Pour chacune des parcelles du réseau maturité, un lot homogène de 10 grappes a été prélevé de façon aléatoire sur cinq rangs espacés de deux rangs pour les analyses de suivi de maturité. Ce lot de baies a été divisé en 3 fractions afin de réaliser les différentes analyses : une première fraction de 70 baies pour les mesures physiques de pénétromètre et AW-mètre, une seconde fraction de 200 baies sous forme de grappillons pour l'analyse sensorielle et une troisième de 1000 baies pour le suivi des maturités technologique et phénolique du réseau.

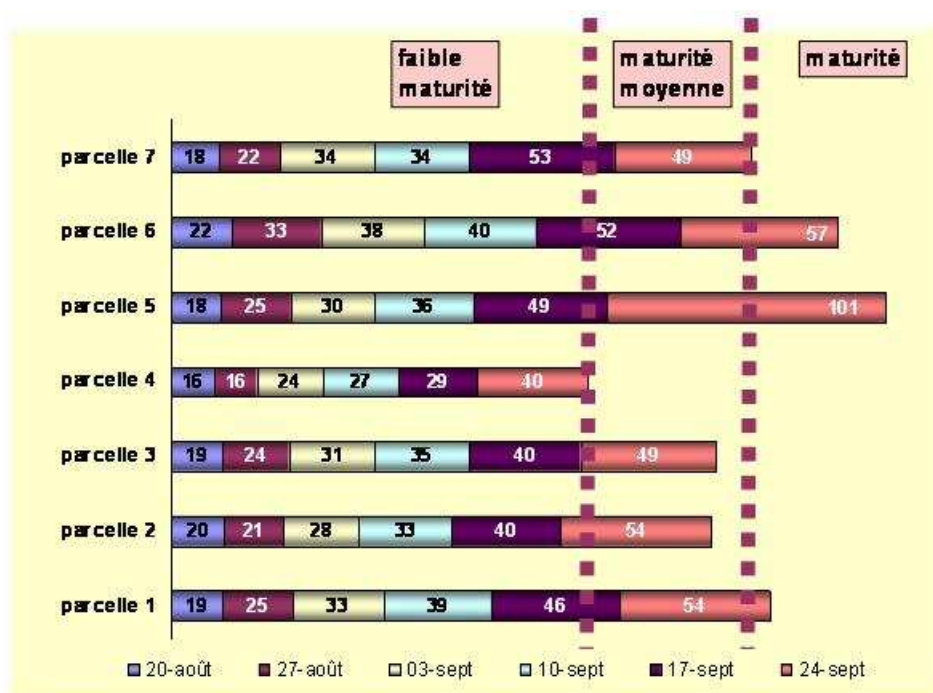
#### **I.5 Prélèvements des baies pour l'analyse génomique, protéique et chimique**

Les prélèvements ont été réalisés de manière identique et en parallèle des prélèvements de baies pour le suivi de maturité sur les parcelles 3, 4 et 5 de cépages Cabernet-sauvignon et Merlot. Les analyses fines étant plus longues et plus coûteuses, nous avons restreint notre étude sur trois parcelles présentant des évolutions de maturation différentes.

En effet, une étude statistique a été menée sur l'ensemble des 14 parcelles du réseau de maturité du millésime 2007 et sur les différents paramètres mesurés afin d'établir un classement des parcelles en fonction de leur maturation.

La Figure 18 présente les indices de maturité technologique (IM, rapport acidité-sucre) des différentes parcelles. Les tests non paramétriques (Tests de Friedman) ont permis de classer les parcelles en trois groupes en fonction de l'évolution de leur indice de maturité au cours du temps :

- les parcelles 1, 5, 6 présentent les IM les plus élevés (groupe 1)
- les parcelles 2, 3, 7 dont les IM sont moins importants (groupe 2)
- la parcelle 4 a connu un retard de maturation technologique (groupe 3).



**Figure 18** : Evolution de l'Indice de maturité dans les parcelles 1 à 7 du 20 août au 24 septembre 2007.

Notre choix s'est porté sur la parcelle 5 appartenant au groupe présentant des indices de maturation élevés, sur la parcelle 3 présentant un IM moins important que la parcelle 5 et sur la parcelle 4 qui possède les IM les moins élevés.

Les 10 grappes aussitôt prélevées ont été plongées dans l'azote liquide puis conservées après égrappage à -80°C jusqu'à l'analyse. Les pellicules ont ensuite été séparées du reste de la baie manuellement à l'aide d'un scalpel puis broyées au pilon et mortier dans l'azote liquide.

## I.6 Prélèvements des baies pour l'étude microscopique

Cette étude a été réalisée sur les baies de Cabernet-sauvignon de la parcelle 3 qui appartiennent au groupe présentant des IM intermédiaires. L'étude des enzymes de dégradation pariétales et de la biosynthèse des tannins ayant été réalisée précédemment au laboratoire sur cette parcelle, la comparaison des résultats aux connaissances acquises au préalable justifie ce choix. Enfin, les parcelles de Merlot et de Cabernet-sauvignon de la

parcelle 3 sont l'une à côté de l'autre, elles possèdent donc le même sol et les mêmes pratiques culturales, ce qui pourrait permettre dans l'avenir une étude similaire sur le Merlot.

Les prélèvements ont eu lieu en 2008 et 2009 aux stades :

- Fermeture de grappe (stade phénologique 33)
- 80% Véraison (stade phénologique 36-37)
- 100% véraison + 15 jours (uniquement 2009, stade phénologique 37-38)
- Maturité (stade phénologique 38)

Cinq pieds ont été identifiés sur la parcelle (premier pied de la seconde piquetée des rangs 3, 5, 7, 9 et 11). Sur chaque pied, 2 grappillons de 3 baies ont été prélevés puis réunis et conservés à 4°C jusqu'à la fixation qui est réalisée au laboratoire.

## **II. Préparation du matériel végétal pour l'étude microscopique**

La fixation et l'inclusion des échantillons de pellicules de baie de raisin est commune pour l'étude en microscopie en transmission et en photonique. Des coupes semi-fines (150  $\mu$ m) ont été réalisées pour les observations en microscopie photonique des tannins, de l'évolution de l'ultrastructure des parois ainsi que pour la cartographie de composants pelliculaires par spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS). La localisation des protéines par immunomarquage a été réalisée sur des coupes ultra-fines (70 nm).

Pour chacun des prélèvements, 15 baies ont été disséquées à l'aide d'une lame de rasoir.

### **II.1 Fixation chimique**

Pour chacune des baies, deux sections de 1mm<sup>3</sup> ont été déposées au pinceau dans un pilulier à l'abri de la lumière contenant du tampon phosphate 0,1M, pH 7,2, avec 4% de paraformaldéhyde et 0,25% de glutaraldéhyde et conservées à 4°C pendant 2h. Après cette étape de fixation, les échantillons ont été rincés à température ambiante pendant 10 minutes dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,2 pour enlever l'excès de fixateur, puis conservés dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,2 à 4°C toute la nuit.

## II.2 Inclusion

Afin de préserver au maximum les structures cellulaires de la pellicule et d'optimiser l'immunomarquage en préservant les antigènes ainsi que leur accessibilité, l'inclusion a été réalisée à basse température selon la technique de « *Progressive Lowering of Temperature* » (PLT) (Robertson *et al.*, 1992).

Les échantillons chimiquement fixés sont déshydratés et inclus par des bains successifs grâce à un appareil de cryosubstitution (AFS, Leica Microsystems). Le programme de déshydratation est le suivant : 30% éthanol/eau (v/v) à 0°C pendant 30 minutes, 50% éthanol/eau (v/v) à -10°C pendant 30 minutes, 70% éthanol/eau (v/v) avec 0.5% acétate d'uranyle (w/v) à -20°C pendant 1 heure, 95% éthanol/eau (v/v) à -35°C pendant 1 heure et 100% éthanol/eau (v/v) à -35°C deux fois 1 heure. Les échantillons sont imprégnés dans la résine Lowicryl HM20 selon le procédé suivant : 33% résine/66% éthanol à -35 °C toute la nuit, 50% résine/50% éthanol à -35 °C pendant 8 heures, 66% résine/33% éthanol à -35 °C toute la nuit, 100% résine à -35 °C pendant 8 heures, et 100% résine à -35 °C toute la nuit. Le jour suivant, les échantillons sont déposés dans un nouveau bain de résine 100% à -35°C pendant 5 heures, puis ils sont introduits dans des gélules de résine HM20 pour une polymérisation sous UV pendant 72 heures à -35°C.

Une fois la polymérisation terminée, les blocs sont retirés de l'AFS et placés sous UV naturels pendant 48 heures. Les blocs sont ensuite démoulés et conservés à l'obscurité.

## II.3 Coupes

Les coupes ont été réalisées par le pôle de microscopie électronique du Bordeaux Imaging Center.

Les blocs contenant les échantillons sont sectionnés en utilisant un couteau de diamant monté sur un ultra-microtome (Ultracut-UCT, Leica Microsystems). Deux types de coupes ont été réalisés :

- des coupes semi-fines de 150 nm d'épaisseur, pour la microscopie photonique, recueillies sur lames de verre.

- des coupes ultra-fines de 70 nm d'épaisseur recueillies pour les observations d'ultrastructure sur des grilles de cuivre (200 mesh) et pour les immunomarquages sur des grilles de nickel (150 mesh) recouvertes d'un film de Formvar.

#### **II.4      Contraste et observations des coupes pour la microscopie électronique**

Pour améliorer leur observation au microscope électronique les échantillons ont subi un contraste positif à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Le dépôt des sels d'uranium permet de contraster les acides nucléiques et les protéines tandis que les sels de plomb se fixent sur les membranes et les organites riches en lipides.

Le protocole de contraste se fait par flottage des grilles sur des gouttes successives. La première étape consiste à placer la grille, côté coupe, au contact d'une goutte de solution saturée d'acétate d'uranyle en solution aqueuse pendant 25 minutes à l'abri de la lumière. Puis la grille est rincée rapidement une première fois à l'eau distillée pour enlever l'excédent d'uranyle puis deux fois 5 minutes, sur deux gouttes d'eau distillée. La grille est mise en contact pendant 5 minutes avec une solution de citrate de plomb, obtenue par réaction de nitrate de plomb et de citrate de sodium en solution aqueuse à  $\text{pH} \approx 12$ . La grille est ensuite rincée dans deux gouttes d'eau distillée puis par un courant d'eau avant d'être séchée.

Les coupes ont été observées avec un microscope électronique en transmission à une haute tension de 120kV (Tecnai 12, FEI).

### **III. Paramètres de caractérisation des raisins**

#### **III.1 Suivis de maturité technologique et phénolique**

Les suivis de maturité technologique et phénolique ont été réalisés pour tous les échantillons prélevés sur les parcelles du réseau maturité.

Le suivi technologique a porté sur le poids des baies, le volume des jus, le pH, l'acidité totale et la teneur en sucre. Le poids des baies a été déterminé par pesée de 3 lots de 200 baies. Le volume des jus, a été estimé à partir d'un lot de 500 baies pressé au pressoir pneumatique Belot en deux temps (une première presse à 3 bars pendant 3 minutes et une seconde de 3 bars également jusqu'à écoulement). Le pH a été mesuré par lecture directe sur ce jus et l'acidité totale a été déterminée par titration à la soude 1/10N, selon la méthode de Guymon et Ough (1962). La méthode de Fehling a permis de doser les sucres.

Le suivi phénolique a été réalisé par la méthode Glories (Glories et Augustin, 1993) et a porté sur la détermination des teneurs en anthocyanes ApH1, ApH3,2, le pourcentage d'anthocyanes extractibles (PAE%) et la richesse phénolique totale (RPT). Ce suivi a été réalisé sur un lot de 500 baies broyées au Vortex 2 fois 1 minute.

#### **III.2 Analyse sensorielle**

##### **III.2.a Fiche de dégustation**

Une fiche de dégustation, (Figure 19), a été réalisée en collaboration avec Elodie Guittard, technicienne sensorielle à la Faculté d'œnologie de Bordeaux, adaptée des protocoles de dégustation des baies de Rousseau et Delteil (2000) et Guyot et Dupraz (2004).

**Nom dégustateur :**  
**Numéro de la parcelle :**

**Date dégustation :**

**Réseau Faculté d'œnologie - UMR 1219**

**Grille de notation de dégustation des baies 2008**

**MODE OPERATOIRE :** Chaque dégustateur doit prélever pour chaque parcelle étudiée, 3 baies dans les présentoirs mis à votre disposition. Dès lors l'analyse sensorielle commence, en effet au cours du prélèvement, veillez à décrire vos sensations visuelles et tactiles. L'analyse gustative de la pulpe, de la pellicule et des pépins sera effectuée et décrite de façon précise, comme indiquée dans l'annexe. Restez vigilants durant toutes les phases de dégustation car 4 de vos sens (vue, toucher, odorat, goût) doivent être exploités au mieux.

Chaque descripteur est noté de 1 à 8, ceux-ci sont définis dans l'annexe.

**EXAMEN VISUEL ET TACTILE DE LA BAIE ENTIERE ( VOIR ANNEXE)**

**Cet examen débute dès le prélèvement des 3 baies**

|                            | 1                        | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        | 7                        | 8                        |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| -1/APTITUDE A L'EGRENAGE   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -2/APTITUDE A L'ECRASEMENT | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**EXAMEN DE LA PULPE (VOIR ANNEXE)**

**Penser bien à extraire la pulpe entre la langue et le palais, à recracher dans la main les pellicules et les pépins et à décrire toutes vos sensations.**

|                                   | 1                        | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        | 7                        | 8                        |
|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| -3/ADHERENCE (pulpe et pellicule) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -4/ ACIDITE DE LA PULPE           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -5/ SUCROSITE PULPE               | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -6/ VEGETAL                       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**EXAMEN DE LA PELLICULE (VOIR ANNEXE)**

**Remettre en bouche les pellicules, mastiquer chaque pellicule de la même manière (environ 15 fois), la description commence dès la mastication.**

|                               | 1                        | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        | 7                        | 8                        |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| -7/APTITUDE A LA DILACERATION | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -8/ACIDITE DE LA PELLICULE    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -9/SUCROSITE PELLICULE        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -10/ ASTRINGENCE              | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -11/AMERTUME                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| -12/ VEGETAL                  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

**Figure 19 : Analyse sensorielle des baies de raisin. Fiche de dégustation 2008 et 2009.**

En 2007, treize critères ont été sélectionnés pour caractériser la baie entière, la pulpe, la pellicule et les pépins en fonction des caractéristiques de maturation de la baie. La dégustation est réalisée à partir de 3 baies prises au hasard sur 10 grappillons mis à disposition du dégustateur. Le nombre de dégustateurs varie de 10 à 23, en fonction des millésimes.

La première étape consiste en un examen visuel et tactile des baies avec trois critères : l'aptitude à l'écrasement qui consiste à presser la baie entre le pouce et l'index afin d'évaluer sa déformabilité et son élasticité, l'aptitude à l'égrainage pour tester son adhérence au pédicelle et la couleur des baies, un des seuls critères utilisés à ce jour pour déterminer la véraison.

La seconde étape est l'examen de la pulpe. En bouche, la pulpe est extraite de la baie en pressant la baie entre la langue et le palais, les pellicules et les pépins étant recrachés dans la main. Le jus est extrait de la pulpe en écrasant complètement la pulpe entre la langue et le palais. Nous avons demandé à notre panel dans un premier temps de noter la facilité avec laquelle la pulpe se détache de la pellicule, la présence éventuelle de pulpe sur les pépins et enfin, si au cours de la mastication des pellicules du jus se libère encore (critère adhérence pulpe/pellicule). L'examen se poursuit par l'évaluation de la sensation acide perçue après la séparation de la pulpe et de la pellicule, la sensation sucrée, l'arôme perçu et son intensité.

La troisième étape, et la dernière, est l'examen de la pellicule (l'examen des pépins étant irréalisable pour ce millésime à cause de leur manque de maturité). Après avoir recraché le jus et la pulpe, les pellicules sont remises en bouche et mastiquées environ 10 à 15 fois chacune. Le premier critère consiste à évaluer le croquant de la pellicule et l'aptitude à la dilacération au cours de la mastication ainsi que d'examiner et de comparer le broyat obtenu. Nous avons ensuite demandé aux juges d'évaluer la sensation acide, l'arôme et son intensité après avoir mis le broyat au contact du palais et des joues. Pour terminer, nous leur avons demandé de décrire l'impression de rugosité perçue en bouche après avoir passé 2 fois la langue sur le palais (lorsque le broyat a été mis en contact avec le palais) ainsi que d'évaluer la difficulté à passer la lèvre supérieure sur les incisives (lorsque le broyat a été mis en contact avec les joues, la langue et les gencives).



En 2008, en fonction de notre problématique et de la première année de dégustations, nous avons redéfini certains critères. Nous avons conservé les quatre critères correspondant à l'analyse de texture de la baie qui sont : l'aptitude à l'écrasement, l'aptitude à l'égrenage, l'adhérence entre la pulpe et la pellicule et l'aptitude à la dilacération. Mais nous avons voulu préciser l'aspect sucre de la pulpe et de la pellicule par la nuance sucosité. Nous avons également reprécisé, en les séparant, les critères d'astringence et d'amertume de la pellicule. La recherche de la maturation de la baie a été renforcée par l'évaluation de l'arôme végétal et de son intensité dans la pulpe mais aussi dans la pellicule.

Nous avons également élargi notre échelle de notation passant de 1 à 4 à 1 à 8.

Pour les millésimes 2008 et 2009, l'analyse sensorielle des pépins a été supprimée du fait de notre thématique.

### III.2.b Constitution du panel de dégustateurs

Le panel sensoriel est composé de techniciens et chercheurs de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux dont le nombre varie en fonction du millésime. La composition du panel pour chacun des millésimes 2007, 2008 et 2009 est présentée dans le Tableau IV.

**Tableau V :** Composition du panel de dégustateurs pour les millésimes 2007, 2008 et 2009.

| Millésime | Dégustateurs (total) | Femmes | Hommes | Fumeurs |
|-----------|----------------------|--------|--------|---------|
| 2007      | 10                   | 9      | 1      | 1       |
| 2008      | 23                   | 16     | 7      | 2       |
| 2009      | 12                   | 7      | 5      | 1       |

### III.2.c Entraînement des dégustateurs

Au cours des millésimes 2007 et 2008 une séance d'entraînement à l'évaluation de l'astringence, de l'amertume, de la sucosité et de l'acidité, a été organisée avant chaque séance de dégustation des baies de raisin. L'objectif étant basé sur la reconnaissance des goûts et sensation. Différentes solutions aqueuses de sulfate de quinine ( $0,25 \text{ g.l}^{-1}$ ), de sulfate d'aluminium ( $3 \text{ g.l}^{-1}$ ), d'acide tartrique ( $4 \text{ g.l}^{-1}$ ) et de glucose ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) ont été utilisées pour définir l'amertume, l'astringence, l'acidité et la sucosité.

### **III.2.d Protocole**

Les dégustations hebdomadaires sont effectuées dans une salle d'analyse sensorielle normalisée (NF EN ISO 8589) de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux, le jour suivant le prélèvement des baies, à 11h.

Chaque juge dispose d'un lot de grappillons de trois à cinq baies par parcelle pour évaluer l'intensité des différents critères de dégustation sur une échelle allant de 1 à 8 dans le sens de la maturité. Un livret expliquant l'évaluation de chaque critère est distribué à chaque juge pour guider sa dégustation.

### **III.2.e Traitements des données**

Les données sensorielles ont été analysées à l'aide du logiciel FIZZ développé par BIOSYSTEMES.

Cet outil informatique intègre l'ensemble des tests sensoriels utilisés régulièrement, il permet ainsi à la fois d'organiser les séances (définition des questionnaires, identification des produits, choix des plans d'expérience, codage des échantillons mais aussi choix des juges et sélection des panels), d'enregistrer et d'archiver les réponses (traitement et gestion des données, bases de données pour le suivi à long terme des juges et des produits) puis d'analyser les résultats (outils statistiques, analyse de données et graphiques).

Pour les analyses sensorielles de 2008 et 2009, la présence de postes informatiques dotés de ce logiciel en salle de dégustation a permis, un gain de temps considérable pour la mise en place du protocole de dégustation, pour les juges et l'acquisition de leurs résultats ainsi que pour le traitement des données. En effet, pour des raisons techniques, en 2007, seule la partie analyse descriptive (NF EN ISO 13299) des résultats de ce logiciel a été utilisée dans cette étude sensorielle.

### III.3 Mesures physiques de texture

#### III.3.a Mesures d'activité de l'eau libre

La mesure de l'activité de l'eau libre est déterminée par le ratio ( $A_w$ , *water availability*) de la vapeur d'eau à la surface de la baie et l'eau pure à une température donnée avec un AW-mètre Labmaster (Novasina) selon la méthode de Deytieux *et al.* (2009) (Figure 20).

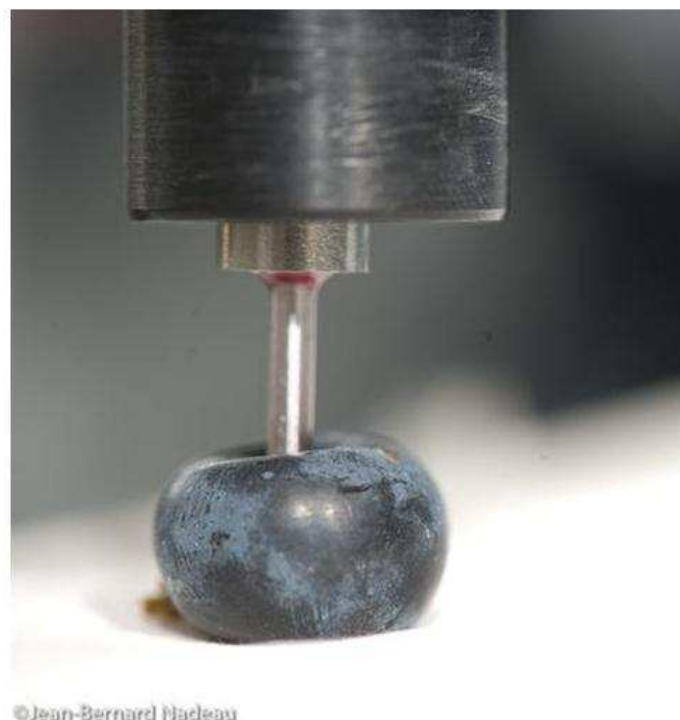


**Figure 20** : Photo AW-mètre (Labmaster, Novasima).

Pour chaque échantillon 10 baies prises au hasard dans le lot de 200 baies prélevées ont été analysées. Chaque baie, dont l'enveloppe est intacte et le pédicelle recouvert de paraffine, est placée dans la chambre de mesure de l'appareil. Une fois l'équilibre de température atteint entre le raisin et l'enceinte, la valeur de l' $A_w$  est obtenue au bout de 10 minutes et est comprise entre 1 et 0,8 (1 étant la valeur pour l'eau libre).

#### III.3.b Mesures de pénétrométrie

Les mesures de pénétration des baies de raisin ont été réalisées avec le Pénéfel DFT 14 équipé d'un embout de 2,5 mm (Figure 21).



**Figure 21** : Photo du Pénéfel DFT 14, Digital Firmness Tester (Agrotechnologie).

La baie dont le pédicelle a été conservé est placée sur un support en position équatoriale. On peut ainsi, par pression manuelle, mesurer la force (en kg) nécessaire pour percer la pellicule de raisin. Les mesures ont été réalisées sur 30 baies par parcelle.

### **III.4 Mesure de l'épaisseur des parois cellulaires**

Afin de comprendre l'évolution de l'ultrastructure de la pellicule de raisin au cours du développement de la baie, une étude concernant les modifications des parois cellulaires a été entreprise.

L'épaisseur des parois des pellicules des baies de raisin de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, a été mesurée à partir des observations des coupes de microscopie électronique réalisées en 2008 et 2009. Les mesures ont été effectuées sur les stades suivants :

- Fermeture de grappe (2008 et 2009)
- 80% véraison (2008 et 2009)
- 100 % véraison (2008)
- Intermédiaire 2, 100% véraison + 15 jours (2009)
- Maturité (2008 et 2009)

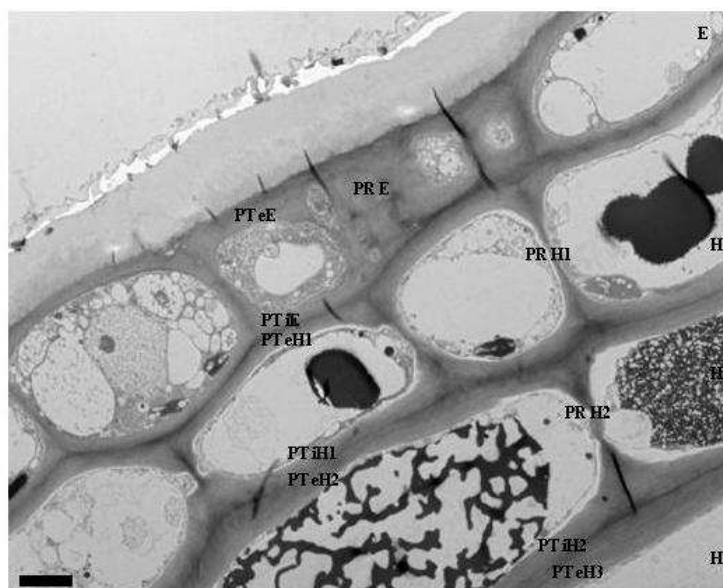
L'épaisseur des quatre premières assises cellulaires de la pellicule a été mesurée :

- Epiderme, E
- 1<sup>ère</sup> assise cellulaire de l'hypoderme, H1
- 2<sup>ème</sup> assise cellulaire de l'hypoderme, H2
- 3<sup>ème</sup> assise cellulaire de l'hypoderme, H3

Pour chaque stade, 16 sections de pellicule ont été examinées et sur chaque section, 2 à 4 zones ont été mesurées. Pour chaque zone et chaque assise cellulaire, les mesures suivantes ont été réalisées :

- épaisseur des parois cellulaires radiales
- épaisseur des parois cellulaires tangentielle externes
- épaisseur des parois cellulaires tangentielles internes

La Figure 22, récapitule ces observations.



**Figure 22 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin, sections pariétales mesurées.

*E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PR E : paroi radiale de l'épiderme ; PR H1 : paroi radiale de H1 ; PR H2 : paroi radiale de H2 ; PT eE : paroi tangentielle externe de l'épiderme ; PT iE : paroi tangentielle interne de l'épiderme ; PT eH1 : paroi tangentielle externe de H1 ; PT iH1 : paroi tangentielle interne de H1 ; PT eH2 : paroi tangentielle externe de H2 ; PT iH2 : paroi tangentielle interne de H2 ; PT eH3 : paroi tangentielle externe de H3 ; PT iH3 : paroi tangentielle interne de H3.*  
*N.B. : (PT iE + PT eH1) = PT E-H1 ; (PT iH1 + PT eH2) = PT H1-H2 ; (PT iH2 + PT eH3) = PT H2-H3. Echelle : 1 µm.*

De plus, les parois internes et externes ont été mesurées du périplasma à la lamelle moyenne.

Les mesures ont été réalisées via le logiciel de traitement d'image ImaJ et le traitement statistique a été réalisé avec Statistica.

#### **IV. Techniques utilisées pour l'étude des tannins**

L'étude des tannins de la pellicule de baie de raisin a été menée sur le tissu entier en considérant que le protocole d'extraction des tannins pelliculaires après broyage des pellicules permettait de libérer les tannins des vacuoles des cellules. Pour doser les tannins pariétaux, un protocole d'obtention des fractions pariétales a été mis au point au laboratoire.

##### **IV.1 Extraction des tannins pelliculaires**

La méthode utilisée est une adaptation de différentes méthodes décrites par Revilla *et al.* (1998) et validée préalablement au laboratoire par Gagné en 2006 (Gagné *et al.*, 2006a), (Figure 23).

Un demi-gramme de pellicules broyées est mis à macérer pendant 3 heures dans 20 ml de méthanol à 0,1% d'HCL 12 N (v/v), à température ambiante et sous agitation modérée (150 rpm). Le milieu est ensuite filtré sur filtre Falcon 40 µm et une partie aliquotée est conservée à -80°C en vue des dosages. Les broyats de pellicules sont alors extraits une seconde fois dans les mêmes conditions. Les extractions sont réalisées en triplicat.

Après chaque macération, les tannins sont dosés sur chaque aliquot et l'addition de chaque concentration respective permet de connaître la teneur totale en tannins de la pellicule.

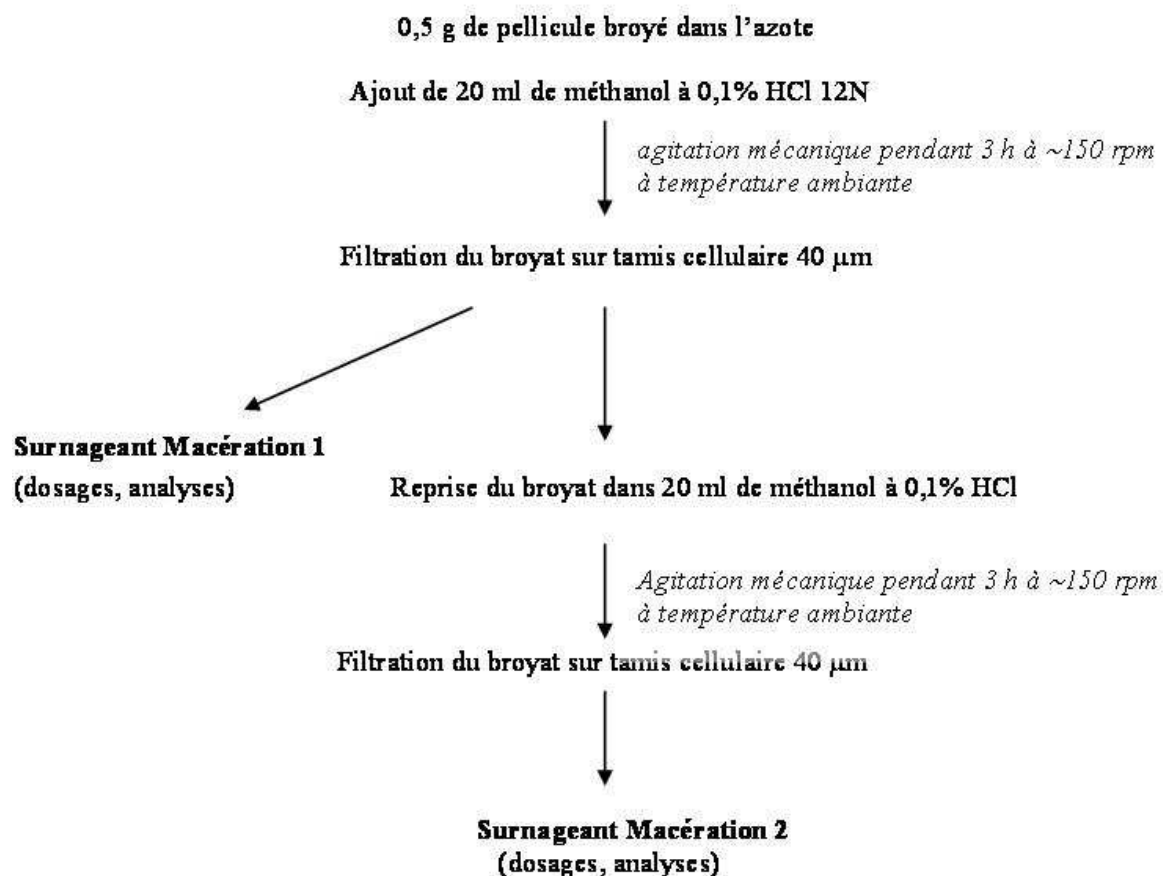


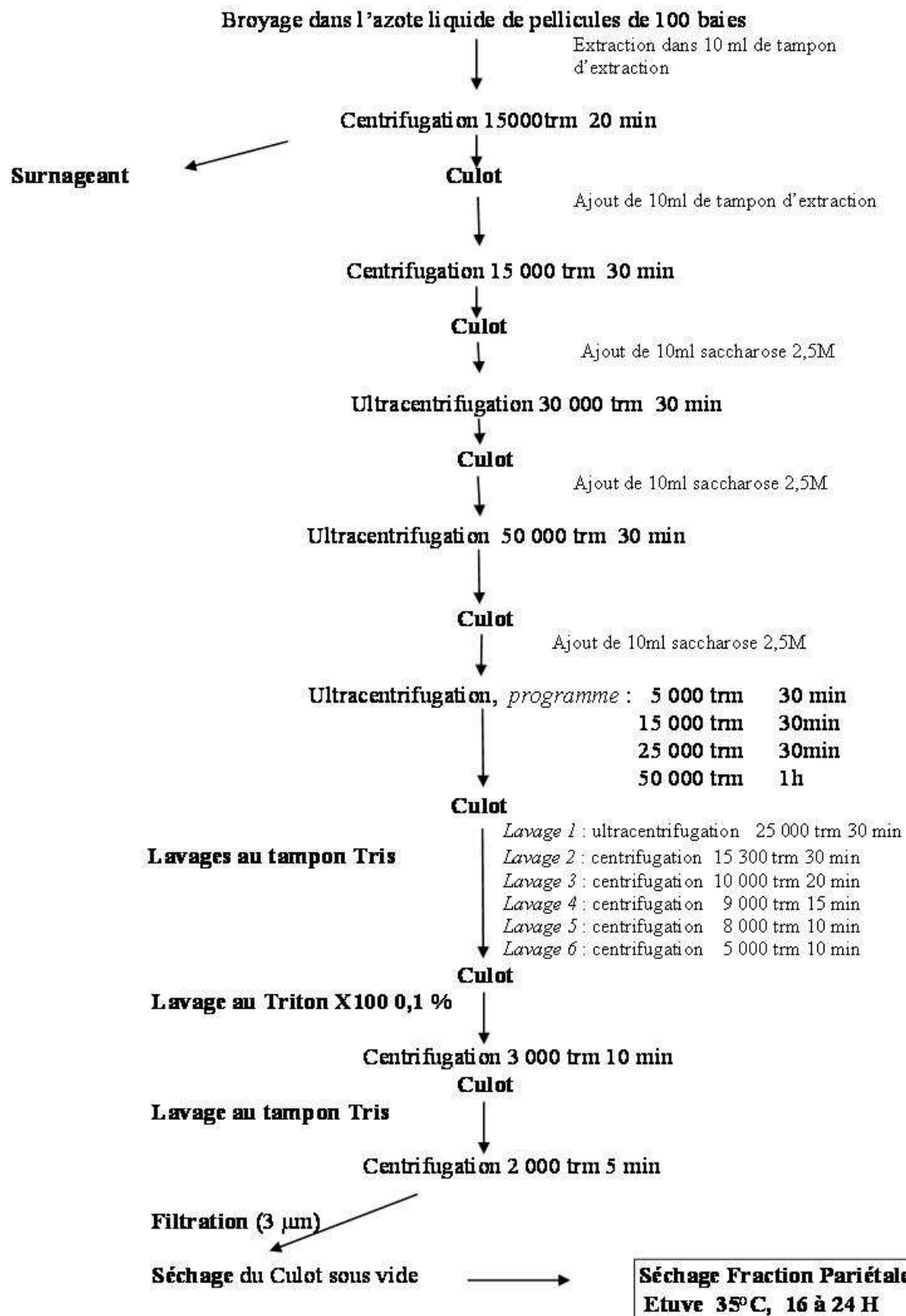
Figure 23 : Extraction des composés phénoliques d'après Revilla *et al.*, 1998.

## IV.2 Extraction des tannins pariétaux

La mise au point des protocoles concernant l'extraction et l'étude des tannins pariétaux a été effectuée sur les pellicules des baies du millésime 2007. Seuls les résultats des millésimes 2008 et 2009 sont présentés dans ce travail.

### IV.2.a Obtention des fractions pariétales

Les pellicules de 100 baies sont broyées finement pendant 5 minutes dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le principe schématique et le détail des centrifugations sont présentés Figure 24.



**Figure 24** : Principe schématique du fractionnement tissulaire des pellicules permettant l'obtention des fractions pariétales, d'après Gény *et al.* (2003).



Le broyat est ensuite réparti dans des tubes d'ultracentrifugation de 30 ml et 10 ml de tampon de lyse à 0,2 M de TrisHCl, pH 7,5 et 2,5% d'EDTA (p/v) sont ajoutés et centrifugés à 15000 rpm pendant 20 minutes.

Le surnageant enrichi en membranes plasmiques et endomembranes n'est pas conservé tandis que le culot enrichi en parois, plus denses, subit une seconde lyse avec le tampon Tris et une centrifugation à 15000 rpm pendant 30 minutes. Afin de lyser l'ensemble des cellules, un gradient de saccharose est appliqué sur le culot. Dix millilitres d'une solution de saccharose à 2,5 M sont ajoutés au culot et le mélange est centrifugé à 30000 rpm pendant 30 min. L'opération est répétée deux fois avec une première centrifugation à 50000 rpm pendant 30min et un gradient discontinu à 5000 rpm pendant 30 min, 15000 rpm pendant 30 min, 25000 rpm pendant 30 min et 50000 rpm pendant 1 heure. Le culot de fractions pariétales ainsi obtenu est lavé 9 fois. Les six premiers lavages sont réalisés avec du tampon Tris à des temps et des vitesses de centrifugations différentes puis un lavage au Triton X100 à 0.1% est réalisé avant de terminer par deux lavages du culot dans du tampon Tris. Le culot ainsi obtenu est ensuite filtré sur filtre de 3  $\mu$ m et séché sous vide. Enfin la fraction pariétale est séchée à l'étuve à 35°C pendant 16 à 24 heures.

#### **IV.2.b Digestion des fractions pariétales**

Afin de libérer les tannins piégés dans le maillage pariétal, les fractions pariétales sont digérées avec un mélange de pectinase, de cellulase et d'hémicellulase.

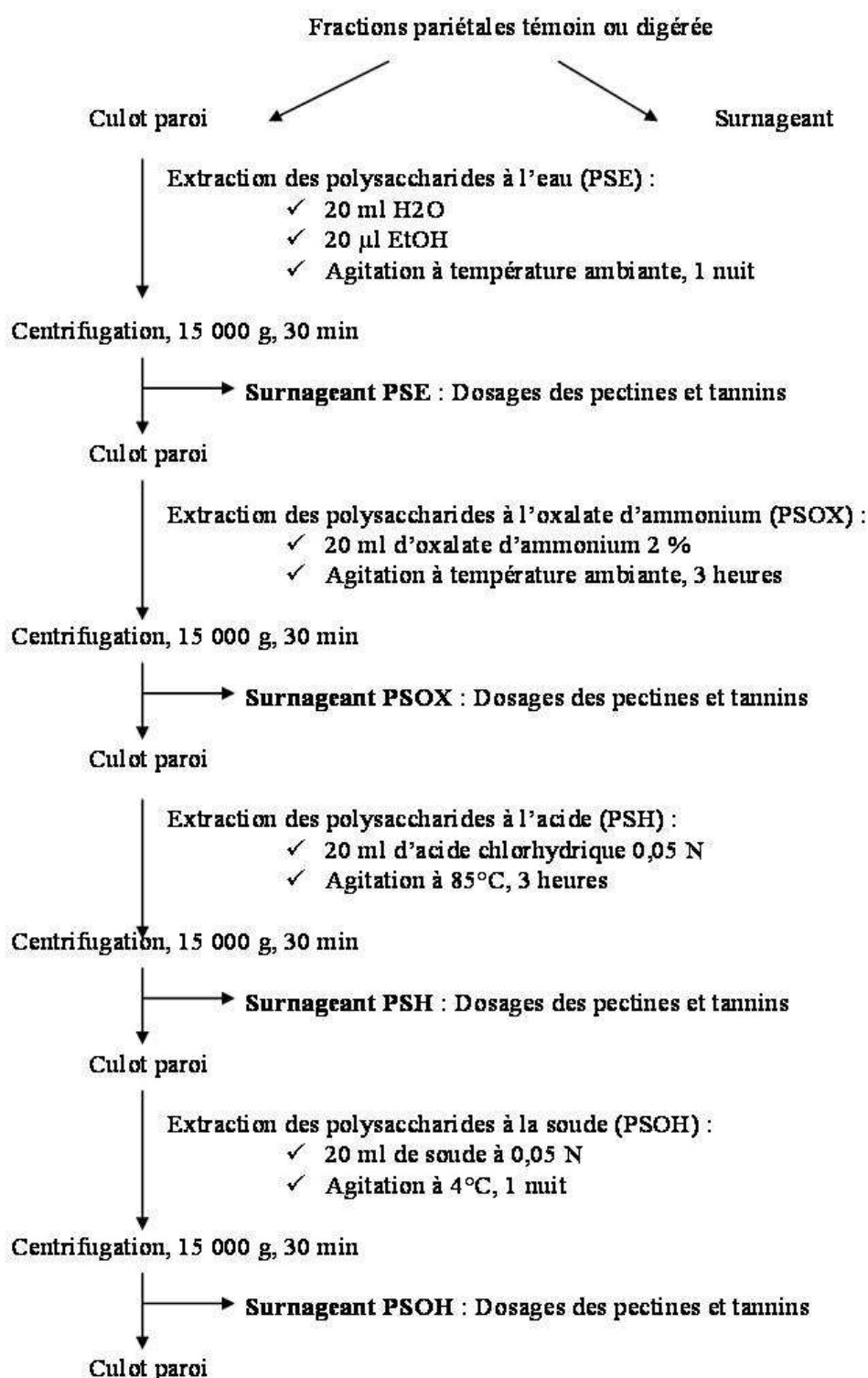
Environ 150 mg de fraction pariétale sont digérés dans 15 ml de tampon MES contenant 0,2 % (p/v) de chacune des enzymes pectinase, cellulase et hémicellulase. Les culots et surnageants sont conservés séparément.

#### **IV.2.c Extraction des tannins**

La méthode utilisée pour l'extraction des tannins des fractions pariétales est identique à celle utilisée pour l'extraction des tannins pelliculaires (Figure 23). Les macérations sont réalisées sur 150 mg de fractions pariétales.

#### IV.2.d Extractions des polysaccharides

Les parois cellulaires étant constituées de différents polysaccharides plus ou moins liés entre eux, les fractions pariétales subissent différentes extractions afin de fragiliser les liaisons chimiques de différentes intensités (Figure 25).



**Figure 25 :** Extraction des différents polysaccharides sur la fraction pariétale des pellicules de raisins d'après Saulnier, 1987.

Le culot des fractions pariétales témoin ou digérées subit une première extraction des polysaccharides à l'eau. Une solution contenant 20 ml d'H<sub>2</sub>O et 20 µl d'éthanol est ajoutée au culot et agitée une nuit à température ambiante. Après une centrifugation à 15000 rpm pendant 30 min le surnageant est prélevé pour doser les pectines ainsi que les tannins libérés. Sur le culot sont ajoutés 20 ml d'oxalate d'ammonium à 2 % et le mélange est extrait à température ambiante par une agitation de 3 heures. Une nouvelle centrifugation à 15000 rpm pendant 30 min est réalisée afin de séparer le surnageant, pour le dosage des polysaccharides et des tannins, et le culot qui subit une nouvelle extraction dans 20 ml d'HCl à 0,05 N pendant 3 h à 85°C. Une nouvelle centrifugation est réalisée. Le surnageant est conservé séparément pour les dosages et le culot est de nouveau extrait sous agitation à 4°C pendant une nuit dans 20 ml de NaOH à 0,05 N. Le surnageant est prélevé pour doser les polysaccharides et les tannins.

#### **IV.2.e Dosage des polysaccharides**

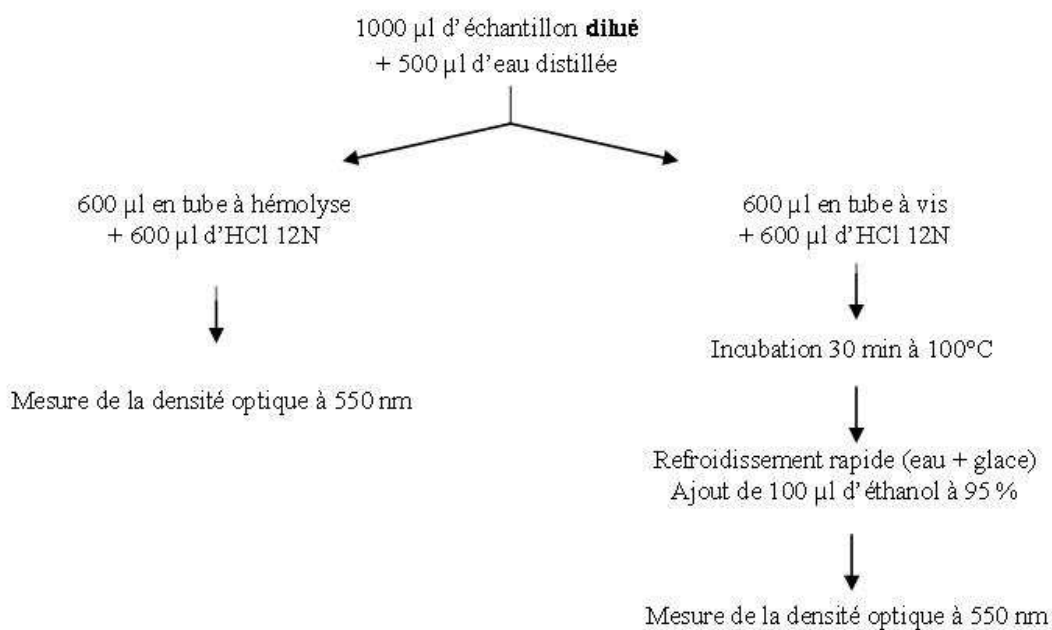
Le dosage des substances pectiques est adapté du protocole de Robertson *et al.* (1979). La méthode est basée sur le dosage colorimétrique des acides galacturoniques des chaînes pectiques par hydrolyse acide à chaud de la fraction pariétale.

A 300 µl de surnageant de fraction pariétale dilué au dixième sont ajoutés 1,5 ml d'acide sulfurique à 95%. Après agitation l'hydrolysate est placé 3 minutes à 0°C puis 6 minutes à 100°C et refroidi 10 minutes dans de la glace. La solution est décolorée par ajout de 30 µl de réactif 3-phénylphénol à 0,15% dilué dans de la soude à 12,5%. Les acides galacturoniques sont dosés par mesure de la densité optique à 520 nm. Le dosage des polysaccharides correspond au nombre de mg.g<sup>-1</sup> d'acide galacturonique dans la fraction pariétale.

### **IV.3 Dosage des tannins**

#### **IV.3.a Dosage des tannins totaux**

La méthode de dosage des tannins est celle proposée par Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1966) adaptée au matériel végétal. Elle utilise la propriété des tannins à se transformer en anthocyanes par chauffage en milieu acide, (Figure 26).



Teneur en tannins par gramme de matière fraîche :

$$[\text{tannins}] \text{ en g/g pell} = \frac{(\Delta DO_1 + \Delta DO_2) \times 19,33 \times V_{\text{extraction}} \times \text{dilution}}{\text{Masse matériel végétal en g}}$$

**Figure 26 :** Dosage des tannins adapté de la méthode de Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1966).

Cette méthode de dosage a été utilisée pour valider les résultats obtenus par la méthode de phloroglucinolyse.

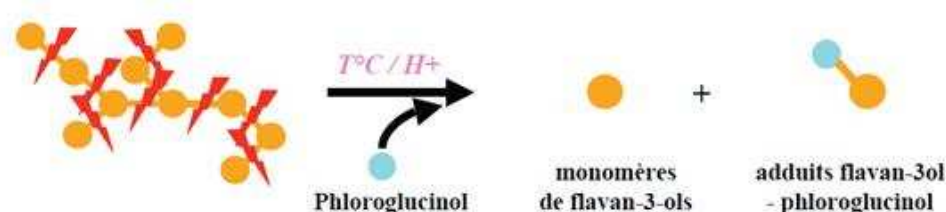
### IV.3.b Etude de la composition phénolique fine

La méthode choisie pour déterminer la composition et le degré de polymérisation des tannins est la phloroglucinolyse suivie par l'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse, la méthode étant adaptée de celle de Kennedy *et al.* (2001).

#### IV.3.b.i Principe

Cette méthode est basée sur la lyse du polymère par rupture des liaisons interflavanes en milieu acide et à chaud en présence d'un agent nucléophile : le phloroglucinol. La réaction libère l'unité terminale sous forme de flavanol et bloque les unités d'extension sous forme de

monomères substitués par l'agent nucléophile en position C4 du flavanol (Figure 27). La solution est alors analysée par CLHP en phase inverse. Il est ainsi possible, dans la mesure où la lyse est totale, de déterminer la composition en monomères et le degré de polymérisation moyen (DPM).



**Figure 27 :** Principe de la réaction de phloroglucinolyse.

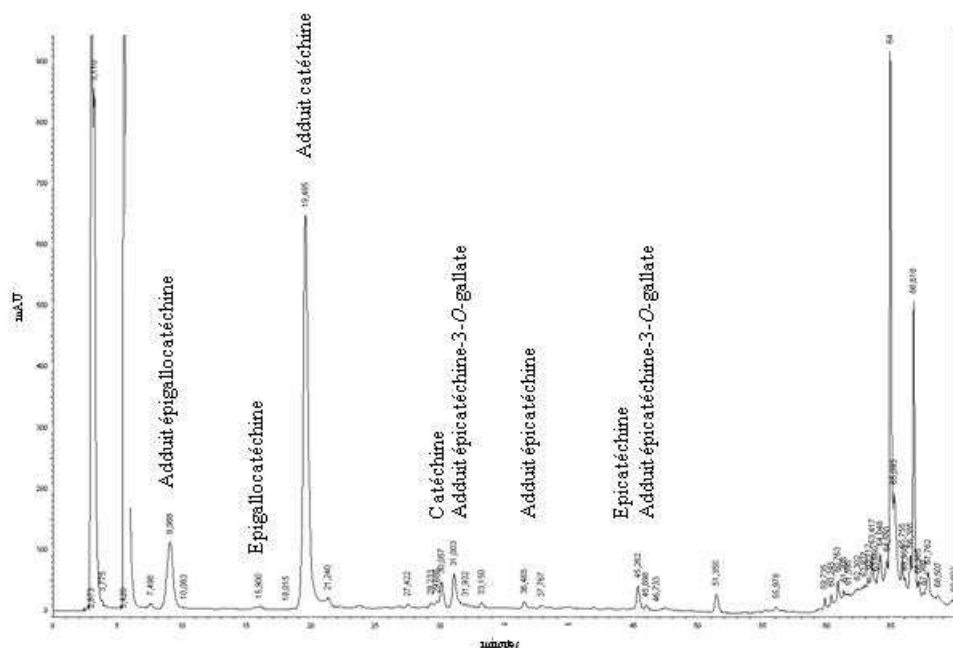
La réaction de phloroglucinolyse est basée sur le même principe que celle de la thiololyse, le choix de la méthode repose sur l'agent nucléophile (phloroglucinol) qui est inodore et moins toxique que le benzylmercaptan utilisé pour la thiololyse.

#### IV.3.b.ii Protocole

Six cents microlitres d'extraits de tannins sont séchés sous flux d'azote à  $35^{\circ}\text{C}$  avant d'être repris dans 200  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel (solution de méthanol à 0,2N contenant 50  $\text{g.l}^{-1}$  de phloroglucinol et 10  $\text{g.l}^{-1}$  d'acide ascorbique) et chauffés au bain-marie à  $50^{\circ}\text{C}$  pendant 20 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 200  $\mu\text{l}$  d'acétate de sodium à 200 mM.

#### IV.3.b.iii Analyse chromatographique

Après la réaction de phloroglucinolyse, l'échantillon est injecté et analysé par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV-visible (Thermo Fisher Scientific), (Figure 28).



**Figure 28** : Exemple de chromatogramme obtenu sur un échantillon d'extrait de tannins de pellicules de baies de raisin après réaction de phloroglucinolyse.

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

**Colonne analytique Beckman Ultrasphère ODS :**

Diamètre des particules : 5  $\mu\text{m}$

Longueur : 25 cm

Diamètre intérieur : 4,6 mm

**Pré-colonne Thermo Hypersil BDS C18 :**

Diamètre des particules : 5  $\mu\text{m}$

Longueur : 1 cm

Diamètre intérieur : 4,6 mm

**Solvant d'élution :**

Phase mobile : eau milliQ à 1 % acide acétique (v/v) / méthanol

Débit : 1 ml/min

Gradient :

| Temps (min) | Acide acétique 1 % | Méthanol |
|-------------|--------------------|----------|
| 0           | 95                 | 5        |
| 10          | 95                 | 5        |
| 30          | 80                 | 20       |
| 55          | 60                 | 40       |
| 60          | 10                 | 90       |
| 70          | 10                 | 90       |
| 75          | 95                 | 5        |
| 80          | 95                 | 5        |

Volume d'échantillon injecté : 10 µl

Détection : U.V. à 280 nm

#### IV.3.b.iv Expression des résultats et méthode de calcul du degré de polymérisation

La réaction de phloroglucinolyse permet de libérer à la fois des unités terminales qui sont, pour les proanthocyanidines, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et la (-)-épicatéchine galloylée mais également des unités d'extension correspondant aux adduits de ces composés. Pour les prodelphinidines, la (-)-épigallocatechine et son adduit sont également libérés.

L'analyse chromatographique permet de doser les différentes unités grâce à leur temps de rétention par rapport à l'étalon interne ainsi que par leur spectre d'absorption. Un spectre d'absorption couplé à un spectre de masse a été réalisé afin de valider la méthode.

Les calculs de concentrations utilisent les coefficients de proportionnalité déterminés par la méthode de Kennedy *et al.* (2001).

Le degré de polymérisation ou DPM est déduit des chromatogrammes à l'aide de la formule suivante :

$$DP_m = \frac{\text{Nombre total de moles de (flavan-3-ols + adduits) libérées}}{\text{Nombre de moles d'unités terminales (flavan-3-ols)}}$$

Le pourcentage de galloylation (%galloylation) est aussi déterminé : il mesure la proportion de monomères liés à une molécule d'acide gallique dans les polymères et est calculé par le rapport suivant :

$$\% \text{ galloylation} = \frac{\text{Nombre total de moles (épicatéchine-gallate + adduit)}}{\text{Nombre de moles d'unités terminales (flavan-3-ols)}}$$

Chaque résultat correspond à la moyenne de deux phloroglucinolyses par échantillon.

#### **IV.3.c Localisations des tannins dans les différents compartiments cellulaires**

Les préparations des échantillons de pellicules utilisés pour cette étude sont décrites dans le paragraphe II. Les coupes utilisées sont des coupes semi-fines de 150 nm d'épaisseur.

##### **IV.3.c.i Préparations des échantillons**

Les coupes ont été déposées dans une goutte d'eau distillée sur des lames de verre superfrost® à bords rodés 90° et 1 mm d'épaisseur. Le milieu de montage est composé de glycérol afin de préserver la fluorescence des échantillons et une lamelle 1.5 (épaisseur 16-19 mm) est apposée puis fixée par du vernis.

##### **IV.3.c.ii Observations UV et épifluorescence**

Les observations de fluorescence ont été réalisées en immersion avec un objectif x100 à l'aide d'un microscope Olympus BX 51 muni d'une lampe UV Olympus U-RFL-T à vapeur de mercure excitant à 365 nm. Pour les observations UV, un filtre vert a été utilisé. Pour l'épifluorescence, un filtre bleu a été nécessaire. Les observations ont été photographiées via un appareil numérique Olympus Camedia Master fixé sur le microscope et les images obtenues via le logiciel Olympus DP-Soft version 3.2.

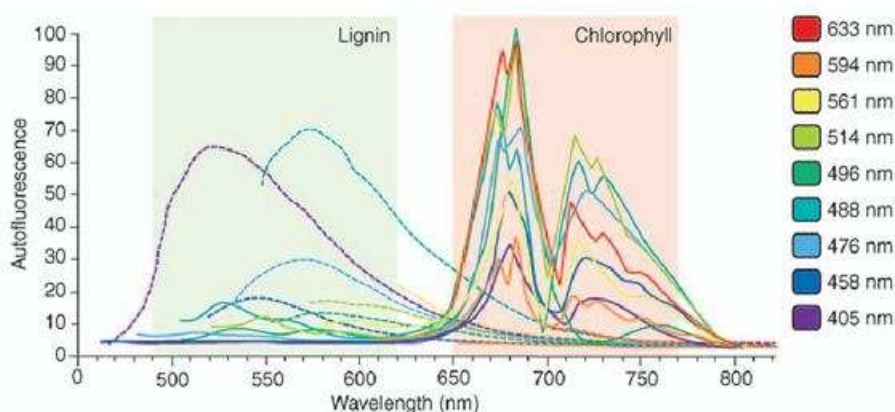


### IV.3.c.iii Observations en microscopie confocale

Le microscope utilisé pour les observations est un microscope confocal Leica droit TCS SP2 AOBS équipé d'un laser argon 488 nm et d'une diode laser à 405 nm. L'objectif utilisé est un objectif x63 à huile pour une étude en immersion et les modes d'acquisition employés sont les modes confocal et acquisition spectrale.

- **Mise au point**

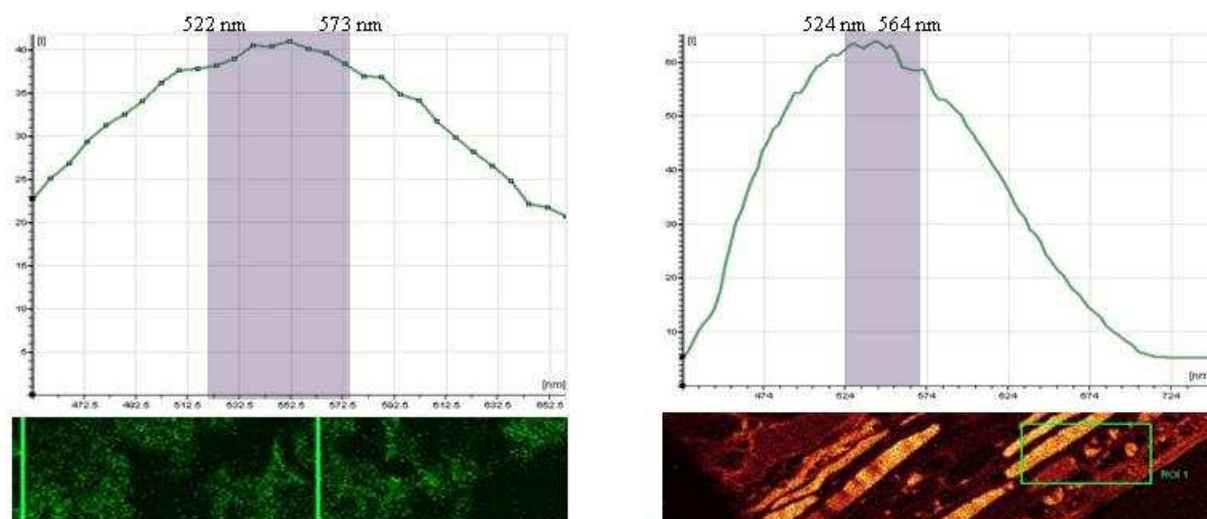
Afin de s'affranchir de l'autofluorescence de composés végétaux tels que la chlorophylle ou la lignine, une étude bibliographique a été réalisée et a permis de prendre connaissance des longueurs d'onde d'émission de ces composés en fonction des différents lasers utilisables en microscopie confocale (Figure 29). Le laser argon 488 nm permet de s'affranchir du bruit de fond de la chlorophylle et de la lignine.



Current Opinion in Plant Biology

**Figure 29** : Spectres d'émission des principales sources d'autofluorescence des racines et des feuilles après excitation avec des sources laser standard de microscope confocal, à 9 longueurs d'onde différentes. La lignine (en pointillé) et la chlorophylle (en trait plein) sont utilisées respectivement pour les racines et les feuilles. On voit par exemple que la lignine émet fortement entre 490 et 620 nm et la chlorophylle entre 650 et 770 nm.

Les paramètres d'observation optimum ont été déterminés par des essais sur coupes de baies fraîches, des coupes semi-fines de pellicule fixée et de poudres de tannins pelliculaires commerciaux et de flavan-3-ols ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine. La Figure 30 présente les spectres d'émission des poudres commerciales de tannins pelliculaires et des coupes semi-fines de pellicules après excitation à 488 nm. L'acquisition spectrale a permis de déterminer les longueurs d'onde d'observation.



**Figure 30** : Spectres d'émission d'autofluorescence des poudres commerciales de tannins pelliculaires (A) et de la pellicule de baie de raisin (B) après excitation avec une source laser à argon à 488 nm de microscope confocal.

#### • Paramètres utilisés

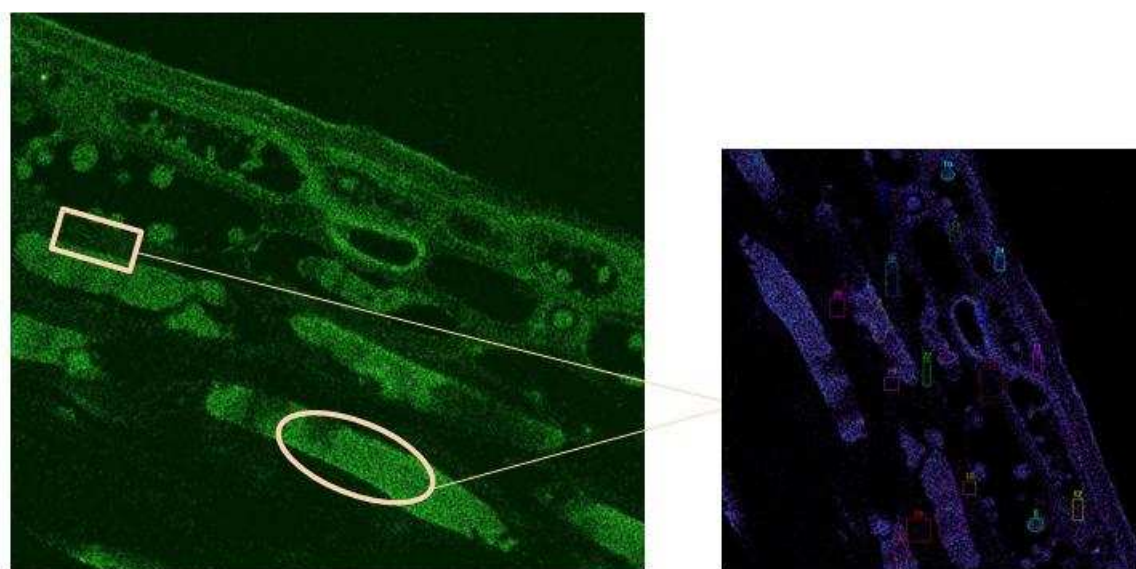
Les paramètres d'observation optimum sont les suivants :

- ✓ Excitation : Laser argon 488 à 15%
- ✓ Emission : 532 à 568 nm
- ✓ PMT : 732 Volt
- ✓ Offset : 1 %
- ✓ Plan Z : 0.07  $\mu\text{m}$
- ✓ Bit : 12 bits
- ✓ Format : 1024x1024
- ✓ Voxel : 78.68x78.68
- ✓ Zoom : 2.96

#### • Mesure des intensités

Les mesures d'intensité de fluorescence des tannins ont été réalisées sur les images d'observations via une macro créée sur le logiciel Metamorph. Une surface théorique de matériel végétal contenant autant de surface pariétale qu'autant de surface vacuolaire a été définie. Pour chacune des zones mesurées, le nombre de pixels par nm a été calculé et rapporté à la surface théorique. Ainsi, pour chaque cas, le calcul nous permet d'établir le

pourcentage d'autofluorescence de chacun des compartiments cellulaires (vacuole et paroi) et de déterminer les proportions de répartition des tannins dans la pellicule. Pour chaque stade étudié, 20 sections de pellicules provenant de 20 coupes semi-fines correspondant à 5 fruits différents ont été observées et analysées. Sur chaque section, l'intensité de fluorescence de 10 zones de parois et celle de 10 zones de vacuoles ont été mesurées. Les mesures ont été réalisées sur les trois premières assises cellulaires de la pellicule (Figure 31).



**Figure 31** : Principe de la mesure d'intensité de l'autofluorescence des tannins pelliculaires à partir du signal digital reconstitué par le logiciel leica du microscope confocal SP2

- **Traitement des images**

Pour les reconstitutions d'image 3D, les empilements d'image ont été reconstitués et déconvolués via les logiciels Imaris et Autoquant.

## V. Préparation du matériel végétal pour l'étude génomique

### V.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon la méthode de Reid *et al.* (2006). La composition du tampon d'extraction est la suivante :

- 300 mM Tris-HCl pH 8,
- 25 mM EDTA,
- 2 M NaCl,
- 2 % (p/v) bromure d'hexadecyltriméthylammonium (CTAB),
- 2 % (p/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP),
- 0,05 % (p/v) spermidine trihydrochloride,
- 2 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol,
- H<sub>2</sub>O DEPC en quantité suffisante pour le volume final.

Le tampon Tris-HCl ainsi que les solutions d'EDTA et de NaCl sont préparés dans de l'eau traitée au DEPC. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol est ajouté extemporanément au tampon d'extraction, puis le tampon d'extraction est chauffé au bain-marie à 65°C pendant 10 à 15 minutes.

Environ 1 gramme de pellicules broyées dans l'azote liquide est mélangé à 20 mL de tampon d'extraction dans un Falcon stérile et incubé pendant 10 à 15 minutes au bain-marie à 65°C en vortexant toutes les minutes afin d'homogénéiser la solution d'extraction. Une première extraction avec 20 ml de chloroforme / alcool isoamylique (IAA ; 24/1 ; v/v) est réalisée. Après centrifugation à 3 500 g pendant 15 min à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et de nouveau extraite avec 20 ml de chloroforme / IAA et centrifugée 15 min à 4°C et 3 500 g. La phase supérieure est alors prélevée et les ARN sont concentrés pendant 30 min à -80°C après ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et 0,6 volume d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 min à 3 500 g et à 4°C. Le surnageant est jeté et les culots sont repris et dissous à température ambiante, dans 1 ml de tampon d'extraction. Les ARN sont précipités 1 nuit à 4°C après avoir été transférés dans un tube de 2 ml, placés dans la glace et additionnés de 0,3 volume de chlorure de lithium à 10 M (LiCl).

Les acides nucléiques sont centrifugés pendant 30 min à 20 000 g et à 4°C puis lavés dans 150 µl d'éthanol à 70% froid. Ils sont de nouveau centrifugés 10 min à 20 000 g et à 4°C avant d'être séchés sous hotte. Ils sont enfin remis en suspension dans 100µl d'eau traitée au DEPC.

## **V.2      Elimination de l'ADN génomique des extraits d'ARN totaux**

Pour chaque méthode d'extraction, la concentration et la pureté des ARN extraits sont évaluées par spectrophotométrie avec mesure des absorbances à 230 nm, 260 nm et 280 nm sur des dilutions au 1/50<sup>ème</sup>. Leur qualité est vérifiée par dépôt sur gel d'agarose à 1,5 %. Si leur qualité et leur quantité sont correctes, un traitement à la DNase est réalisé pour éliminer toute trace d'ADN génomique qui fausserait la détermination du niveau d'expression.

L'extrait contenant les ARN totaux est mélangé à 1 unité de désoxyribonucléase (DNase) par µg d'ARN, dans du tampon 10X RQ1 RNase-free (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 250 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; spermidine 2,5 mM; DTT 50 mM), puis incubé à 37°C pendant 30 min. La réaction est arrêtée par ajout d'un volume de DNase Stop Solution (EGTA 20 mM pH 8,0).

Une extraction au phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) est ensuite réalisée pour éliminer les protéines du mélange réactionnel. Après agitation au vortex pendant 5 min et centrifugation à 15 700 g pendant 5 min à température ambiante, la phase aqueuse est récupérée et les ARN qu'elle contient sont précipités pendant au moins 2 h à -80°C par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Les échantillons sont centrifugés à 15 700 g pendant 30 min à 4°C, puis le culot est lavé par 1 volume d'éthanol 70 % (v/v), séché sous hotte et enfin remis en suspension dans 15 µL d'eau traitée au DEPC.

Les ARN sont à nouveau dosés par spectrophotométrie et analysés par électrophorèse.

### **V.3 Quantification et vérification de l'intégrité des ARN**

#### **V.3.a Estimation de la quantité et de la contamination des ARN**

La concentration des ARN est déterminée par mesure d'absorbance à 260 nm qui correspond à leur maximum d'absorption. Des mesures d'absorbance à 230 nm et à 280 nm sont également effectuées afin d'évaluer la présence de sucres et de protéines. Le rapport A260 nm/A280 nm évalue la contamination protéique et doit être proche de 2. Le rapport A260 nm/A230 nm est un indice de la présence de sucres et doit être compris entre 1,8 et 2.

#### **V.3.b Electrophorèse**

L'intégrité des ARN totaux est contrôlée par dépôt de 1 µg d'ARN sur gel à 1,5 % (p/v) d'agarose. Le gel est préparé à partir d'agarose dissout dans du tampon TAE 1X (Tris Base 2,42 g.L<sup>-1</sup>, acide acétique 0,057 % (v/v), EDTA 0,5 mM pH 8,0) en présence de bromure d'éthidium (BET) à raison de 1,5 µL de solution à 10 µg.mL<sup>-1</sup> pour 100 mL de gel. Le BET s'intercale entre les bases azotées, ce qui permet ensuite sa visualisation sous rayonnement UV. La migration se fait dans du tampon TAE 1 X sous un voltage constant de 100 mV. Les acides nucléiques étant chargés négativement, ils migrent vers l'anode en fonction de leur masse et de leur encombrement stérique.

L'observation de deux bandes majoritaires, correspondant aux ARN ribosomiques 28S et 18S, ARN les plus abondants dans les extraits, indiquent que les ARN ne sont pas dégradés. Parallèlement, des amplifications par PCR sont réalisées à partir d'ARN totaux afin de vérifier qu'aucune contamination par de l'ADN génomique ne persiste.

### **V.4 Synthèse des ADN complémentaires**

Les ARNm, contenus dans les extraits d'ARN totaux, ont été utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) par la technique de transcription inverse (RT, reverse transcription).

Deux microgrammes d'ARN totaux sont mélangés avec 3 µl d'oligo(dT)<sub>15</sub> et le volume est complété à 15 µl avec de l'eau traitée au DEPC. Ils sont dénaturés par chauffage à

75°C pendant 10 min puis placés dans la glace afin d'éviter la reformation de structures secondaires. La synthèse d'un simple brin d'ADNc est réalisée, par incubation à 42°C pendant 60 min, après ajout des éléments suivants dans chaque tube :

- 5 µL de tampon de transcription inverse RT 5X Buffer (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, DTT 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM; Promega),
- 2 µL de dNTP 40 mM (mélange de dATP, dCTP, dGTP et dTTP à 10 mM chacun),
- 1 µL de DTT 100 mM,
- 1 µL de RNasin, inhibiteur de RNases (Promega),
- 1 µL de transcriptase inverse M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) soit 200 unités.

La réaction enzymatique est arrêtée par un passage de 10 min à 70°C. Les ADNc synthétisés sont dilués au 1/5ème dans de l'eau stérile et stockés à -20°C. Pour chaque réaction de PCR, 2,5 µL d'ADNc sont utilisés.

## **V.5 Amplification des ADNc par PCR et analyse des amplifiats sur gel d'agarose**

### **V.5.a Amplification par PCR**

Les ADNc synthétisés ont été amplifiés par PCR (*polymerase chain reaction*) à l'aide d'amorces spécifiques dans un thermocycleur à couvercle chauffant.

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

- 2,5 µL de tampon 10 X (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, BSA 500 µg.mL<sup>-1</sup>, ficoll 0,5 % (v/v), saccharose 1 % (p/v), KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Tartrazine 1 mM),
- 1 µL de dNTP 40 mM en mélange équimolaire,
- 1 µL d'amorce sens 10 mM et 1 µL d'amorce antisens 10 mM,
- 2,5 µL de matrice ADNc,
- 0,5 µL de Taq DNA polymerase à 2,5 unités (Promega).

Le volume est complété à 25 µL avec de l'eau stérile.

Pour les amplifications à partir des banques d'ADNc réalisées par l'équipe CMSB (UMR EGFV - INRA - ISVV), le volume de matrice utilisé est de 1  $\mu$ L et le programme d'amplification comprenait 30 cycles.

Différents programmes d'amplification ont été utilisés. Les amplifications ont été réalisées à une température d'hybridation 54°C pour le gène eEF1 $\gamma$  et à 60°C pour les autres gènes pendant 45 s, avec un temps d'élongation de 1 min à 72°C, le nombre de cycles étant de 30. La température d'hybridation a été définie au préalable en réalisant des gradients de température : de 52°C à 60°C (52°C, 52,6°C, 53,6°C, 54,9°C, 57°C, 58,5°C, 59,5°C et 60°C).

### **V.5.b Visualisation des amplifiats**

Les produits d'amplifications sont déposés sur gels à 1,8 % d'agarose (p/v) après ajout de 2  $\mu$ L de tampon de charge (5X Green GoTaqR reaction buffer, Promega).

Les fragments d'acides nucléiques sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% afin de vérifier leur taille et de les quantifier. 5  $\mu$ L d'un marqueur de taille de 100 paires de bases (Promega) sont déposés en parallèle de façon à obtenir une bande correspondant à une quantité 150 ng d'ADN pour la taille 500 pb et plusieurs bandes correspondant à 75 ng d'ADN. La quantification est réalisée à l'aide du logiciel Bio1D (Société Vilber Lourmat) qui mesure la quantité d'ADN présente sur gel à partir de l'intensité des bandes de référence choisies.

## **V.6 Etude de l'expression par PCR quantitative en temps réel**

La méthode choisie pour les expériences de RT-PCR quantitative utilise le SYBR IQ-Green supermix (Bio-Rad). Cet agent intercalant, une fois lié à l'ADN double brin, émet une fluorescence directement mesurée dans le tube PCR à l'aide d'un fluorimètre couplé à un thermocycleur (MyIQ™ Single Color Real-Time PCR Détection System, Bio-Rad). Les *threshold cycles* ou cycles seuil correspondent au nombre de cycles à partir desquels la fluorescence émise par le produit de PCR est égale au seuil de détection du fluorimètre, le seuil de détection étant significativement plus élevé que le niveau de base de fluorescence.



Pour la réaction de PCR quantitative en temps réel, 5  $\mu$ L d'ADNc à 0,4 ng/ $\mu$ L sont mélangés à 10  $\mu$ L de "IQTM SYBR Green Supermix" de Bio-Rad (2X), 0,5  $\mu$ L de chaque amorce (10  $\mu$ M) et le volume est complété à 20  $\mu$ L avec de l'eau traitée au DEPC.

La première étape de la PCR est une dénaturation des échantillons à 95°C pendant 3 min, suivie de 60 cycles d'amplification : 10 s de dénaturation à 95°C, 20 s d'hybridation à 60°C et 10 s d'élongation à 72°C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. Ensuite, les courbes de fusion sont réalisées par augmentation de la température de 0,5°C toutes les 10 s et mesure de la fluorescence à chaque palier.

Pour chaque couple d'amorces, l'efficacité de PCR était comprise entre 85 et 115. Des courbes d'étalonnage ont également été réalisées pour chaque PCR quantitative en temps réel de façon à vérifier que le coefficient  $r^2$  était supérieur à 0,95.

Des triplicats techniques sont réalisés pour chaque échantillon. L'analyse est réalisée avec le logiciel Bio-Rad IQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software.

## **V.7 Définition des amorces et vérification de leur spécificité**

Les amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes PCR quantitative en temps réel sont présentées dans le Tableau VI. Sept gènes sont étudiés. Parmi eux, deux gènes de ménage, c'est-à-dire exprimés constitutivement, UBI codant pour une protéine de fusion ubiquitine - protéine ribosomique L40 et eEF1 $\alpha$  codant la chaîne alfa du facteur d'élongation eF1, permettent de vérifier que la concentration en ADNc est constante entre les échantillons à comparer.

**Tableau VI : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel.**

| Gène |          | Séquence 5' → 3'           | T <sub>m</sub><br>(°C) | Taille du<br>fragment<br>amplifié (pb) |
|------|----------|----------------------------|------------------------|----------------------------------------|
| UBI  | sens     | 5'CTTGATGGGACAGGTCTGGT 3'  | 64                     | 100                                    |
|      | antisens | 5'TGTCTTGGAGGCAGGATAGC 3'  | 64,2                   |                                        |
| EF1  | sens     | 5'GAAGGTTGACCTCTCGGATG 3'  | 63,6                   | 88                                     |
|      | antisens | 5'CAGAAGAGCCTCTCCCTCAA 3'  | 63,6                   |                                        |
| LAR1 | sens     | 5'CTCCAACGGATTCTTCCAG 3'   | 63,4                   | 99                                     |
|      | antisens | 5'CGTCCACTGTTTTTCATCGTG 3' | 64,2                   |                                        |
| LAR2 | sens     | 5'TAAACGAGCTGGCATCACTG 3'  | 63,9                   | 88                                     |
|      | antisens | 5'GCAGCGGCTAGTAGGTCATC 3'  | 63,8                   |                                        |
| ANR  | sens     | 5'CTTGATGGGACAGGTCTGGT 3'  | 64                     | 102                                    |
|      | antisens | 5'TGTCTTGGAGGCAGGATAGC 3'  | 64,2                   |                                        |
| PG1  | sens     | 5'GATCCCAGAAAGGTGCAAGTC 3' | 63,6                   | 100                                    |
|      | antisens | 5'CATCCGAAACATGAGCCTC 3'   | 64,1                   |                                        |
| PME  | sens     | 5'GGCACCGTCGATTTCATATT 3'  | 63,5                   | 100                                    |
|      | antisens | 5'CGGTGATGGTGTCTTTTGA 3'   | 63,5                   |                                        |

Les ADNc des gènes de Vigne sont recherchés spécifiquement dans la base de données TIGR (<http://www.tigr.org/>). Quand différents clones existent, des alignements de séquences sont réalisés avec le logiciel Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) afin de déterminer leur niveau d'homologie et ainsi de connaître le nombre de transcrits différents à rechercher et positionner les amorces.

Les amorces sont élaborées à partir des séquences d'ADNc à l'aide du programme "Primer 3" (<http://emboss.cbr.cr.ca/cgi-bin/emboss/eprimer3>). Elles sont définies pour amplifier des fragments d'environ 100 paires de bases, à une température d'hybridation optimale de 60°C pour chacun des couples, leur taille étant comprise entre 18 et 25 bases, leur pourcentage en G/C avoisinant les 50% et le maximum de bases auto-complémentaires en 3' étant de 4. Ces conditions sont imposées de façon à éviter la formation de dimères d'amorces qui fausseraient la quantification.

Toutes les amorces sont testées au préalable sur une banque d'ADNc réalisée par l'équipe Contrôle du Métabolisme Secondaire de la Baie (UMR EGFV - INRA - ISVV) sur des pellicules de Cabernet-sauvignon prélevées aux stades fermeture de grappe et maturité. Les températures de fusion ont été vérifiées après chaque amplification.

Les amplifiats sont ensuite déposés sur gel pour vérifier la présence d'une bande unique de taille attendue, puis purifiés à l'aide du kit « PCR Product Purification Kit » (Qiagen). Le principe consiste à fixer l'ADN amplifié sur une colonne de silice grâce un tampon à forte salinité, les autres constituants du milieu n'étant pas retenus. Après lavage de la colonne, l'ADN est récupéré par centrifugation 1 min à 15 000 g dans de l'eau traité au DEPC.

Les produits purifiés sont alors envoyés pour séquençage automatique à MilleGen (Labège). L'alignement des séquences nucléotidiques obtenues est effectué par le logiciel Clustal\_X (Thompson *et al.*, 1997). Les comparaisons de séquences avec les banques de données ont été réalisées avec le programme BLAST (Altschul *et al.*, 1997) via Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## **VI. Etude des activités enzymatiques**

Un protocole d'extraction commun aux trois enzymes étudiées dans ce travail (PME, LAR et ANR) a été mis au point au laboratoire. Il est adapté des protocoles d'extraction de chacune des enzymes.

### **VI.1 Extraction enzymatique**

L'extraction est réalisée à partir de deux grammes de pellicules broyées dans l'azote liquide. Les pellicules sont homogénéisées dans 3 ml de tampon d'extraction (HEPES 0,1 M, polyéthylène glycol 600 (PEG) 1 % (v/v), sucrose 1 % (p/v), dithiothréitol (DTT) 100mM, chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) 25 mM, cocktail antiprotéases 500 µl.l<sup>-1</sup> (Sigma), pH 7,5) et 200mg de PVPP sont ajoutés. Après agitation dans la glace, à 4°C, pendant 3 heures, les extraits sont centrifugés à 4°C, pendant 30 minutes, à 18 000 g. Le surnageant est alors aliquoté et conservé à -20°C jusqu'au dosage.

## VI.2 Dosage de la pectine méthyl estérase (PME)

La mesure de l'activité est réalisée sur l'extrait brut avec un pH ajusté à 7,5. Les témoins négatifs ont été réalisés avec des extraits bruts préalablement bouillis.

La PME déméthoxyle spécifiquement les pectines et libère du méthanol. L'alcool oxydase de *Pichia pastoris* catalyse l'oxydation du méthanol en formaldéhyde. La 2,4-pentanedione se condense exclusivement avec des aldéhydes de faible poids moléculaire tels que le formaldéhyde en formant un composé chromophore absorbant à 412 nm.

A 150  $\mu$ l d'extrait enzymatique brut sont ajoutés 200  $\mu$ l de pectine de citrus 0,05% préparée dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7.5. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 30°C avant d'être porté à ébullition pendant 10 min puis ramené à 25°C dans la glace. La deuxième étape du dosage se fait par ajout de 1 ml à 1 Unité d'alcool oxydase puis le mélange est incubé pendant 15 min à 25°C. La condensation des aldéhydes est réalisée par addition de 1 ml de pentanedione 20mM dans de l'acétate d'ammonium 2M et la réaction colorée est révélée par incubation pendant 15 min à 60°C. La réaction est arrêtée en ramenant l'échantillon à 25°C et la densité optique est mesurée à 412 nm.

## VI.3 Dosage de la leucoanthocyanidine réductase

Le protocole de dosage de la LAR est adapté de celui de Pfeiffer *et al.* (2006). La formation de catéchine est mesurée par HPLC couplée à un détecteur UV-visible.

*In vivo*, le substrat de la LAR est la leucoanthocyanidine. Cette molécule est trop instable pour être utilisée comme substrat de la réaction d'intérêt (Pfeiffer *et al.*, 2006). La dihydroquercétine, substrat de la DFR, enzyme précédent la réaction de la LAR, est donc utilisée comme substrat dans cette méthode.

L'extrait enzymatique brut (70 $\mu$ l) est mélangé avec 10 $\mu$ l de solution de DHQ commerciale dans du méthanol (1 mg/ml), 10  $\mu$ l de NADPH à 20mM (Sigma) et 110 $\mu$ l de tampon Tris-HCl à pH 7,5. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à 25°C au bain-marie. Les produits de réaction sont extraits deux fois avec 200 $\mu$ L d'acétate d'éthyle. Les surnageants sont réunis et séchés sous flux d'azote, puis repris dans 100  $\mu$ l de MeOH pour l'analyse par

## HPLC.

Pour chaque point mesuré, un échantillon est analysé directement après ajout de l'extrait protéique (t=0) dans les mêmes conditions. Les dosages sont réalisés en triplicatas. L'analyse HPLC utilise une colonne en phase inverse (Beckman Coulter, ODS, diamètre 4.6, 25cm) et les conditions d'analyse chromatographique sont les suivantes :

✓ Solvant d'élution :

Phase mobile : eau milliQ à 5 % acide acétique (v/v) / méthanol

Débit : 1 ml/min<sup>-1</sup>

Gradient :

| Temps (min) | Acide acétique 1 % | Méthanol |
|-------------|--------------------|----------|
| 0           | 95                 | 5        |
| 5           | 95                 | 5        |
| 10          | 90                 | 10       |
| 16          | 90                 | 10       |
| 21          | 10                 | 90       |
| 31          | 10                 | 90       |
| 36          | 95                 | 5        |
| 45          | 95                 | 5        |

✓ Volume d'échantillon injecté : 50 µl

✓ Détection : U.V. à 280 nm

#### VI.4 Dosage de l'anthocyanidine réductase

Le protocole de dosage de l'ANR est adapté de celui de Xie *et al.* (2003) et de Punyasiri *et al.* (2004). La formation d'épicatéchine est mesurée par HPLC couplée à un détecteur UV-visible.

La réaction de l'anthocyanidine réductase contient 50 µl de NADPH (20 mM), 40 µl d'une solution de cyanidine chloride (5 mg/ml de MeOH), 200 µl d'extrait enzymatique ainsi

que du Tris-HCl à pH 6 pour un volume final de 500 $\mu$ l. La réaction se fait à 35°C, dans une étuve, durant 45 min. De la même manière que pour la LAR, les produits de réactions sont extraits avec de l'acétate d'éthyle (2 fois 500 $\mu$ l) et séchés sous flux d'azote avant d'être repris dans 100  $\mu$ l de MeOH.

L'analyse HPLC utilise une colonne en phase inverse (Beckman Coulter, ODS, diamètre 4.6, 25cm) et les conditions d'analyse chromatographique sont les suivantes :

✓ Solvant d'élution :

Phase mobile : eau milliQ à 5% acide acétique (v/v) / méthanol

Débit : 1 ml/min<sup>-1</sup>

Gradient :

| Temps (min) | Acide acétique 1 % | Méthanol |
|-------------|--------------------|----------|
| 0           | 95                 | 5        |
| 5           | 95                 | 5        |
| 10          | 90                 | 10       |
| 15          | 90                 | 10       |
| 25          | 85                 | 15       |
| 40          | 85                 | 15       |
| 65          | 10                 | 90       |
| 75          | 10                 | 90       |
| 80          | 95                 | 5        |
| 85          | 95                 | 5        |

✓ Volume d'échantillon injecté : 50  $\mu$ l

✓ Détection : U.V. à 280 nm

## VII. Immunolocalisation des protéines étudiées.

La localisation cellulaire de deux catégories de protéines a été réalisée dans ce travail :

- localisation de protéines de dégradation des parois cellulaires : PME, PG. Des immunolocalisations complémentaires ont été réalisées afin d'évaluer l'activité de la PME, utilisant les anticorps monoclonaux commerciaux JIM5 et JIM7 (Plantprobes®, anticorps primaires monoclonaux dirigés contre les chaînes homogalacturonanes), marquant respectivement les pectines partiellement et fortement méthylestérifiées (Knox *et al.*, 1990 ; Willats *et al.*, 2000).
- localisation des deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse des tannins : LAR1 et LAR 2 (deux isoformes de la LAR) et ANR.

### VII.1 Synthèse des anticorps

Les anticorps primaires synthétisés sont des anticorps polyclonaux. En effet, les anticorps polyclonaux ont la capacité de tolérer des changements de nature des antigènes, de détecter des protéines dénaturées et de pouvoir être générés par différentes espèces animales. Dans le cadre de notre étude de localisation et de co-localisation d'enzymes, le choix d'anticorps polyclonaux s'est avéré le plus pertinent.

Le Tableau VII récapitule les numéros d'accession, la taille et la masse des protéines étudiées et le Tableau VIII présente les séquences des peptides immunogènes dirigés contre les protéines PME, PG, LAR 1, LAR 2 et ANR.

**Tableau VI I:** Caractéristiques des protéines étudiées en immunomarquage.

| <b>Protéine</b>                                         | <b>UniProtKB/TrEMBL</b> | <b>Taille (aa)</b> | <b>Masse (Da)</b> |
|---------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|
| Pectine méthyl extérase<br><b>PME1</b>                  | Q94B16                  | 531                | 58,009            |
| Polygalacturonase<br><b>PG1</b>                         | Q94B15                  | 444                | 47,420            |
| Putative leucoanthocyanidine réductase 1<br><b>LAR1</b> | Q4W2K4                  | 346                | 38,019            |
| Leucoanthocyanidine réductase 2<br><b>LAR2</b>          | Q3S9L6                  | 362                | 39,053            |
| Anthocyanidine réductase<br><b>ANR</b>                  | Q7PCC4                  | 338                | 36,735            |

**Tableau VIII :** Séquence des peptides immunogènes dirigés contre les protéines PME, PG, LAR1, LAR2 et ANR.

| <b>Protéine</b>                                         | <b>Peptide immunogène synthétisé</b> |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Pectine méthyl extérase<br><b>PME1</b>                  | CTTTAQGRKDPAQPTG                     |
| Polygalacturonase<br><b>PG1</b>                         | YGAKGDGSDATEAFKC                     |
| Putative leucoanthocyanidine réductase 1<br><b>LAR1</b> | RPGPRSPSKAKIFKC                      |
| Leucoanthocyanidine réductase 2<br><b>LAR2</b>          | TIKTINDDRTV NKSC                     |
| Anthocyanidine réductase<br><b>ANR</b>                  | TTVRDPDNQKKVSHC                      |

### VII.1.a Enzymes de dégradation des parois cellulaires

La synthèse des peptides antigéniques a été réalisée à partir des séquences protéiques des gènes étudiés et après vérification des domaines conservés par des alignements de séquences via le logiciel ClustalX.



La production des anticorps primaires polyclonaux pour les protéines PME et PG a été réalisée par la société Interchim Innovations. Les anticorps primaires dirigés contre la protéine PME ont été produits chez la souris tandis que ceux dirigés contre la PG ont été produits chez le lapin. Le choix de différentes espèces animales est justifié par la réalisation de co-localisation des protéines.

Le *design* des peptides a été réalisé après recherche d'immunogénicité sur la séquence des protéines d'intérêts et vérification de la spécificité des séquences peptidiques proposées par Interchim pour la protéine d'intérêt par blast dans des bases de données *Vitis vinifera* et contrôle des alignements de séquences. La Figure 32 présente les résultats des *blasts* du peptide antigénique dirigé contre la protéine PME1.

Dans la banque *Vitis vinifera*, le peptide antigénique reconnaît 18 protéines dont 4 (Q9XGT5, Q94B16, D7TGK6 et A5AUK1) avec 100% d'homologie. Parmi ces quatre protéines, 2 sont des protéines non caractérisées (D7TGK6 et A5AUK1), une est considérée comme une PME partielle (Q9XGT5) et la dernière est notre protéine d'intérêt : Q94B16. Les blast et alignement du peptide antigénique dirigé contre la PG1 sont présentés dans la Figure 33. Le peptide blast avec 6) protéines de *Vitis vinifera* (Q94B15, D7TI31, D7TI30, D7TI28, A5BZI5 et A5BYD8, dont seulement une est caractérisée : Q94B15 et correspond à notre protéine PG1 de l'étude.

La quantité de peptide synthétisé est de 25 mg pour une pureté supérieure à 70%. La qualité des peptides de 11 à 19 acides aminés a été contrôlée par chromatographie liquide et spectrométrie de masse. Cinq milligrammes de peptide, ou haptènes car leur masse est supérieure à 10000 Da, ont été couplés à la protéine porteuse KLH (hémocyanine) pour l'immunisation des souris. Le programme d'immunisation de 12 souris a duré 77 jours et 4 injections ont été réalisées aux jours 0, 21, 35 et 70. La production des anticorps a été suivie par des tests ELISA réalisés aux 42<sup>ème</sup> et 77<sup>ème</sup> jours. Les anticorps primaires ont été purifiés sur colonne C-16-G et leur activité a été contrôlée par ELISA sur le peptide C-16-G. Un volume de 30 ml d'anticorps anti-PME à 80 µg.ml<sup>-1</sup> a été obtenu.

Le protocole de production des anticorps primaires anti-PG est similaire à celui des anticorps primaires anti-PME. Cinq injections ont été réalisées aux jours 0, 14, 28, 56 et 70.

Les sérums immuns de lapin ont été purifiés après 84 jours. Un volume de 34 ml d'anticorps primaires anti-PG purifiés à 121  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  a été obtenu.

Detailed BLAST results

| Alignments | Accession | Entry name   | Status | Protein Names                                    | Organism               | Length | Identity | E-Value |
|------------|-----------|--------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------|--------|----------|---------|
|            | Q9XGT5    | Q9XGT5_VITVI | *      | Pectinesterase                                   | Vitis vinifera (Grape) | 96     | 100.0%   | 7.0e-10 |
|            | Q94B16    | Q94B16_VITVI | *      | Pectinesterase                                   | Vitis vinifera (Grape) | 531    | 100.0%   | 7.0e-10 |
|            | D7TGK6    | D7TGK6_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 527    | 100.0%   | 7.0e-10 |
|            | A5AUK1    | A5AUK1_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 534    | 100.0%   | 7.0e-10 |
|            | D7U9X2    | D7U9X2_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 571    | 80.0%    | 6.3e-10 |
|            | Q9XGT4    | Q9XGT4_VITVI | *      | Pectinesterase                                   | Vitis vinifera (Grape) | 82     | 80.0%    | 8.4e-10 |
|            | D7TJ29    | D7TJ29_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 670    | 80.0%    | 8.4e-10 |
|            | A5B6F8    | A5B6F8_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 288    | 80.0%    | 8.4e-10 |
|            | D7U7V9    | D7U7V9_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 259    | 80.0%    | 1.5     |
|            | D7TF24    | D7TF24_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 561    | 73.0%    | 8.9     |
|            | D7T1A5    | D7T1A5_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 415    | 73.0%    | 8.9     |
|            | D7T1A5    | D7T1A5_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 444    | 73.0%    | 8.9     |
|            | D7T1A4    | D7T1A4_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 259    | 73.0%    | 8.9     |
|            | D7T1A2    | D7T1A2_VITVI | *      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 152    | 73.0%    | 8.9     |
|            | A5BWW2    | A5BWW2_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 512    | 73.0%    | 8.9     |
|            | A5BPH1    | A5BPH1_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 497    | 73.0%    | 8.9     |
|            | A5B8V9    | A5B8V9_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 559    | 73.0%    | 8.9     |
|            | A5B8K9    | A5B8K9_VITVI | *      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 513    | 73.0%    | 8.9     |

Job information

Query sequence: **CYTAQSHKQFQYQ**

```

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 MASLLRTRLQSFLFFIIFFFIFSCSSSTFASSSDEEANLKLQSQCLAVPSSAFIS3LK
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 ---MIDDSNSSYGRD-EVMARYASFDSSSTFASSSDEEANLKLQSQCLAVPSSAFIS3LK
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 MASLLRTRLQSFLFFIIFFFIFSCSSSTFASSSDEEANLKLQSQCLAVPSSAFIS3LK

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 STIDVLRGTMSVVSQFTKVFNDPRLSNAISDCLELLDFAADDLSWSLSAIQNPFGKDNGT
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 STIDVLRGTMSVVSQFTKVFNDPRLSNAISDCLELLDFAADDLSWSLSAIQNPFGKDNGT
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 STIDVLRGTMSVVSQFTKVFNDPRLSNAISDCLELLDFAADDLSWSLSAIQNPFGKDNGT

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 GDLGSDLKTWLSSTFTNQDTCIEGFVGTNGIVKTVVAESLSQVASLVHSLTLMVHDPAPK
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 GDLGSDLKTWLSSTFTNQDTCIEGFVGTNGIVKTVVAESLSQVASLVHSLTLMVHDPAPK
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 GDLGSDLKTWLSSTFTNQDTCIEGFVGTNGIVKTVVAESLSQVASLVHSLTLMVHDPAPK

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 GK3NGGGGGVKGHVSGDFFPSWVGKHSRKLQASSVSPDVTVAADGTGNYYTVMQAVQAAAP
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 GK3NGGGGGVKGHVSGDFFPSWVGKHSRKLQASSVSPDVTVAADGTGNYYTVMQAVQAAAP
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 GK3NGGGGGVKGHVSGDFFPSWVGKHSRKLQASSVSPDVTVAADGTGNYYTVMQAVQAAAP

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 DYSQNHVYVIYIKQGIYRENVEIKKKKWNLMQVGDGMGATVITGNRSYIDGWTTIYASATFA
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 DYSQNHVYVIYIKQGIYRENVEIKKKKWNLMQVGDGMGATVITGNRSYIDGWTTIYASATFA
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 DYSQNHVYVIYIKQGIYRENVEIKKKKWNLMQVGDGMGATVITGNRSYIDGWTTIYASATFA

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 VKGKGFIARDMTFENTAGPEKHQAVLRSDSDLSVYYRC5MRGYQDTLYPHTNRQFYREC
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 VKGKGFIARDMTFENTAGPEKHQAVLRSDSDLSVYYRC5MRGYQDTLYPHTNRQFYREC
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 VKGKGFIARDMTFENTAGPEKHQAVLRSDSDLSVYYRC5MRGYQDTLYPHTNRQFYREC

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 RISGTVDFIFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAQGRKDPAQPTGFSIQFSNISADS
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 RISGTVDFIFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAQGRKDPAQPTGFSIQFSNISADS
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 RISGTVDFIFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAQGRKDPAQPTGFSIQFSNISADS

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 DLLASVNSTLSYLGRFWKQYSRTIIMKSYISDAIRPEGWLEWNGDFALDTLYYGEYMYNG
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 DLLASVNSTLSYLGRFWKQYSRTIIMKSYISDAIRPEGWLEWNGDFALDTLYYGEYMYNG
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 DLLASVNSTLSYLGRFWKQYSRTIIMKSYISDAIRPEGWLEWNGDFALDTLYYGEYMYNG

tr|Q94B16|Q94B16_VITVI/1-531 PSAGLGSRVQWPGFPHLLNNSAQAANFTVTEFIAGN-LWLPSTGVKYSAGLAV--
tr|D7TGK6|D7TGK6_VITVI/1-527 PSAGLGSRVQWPGFPHLLNNSAQAANFTVTEFIAGN-LWLPSTGVKYSAGLAV--
tr|Q9XGT5|Q9XGT5_VITVI/1-96 -----
peptide/1-16
tr|A5AUK1|A5AUK1_VITVI/1-534 PSAGLGSRVFVAGFSSVEQLR3GRQLHGDRIHSRKPVAADVDRGEIFSRIS3LKQ

```

**Figure 32** : Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine PME1 dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.



## Detailed BLAST results

| Alignments | Accession | Entry name   | Status | Protein Names                                    | Organism               | Length | Identity | E-Value              |
|------------|-----------|--------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------|--------|----------|----------------------|
|            | Q94B15    | Q94B15_VITVI | ★      | Polygalacturonase PG1                            | Vitis vinifera (Grape) | 444    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7T131    | D7T131_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 442    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7T130    | D7T130_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 442    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7T128    | D7T128_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 441    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | A5B25     | A5B25_VITVI  | ★      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 441    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | A5BYD8    | A5BYD8_VITVI | ★      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 442    | 100.0%   | 1.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7T129    | D7T129_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 442    | 93.0%    | 2.0×10 <sup>-3</sup> |

## Job information

|                              |                                                                |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Query sequence               | YVARGGSDATEAFK                                                 |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYGLQGNPPYDYLDDAYGYAS-----SQAYDKRF         |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYXILQGNPPYDYLDDAYGYAS-----SQAYDKRF        |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYGLQGNPPYDYLDDAYGYDS-----SRAYESWF         |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYGLQGNPPYDYLDDAYGYDS-----SRAYESWF         |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYGLQGNPPYDYLDDAYGYDS-----SRAYEKWF         |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | MSLQRRFIPFLIVFLLSFPCYYGLQGNPPYDYLDDAYGYDS-----SRAYEKWF         |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | MSLQRRFVPCIVFLLSFPCYFSLQASPPYDYLGEASGYDSQANHLHFTSIQSRETNWF     |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVNVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVNVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVSVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVSVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVSVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | WRKFGSKIMGSKRIGEVGRSLASVITVSVNDYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL  |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | WRKFGS-----KTGKSLASVQVNVNYYGAKGDDGSDATEAFKKAWEAACSSQGSVL       |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | VVFKN-NYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQLQASTDRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | VVFKN-NYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQLQASTDRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | VVFKNKNYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQASADRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG   |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | VVFKNKNYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQASADRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG   |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | VVFKNKNYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQASADRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG   |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | VVFKNKNYLLKPIITFEGPCKSSITVQIYGTQASADRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG   |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | VVFKNKNYLLKPIITFQGPCKSSITVQIYGTQASTDRSAYSNDLTRWLVFENVQNLAVQG   |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | GGTINGNGKIWNENCKVDDDLSCKDAPTALTFFYNCKNLVVKNLKIENAQQIMVSFEKCV   |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | GVQASGLTVAAPGDSPTNDGIMHVIDTQNIQISSSVIGTGDDCISIVSGTQNLQATGITCG  |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | GVQASGLTITAPGNSPTNDGIMHVSITRIQISSSVIGTGDDCISIVSGSQVQVNGITCG    |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | PCHGISIGSLGYNSEALVSDITVNGATLSGTTNGVRIKTWPGGSGSASNIKFQNIEMHD    |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | VDNPIIINQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | VDNPIIINQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | VDNPIIINQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | VKNPIIIDQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | VKNPIIIDQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | VKNPIIIDQKYCDQDKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | VENPIIIDQKYCDQSKPCKESQSAVQVQNVLYQNIKGTSSSSEAIQLDCSSEKFPCCQGVIL |
| ex D7T128 D7T128_VITVI/1-441 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| ex A5B215 A5B215_VITVI/1-441 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| ex D7T129 D7T129_VITVI/1-442 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| ex D7T131 D7T131_VITVI/1-442 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| ex D7T130 D7T130_VITVI/1-442 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| ex A5BYD8 A5BYD8_VITVI/1-442 | QDIDIEIGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |
| peptide/1-16                 |                                                                |
| ex Q94B15 Q94B15_VITVI/1-444 | RDIDIKVGGGKAATAVCNDKAVTEKGDVSPSCT                              |

**Figure 33 :** Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine PG1 dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.



## VII.1.b Enzymes de la voie de biosynthèse des tannins

Les anticorps primaires polyclonaux dirigés contre les protéines LAR1 (Q4W2K4), LAR2 (Q3S9L6) et ANR (Q7PCC4) ont été produits chez trois espèces différentes qui sont respectivement le lapin, la souris et le rat afin de permettre la co-localisation de ces enzymes dans les cellules de la pellicule de raisin.

La conception de ces anticorps primaires a été confiée à la société BIOTEM. Les séquences des peptides synthétisés sont résumées dans le Tableau VII et leur spécificité envers les protéines d'intérêts a été vérifiée par *blast* des séquences peptidiques dans une banque protéique *Vitis vinifera* (Figures 34 et 35).

A

Detailed BLAST results

| Alignments | Accession | Entry name   | Status | Protein Names                           | Organism               | Length | Identity | E-Value              |
|------------|-----------|--------------|--------|-----------------------------------------|------------------------|--------|----------|----------------------|
|            | Q4W2K4    | Q4W2K4_VITVI | ★      | Putative leucoanthocyanidin reductase 1 | Vitis vinifera (Grape) | 346    | 100.0%   | 4.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | Q4W2K5    | Q4W2K5_VITVI | ★      | Leucoanthocyanidin reductase 1          | Vitis vinifera (Grape) | 346    | 92.0%    | 4.0×10 <sup>-3</sup> |
|            | Q3KN76    | Q3KN76_9ROSI | ★      | Leucoanthocyanidin reductase 1          | Vitis shuttleworthii   | 346    | 92.0%    | 1.0×10 <sup>-3</sup> |

Job information

Query sequence: P-3465164\_LAR1-3465164/3465164/1-15

```

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|MTVSFVPSFKGRVLIAGATGFIGQFVAAASLDAHRPTYILARPGPRSPSKANIFKALEDK
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|MTVSFVPSFKGRVLIAGATGFIGQFVAAASLDAHRPTYILARPGPRSPSKAKIKAHEDK
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|MTVSFVPSFKGRVLIAGATGFIGQFVATASLDAHRPTYILARPGPRSPSKAKIFKALEDK
peptide/1-15|-----RFGPRSPSKAKIFRC-----

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|GAIIVYGLINEQEAMEKILKEHEIDIVVSTVGGESILDQIALVKAMKAVGTIKRFLPSEF
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|GAIIVYGLINEQESMERKILKEHEIDIVVSTVGGESILDQIALVKAMKAVGTIKRFLPSEF
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|GAIIVYGLINEQEAMEKILKEHEIDIVVSTVGGESILDQIALVKAMKAVGTIKRFLPSEF
peptide/1-15|-----

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|GHDVNRADPVEPGLNMYREKRRVRQLVEESGIPFTYICCNISIASWPYYNNIHPSEVLPPPT
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|GHDVNRADPVEPGLNMYREKRRVRQLVEESGIPFTYICCNISIASWPYYNNIHPSEVLPPPT
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|GHDVNRADPVEPGLNMYREKRRVRQLVEESGIPFTYICCNISIASWPYYNNIHPSEVLPPPT
peptide/1-15|-----

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|DFFQIYGDGNVKAYFVAGTIDIGKFTMKIVDDVRTLNKSVHFRPSCNCLINELASVWEKK
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|DFFQIYGDGNVKAYFVAGTIDIGKFTMKIVDDVRTLNKSVHFRPSCNCLINELASVWEKK
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|DFFQIYGDGNVKAYFVAGTIDIGKFTMKIVDDVRTLNKSVHFRPSCNCLINELASVWEKK
peptide/1-15|-----

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|IGRTLPRVTETEDDLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNFSIDGPEDEVTTLYP
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|IGRTLPRVTETEDDLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNFSIDGPEDEVTTLYP
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|IGRTLPRVTETEDDLAAAGENIIPQSVVAAFTHDIFIKGCQVNFSIDGPEDEVTTLYP
peptide/1-15|-----

tr|Q4W2K5|Q4W2K5_VITVI/1-346|EDSFRTVEECFGEYIVKIEEKQPTADSAIANTGPFVVGMRQVTATCA
tr|Q3KN76|Q3KN76_9ROSI/1-346|EDSFRTVEECFGEYIVKIEEKQPTADSAIANTGPFVVGMRQVTATCA
tr|Q4W2K4|Q4W2K4_VITVI/1-346|EDSFRTVEECFGEYIVKIEEKQPTADSAIANTGPFVVGMRQVTATCA
peptide/1-15|-----

```

**B**

## Detailed BLAST results

| Alignments | Accession | Entry name   | Status | Protein Names                                    | Organism               | Length | Identity | E-Value              |
|------------|-----------|--------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------|--------|----------|----------------------|
|            | Q3S9L6    | Q3S9L6_VITVI | ★      | Leucoanthocyanidin reductase 2                   | Vitis vinifera (Grape) | 362    | 100.0%   | 2.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7SIV3    | D7SIV3_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 358    | 100.0%   | 2.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | Q4W2K6    | Q4W2K6_VITVI | ★      | Putative leucoanthocyanidin reductase 2          | Vitis vinifera (Grape) | 362    | 92.0%    | 6.0×10 <sup>-3</sup> |

## Job information

Query sequence

-&gt;449104 LAR\_1

```

>449104 LAR_1
SVISLSDGCVWDC

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  MIVLSVSTSPAPQAPPAATGPRTLIVVGASGFGRFVAEASLSSGHPTVYVLRSSATTSSS
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  MIVLSVSTSPAPQAPPAATGPRTLIVVGASGFGRFVAEASLSSGHPTVYVLRSSATTSSS
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  MIVLSVSTSPAPQAPLAATGPRTLIVVGASGFGRFVAEASLSSGHPTVYVLRSSATTSSS
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  KASTIKSLEDQGAAILVTGSGIGDKEVMIEILRKYIEVVISAVGGATILDLTLAEAIKAV
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  KASTIKSLEDQGAAILVTGSGIGDKEVMIEILRKYIEVVISAVGGATILDLTLAEAIKAV
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  KASTIKSLEDQGAAILVTGSGIGDKEVMIEILRKYIEVVISAVGGATILDLTLAEAIKAV
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  GSIKRFLPSEFGHDIDRAEFVEPGLTMYMEKKRVRRFIEEAAIFPTYICCNSTAAWPFYHD
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  GSIKRFLPSEFGHDIDRAEFVEPGLTMYMEKKRVRRFIEEAAIFPTYICCNSTAAWPFYHD
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  GSIKRFLPSEFGHDIDRAEFVEPGLTMYMEKKRVRRFIEEAAIFPTYICCNSTAAWPFYHD
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  NTHPADVLPPLDRFHIYGDGSKVAYFVAGTDIGKFTIKTINDDRTVNKSLHFRPPSNLVS
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  NTHPADVLPPLDRFHIYGDGSKVAYFVAGTDIGKFTIKTINDDRTVNKSLHFRPPSNLVS
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  NTHPADVLPPLDRFHIYGDGSKVAYFVAGTDIGKFTIKTINDDRTVNKSLHFRPPSNLVS
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  INELASLWEKKIGRTLPRVTVEEDDLAAAEMRIPDSIVASFTHDIFIKGCQVNFSLDK
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  INELASLWEKKIGRTLPRVTVEEDDLAAAEMCIPEISIVASFTHDIFIKGCQVNFSLDK
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  INELASLWEKKIGRTLPRVTVEEDDLAAAEMCIPEISIVASFTHDIFIKGCQVNFSLDK
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  PTDLEATSLYPQMQRITIDECFDEFVEKIMGGQAAAEKAAGKEGIVVPASAPDALVITAT
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  PTDLEATSLYPQMQRITIDECFDEFVEKIMGGQAAAEKAAGKEGIVVPASAPDALVITAT
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  PTDLEATSLYPQMQRITIDECFDEFVEKIMGGQAAAE----KEGIVVPASAPDALVITAT
peptide/1-15

tr|Q3S9L6|Q3S9L6_VITVI/1-362  CA
tr|Q4W2K6|Q4W2K6_VITVI/1-362  CA
tr|D7SIV3|D7SIV3_VITVI/1-358  CA
peptide/1-15

```

**Figure 34 :** *Blasts* des peptides antigéniques dirigé contre les protéines LAR1 (A) et LAR2 (B) dans la banque *Vitis vinifera* et alignements de séquences des protéines reconnues à 100% par les peptides antigéniques.

La séquence peptidique dirigée contre la protéine LAR1 (Figure 34 A) est reconnue par trois protéines de *Vitis vinifera* (Q4W2K4, Q4W2K5 et Q3KN76) mais ne présente 100% d'homologie qu'avec la protéine Q4W2K4, notre protéine d'intérêt. Concernant la protéine LAR2 (Figure 34 B), le blast du peptide antigénique dans les banques *Vitis vinifera* a révélé 100% d'homologie avec deux protéines LAR2 de *Vitis vinifera* de 362 acides aminés (Q3S9L6 et D7SIV3) dont notre protéine d'intérêt (Q3S9L6) et 92% avec une LAR2 de *Vitis vinifera* de 358 acides aminés (Q4W2K6). Pour la protéine ANR, la séquence peptidique est reconnue par quatre protéines de *Vitis vinifera* (Q7PCC4, Q5FB34, D7U6G6 et A5AER1) de 338 acides aminés et de 100 % d'homologie (Figure 35). Parmi ces quatre protéines, deux ne sont pas caractérisées et les deux autres sont reconnues comme ANR dont la protéine Q7PCC4, notre protéine d'intérêt.



Detailed BLAST results

| Alignments | Accession | Entry name   | Status | Protein Names                                    | Organism               | Length | Identity | E-Value              |
|------------|-----------|--------------|--------|--------------------------------------------------|------------------------|--------|----------|----------------------|
|            | Q7PCC4    | Q7PCC4_VITVI | ★      | Anthocyanidin reductase                          | Vitis vinifera (Grape) | 338    | 100.0%   | 2.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | Q5FB34    | Q5FB34_VITVI | ★      | Anthocyanidin reductase                          | Vitis vinifera (Grape) | 338    | 100.0%   | 2.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | D7U6G6    | D7U6G6_VITVI | ★      | Whole genome shotgun sequence of line PN40024... | Vitis vinifera (Grape) | 338    | 100.0%   | 2.0×10 <sup>-4</sup> |
|            | ASAER1    | ASAER1_VITVI | ★      | Putative uncharacterized protein                 | Vitis vinifera (Grape) | 338    | 100.0%   | 8.0×10 <sup>-2</sup> |

Job information

Query sequence: TTVRDPDNQKKVSHC

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 MATQHPIGKKTACVVGGTGFVASLLVKLLLQKGYAVNTTVRDPDNQKKVSHLLELQELGD
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 MATQHPIGKKTACVVGGTGFVASLLVKLLLQKGYAVNTTVRDPDNQKKVSHLLELQELGD
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 MATQHPIGKKTACVVGGTGFVASLLVKLLLQKGYAVNTTVRDPDNQKKVSHLLELQELGD
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 WPPSTPSERRPHV33AAPDLLHLCWLSFCCRRAMLSTPLYRDPDNQKKVSHLXLQELGD

```

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 LKIFRADLTDELSFEAPIAGCDFVFHVATFVHFASEDPENDMIKPAIQGVVVMKACTRA
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 LKIFRADLTDELSFEAPIAGCDFVFHVATFVHFASEDPENDMIKPAIQGVVVMKACTRA
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 LKIFRADLTDELSFEAPIAGCDFVFHVATFVHFASEDPENDMIKPAIQGVVVMKACTRA
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 LKIFRADLTDELSFEAPIAGCDFVFHVATFVHFASEDPENDMIKPAIQGVVVMKACTRA

```

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 KSVKRVILTSSAAAVTINQLDGTGLVVDENWTDIEFLTSAKPPTWGPASKT LAEKAAN
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 KSVKRVILTSSAAAVTINQLDGTGLVVDENWTDIEFLTSAKPPTWGPASKT LAEKAAN
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 KSVKRVILTSSAAAVTINQLDGTGLVVDENWTDIEFLTSAKPPTWGPASKT LAEKAAN
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 KSVKRVILTSSAAAVTINQLDGTGLVVDENWTDIEFLTSAKPPTWGPASKT LAEKAAN

```

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 KFAEENNIDLITVIPTLMAGSSSLTSDVPSSIGLAMSLITGNEFLINGMKGMQMLSGSVSI
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 KFAEENNIDLITVIPTLMAGSSSLTSDVPSSIGLAMSLITGNEFLINGMKGMQMLSGSVSI
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 KFAEENNIDLITVIPTLMAGSSSLTSDVPSSIGLAMSLITGNEFLINGMKGMQMLSGSVSI
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 KFAEENNIDLITVIPTLMAGSSSLTSDVPSSIGLAMSLITGNEFLINGMKGMQMLSGSVSI

```

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 AHVEDVCAHIFVAEKESASGRYICCAANTSVPELAKFLSKRYPQYKVPTDFGDFPFXSK
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 AHVEDVCAHIFVAEKESASGRYICCAANTSVPELAKFLSKRYPQYKVPTDFGDFPFXSK
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 AHVEDVCAHIFVAEKESASGRYICCAANTSVPELAKFLSKRYPQYKVPTDFGDFPFXSK
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 AHVEDVCAHIFVAEKESASGRYICCAANTSVPELAKFLSKRYPQYKVPTDFGDFPFXSK

```

peptide/1-15

```

tr|D7U6G6|D7U6G6_VITVI/1-338 LIISSDKLVKEGFSFKYGIEEYDESVEYFKAGLLQN
tr|Q5FB34|Q5FB34_VITVI/1-338 LIISSDKLVKEGFSFKYGIEEYDESVEYFKAGLLQN
tr|Q7PCC4|Q7PCC4_VITVI/1-338 LIISSDKLVKEGFSFKYGIEEYDESVEYFKAGLLQN
tr|ASAER1|ASAER1_VITVI/1-338 LIISSDKLVKEGFSFKYGIEEYDESVEYFKAGLLQN

```

**Figure 35 :** Blast du peptide antigénique dirigé contre la protéine ANR dans la banque *Vitis vinifera* et alignement de séquences des protéines reconnues à 100% par le peptide antigénique.

Chaque animal a subi 4 immunisations et les sérums ont été contrôlés par ELISA avant la première immunisation et après la dernière. La méthode utilisée pour purifier les anticorps est la chromatographie d'affinité sur protéine G sepharose 4 fast flow et la pureté des produits a été analysée sur gel d'électrophorèse SDS PAGE (polyacrylamide 13,5% en conditions dénaturantes, coloration au bleu de Coomassie).

Les volumes et les concentrations obtenues pour les anticorps primaires purifiés sont les suivants :

- ✓ Anti-LAR 1 : 70 ml à 8,8 mg.ml<sup>-1</sup>
- ✓ Anti-LAR 2 : 4 ml à 7,4 mg.ml<sup>-1</sup>
- ✓ Anti-ANR : 12 ml à 3,6 mg.ml<sup>-1</sup>

## VII.2 Vérification de la spécificité des anticorps primaires polyclonaux

Afin de confirmer la spécificité des peptides antigéniques envers les protéines d'intérêt, des *western-blot* ont été réalisés sur des extraits de protéines totales de pellicules de baie de raisin ou de fleurs de vigne.

### VII.2.a Matériel végétal

La spécificité des anticorps primaires dirigés contre les protéines PME, PG a été étudié sur des extraits de protéines totales de pellicules de baies de Cabernet-sauvignon (Parcelle 3, millésime 2009) au stade maturité, stade pour lequel l'activité et l'expression sont les plus élevées. Les expériences concernant les protéines LAR 1 et LAR 2 ont été réalisées sur des pellicules de baies au stade vert (parcelle 3, Cabernet-sauvignon, millésime 2009) tandis que celles concernant la protéine ANR ont été effectuées sur des fleurs (parcelle 3, Merlot, millésime 2010).

### VII.2.b Extractions des protéines totales

Le protocole utilisé est celui de Deytieux (2007), adapté de Saravanan et Rose (2004). Les pellicules de 20 baies sont séparées et broyées finement dans l'azote liquide. Pour l'extraction des protéines totales de fleurs, 2 g de fleurs ont été broyées dans l'azote liquide. Trois volumes (p/v) de tampon d'extraction sont ajoutés sur le matériel végétal, dans un tube en téflon pour centrifugeuse. Ce tampon est composé de :

- |                          |       |
|--------------------------|-------|
| ✓ PVPP                   | 1 %   |
| ✓ Saccharose             | 0,7 M |
| ✓ Chlorure de potassium  | 0,1 M |
| ✓ Tampon Tris HCl pH 7,5 | 0,5 M |
| ✓ EDTA                   | 10 mM |

- ✓ PMSF dissous dans l'éthanol 1 mM
- ✓  $\beta$  mercaptoéthanol 2 %

L'extrait est homogénéisé sur une table d'agitation pendant 30 min dans la glace fondante. Un volume égal d'une solution de phénol (Phe-Tris HCl pH 7,5) est ajouté au mélange. Le tout est bien agité et homogénéisé comme précédemment pendant 30 minutes. L'extrait est centrifugé à 9000 g, pendant 30 min à 4°C et la phase phénolique supérieure est récupérée. La phase aqueuse est extraite de nouveau par ajout de 2 ml de tampon d'extraction et 2 ml de phénol. Ce mélange est agité pendant 15 min puis centrifugé comme précédemment ; la phase phénolique supérieure étant récupérée et ajoutée à la première.

Cette phase phénolique est ensuite lavée trois fois avec un volume égal de tampon d'extraction pour éliminer le maximum d'agents contaminants, tels que les composés phénoliques.

A la phase phénolique sont ajoutés 5 volumes d'une solution d'acétate d'ammonium dans du méthanol à la concentration de 0,1 M. La précipitation des protéines a lieu toute la nuit à – 20°C. Le culot protéique est récupéré après centrifugation à 9000 g pendant 30 min à 4°C et subit plusieurs lavages à l'aide :

1. d'acétate d'ammonium dans le méthanol à 0,1 M
2. de méthanol froid, 2 fois
3. d'acétone 80 % froid, 2 fois.

Entre chaque lavage, le culot dans la solution de lavage est agité au vortex puis soniqué 3 fois 1 min. Les tubes sont ensuite laissés au repos 15 min à – 20°C avant d'être centrifugés 20 min à 9000 g et à 4°C. A la fin des lavages, le culot est finalement séché sous flux d'azote.



## VII.2.c Western-blot

### VII.2.c.i Protocole

Les culots protéiques sont repris dans du tampon Laemmli (Tris-HCl 0,05 M pH 6.8 , SDS 2 %, saccharose 5%, DTT 0,1 M, bleu de bromophénol 0.5 mg.ml<sup>-1</sup>) et solubilisés 3 min à 100°C. Les échantillons sont ensuite mis à migrer en gel de polyacrylamide 10%.

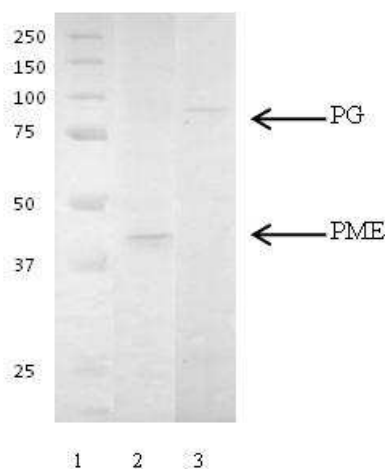
Les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Pour cela, une membrane et 4 papiers Whatman 3M sont découpés à la taille de gel et trempés dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 200mM, méthanol 20%). Le « sandwich » pour le transfert des protéines est composé du côté noir de la cassette, d'un scotch brite, de 2 papiers Whatman, du gel de protéines (d'épaisseur 0,75 mm), de la membrane, de 2 papiers Whatman, d'un scotch brite et du côté rouge de la cassette. La migration est réalisée à 200mA (voltage limitant 100V), pendant 1H30 et à température ambiante.

La membrane est saturée avec la solution de blocage (Lait écrémé 5 %, Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1 %) pendant 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4°C. Le tampon de blocage est éliminé puis la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage avec un volume correspondant à 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de membrane. La membrane est lavée dans un premier tampon de lavage (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 1 M, Tween 20 0,25 %) pendant 30 min sous agitation et en changeant le tampon toutes les 5 min. Elle subit ensuite deux autres lavages de 5 min dans du tampon Tris 10 mM pH 7,5 avec 1M de NaCl et 0,1 % de Tween 20. La membrane est incubée pendant 1 heure avec les anticorps secondaires commerciaux conjugués à la peroxydase dilués dans du tampon de blocage (volume : 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de membrane). La membrane est de nouveau lavée dans le premier tampon de lavage pendant 30 min sous agitation en changeant le tampon toutes les 5 min puis dans le second tampon de lavage deux fois 5 min.

La membrane est incubée avec le kit de détection (Opti-4CN Substrate Kit de BIO-RAD) sous agitation pendant 30 min ou jusqu'à ce que le niveau de sensibilité désiré soit atteint. La membrane est ensuite lavée à l'eau bi-distillée pendant 15 min et scannée.

### VII.2.c.ii Résultats

Afin de confirmer la spécificité des anticorps primaires dirigés contre les protéines PME et PG, des westerns blot ont été réalisés sur des protéines de pellicules de Cabernet-sauvignon au stade récolte (Figure 36). Concernant, la protéine PME, deux bandes ont été détectées à 25 kDa, ce résultat confirme la spécificité de la protéine, les deux autres bandes visualisées sur la membrane pourraient correspondre à une forme de phosphorylation de la protéine. Un western blot sur gel 2D a été réalisé dans le but de confirmer cette hypothèse mais malheureusement les quantités trop faibles de PME n'ont pas permis de la visualiser. Néanmoins, une analyse LC-MS a été entreprise pour confirmer la présence de la protéine. Pour la protéine PG, une bande a été détectée par les anticorps anti-PG, confirmant la spécificité de reconnaissance des anticorps pour la protéine. La taille de la bande observée est supérieure à la taille attendue (47,42 kDa) mais l'étude des séquences blastées avec l'anti-corps anti-PG, n'a pas permis d'infirmer la spécificité. La différence de taille peut provenir d'une modification de conformation de la protéine lui permettant de migrer plus loin dans le gel.



**Figure 36** : Western-blot sur protéines extraites de pellicules de baies de Cabernet-sauvignon au stade récolte.

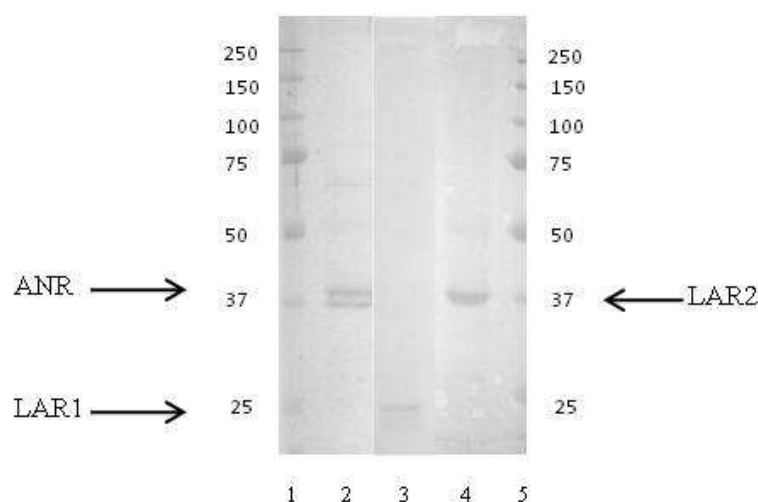
*Ligne 1, marqueur de poids moléculaire (Precision Plus protein standards all blue prestained, Bio-rad) ; lignes 2 et 3, extraits protéiques. Ligne 2, l'anticorps reconnaît une seule bande protéique, 43 kDa, dans l'extrait protéique. Ligne 3, l'anticorps reconnaît une seule bande protéique, 90 kDa, dans l'extrait protéique.*

Pour confirmer la spécificité des anticorps contre la protéine ANR, un western blot a été réalisé sur des protéines de fleurs de Cabernet-sauvignon (Figure 37). Deux bandes ont été détectées à 37 kDa, ce résultat confirme la spécificité de la protéine, la deuxième bande visualisée sur la membrane pourrait correspondre à une forme de phosphorylation de la

protéine. Un western blot réalisé sur gel 2D a été réalisé dans le but de confirmer cette hypothèse mais malheureusement les quantités trop faibles d'ANR n'ont pas permis de la visualiser.

Pour confirmer la spécificité des anticorps contre la protéine LAR1, un western blot a été réalisé sur des protéines de pellicules de Cabernet-sauvignon au stade fermeture de grappe (Figure 37). Trois bandes ont été détectées à 25 kDa, ce résultat confirme la spécificité de la protéine, les deux autres bandes visualisées sur la membrane pourraient correspondre à une forme de phosphorylation de la protéine. De la même manière que pour l'ANR, un western blot sur gel 2D a été réalisé dans le but de confirmer cette hypothèse mais malheureusement les quantités trop faibles de LAR n'ont pas permis de la visualiser.

De la même manière que pour les anti-corps précédents, l'anti-corps LAR2 a été testé par western-blot (Figure 37). Une seule bande a été détectée à 38 kDa, confirmant la spécificité de l'anti-corps.



**Figure 37 :** Western-blot sur protéines extraites de fleurs, ligne 2, et de pellicules de baies, lignes 3 et 4 de Cabernet-sauvignon au stade fermeture de grappe.

Ligne 1, marqueur de poids moléculaire (*Precision Plus protein standards all blue prestained, Bio-rad*) ; lignes 2, 3 et 4, extraits protéiques. Ligne 2, l'anticorps reconnaît deux bandes protéiques, 38 kDa, dans l'extrait protéique. Ligne 3, l'anticorps reconnaît deux bandes protéiques, 25 kDa, dans l'extrait protéique. Ligne 4, l'anticorps reconnaît une bande protéique 38 kDa, dans l'extrait protéique.

## VII.2.d Analyse LC-MS

### VII.2.d.i Protocole

Les spots des protéines d'intérêt sont repérés sur le gel de polyacrylamide 10 %, lavés pendant 4 heures dans un mélange d'eau et d'acétonitrile (ACN) à 50%, (v/v) et digérés selon le protocole décrit par Deytieux *et al.* (2007).

Les mélanges peptidiques sont analysés par un système HPLC (LC Packings, Amsterdam) couplé à un spectromètre de masse équipé d'une trappe linéaire (LTQ OrbiTrap) (ThermoFinnigan, San José, CA).

Les peptides sont séparés sur une colonne C18 PepMap™ de 15 cm et de 75 µm de diamètre interne équipée d'une précolonne C18 PepMap™ de 5mm et 300 µm de diamètre interne.

Le débit de la colonne est de 200 nl/min et les peptides sont élués par un gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B en 35 min (solvant A : 0,1 % d'acide formique, 5 % D'ACN et 95 % d'eau ; solvant B : 0,1 % d'acide formique, 80 % d'ACN et 20 % d'eau). Le spectromètre de masse opère en mode positif avec un voltage appliqué de 2 kV. Les données sont enregistrées en alternant un scan MS sur la gamme  $m/z$  300-1700 et 5 scans MS/MS en mode d'exclusion dynamique, chaque ion étant fragmenté une seule fois.

Les données issues de la fragmentation MS/MS ont été analysées par le logiciel Biowoks (ThermoFinnigan, Torrence, CA) utilisant l'algorithme SEQUEST. La banque interrogée est la banque NCBI de l'espèce *Vitis vinifera*. L'oxydation des méthionines (+16) et la carbométhylation des cystéines (+57) sont considérées comme modifications différentielles. Seuls les peptides ayant un score de corrélation Xcorr supérieur à 1,9 (peptide monochargé), 2,2 (peptide dichargé), 3,75 (peptide trichargé) et 4 (peptide quadrichargé ou plus) sont retenus. Dans tous les cas, le  $\Delta C_n$  doit être supérieur à 0,1. Les protéines identifiées sur la base d'un peptide unique sont rejetées.

### VII.2.d.ii Résultats

L'analyse des bandes de gel n'a permis d'identifier qu'une seule protéine : la PME. Les séquences peptidiques détectées correspondent à la protéine PME1, Q94B16, notre protéine d'intérêt et une protéine non caractérisée mais identifiée comme une PME, A5AUKI.

L'alignement de ces deux protéines montre que leurs séquences diffèrent sur les 45 derniers acides aminés (Figure 38).

```

|Q94B16_VITVI/1-531 MASLLRTRLNQFSLPFTTIFFFIFSCSSSTFASSSDEEANLKLQSQCLAVPSSAFISSLK
|ASAUK1_VITVI/1-534 MASLLRTRLNQFSLPFTTIFFFIFSCSSSTFASSSDEEANLKLQSQCLAVPSSAFISSLK

|Q94B16_VITVI/1-531 STIDVLRGTMSVVSQFTKVFNDFRLSNAISDCLELLDFAADDLSWSLSAIQNPRGKDNGT
|ASAUK1_VITVI/1-534 STIDVLRGTMSVVSQFTKVFNDFRLSNAISDCLELLDFAADDLSWSLSAIQNPRGKDNGT

|Q94B16_VITVI/1-531 GDIGSDLKTWLSSTFTNQDTCIEGFVGTNGIVKTVVAESLSQVASLVHSLLTVMVHDPAPK
|ASAUK1_VITVI/1-534 GDIGSDLKTWLSSTFTNQDTCIEGFVGTNGIVKTVVAESLSQVASLVHSLLTVMVHDPAPK

|Q94B16_VITVI/1-531 GKSNNGGGGVKGVGSGDFPSWVGKHSRKLQASSVSPDVTVAADGTGNVTTVMQAAAP
|ASAUK1_VITVI/1-534 GKSNNGGGGVKGVGSGDFPSWVGKHSRKLQASSVSPDVTVAADGTGNVTTVMQAAAP

|Q94B16_VITVI/1-531 DYSQNHVYIYIKQGIYRENVEIKKKKWNLMVGDGMGATVITGNRSYIDGWTTYASATFA
|ASAUK1_VITVI/1-534 DYSQNHVYIYIKQGIYRENVEIKKKKWNLMVGDGMGATVITGNRSYIDGWTTYASATFA

|Q94B16_VITVI/1-531 VKGKGFIARDMTFENTAGPEKHQAVALSDDLSVYYRCMRGYQDTLYPHTNRQFYREC
|ASAUK1_VITVI/1-534 VKGKGFIARDMTFENTAGPEKHQAVALSDDLSVYYRCMRGYQDTLYPHTNRQFYREC

|Q94B16_VITVI/1-531 RISGTVDVFIFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAQGRKDPAQPTGFSIQFSNISADS
|ASAUK1_VITVI/1-534 RISGTVDVFIFGDATVVFQNCQILVKKGLPNQKNTITAQGRKDPAQPTGFSIQFSNISADS

|Q94B16_VITVI/1-531 DLLASVNSTLSYLGRFPWKQYSRTIIMKSYISDAIRPEGWLEWNGDFALDTLYYGEYMYG
|ASAUK1_VITVI/1-534 DLLASVNSTLSYLGRFPWKQYSRTIIMKSYISDAIRPEGWLEWNGDFALDTLYYGEYMYG

|Q94B16_VITVI/1-531 PSAGLGSRVQWPGFHLLNNSAQANFTVTEFIAGN-LWLPSTGVKYSAGLAV--
|ASAUK1_VITVI/1-534 PSAGLGSRVQWPGFSSVEQLRSGRQLHGDRHSRKPFVAAVDRGEIFSRISSLKQ

```

**Figure 38** : Alignement des séquences protéiques des deux protéines reconnues par l'anticorps dirigé contre la protéine PME.

### VII.3 Immunomarquage en *post-embedding*

Les immunomarquages ont été réalisés après inclusion ou en *post-embedding* avec l'automate d'immunomarquage, IGL (Leica, Microsystems).

Toutes les étapes se déroulent à température ambiante et deux types de contrôle ont été réalisés : omission de l'anticorps primaire et quand les sérums étaient à disposition, remplacement de l'anticorps primaire par du sérum préimmun.

Dans un premier temps, les échantillons sont incubés pendant 15 min dans du tampon PBS contenant 50 mM de glycine puis dans deux bains successifs de 15 min de tampon PBS à 1 % d'albumine de sérum de bœuf (BSA). Les grilles sont ensuite rincées pendant 10 min (2 bains de 5 min) dans du tampon d'incubation (IB) composé de PBS et de 0,1 de BSA-c (BSA dénaturée permettant un blocage plus fin des sites aspécifiques). Les coupes sont ensuite incubées 1 heure en présence de l'anticorps primaire dilué dans de l'IB. Les grilles sont lavées

trois fois 5 min dans de l'IB puis trois fois 5 min dans du PBS. Les anticorps primaires sont incubés pendant 90 min et ainsi détectés par des anticorps secondaires dirigés contre l'espèce des anticorps primaires couplé à de l'or colloïdal dilués dans de l'IB (Tableau IX). Un dernier bain dans du PBS à 1% de glutéraldéhyde permet de fixer l'immunomarquage. Pour finir, les échantillons sont lavés dans du PBS (2 bains de 5 min) et dans l'eau distillée (6 bains de 1 min) puis rincés sous filet d'eau pendant 15 secondes avant d'être séchés et rangés.

**Tableau IX** : Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la localisation des protéines PME, PG, LAR1, LAR2 et ANR.

| <b>Protéine</b>                                         | <b>Anticorps primaire</b> | <b>Anticorps secondaire, taille des particules d'or</b> |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|
| Pectine méthyl extérase<br><b>PME1</b>                  | Souris                    | Chèvre anti-Souris<br>6 nm                              |
| Polygalacturonase<br><b>PG1</b>                         | Lapin                     | Chèvre anti-Lapin<br>6 nm                               |
| Putative leucoanthocyanidine<br>réductase 1 <b>LAR1</b> | Lapin                     | Chèvre anti-Lapin<br>6 nm                               |
| Leucoanthocyanidine réductase 2<br><b>LAR2</b>          | Souris                    | Chèvre anti-Souris<br>6 nm                              |
| Anthocyanidine réductase<br><b>ANR</b>                  | Rat                       | Chèvre anti-Rat<br>10 nm                                |

#### **VII.4 Observations en microscopie en transmission**

Après avoir été contrastées, les grilles ont été observées avec un microscope électronique à transmission à 120kV (Tecnai 12, FEI).

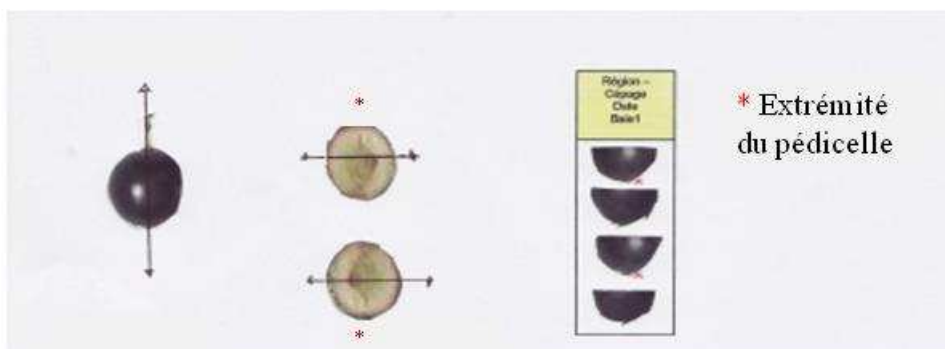
## VIII. Techniques utilisées pour la cartographie de composants cellulaires

Cette étude a été menée en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse et de chimie laser (LSMCL) de l'Université Paul Verlaine de Metz. Les objectifs étaient d'identifier et de cartographier des composants cellulaires de la pellicule de baie de raisin prélevés à différents stades de maturité. Les analyses ont été effectuées par spectrométrie de masse au LSMCL. Deux approches ont été menées en parallèle : la cartographie de pellicules de baies de raisin par désorption/ionisation laser associée à un spectromètre de masse à temps de vol (LDI-TOFMS) et leurs extraits méthanoliques par électrospray couplée à un spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (ESI-FTICRMS).

### VIII.1 Echantillons analysés

Des extraits méthanoliques de pellicules entières ainsi que de fractions pariétales ont été obtenus suivant le protocole précédemment décrit dans le chapitre 2, paragraphe IV.2.c. Ils sont issus de pellicules de baies de raisins récoltées à différents stades de maturité (fermeture de grappe, fin véraison (80%) et récolte) pour les années 2008 et 2009 puis conservés à -80°C.

Pour cartographier ces composants au niveau tissulaire, des pellicules de baie de raisin prélevées dans l'azote au cours des millésimes 2008 et 2009, ont été découpées comme illustré dans la figure 39, puis rincées à l'eau distillée et séchées entre 2 lames de verre pendant 24 heures dans une étuve à 29°C. Les morceaux de pellicules ont ensuite été décollés avec de la vapeur d'eau, placés sur du papier absorbant pour ôter l'humidité et de nouveau séchées à l'étuve pendant 12 heures et enfin conservés à l'abri de l'humidité dans un dessiccateur jusqu'à analyse.

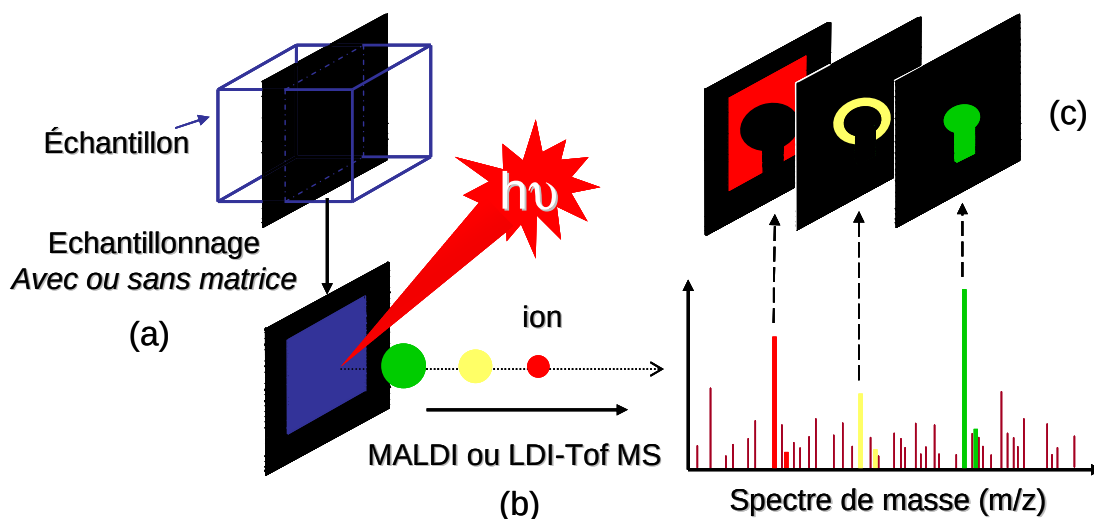


**Figure 39** : Orientation des coupes de pellicules de baies de raisin pour la cartographie des composants tissulaires par Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS).

Pour cartographier certains éléments minéraux dans la pellicule, la technique de spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) a été entreprise sur des coupes semi-fines préparées pour la microscopie photonique.

### VIII.2 Imagerie par spectrométrie de masse (IMS)

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS, Imaging Mass Spectrometry) combine la localisation spatiale des composés et la capacité analytique de la spectrométrie de masse (figure 40). Elle permet d'analyser localement la composition d'échantillons. L'imagerie par spectrométrie de masse se décline en trois étapes essentielles que sont, l'étape de préparation de l'échantillon (figure 40.a), puis l'analyse par spectrométrie de masse proprement dite (figure 40.b) et enfin le traitement informatique des résultats pour obtenir « une carte de répartition moléculaire » (figure 40.c).



**Figure 40 :** Schéma de principe d'une expérience d'imagerie par spectrométrie de masse (IMS).

Pour étudier les pellicules de baies de raisin par IMS, une partie de la pellicule est découpée puis déposée directement sur une plaque métallique et fixée par du ruban adhésif en aluminium. L'échantillon est contrôlé de manière à ce qu'il soit le plus plat possible pour assurer un impact régulier du laser.



Les coordonnées de la zone à cartographier sont établies à l'aide du logiciel CreateTarget qui définit trois spots de référence sur la plaque délimitant une zone de 4 mm<sup>2</sup>. Sachant que chaque pixel correspondra à la zone d'impact du laser conduisant à un spectre de masse, le pas des pixels est fixé à 50 µm pour une meilleure résolution de l'image. Dans ces conditions, le spot du laser ayant un diamètre de 10µm, la résolution de l'image est de 16000 points.

Pour l'obtention des spectres de masse, les paramètres de l'image sont importés dans le logiciel Flexcontrol (Bruker Daltonique) qui pilote le spectromètre de masse de type temps de vol (TOF). Ce système d'analyse a été utilisé dans le cadre des études *in-situ* des feuilles de vigne (Hamm, 2010 ; Hamm *et al.*, 2010). Son principe est basé sur la séparation des ions de rapports masse sur charge différents par des temps de parcours différents d'une même distance. Dans un premier temps, des ions de masse  $m$  et de charge  $ze$  sont accélérés par une différence de potentiel  $V$ .

Ils acquièrent une énergie cinétique donnée par :

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

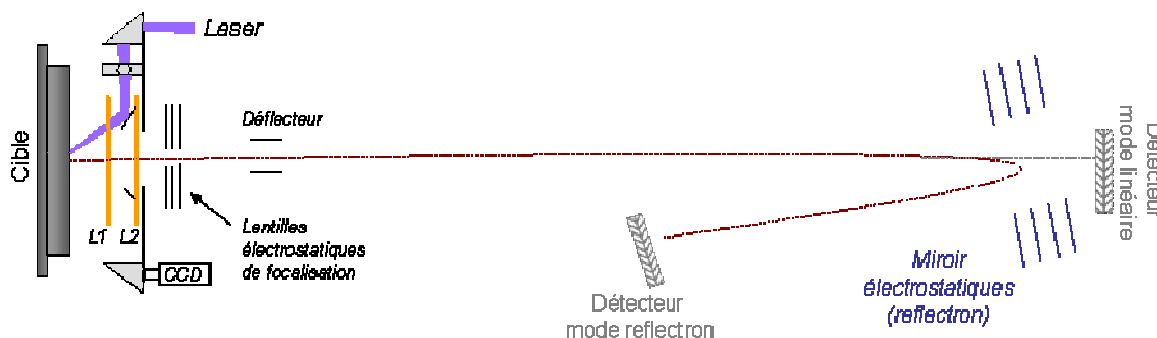
Ils possèdent alors une vitesse égale à :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}}$$

À cette vitesse, le temps qu'ils mettront à parcourir une longueur  $L$  sera donné par :

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} = K\sqrt{m/z}$$

Après accélération, les ions parcourent la zone libre de champ en un « temps de vol » proportionnel à leur rapport  $m/z$ . Les ions les plus légers sont détectés les premiers, les ions plus lourds parviennent au détecteur après un temps de vol plus long. Un schéma de principe d'un spectromètre à temps de vol est présenté sur la Figure 41.



**Figure 41** : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol.

Pour être séparés selon leurs temps de vol, les ions doivent être introduits dans l'analyseur par paquets de faible largeur spatiale et temporelle. Cela est réalisé par l'impulsion laser (quelques ns de temps d'impulsion avec un diamètre d'impact d'environ 10  $\mu\text{m}$ ) permettant à la fois de former des ions à partir de son interaction avec un échantillon solide et de définir l'origine du temps de départ des ions de la source vers l'analyseur.

Le spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS) utilisés dans le cadre de nos analyses est un instrument de type Bruker Reflex IV (Bruker-Daltonics, Brême, Allemagne) possédant comme source de désorption/ionisation un laser azote possédant une longueur d'onde de 337 nm. Il est également possible de travailler en mode de désorption/ionisation laser à 266 nm à l'aide d'un laser Nd:YAG quadruplé en fréquence.

Sur chaque pixel, 50 tirs laser conduisent à l'obtention de 50 spectres de masse qui seront moyennés. L'acquisition d'une image correspond donc à 80000 spectres de masse acquis en 4 heures grâce à une vitesse d'analyse élevée. Le logiciel AnalyseThis! convertit tous les spectres en un fichier image qui sera exploité par le logiciel BioMap. Ce logiciel permet d'obtenir une image de chaque rapport  $m/z$  sélectionné pour la zone cartographiée.

### VIII.3 Analyse en ESI-FTICRMS

Les échantillons analysés en ESI-FTICRMS sont des extraits de tannins de pellicules entières issus des baies de raisin prélevées aux stades fermeture de grappe, fin véraison et récolte au cours des millésimes 2008 et 2009, ainsi que de fractions pariétales issus des baies de raisin prélevées aux stades fermeture de grappe, fin véraison et récolte au cours du millésime 2009.

La source d'ionisation choisie pour cette étude est l'électrospray ou électronébulisation (ESI). Cette source est adaptée à l'étude de composés en solution et permet une caractérisation fine des polyphénols dont les flavonoïdes. C'est une ionisation douce, qui induit peu de fragmentation directement dans la source. Il est possible d'ioniser des molécules sur une large gamme de masse et de former également des ions multichargés. Les concentrations des échantillons préconisées sont comprises entre  $10^{-5}$  et de  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup> afin d'éviter la pollution de la source. Dans notre cas, les extraits de pellicules aux stades vert et fin véraison ont été dilués 10 fois tandis que les extraits issus des extraits de pellicule au stade récolte ont été dilués 100 fois.

L'ionisation est obtenue par application d'une différence de potentiel élevée (entre 3000 et 5000 volts) entre l'extrémité d'un capillaire et l'orifice du spectromètre. Cette tension fournit le gradient électrique nécessaire produisant une séparation de charges à la surface du liquide conduisant à la dispersion de l'échantillon sous forme de micro-gouttellettes. La désolvatation est permise par une température élevée et un rideau de gaz, le plus souvent composé de diazote (N<sub>2</sub>). La solution est alors sous forme d'ions en phase gazeuse qui peuvent être exploitables en spectrométrie de masse.

Dans cette étude les extraits pariétaux ont été étudiés uniquement en mode négatif, permettant la détection des ions déprotonés [M-H]<sup>-</sup> et des ions avec des adduits chlorures. Les extraits de pellicules entières ont été étudiés en mode négatif mais également, en mode positif, permettant l'observation des ions protonés [M+H]<sup>+</sup> ainsi que des adduits sodium et potassium.

Les analyses ont été effectuées avec un spectromètre de masse de type FTICR « Explorer QFT-9 » de la société IonSpec (Varian) doté d'un champ magnétique de 9.4T.

Le principe de la FTICR est le suivant : la trajectoire d'un ion s'incurve dans un champ magnétique intense. Si la vitesse de l'ion est faible et le champ assez fort, le rayon de courbure de la trajectoire de l'ion devient petit. L'ion peut ainsi être piégé sur une trajectoire circulaire dans le champ magnétique : c'est le mouvement cyclotron. Dans ce cas les ions sont piégés dans le plan xy, plan qui est perpendiculaire à la direction du champ magnétique (axe z). Pour piéger les ions suivant l'axe z, on utilise deux plaques de piégeages portées à un potentiel répulsif (positif pour analyser des cations et négatif pour des anions).

Détermination du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) :

$$\text{Force centripète : } F_1 = q \cdot v \cdot B \qquad \text{Force centrifuge : } F_2 = m \cdot \frac{v^2}{r}$$

Lorsque l'ion se stabilise sur une trajectoire circulaire, les deux forces sont égales, d'où la vitesse angulaire définie par :

$$\frac{v}{r} = \omega = \frac{q \cdot B}{m}$$

$$\text{ainsi : } 1/f = 2\pi \cdot \frac{B}{e} \cdot \frac{m}{z}$$

On aboutit ainsi sur une relation qui relie la fréquence et le rapport  $m/z$  de l'ion.

Avec :  $f$  : la fréquence cyclotronique *en Hertz* ;

$B$  : le champ magnétique *en Tesla* ;

$e$  : la charge élémentaire *en Coulombs* ;

$m$  : la masse de l'ion *en kilogramme* ;

$z$  : la charge de l'ion.

Exemple avec un champ magnétique de 9,4T :

Un ion de masse 300uma aura une fréquence cyclotronique d'environ 481 177Hz.

#### VIII.4 Technique SIMS

La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS) est une technique d'analyse physico-chimique de l'extrême surface. Elle est basée sur la détection des particules chargées (ions secondaires) produits sous l'effet d'un bombardement d'ions incidents (ions primaires). La nature des ions secondaires émis est intimement liée à celle de la surface de l'échantillon. De plus, les ions secondaires ne peuvent provenir que de l'extrême surface (10Å) ce qui fait du SIMS une des techniques les plus sensibles à la surface. Le phénomène SIMS est suffisamment général pour pouvoir analyser tout type de surface, les seules contraintes concernent les échantillons non compatibles avec l'ultravide. Les applications du SIMS sont

donc nombreuses : analyse élémentaire et moléculaire, profil en profondeur, imagerie ionique, identification chimique etc.

Dans notre étude, la technique du SIMS a été testée sur des coupes semi-fines de pellicules de baie de raisin de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe du millésime 2008. Les analyses ont été effectuées par le département des Sciences des matériaux et des procédés, PCPM, dirigé par Arnaud Delcorte, de l'unité de physico-chimie et de physique des matériaux de l'Université catholique de Louvain, Belgique.

## **IX. Analyse statistique**

Dans ce travail, différents logiciels de statistiques ont été utilisés. Les statistiques paramétriques (ANOVA, ACP, Test t de Student) ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica. Un grand nombre de données concernaient de petits échantillons, ainsi les statistiques non paramétriques ont été réalisées avec les utilitaires de l'association Anastat. Enfin pour les données sensorielles, une partie des traitements ainsi que l'analyse sensorielle descriptive (NF EN ISO 13299) a été directement réalisée avec le logiciel de dégustation FIZZ.

## **X. Analyse et traitement des images**

En microscopie photonique, les images ont été reconstituées par le logiciel Leica du microscope confocal SP2, puis déconvoluées et reconstituées en 3D par les logiciels Autoquant et Imaris. L'analyse de ces images a été réalisée avec le logiciel Metamorph.

## Chapitre 3 : Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin

---

Dans la baie de raisin, les tannins sont localisés dans les pépins et les pellicules. Leur étude, relativement récente par rapport aux travaux réalisés sur l'ensemble des composés phénoliques, apporte principalement des données chimiques et biochimiques. Peu de données concernent leur localisation spécifique dans la cellule, leur mode de transport ou leur mode de liaison avec d'autres composés cellulaires.

Dans les pépins, seules des procyanidines sont présentes : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et (-)-épicatéchine-3-O-gallate (Su et Singleton, 1969), alors que dans les pellicules, ces monomères sont présents ainsi que la prodelphinidine (-)-épigallocatechine (Kennedy *et al.*, 2001). Dans la pellicule (Amrani Joutei et Glories, 1994), les tannins peuvent être :

- ~ libres dans le suc vacuolaire, sous forme granuleuse ou sous forme d'amas plus ou moins grands surtout localisés au niveau du tonoplaste,
- ~ liés aux protéines et aux polysaccharides des membranes vacuolaires,
- ~ liés aux parois et plus spécifiquement aux polysaccharides pariétaux.

Les teneurs en tannins dans le péricarpe décroissent généralement des cellules de l'épiderme à celles de la pulpe dont les parois en sont dépourvues, à l'exception de quelques cellules du faisceau vasculaire (Amrani Joutei *et al.*, 1994). Un gradient de condensation a également été observé du mésocarpe vers l'épiderme : dans les couches profondes de la pellicule, les tannins sont peu condensés et localisés dans de petites vacuoles tandis que vers la périphérie, la taille des vacuoles et la condensation des tannins augmentent. Par ailleurs, la présence de tannins dans les parois suggère un transport intercellulaire. L'hypothèse d'une

migration centrifuge des tannins a été émise pour expliquer ce phénomène, les monomères subissant un transport apoplasmique ou symplasmique (Amrani Joutei, 1993).

Les derniers travaux de Gagné *et al.* (2006b), sur les tannins pelliculaires, ont mis en évidence une localisation majoritaire dans la fraction intracellulaire et seulement 10% des tannins totaux de la pellicule seraient associés aux parois. De plus, quelle que soit la localisation des tannins, la composition est relativement constante au cours du développement avec seulement quelques différences au niveau des unités terminales des polymères (les unités terminales de la fraction pariétale sont plus riches en prodelphinidine), suggérant des capacités d'interactions des tannins différentes, en fonction de leur localisation. De plus, le degré de polymérisation des tannins pariétaux étant plus élevé que celui des tannins de la fraction intracellulaire, ces résultats complètent les travaux d'Amrani Joutei en 1993 et 1994, et émettent l'hypothèse d'une condensation des tannins pariétaux par polymérisation et d'une condensation des tannins intracellulaires par auto-association des amas granuleux visibles dans la vacuole.

Ainsi, si maintenant il est admis qu'une partie des tannins pelliculaires peuvent être localisés dans les parois, aucunes données ne permettent d'expliquer comment ils se lient aux composés pariétaux et par quels types de liaison.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier les tannins pariétaux en combinant une approche biochimique et microscopique afin d'apporter des éléments nouveaux sur les modes de liaison des tannins avec certains composés pariétaux. Pour ce travail, deux approches innovantes ont été utilisées :

- la microscopie confocale permettant de localiser les tannins sans coloration dans la cellule grâce à leur autofluorescence,
- la digestion pariétale permettant de casser spécifiquement le maillage pectique de la paroi et ainsi libérer séquentiellement les tannins.

Ces résultats devraient également nous permettre de mieux comprendre comment les mécanismes de dégradation pelliculaire influencent les mécanismes d'extractibilité et de diffusion des tannins dans les moûts qui impactent directement la perception sensorielle de la

composante tannique. En effet, l'association des tannins à des protéines et à des polysaccharides, qui limiterait à la fois leur extractibilité et leur réactivité, permettrait de penser que seuls les tannins libres dans le suc vacuolaire seraient dotés de propriétés gustatives et seraient majoritairement extraits lors de la vinification.

## **I. Approche microscopique**

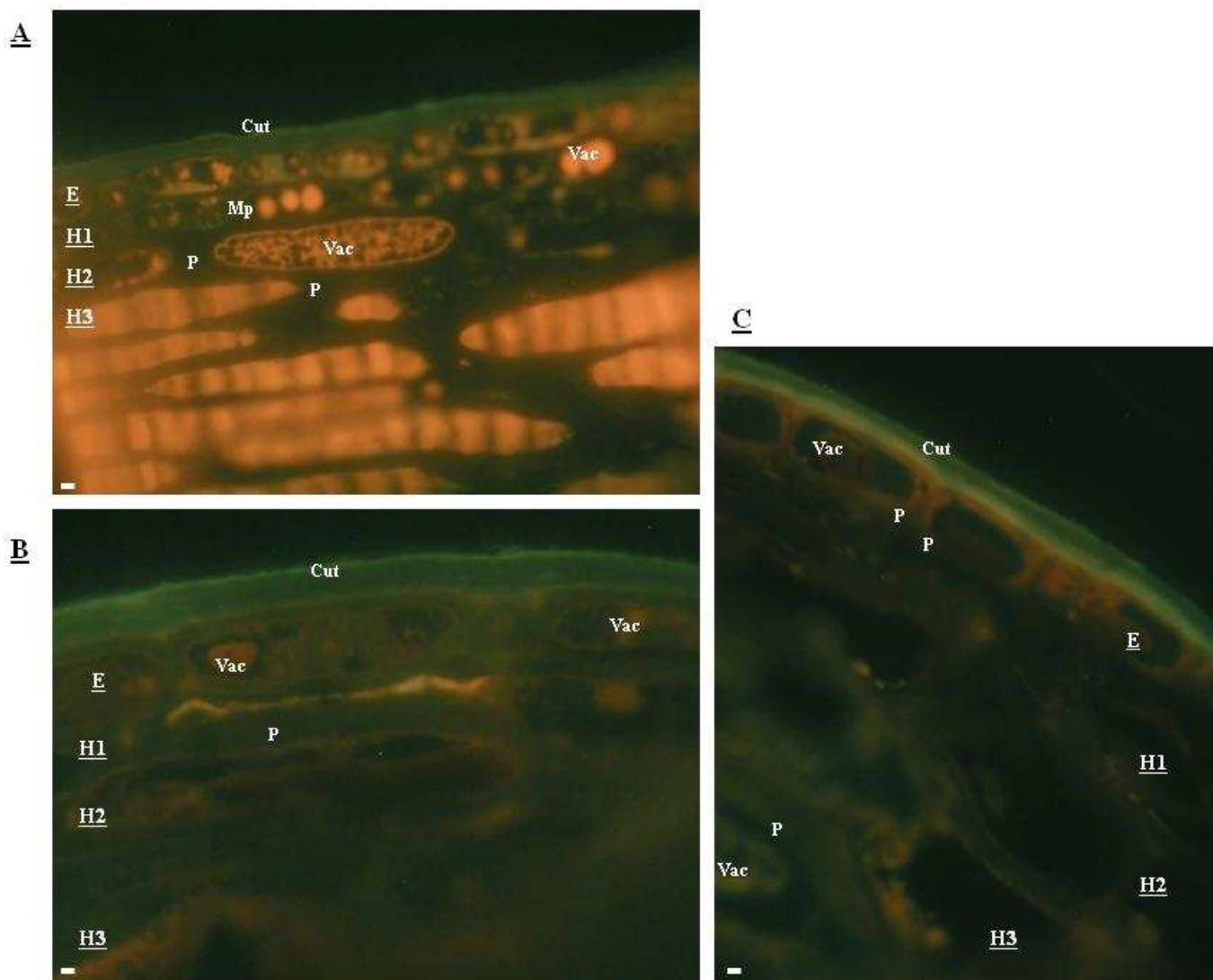
Généralement, l'étude de la localisation des composés phénoliques sur des coupes de tissus fixés est réalisée par observations après coloration des tissus au 4-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA) ou à la vanilline en milieu acide (Li *et al.*, 1996 ; Feucht *et al.*, 2004). Les travaux de Zeiger et Hepler, en 1979, ont mis en évidence l'autofluorescence verte des flavonols, sans traitement chimique et sous excitation en lumière bleue, et ainsi leur localisation dans les vacuoles de cellules d'oignon. Ces travaux ont été récemment confirmés par Sudo *et al.* (2009) en précisant la localisation de la quercétine, du kaempferol et de la naringénine dans les vacuoles des cellules épidermiques d'oignon. Nous avons choisi d'utiliser cette propriété d'autofluorescence des tannins pour observer leur localisation cellulaire sans coloration des tissus. Mais, avant d'être étudiées en microscopie confocale, les coupes de pellicules ont été observées sous lumière UV ainsi qu'en épifluorescence afin de vérifier la présence des tannins.

Cette étude a été menée sur des coupes semi-fines de pellicules de baies de raisin, cépage Cabernet-sauvignon, de la parcelle 3, du millésime 2008. Trois stades ont été étudiés : le stade fermeture de grappe, 80 % véraison et baie mûre correspondant à la récolte.

### **I.1 Observations sous lumière UV**

Les observations des coupes semi-fines de pellicules aux trois stades de développement étudiés sont présentées Figure 42. L'observation des tissus sous excitation UV et avec un filtre vert permet d'observer la chlorophylle en rouge et les composés phénoliques en bleu ou en jaune-orange.





**Figure 42** : Auto fluorescence des tannins (jaune à orange) sous lumière UV dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : **(A)** fermeture de grappe, **(B)** 80% véraison et **(C)** récolte. Abréviations : Cut, cuticule ; P, paroi cellulaire ; P Cut, paroi cuticularisée ; Vac, vacuole ; Mp, membrane plasmique ; E, épiderme ; H1, première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2, seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3, troisième assise cellulaire de l'hypoderme. Echelle : A, B, C : 0,5  $\mu$ m.

En fonction des stades observés, les tannins sont localisés dans l'espace intracellulaire mais également dans les parois des cellules :

- Au stade fermeture de grappe (Figure 42 **(A)**) les composés phénoliques sont essentiellement localisés dans l'espace intracellulaire au niveau des vacuoles et de la membrane plasmique. Dans les assises hypodermiques profondes, les tannins sont

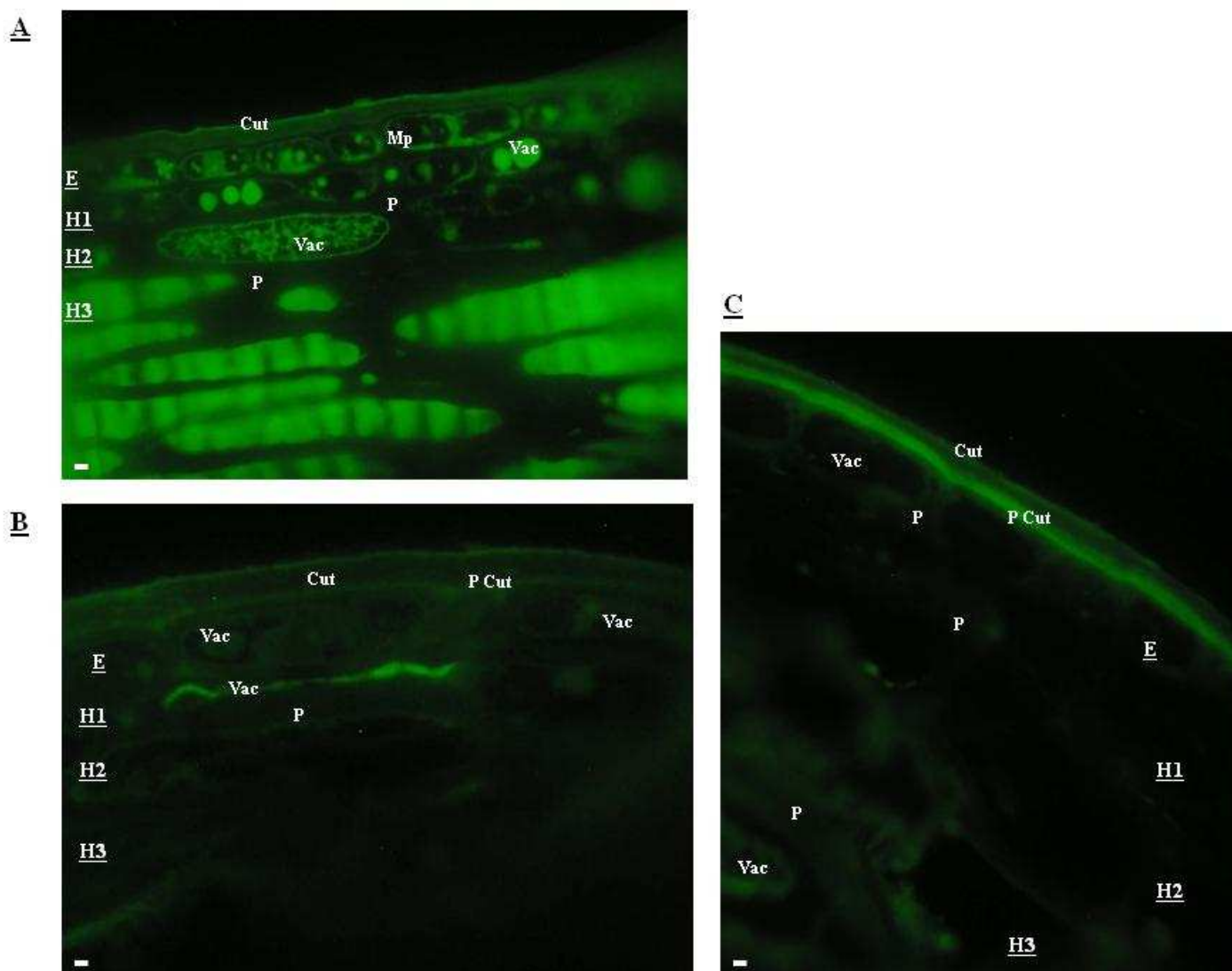
majoritairement vacuolaires et la coloration est homogène alors que dans les assises superficielles la coloration est présente sous forme d'amas et de granules. On observe également, un léger marquage des parois des assises épidermiques.

- En fin de véraison, Figure 42 (**B**), l'intensité de l'autofluorescence diminue dans l'espace intracellulaire quelles que soient les assises considérées. Par contre, elle augmente dans les parois, de l'épiderme et de la première assise hypodermique essentiellement, dont la couleur évolue vers l'orangé.

- A la récolte, Figure 42 (**C**), l'espace intracellulaire des assises hypodermiques est exempt de coloration jaune-orangé alors que les parois sont légèrement colorées en jaune. Au niveau des deux premières assises cellulaires (épiderme et première assise hypodermique), l'intensité de l'autofluorescence des composés phénoliques est plus marquée, principalement dans les parois qui présentent une coloration orange intense indiquant une forte concentration tannique. De plus, au niveau de l'épiderme, certaines vacuoles présentent encore une faible coloration orangée.

## **I.2 Observations en épifluorescence**

En lumière bleu, l'autofluorescence des composés phénoliques permet de les observer en vert (Zeiger et Hepler, 1979 ; Suco *et al.*, 2009). Les observations réalisées sur les coupes de pellicules de raisin aux trois stades de développement (fermeture de grappe, 80% véraison et récolte), confirment les observations réalisées sous UV et montrent à la fois une localisation intracellulaire et pariétale (Figure 43).



**Figure 43** : Autofluorescence des tannins (vert) en épifluorescence (lumière bleue) dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**) 80% véraison et (**C**) récolte. Abréviations : Cut, cuticule ; P, paroi cellulaire ; P Cut, paroi cuticularisée ; Vac, vacuole ; Mp, membrane plasmique ; E, épiderme ; H1, première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2, seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3, troisième assise cellulaire de l'hypoderme. Echelle : A, B, C : 0,5  $\mu$ m.

Dans la baie verte, Figure 43 (**A**), l'autofluorescence des composés phénoliques est essentiellement localisée dans les vacuoles, associée aux membranes plasmiques de la cellule et légèrement dans les parois cellulaires. On remarque également, une fluorescence de la cuticule.

Dans la baie à 80% véraison, Figure 43 (**B**), l'autofluorescence est plus faible et plus diffuse que dans la baie en début de développement. Cette technique permet de localiser les

composés phénoliques dans les vacuoles des deux premières assises cellulaires, dans les parois de l'ensemble des assises pelliculaires et également au niveau de la jonction entre la paroi externe de l'épiderme et la cuticule.

Dans les baies mûres, Figure 43 (C), l'autofluorescence est essentiellement présente au niveau des parois pour l'ensemble des assises cellulaires, dans l'espace intracellulaire au niveau de petites vacuoles et en petits amas à proximité de la membrane plasmique. L'autofluorescence de la zone de jonction entre la cuticule et la paroi externe de l'épiderme semble s'intensifier.

### **I.3 Etude des tannins pelliculaires en microscopie confocale**

La microscopie confocale augmente la résolution du microscope optique. Le but d'une observation en microscopie confocale est d'obtenir un signal fluorescent spécifique, durable et fort sans dégradation et respectant autant que possible les fonctions cellulaires. Pour que la microscopie soit quantitative, l'efficacité du processus doit être constante dans le temps et globalement homogène. Le principe consiste à observer des signaux fluorescents appartenant non plus à un volume mais à un plan focal, ce qui rend l'image de la fluorescence plus nette. Le « *pin hole* » rend ce phénomène possible en ne laissant passer qu'un seul point lumineux : généralement un laser. De ce fait, tous les points lumineux en dehors du plan focal ne sont pas détectés. Ainsi, le microscope confocal permet de balayer tous les points confocaux selon une série d'axes ou sections optiques. Les intensités lumineuses, pour chaque point, sont enregistrées par l'ordinateur qui produit une image digitale. La projection des différentes sections optiques par un logiciel approprié (dans notre cas trois logiciels ont été utilisés : le logiciel Leica du microscope confocal SP2, le logiciel Imaris et le logiciel Autoquant) permet alors de condenser l'information sur un plan, de naviguer par plans à travers ces données et de faire des reconstructions en relief.

L'intérêt d'une telle méthode dans notre étude, est d'observer la fluorescence spécifique des tannins et de préciser leur localisation en diminuant au maximum les signaux définis comme du bruit de fond. Pour cela, la détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission a été mise au point à partir de poudres commerciales de catéchine et épicatechine mais également de tannins pelliculaires en prenant compte des autres composés autofluorescents des végétaux tels que la chlorophylle. La mise au point de nos conditions

d'observation a été développée dans le chapitre 2, matériel et méthodes. Les observations ont été réalisées à des longueurs d'onde d'émission comprises entre 532 et 568 nm pour une excitation avec un laser argon 488 nm.

### **I.3.a Localisation des tannins**

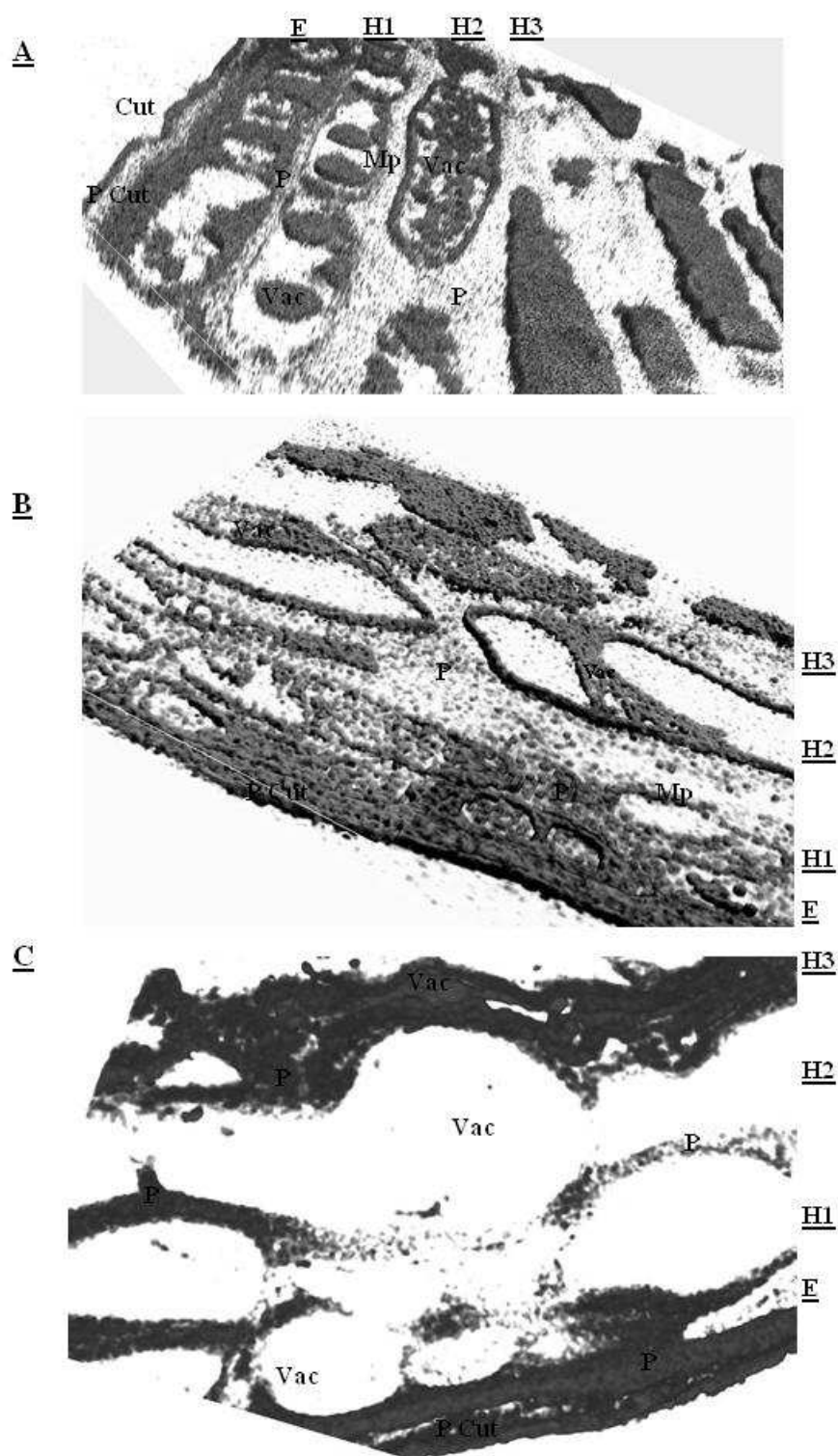
La Figure 44 présente les reconstructions en trois dimensions des empilements de sections optiques correspondant à l'autofluorescence spécifique des tannins dans les coupes de pellicules de raisin aux trois stades étudiés ; fermeture de grappe, 80% véraison et récolte. Pour chaque reconstruction, seul le « squelette tannique » de la pellicule est présenté.

Aux trois stades étudiés, l'autofluorescence des tannins est détectée dans la cuticule, les vacuoles et les parois cellulaires.

Au stade fermeture de grappe, Figure 44 (**A**), les tannins sont essentiellement présents dans les vacuoles et à proximité de la membrane plasmique, mais également à plus faible intensité, dans les parois cellulaires, surtout celle entre la cuticule et la paroi cellulaire externe de l'épiderme.

A 80% véraison, Figure 44 (**B**), les tannins sont localisés dans les vacuoles, au niveau de la membrane plasmique et de plus en plus dans les parois cellulaires. La « paroi cuticularisée » est également marquée par l'autofluorescence des tannins.

A maturité, Figure 44 (**C**), les vacuoles ne présentent que très peu de tannins alors que les parois cellulaires en sont riches.



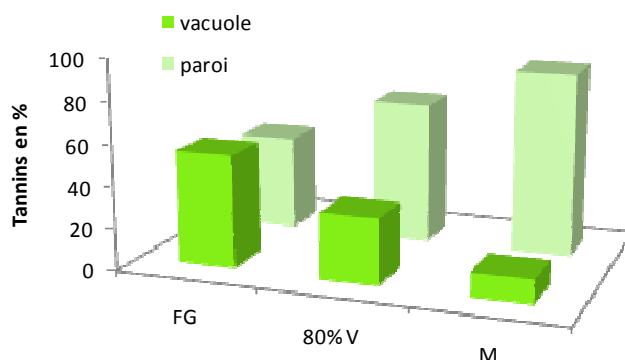
**Figure 44** : Reconstruction en 3D de l'autofluorescence des tannins en microscopie confocale à balayage dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon du millésime 2008, à différents stades de développement : (A) fermeture de grappe, (B) 80% véraison et (C) récolte. Abréviations : Cut, cuticule ; P, paroi cellulaire ; P Cut, paroi cuticularisée ; Vac, vacuole ; Mp, membrane plasmique ; E, épiderme ; H1, première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2, seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3, troisième assise cellulaire de l'hypoderme.

### **I.3.b Estimation de la répartition des tannins dans les différents compartiments cellulaires**

La microscopie confocale permet de localiser les tannins de la pellicule de raisin par un signal fluorescent spécifique. Les résultats obtenus confirment les observations réalisées sous UV ainsi qu'en épi-fluorescence. L'avantage majeur de cette technique est de pouvoir quantifier les intensités d'autofluorescence et donc de calculer la proportion des tannins selon leur localisation dans la cellule. Pour cela, à l'aide du logiciel Métamorph, une macro permettant de calculer l'intensité de la fluorescence émise dans les parois et dans les vacuoles a été développée. Une surface théorique de matériel végétal contenant autant de surface pariétale qu'autant de surface vacuolaire a été définie. Pour chacune des zones mesurées, le nombre de pixels par nm a été calculé et rapporté à la surface théorique. Ainsi, pour chaque cas, le calcul nous permet d'établir le pourcentage d'autofluorescence de chacun des compartiments cellulaires (vacuole et paroi) et de déterminer les proportions de répartition des tannins dans la pellicule.

Les mesures correspondent donc au pourcentage de tannins présents dans les vacuoles et dans les parois en fonction du stade de développement étudié. Trois stades ont été étudiés : fermeture de grappe, 80% véraison et maturité. Pour chaque cas, 20 sections de pellicules correspondant à 5 fruits différents ont été observées et pour chaque section, l'intensité de l'autofluorescence des tannins a été évaluée dans 10 zones de vacuoles et 10 de paroi. Ainsi, pour chaque stade, 400 mesures (200 de vacuoles et 200 de parois) ont été réalisées.

La Figure 45 présente les résultats des mesures d'intensités de fluorescence des tannins. Au cours de la maturation de la baie, la répartition des tannins pelliculaires au sein des cellules évolue de manière inverse. Ainsi, du stade vert à la récolte, la proportion des tannins intracellulaires diminue alors qu'elle augmente dans la paroi : au stade vert, les proportions de tannins pariétaux et vacuolaires sont proches (60% dans les vacuoles contre 40% dans les parois) alors qu'à la récolte, les tannins pariétaux peuvent représenter jusqu'à 90%) du pool total des tannins.



**Figure 45** : Répartition de l'autofluorescence (en %) des tannins pelliculaires dans les vacuoles et dans les parois cellulaires, à différents stades de développement de la baie de raisin : FG, fermeture de grappe (2008) : FG, fermeture de grappe ; 80% V, 80% véraison et M, maturité. Les mesures d'estimation ont été effectuées sur 20 sections différentes de pellicules de Cabernet-sauvignon, du millésime 2008 et 200 zones pour chaque compartiment cellulaire étudié ont été mesurées.

#### I.4 Discussion

L'approche microscopique par plusieurs techniques nous a permis, pour la première fois, de prouver la présence de tannins dans les parois cellulaires chez le raisin. La technique développée en microscopie confocale permet également d'évaluer l'intensité de l'autofluorescence des tannins et d'estimer leur proportion au sein des compartiments cellulaires.

Ainsi, que cela soit sous UV, en épi-fluorescence ou en microscopie confocale, nos résultats montrent la présence de tannins dans le compartiment intracellulaire et dans la paroi. On observe également, une coloration de la cuticule qui n'est pas directement due aux tannins mais aux acides férulique et p-coumarique présents dans la cuticule (Considine et Knox, 1979). Selon la profondeur des assises considérées et le stade de développement, les tannins sont localisés dans les vacuoles (sous forme homogène ou sous forme d'amas), proche de la membrane plasmique et **au sein de la paroi**. Ces résultats complètent ceux d'Amrani-Joutei et Glories (1994) qui avaient déjà observé sur leurs coupes des zones sombres pouvant correspondre à des tannins. A ce jour, seules deux études en microscopie confocale ont permis la localisation pariétale des composés phénoliques, sans pour autant apporter des informations sur l'agencement des tannins dans la paroi ou leur lieu de biosynthèse. Dans la première



étude, Hutzler *et al.* (1998) ont observé l'autofluorescence de composés phénoliques dans les parois cellulaires des tissus conducteurs de fève (*Vicia faba* L.), seigle (*Seca cereale*), prêle (*Equisetum arvense*) et épicéa (*Picea abies* (L.) Karst.). La seconde étude (Suco *et al.*, 2009) a été réalisée dans les cellules épidermiques d'oignon et rapporte la distribution des flavonols au sein des vacuoles mais également dans les parois cellulaires.

Au cours du développement de la baie, la répartition des tannins au sein de la pellicule évolue également, puisqu'ils semblent être en quantité importante dans les vacuoles des assises profondes au début de la maturation puis localisés préférentiellement dans la paroi des assises les plus externes en fin de maturation. Ces résultats sont, pour les assises profondes de la pellicule, en accord avec les observations de Fougère-Rifot *et al.* (1997) qui observent qu'au cours du grandissement cellulaire du péricarpe, les remaniements les plus apparents sont, entre autre, la diminution des teneurs en tannins vacuolaires des futures cellules de pulpe. En ce qui concerne les tannins pariétaux, nous sommes les premiers à les montrer et aucune référence bibliographique n'est à notre connaissance disponible à ce jour.

La technique de microscopie confocale a permis pour la première fois d'estimer les proportions des tannins entre les compartiments cellulaires étudiés. Si les proportions estimées sont peu différentes entre les tannins vacuolaires et les tannins pariétaux dans la baie verte, il n'en est pas de même à maturité où les tannins pariétaux peuvent représenter 90% du pool tannique total. Ces résultats ne sont pas conformes à ceux de Gagné *et al.* (2006) qui par une approche biochimique estimait à 10% la quantité de tannins pariétaux par rapport aux tannins totaux de pellicule. Cette différence peut s'expliquer par la méthode utilisée, la méthode de dosage chimique n'extrayant surement pas la totalité des tannins « emprisonnés » dans le maillage pectique mais permettant de libérer seulement les tannins les moins « accrochés » à la paroi ou localisés vers l'extérieur de celle-ci.

Ainsi, la microscopie permet de confirmer la présence de tannins dans la paroi des pellicules et de voir qu'ils étaient majoritaires dans ce compartiment cellulaire à maturité, mais elle n'apporte aucune information sur les teneurs ni sur la façon dont ces tannins sont organisés au sein de la paroi.

***L'approche microscopique nous a permis, pour la première fois, de montrer la présence de tannins dans les parois cellulaires chez le raisin. Au cours du développement de la baie, la répartition des tannins au sein de la pellicule évolue : les tannins sont localisés en quantité importante dans les vacuoles des assises profondes au début de la maturation puis localisés préférentiellement dans la paroi des assises les plus externes en fin de maturation.***

## **II. Etude des tannins pelliculaires par l'approche biochimique**

Les parois cellulaires représentent une structure complexe. Il est indispensable de visualiser cet ensemble comme un maillage polysaccharidique en 3 dimensions piégeant de nombreux composés tels que des protéines, des ions mais également des tannins (Nunan *et al.*, 1997). Il est donc difficile d'évaluer la teneur exacte en tannins de cette fraction. La rétention des polyphénols dans la paroi cellulaire dépend en grande partie de leur composition et de leur structure (conformation, flexibilité des chaînes polymériques, poids moléculaires, pourcentage de galloylation), mais également de la composition chimique des parois cellulaires ainsi que des modifications de leur structure (Vernhet *et al.*, 2002 ; Le Bourvellec *et al.*, 2004). Ainsi, selon Ortega-Regules *et al.* (2006), chez le raisin, il existerait une forte relation entre la composition de la paroi cellulaire et l'extractibilité des anthocyanes : la composition en galactose, arabinose et cellulose ainsi que le degré de méthylation des pectines augmenteraient l'extractibilité des anthocyanes.

L'approche microscopique nous a permis de confirmer la présence de tannins dans la paroi des cellules de la pellicule, mais aucune donnée n'est disponible sur leur mode d'arrangement dans cette fraction. Ainsi, par l'approche biochimique, notre objectif est d'une part, d'évaluer les teneurs en tannins présents dans la paroi mais également d'analyser les polysaccharides pariétaux afin d'évaluer les modes de rétention possibles des tannins dans le maillage pariétal.

Pour cela, il a été envisagé d'étudier conjointement la composition tannique et polysaccharidique de parois de cellules de pellicules à partir de fractions pariétales plus ou moins digérées par un cocktail enzymatique visant à mimer les mécanismes de dégradation

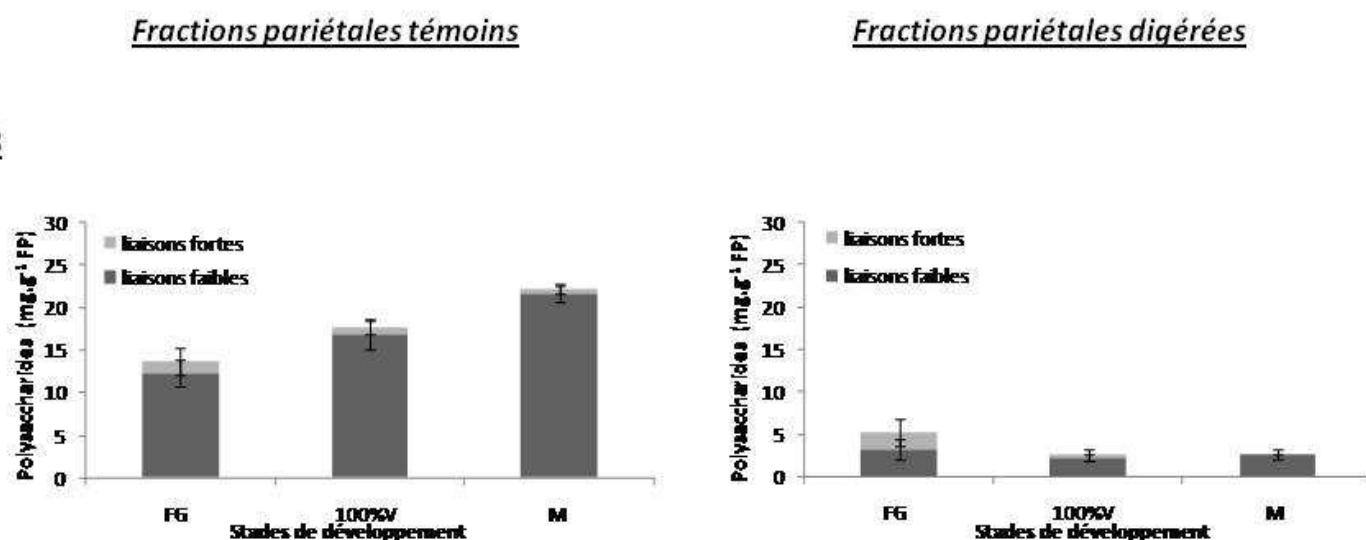
naturelle par rupture des sucres de la chaîne polysaccharidique. Ensuite, les polysaccharides et les tannins ont été extraits avec plusieurs types de solvant (eau, acide, soude et oxalate) afin de briser les liaisons chimiques, d'intensité variable, qui relient les différents polysaccharides entre eux. Les liaisons dénommées « faibles » correspondent aux liaisons de type Van der Waals et covalentes tandis que les liaisons dites « fortes » représentent les liaisons de type  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Les extractions ont été réalisées sur des fractions pariétales témoins ainsi que sur des fractions pariétales dégradées par le cocktail enzymatique.

Cette étude a été menée sur les pellicules de Cabernet-sauvignon de la parcelle 3, en 2008 et 2009, à fermeture de la grappe (FG), 100% véraison (100% V) et maturité (M).

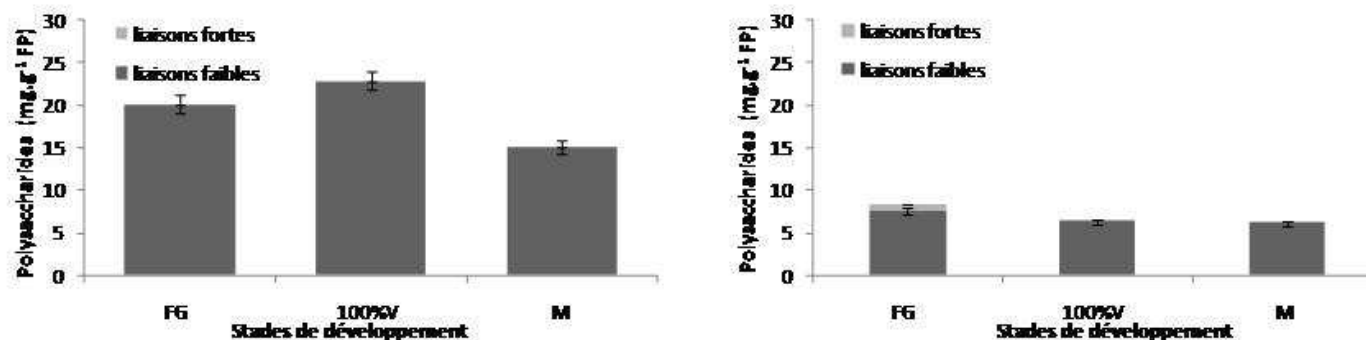
## **II.1 Etude des teneurs totales en polysaccharides**

Les polysaccharides extraits à partir de la fraction pariétale témoin sont en quantités plus importante que ceux extraits à partir de la fraction pariétale digérée, montrant que le cocktail enzymatique utilisé agit sur l'agencement des composés pariétaux. De manière générale, quel que soit le millésime ou le stade étudié, l'extraction des polysaccharides par rupture des liaisons faibles du maillage pariétal, permet de libérer une plus grande quantité de ces composés que l'extraction réalisée en cassant les liaisons fortes (Figure 46) indiquant qu'ils sont préférentiellement liés entre eux par des liaisons de type covalente et Van der Waals. Par contre, en comparant les stades entre eux, il est possible de remarquer qu'au stade fermeture de grappe, l'extraction des polysaccharides après rupture des liaisons fortes est plus importante que dans les autres stades.

2008



2009



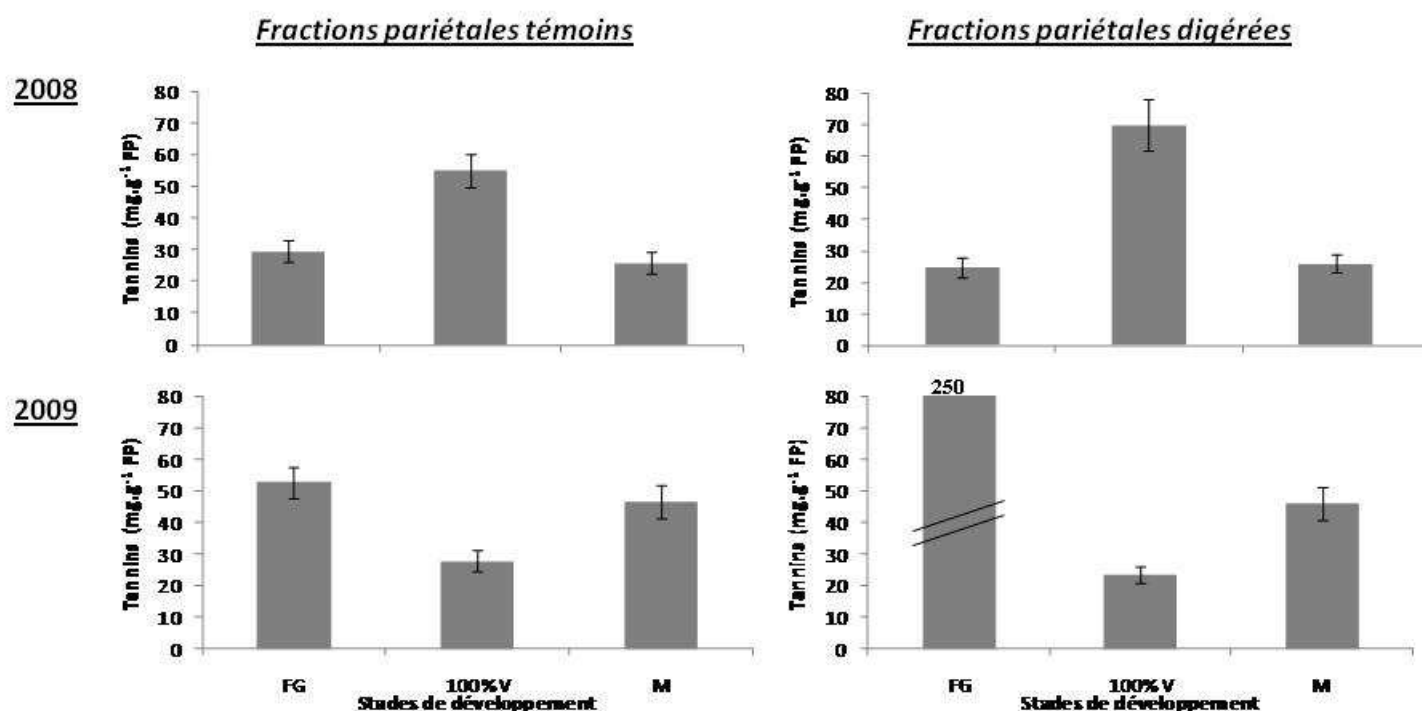
**Figure 46 :** Teneurs (en mg.g<sup>-1</sup> de fraction pariétale) en polysaccharides extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité des fractions pariétales témoins et digérées, aux différents stades étudiés du développement de la baie : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009. *Les résultats du dosage des polysaccharides, représentent la moyenne  $\pm$  écart-type.*

## II.2 Etudes des tannins

En parallèle des polysaccharides, les teneurs en tannins (Figures 47 et 48) ainsi que leur degré de polymérisation (Figures 49 et 50) ont été étudiés dans les fractions pariétales témoins et digérées par le cocktail enzymatique avant et après rupture des liaisons fortes et faibles du maillage pariétal. Par convention, nous avons appelé « tannins solubles » les tannins extraits de la fraction pariétale intacte ou digérée et « tannins issus de la fraction polysaccharidique », les tannins récupérés après la rupture des liaisons fortes et faibles.

## II.2.a Teneurs

La Figure 47 montre, que les teneurs en « tannins solubles » de la fraction pariétale varient en fonction du stade de développement et du millésime étudiés. La digestion enzymatique de la fraction pariétale ne permet pas de récupérer plus de tannins, excepté en fin de véraison pour le millésime 2008 et au stade fermeture de grappe en 2009.



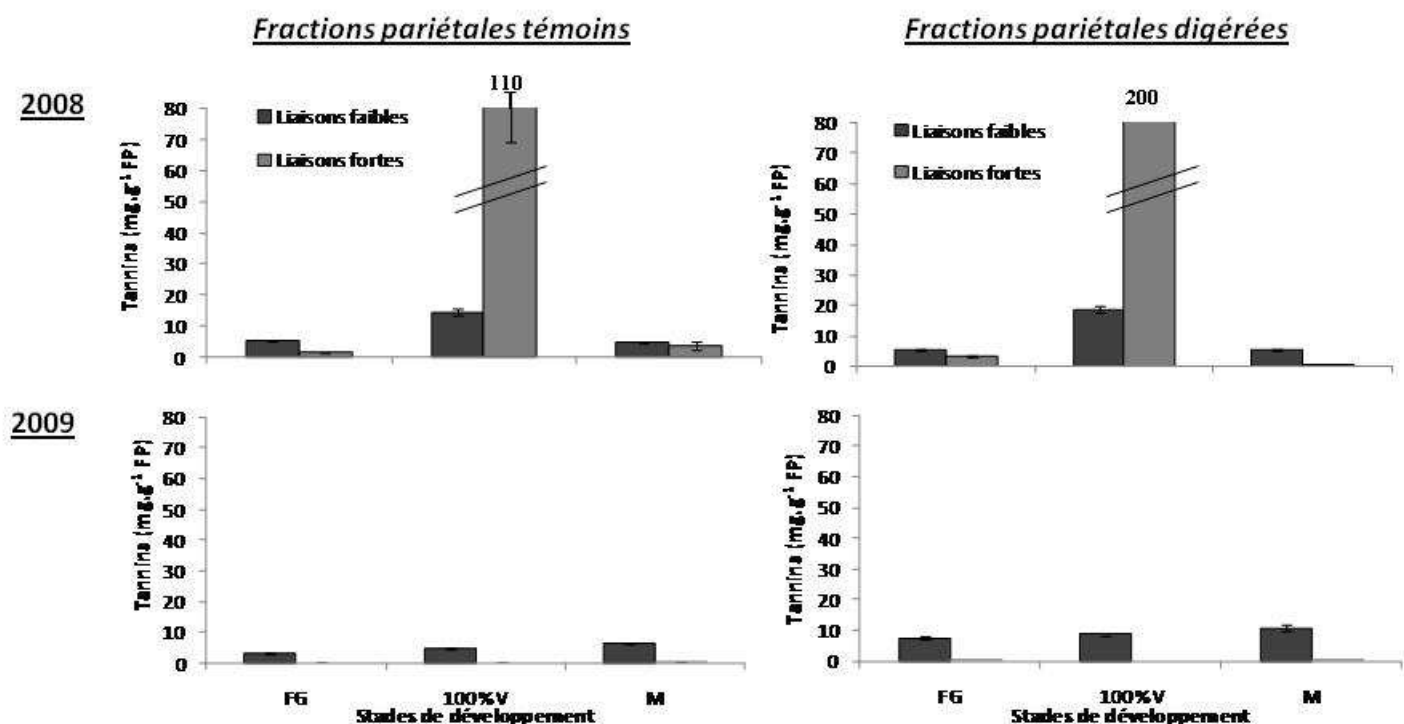
**Figure 47** : Teneurs en tannins solubles (en mg.g<sup>-1</sup>) des fractions pariétales témoins et digérées par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009. Stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte. Les résultats du dosage des tannins, représentent la moyenne ± écart-type.

Au cours du millésime 2008, les teneurs en « tannins solubles » de la fraction pariétale témoin augmentent entre le stade fermeture de grappe et la fin de la véraison, avec un maximum aux environs de 57 mg.g<sup>-1</sup> de fractions pariétales puis diminuent à maturité. Dans les fractions pariétales digérées, les teneurs en « tannins solubles » sont similaires hormis en fin de véraison où la digestion semble permettre une libération plus importante, 23% de tannins en plus (70 mg.g<sup>-1</sup> de FP). En 2009, les teneurs en « tannins solubles » sont élevées au stade fermeture de grappe puis diminuent en fin de véraison pour réaugmenter à maturité. Dans les fractions pariétales digérées, le profil d'évolution des teneurs en « tannins solubles »

est similaire, cependant, la digestion de la fraction pariétale au stade fermeture de grappe augmente de 300% l'extraction des tannins (200 mg.g<sup>-1</sup> de FP).

Ainsi, selon le niveau de dégradation des pectines, celluloses et hémicelluloses, les tannins sont plus ou moins facilement extraits. Lorsque les activités des enzymes pectolytiques n'ont pas encore eu lieu ou sont incomplètes (stades fermeture de grappe et véraison), la digestion de la paroi augmente le niveau d'extraction en tannins. A maturité, stade où les pectines sont normalement altérées, les teneurs en « tannins solubles » récupérés sont similaires pour les deux essais, semblant indiquer que les enzymes pectolityques (PME-PG) peuvent être impliquées dans la diffusion des tannins au sein de la pellicule.

Afin de vérifier si l'intégralité des tannins de la fraction pariétale avait pu être libérée par la simple digestion enzymatique, la déstructuration de la paroi par rupture chimique du maillage polysaccharidique a été réalisée sur la fraction pariétale témoin et sur la fraction pariétale digérée exempte des « tannins solubles ». Ainsi, ces extractions ont encore permis de récupérer des tannins qui sont appelés « tannins de la fraction polysaccharidique » et qui ont été extraits soit par rupture des liaisons chimiques de faible intensité, soit par rupture des liaisons chimiques de forte intensité existant entre les polysaccharides. Les résultats sont présentés dans la Figure 48.



**Figure 48 :** Teneurs en tannins issus de la fraction pariétale (en mg.g<sup>-1</sup>), extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité, des polysaccharides de la fraction pariétale témoin et digérée par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009. Stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte. Les résultats du dosage des tannins, représentent la moyenne  $\pm$  écart-type.

Quel que soit le millésime, la rupture des liaisons fortes et faibles entre les polysaccharides permet de libérer encore des tannins indiquant que ces composés peuvent être « piégés » dans le maillage pectique. De manière générale, l'extraction des tannins après rupture des liaisons faibles entre les polysaccharides est plus importante qu'après rupture des liaisons fortes sauf pour le stade 100% véraison de 2008. Lorsque les parois sont digérées par le cocktail enzymatique, la quantité de tannins libérés après rupture des liaisons entre les polysaccharides n'est pas significativement augmentée, sauf dans le cas du stade 100% véraison de 2008. Il est également important de noter, qu'en 2009, la quantité de tannins libérés est moins importante qu'en 2008 et que ces tannins sont majoritairement récupérés après rupture des liaisons faibles.

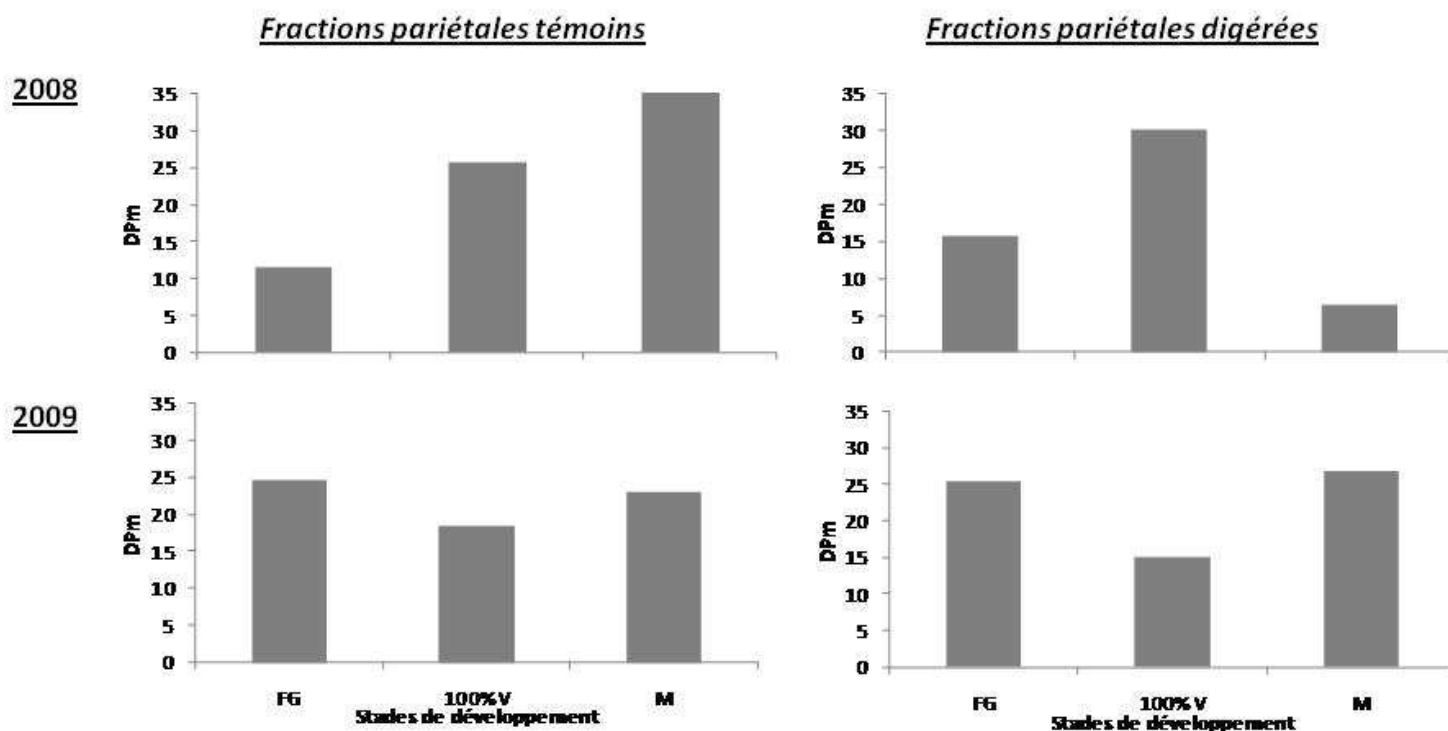
Ainsi, la désorganisation du maillage polysaccharidique par rupture des liaisons fortes ou faibles entre les polysaccharides permet de récupérer des tannins supplémentaires, ce qui montre qu'une partie des tannins est piégée au cœur de la trame rigide de la paroi. Le fait que

l'extraction soit plus importante quand on réalise une scission des liaisons faibles permet également de penser qu'ils puissent être préférentiellement localisés au « cœur de la paroi ».

### II.2.b Degré de polymérisation moyen (DPm)

Comme pour les quantités, le degré de polymérisation moyen (DPm) des tannins pariétaux a été calculé. Les Figures 49 et 50 présentent les DPm des « tannins solubles » extraits de la fraction pariétale témoin et digérée et des « tannins extraits de la fraction polysaccharidique » après rupture chimique de la trame rigide de la paroi.

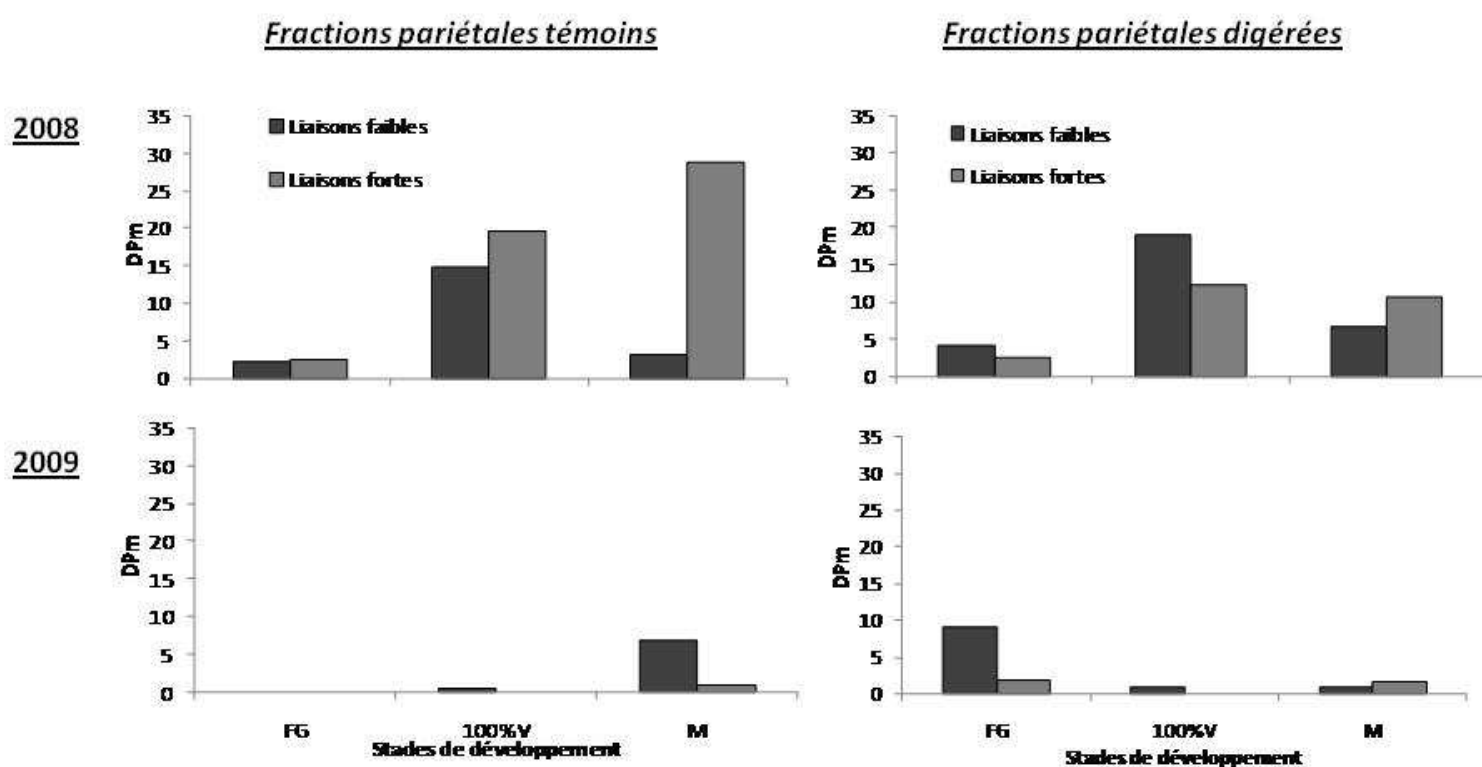
Le DPm des « tannins solubles » extraits à partir des fractions pariétales varie en fonction du stade de développement et du millésime. En 2008, le DPm augmente au cours de la maturation alors qu'en 2009, il reste quasiment constant. De manière générale, la digestion enzymatique ne modifie pas significativement le DPm des tannins extraits sauf à maturité en 2008 où il est fortement diminué (Figure 49).



**Figure 49** : Degré de Polymérisation moyen (DPm) des tannins des fractions pariétales témoins et digérées par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009. Stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte.



Ces résultats suggèrent que les tannins les plus polymérisés peuvent être extraits directement à partir de la digestion de la fraction pariétale et donc qu'ils sont facilement accessibles. Ainsi, les tannins les plus polymérisés ne sembleraient pas être piégés au cœur du maillage polysaccharidique. Pour vérifier cela, nous avons évalué le degré de polymérisation des tannins extraits de la fraction polysaccharidique après rupture chimique de la trame rigide de la paroi (Figure 50).



**Figure 50 :** Degré de Polymérisation moyen (DPM) des tannins extraits par rupture des liaisons chimiques de faible et de forte intensité, des polysaccharides de la fraction pariétale témoin et digérée par le cocktail d'enzymes pectolytiques, au cours des millésimes 2008 et 2009. Stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 100%, 100% véraison ; M, baie mûre à la récolte.

Lorsque la fraction pariétale n'est pas digérée, la rupture des liaisons entre les polysaccharides permet de libérer des tannins dont le DPM varie de 3 à 30. En 2008, les tannins libérés présentent un DPM plus important que ceux libérés en 2009, et ceux libérés après rupture des liaisons fortes sont plus gros que ceux libérés après rupture des liaisons faibles. C'est le contraire en 2009. Lorsque la fraction pariétale est digérée par le cocktail

enzymatique, le DPM moyen des tannins est plus faible que celui des tannins extraits à partir de la fraction polysaccharidique issue des parois non digérées. Ce qui semble indiquer que la libération des unités pectiques ne permet pas de libérer des tannins plus gros. Lorsque l'on fait agir le cocktail enzymatique, les résultats obtenus montrent que le DPM des tannins obtenus après rupture des liaisons fortes et faibles est similaire, sauf pour le stade 100% véraison en 2008 et fermeture de grappe en 2009 où les tannins les plus gros sont ceux obtenus après coupure des liaisons faibles.

### **II.3 Discussion**

Les résultats obtenus par l'approche biochimique sont en accord avec les observations microscopiques et confirment la présence de tannins associés à la paroi et à certains composés pariétaux, puisqu'il est possible d'extraire des tannins à partir d'une fraction pariétale de cellules de pellicule mais également à partir de la fraction polysaccharidique de parois cellulaires. La comparaison systématique des résultats obtenus à partir d'extraits pariétaux non digérés et digérés par un cocktail enzymatique visant à rompre les liaisons entre pectines, celluloses et hémicelluloses montre l'influence probable des enzymes pectolytiques sur la composition tannique de la paroi. Ainsi, les teneurs et la taille des tannins extraits varient en fonction du stade de développement semblant indiquer que l'état de dégradation de la paroi influence la disponibilité des tannins. La rupture des liaisons entre les polysaccharides a permis de libérer encore plus de tannins, indiquant qu'un certain nombre d'entre eux seraient localisés à l'intérieur du maillage polysaccharidique et qu'ils seraient préférentiellement associés à des polysaccharides reliés entre eux par des liaisons faibles, sauf en 2008 au stade 100% véraison. L'étude des DPM laisse également penser que le degré de polymérisation varie en fonction de la localisation des tannins au niveau du compartiment pariétal : les tannins piégés au « cœur » du maillage polysaccharidique semblent moins polymérisés que ceux localisés vers l'extérieur de la paroi.

Ces résultats apportent des données nouvelles sur la répartition des tannins au sein de la cellule, mais malheureusement ils ne peuvent s'appuyer sur aucune référence bibliographique. En effet, à notre connaissance, nous sommes les seuls à avoir adopté cette approche à partir de matériel végétal pour essayer d'étudier l'affinité entre les polysaccharides et les tannins qui semble varier en fonction de la composition de la paroi. Plusieurs études menées *in vitro*, par reconstitution des milieux pariétaux de pomme et de raisin, ont permis de

mieux comprendre l'absorption des composés phénoliques dans les parois cellulaires. Les études menées sur la pomme (Le Bourvellec *et al.*, 2005), ont démontré que les proanthocyanidines (PA) avaient une affinité croissante pour la cellulose, les xyloglucanes et les pectines. La liaison des PA avec les polysaccharides augmente avec leur degré de polymérisation et leur teneur en (+)-catéchine. De plus, la diminution de la porosité des parois cellulaires par séchage montre une diminution de l'affinité entre ces deux partenaires (Le Bourvellec *et al.*, 2004, 2005). Chez le raisin, Ortega-Regules *et al.*, en 2006, ont montré qu'il existait une forte relation entre la composition de la paroi cellulaire et l'extractibilité des anthocyanes : la composition en galactose, arabinose et cellulose ainsi que le degré de méthylation des pectines augmentent l'extractibilité des anthocyanes, ce qui peut être associé à l'épaisseur et à la densité des parois cellulaires lors de la maturation des raisins. Enfin, Bindon *et al.*, en 2010, ont mis en évidence l'affinité des parois cellulaires pour les PA de haut poids moléculaire et de faible pourcentage de galloylation.

Ainsi, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur l'organisation des tannins dans la paroi. La structure polysaccharidique pariétale est composée de cellulose, d'hémicellulose et de pectine. La chimie et la structure de la cellulose expliquent son rôle de trame rigide de la paroi : la cellulose est un polymère monotone formé de chaînes linéaires non ramifiées d'unités  $\beta$ -D- glucopyranosides liées en position (1 $\rightarrow$ 4) et le réseau cellulosique est formé par des liaisons hydrogènes intra et inter-chaînes. La flexibilité de la cellulose s'explique par le degré de liberté au niveau de chaque liaison hydrogène. Les hémicelluloses sont des hétéropolymères avec une structure répétée de glucoses liés en  $\beta$ -1,4 et de courtes chaînes latérales de xylose, de galactose et de fucose. La conformation de la chaîne principale de ce polymère serait responsable des liaisons hydrogènes avec les microfibrilles de cellulose. Ainsi, dans la paroi, la majorité des tannins, peu polymérisés, serait associée à la trame rigide de la paroi c'est-à-dire aux complexes de cellulose et d'hémicellulose. Les pectines sont une famille d'oligosaccharides et de polysaccharides très complexes et diversifiés dans leur structure fine (Ridley *et al.*, 2001) et dont la chaîne principale est constituée d'acide galacturonique. Le réseau de pectines consolide le maillage pariétal et influence, par leurs propriétés ioniques, l'activité des enzymes pariétales, comme celle de la PME. La déméthylation des pectines par la PME, augmente les zones de jonctions des chaînes homogalacturoniques en favorisant la formation d'interactions de type « *egg box* » avec les ions calcium (Rees, 1982) renforçant ainsi la cohésion pariétale. Ces interactions

expliqueraient que peu de tannins soient associés aux polysaccharides dits de liaisons fortes. En effet, l'activité de la PME variant en fonction du stade de développement de la baie (Deytieux *et al.*, 2008), il est possible de penser que son implication dans l'évolution de l'ultrastructure de la paroi puisse jouer un rôle dans la complexation des tannins au maillage polysaccharidique. De plus, les ions calcium entrant en compétition avec la polygalacturonase (PG) en bloquant ses sites d'action, l'activité pectolytique de la paroi pourrait considérablement influencer l'association des tannins entre les pectines et la trame rigide de cellulose et d'hémicellulose.

La déstructuration chimique de la paroi, en extrayant les polysaccharides par rupture des liaisons dites faibles, permettrait de casser la trame rigide de la paroi en altérant d'une part les fibrilles de celluloses, et d'autre part, la liaison entre l'hémicellulose et la cellulose. L'extraction des polysaccharides par rupture des liaisons dites fortes, affecterait la consolidation de la trame rigide par les pectines. Ainsi, considérant que la digestion enzymatique affecte la structure des chaînes polysaccharidiques de cellulose, d'hémicellulose et de pectine, elle altère en même temps les liaisons entre les différentes chaînes et ainsi la cohésion « chimique » plus ou moins forte de la paroi. L'état de dégradation naturelle de la paroi par les enzymes pectolytiques et notamment par l'intervention de la PME, serait donc directement responsable de l'extractibilité des tannins.

***Pour résumer, au cœur de la paroi cellulaire, une partie des tannins, faiblement ou moyennement polymérisés, sont piégés entre les fibrilles de cellulose et d'hémicellulose, composés qui constituent la trame rigide de la paroi. Un second groupe de tannins, un peu plus gros que ceux localisés au « cœur de la paroi » est complexé avec les pectines et la trame rigide de la paroi. L'association de ces tannins semble dépendre fortement de l'activité des enzymes pectolytiques. Enfin, la majorité des tannins, les plus polymérisés, semblent être localisés en périphérie du maillage pariétal. Ainsi, il semblerait que les teneurs en tannins de la paroi soient directement liées à l'ultrastructure pariétale.***

### III. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'étudier les tannins pariétaux en combinant une approche biochimique et microscopique afin d'apporter des éléments nouveaux sur les modes de liaison des tannins avec certains composés pariétaux et de mieux appréhender les mécanismes qui pourraient influencer leur extractibilité et leur diffusion dans les moûts. Les résultats obtenus apportent des données nouvelles concernant la localisation des tannins pelliculaires, leur évolution à travers les différents compartiments cellulaires au cours de la maturation de la baie, leur complexation avec les composants pariétaux et ainsi leur extractibilité.

Ainsi l'approche microscopique a permis de confirmer les résultats de travaux antérieurs (Hutzler *et al.* 1998 ; Amrani Joutei et Glories, 2003 ; Suco *et al.*, 2009) sur la présence de tannins dans le compartiment pariétal. La microscopie confocale a également permis d'évaluer la répartition des tannins au cours du développement de la baie de raisin mais nos résultats diffèrent de ceux de Gagné *et al.* (2006) quant à la proportion des tannins dans les différents compartiments cellulaires. En effet, pour cet auteur, seulement 10% des tannins totaux seraient associés au compartiment pariétal alors que nos résultats montrent que cette proportion varie au cours du développement et peut représenter jusqu'à 90% à maturité selon le millésime. Cette différence peut s'expliquer par la méthode utilisée, la méthode de dosage chimique n'extrayant surement pas la totalité des tannins « emprisonnés » dans le maillage pectique mais permettant de libérer seulement les tannins les moins « accrochés » à la paroi ou localisés vers l'extérieur de celle-ci alors que l'approche microscopique permet de visualiser l'ensemble des tannins. Le développement de la technique de microscopie confocale pourrait être un atout non négligeable dans l'étude du profil tannique de la baie de raisin au cours de son développement puisqu'en jouant sur les spectres d'excitation et d'émission des différents monomères, dimères et oligomères des tannins, il serait possible d'observer *in situ* ces composés et de voir l'évolution de leur localisation au sein de la cellule en s'affranchissant du niveau d'extractibilité qui gêne pour l'approche biochimique. Néanmoins, la microscopie ne permet pas encore d'apporter des informations sur les modes de liaisons entre les composés.

L'approche biochimique développée nous a permis d'une part de confirmer la présence de tannins dans le compartiment pariétal des cellules de pellicule de raisin mais

également d'apporter des données nouvelles pour mieux comprendre leur organisation au sein de ce compartiment. L'approche choisie pour étudier le profil tannique de la fraction pariétale et ainsi l'extractibilité des tannins piégés dans le réseau polysaccharidique, repose sur le principe de destructuration de la paroi en mimant dans un premier temps la dégradation « naturelle » de la paroi par des digestions enzymatiques et dans un second temps, en rompant les différentes liaisons chimiques de ce réseau qui peuvent intervenir dans l'évolution de son ultrastructure. En effet, Le Bourvellec *et al.* (2004, 2005) ont montré sur la pomme que la composition de la paroi pouvait modifier l'extractibilité des tannins, or il est bien connu qu'au cours du développement de la baie, la composition et la structure de la paroi cellulaire changent continuellement (Rajei, 1987 ; Fry, 1995 ; Fougère-Rifot *et al.*, 1996 ; Hardie et Jaudzems, 1996 ; Nunan *et al.*, 1997 ; Ollat, 2002 ; Brummell *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2005 ; Goulao, 2008 ; Deytieux *et al.*, 2008) : une série coordonnée de processus biochimiques impliquant la biosynthèse des composants de la paroi cellulaire intervient pendant la phase de croissance de la cellule, ces composés étant dégradés ou réarrangés ensuite pendant la phase de maturation du fruit, ce qui implique de nombreuses modifications dans les interactions chimiques des différents constituants. L'action des différentes enzymes pectolytiques, telles que la PME et la PG, entraînent de nombreuses interactions chimiques entre polysaccharides et la digestion enzymatique des parois est un processus coordonné qui pourrait moduler l'extractibilité des tannins. Ainsi en analysant conjointement les teneurs et le degré de polymérisation des tannins extraits à partir de fractions pariétales plus ou moins dégradées et de fractions polysaccharidiques issues des fractions pariétales, nous avons pu montrer qu'il existait une affinité préférentielle des tannins pour les polysaccharides associés entre eux par des liaisons faibles et que le DPm des tannins pouvait être relié au niveau de dégradation pariétale.

Ces résultats confirment les deux hypothèses de complexation des tannins aux polysaccharides pariétaux décrites dans la bibliographie :

- Les interactions reposeraient sur des liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles des phénols et les atomes d'oxygène des liaisons des sucres des chaînes polysaccharidiques de la paroi (De Freitas *et al.*, 2003 ; Le Bourvellec *et al.*, 2005).

- La capacité des polysaccharides à former des structures secondaires permettrait d'encapsuler les polyphénols dans des cavités hydrophobes (Ficcaro *et al.*, 2002 ; Le Bourvellec *et al.*, 2005).

Ainsi, l'état de dégradation des parois cellulaires de la pellicule jouerait un rôle important dans l'extractibilité des tannins pelliculaires. Néanmoins, les biais techniques de l'approche biochimique ne permettent pas de conclure sur la composition et la répartition réelle des tannins pelliculaires. La difficulté d'obtenir des fractions pariétales pures et d'en extraire la totalité des tannins reste un problème majeur.

***Les résultats présentés dans ce chapitre, montrent donc qu'une partie des tannins de la pellicule est pariétale et que son extractibilité peut être directement liée à l'évolution de l'ultrastructure de la paroi et donc au niveau de maturation de la pellicule. Si les mécanismes physiologiques impliqués dans la maturation de la pulpe sont globalement bien connus, les données concernant les mécanismes liés à la maturation pelliculaire sont moins nombreuses. Afin de mieux comprendre quels sont les phénomènes permettant la libération des tannins pariétaux dans le moût, il semble important de mieux connaître les mécanismes impliqués dans la dégradation pariétale mais également les étapes de la biosynthèse des tannins au sein de la cellule. Les chapitres 4 et 5, portant respectivement sur le métabolisme des tannins et l'action de la PME et de la PG sur la désorganisation de la paroi cellulaire, se proposent d'étudier ces deux aspects de la maturation pelliculaire.***

## Chapitre 4 : Etude et localisation de la voie de biosynthèse des tannins pelliculaires

---

Les résultats présentés dans le chapitre précédent, nous ont permis de mettre en évidence par une double approche, biochimique et microscopique, la présence de tannins à la fois dans le matériel intra cellulaire de la pellicule de la baie de raisin mais également dans les parois. D'autre part, nos résultats montrent une évolution de la répartition des tannins des vacuoles vers la paroi : s'agit-il d'un transport des tannins vacuolaires vers la paroi, les tannins sont-ils synthétisés dans les parois ?... S'il est maintenant admis que les tannins sont accumulés dans les différents compartiments cellulaires de la pellicule, leur synthèse et leur transport sont, à ce jour, mal connus. Ce chapitre a pour objectif d'apporter des éléments nouveaux sur la synthèse des tannins et la localisation cellulaire de cette voie au cours de la maturation de la pellicule de la baie de raisin.

Depuis plusieurs années, les deux dernières enzymes, connues et identifiées, de la voie de biosynthèse des tannins, la leucoanthocyanidine réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) sont étudiées au laboratoire. Leur activité ainsi que leur expression génique ont été suivies de la fleur à la baie mûre et certains modes de régulations via les régulateurs hormonaux tels que l'acide abscissique (ABA) ont été mis en évidence (Gagné *et al.*, 2009 ; Lacampagne *et al.*, 2010). Ces résultats ont permis d'obtenir des informations nouvelles sur les mécanismes de biosynthèse des tannins mais ils restaient incomplets. La littérature est relativement mal documentée par rapport à la localisation de la voie de biosynthèse. Selon Winkel *et al.* (2004) et Jorgensen *et al.* (2005) les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes seraient localisées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) et organisées en complexes multi-enzymatiques. Cette localisation permettrait de faciliter l'acheminement des flavonoïdes vers leurs lieux de stockage (vacuole, membrane plasmique,



paroi cellulaire), (Amrani-Joutei, 1993) par un transport membranaire. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a permis de localiser les deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse des tannins, la LAR et l'ANR.

Dans ce chapitre, nous avons donc étudié en complément de l'activité de ces enzymes et de l'expression de leurs gènes, la localisation des isoformes LAR1, LAR2 et ANR. Cette approche, réalisée par immunomarquage en microscopie électronique en transmission permettra pour la première fois de situer dans la cellule les lieux de synthèse des tannins et de mieux comprendre leur localisation. Cette étude a été réalisée sur les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon de la parcelle 3 au cours des millésimes 2007, 2008 et 2009 pour la partie biochimique et 2008 et 2009 pour la partie immunolocalisation, la synthèse des anticorps ayant été effectuée la première année.

Après un bref rappel bibliographique sur les mécanismes de fonctionnement et de régulation des enzymes LAR et ANR, les résultats concernant les activités, l'expression des gènes et leur localisation cellulaire seront présentés et discutés.

## I. Rappels bibliographiques

La LAR et l'ANR ont été étudiées chez de nombreuses espèces comme *Arabidopsis thaliana* (Devic *et al.*, 1999), *Medicago truncatula* (Xie *et al.*, 2004) et *Camillia sinensis* L. (Punyasiri *et al.*, 2004), mais peu de travaux ont été publiés chez la vigne (Bogs *et al.*, 2005 ; Fujita *et al.*, 2005). De plus, aucun de ces auteurs ne proposait une étude de l'activité et de l'expression des gènes de ces enzymes et leur relation avec l'accumulation des tannins dans les tissus ou organes d'intérêt.

Ainsi, chez *Vitis vinifera*, les travaux de Bogs en 2005, ont permis d'isoler deux isoformes du gène de la LAR, *VvLAR1* et *VvLAR2* et le gène *VvANR*. L'étude de l'expression de ces gènes par PCR quantitative en temps réel a révélé des profils différents et notamment des expressions tissus spécifiques. Ainsi *VvLAR1* et *VvLAR2* apparaissent être spécifiques des pépins, avec une forte expression deux semaines après floraison pour *VvLAR1*, et durant la véraison pour *VvLAR2*. Les transcrits de ce gène sont aussi détectés dans les fleurs, la pellicule, et les feuilles mais à un faible niveau. Concernant le gène *VvANR*, il est exprimé à des niveaux équivalents dans les feuilles, dans les fleurs mais aussi dans la pellicule et dans les pépins en développement. Tous ces tissus présentent des teneurs significatives en proanthocyanidines (PA) basées sur des sous unités de catéchine et d'épicatéchine, avec une taille ainsi qu'une composition en PA variant en fonction des tissus.

Une étude réalisée au laboratoire, sur des fleurs, des jeunes baies ainsi que sur des pellicules de baies de Cabernet-sauvignon par Gagné *et al.* (2009), a pour la première fois permis de corréler l'activité, l'expression des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR* et les teneurs en tannins. En effet, les enzymes LAR et ANR sont fortement exprimées durant la floraison, dans les jeunes baies ainsi qu'au cours de la véraison. Ces profils d'activités sont corrélés avec les teneurs en catéchine et épicatéchine, sous forme de monomères ou polymérisées, mais aussi avec les profils d'expression des gènes. De plus, alors que *VvLAR1* et *VvLAR2* sont tous les deux exprimés dans la baie verte, le gène *VvLAR2* est également exprimé durant la véraison, mettant en évidence deux formes actives de la LAR.

## II. Etude de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavanols dans la pellicule

L'activité et l'expression des gènes de deux enzymes responsables de la biosynthèse des unités flavanols : la leucoanthocyanidine réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) ont été étudiées dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon de la parcelle 3, prélevées au cours des millésimes 2007, 2008 et 2009. Les activités de ces deux enzymes ont été mesurées selon un protocole adapté de Gagné *et al.* (2009) et l'expression des gènes a été réalisée par PCR quantitative en temps réel.

### II.1 La leucoanthocyanidine réductase (LAR)

La leucoanthocyanidine réductase catalyse la réduction NADPH-dépendante de la leucoanthocyanidine en leucocyanidine et produit majoritairement la (+)-catéchine. Les deux allèles, *VvLAR1* et *VvLAR2*, du gène codant pour la LAR chez la vigne ont été étudiés.

#### II.1.a Etude de l'activité LAR

La Figure 51 présente les activités LAR pour les trois millésimes (2007, 2008 et 2009). Dans tous les cas, cette activité est importante juste avant la véraison et au cours de la première phase de changement de couleur des baies. Elle s'effondre ensuite pendant la fin de la véraison pour ré-augmenter au début de la maturation en 2007 et 2009. A la récolte, l'activité n'est plus détectée quelle que soit l'année étudiée.

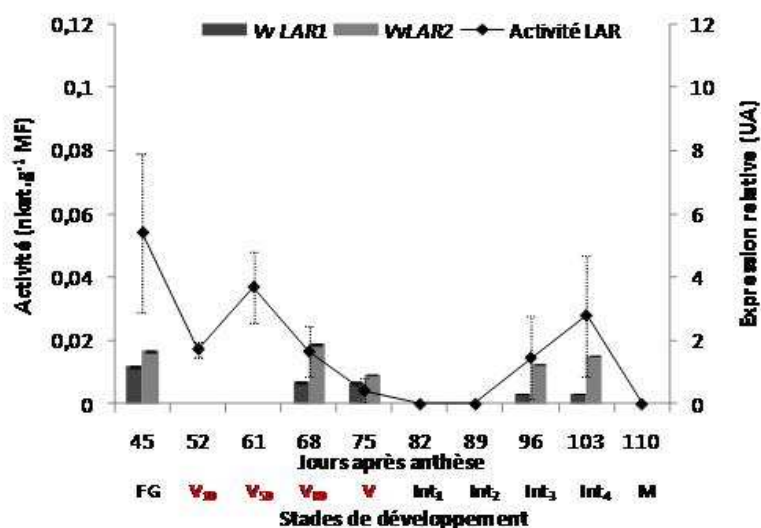
En ce qui concerne, le niveau d'activité, il est similaire pour les 3 millésimes étudiés, avec des maxima compris entre 0,04 et 0,08 nkat.g<sup>-1</sup> de matière fraîche.

#### II.1.b Etude de l'expression du gène LAR

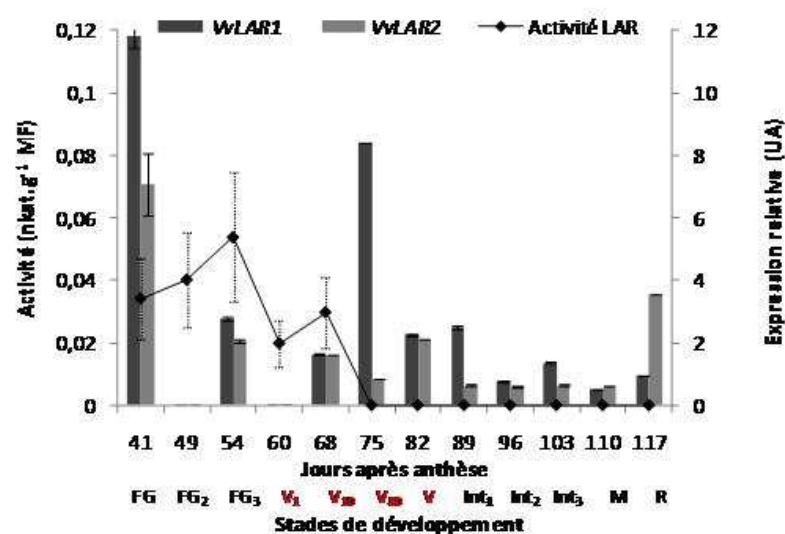
L'expression des deux allèles, *VvLAR1* et *VvLAR2*, du gène *LAR* a été étudiée en parallèle des activités.

Contrairement à l'activité, les profils d'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* sont peu similaires entre les années (Figure 51) :

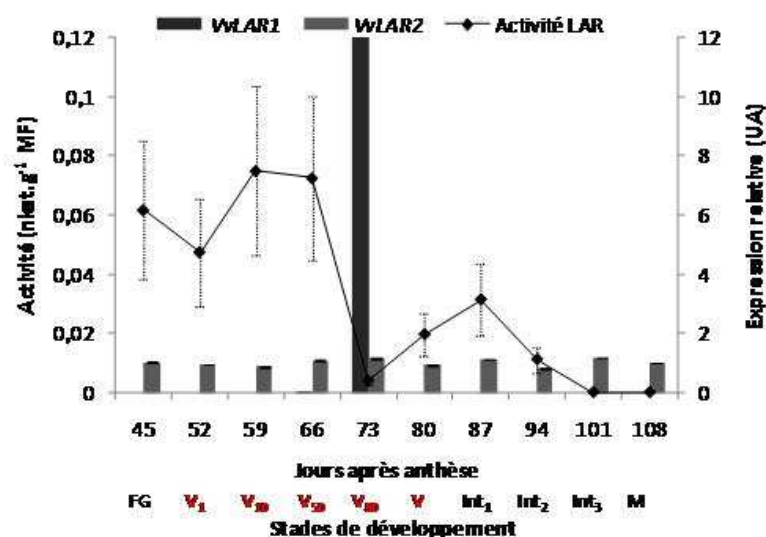
2007



2008



2009



**Figure 51 :** Évolution de l'activité LAR, exprimée en  $\text{ngat.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF) et de l'expression de *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes. Les résultats de l'expression sont normalisés par rapport à l'expression des gènes *UBI* et *EF1*.

- En 2007, les transcrits *LAR1* et *LAR2* sont détectés à trois stades : dans les baies vertes, en fin de véraison et au cours de la maturation. L'expression du transcrit *LAR1* diminue au cours de la maturation de la baie, tandis que celle du transcrit *LAR2* augmente à la fin de la véraison ainsi que durant la phase de maturation. L'expression de *VvLAR2* est supérieure à celle de *VvLAR1* surtout dans les deux derniers pics d'expression.

- En 2008, le transcrit *LAR1* est globalement plus exprimé que *VvLAR2*. Le transcrit *LAR1* est fortement exprimé dans les baies vertes puis son expression diminue jusqu'à la maturation avec un second pic au cours de la véraison, inférieur au premier, représentant 66 % de l'expression initiale. La synthèse de *VvLAR2* est similaire à celle de *VvLAR1*, c'est-à-dire avec deux pics d'expression : le premier dans les baies vertes et le second au cours de la véraison. L'expression de *VvLAR2* augmente de nouveau au cours de la maturation, avec un pic à maturité 2 fois plus important que le pic à véraison.

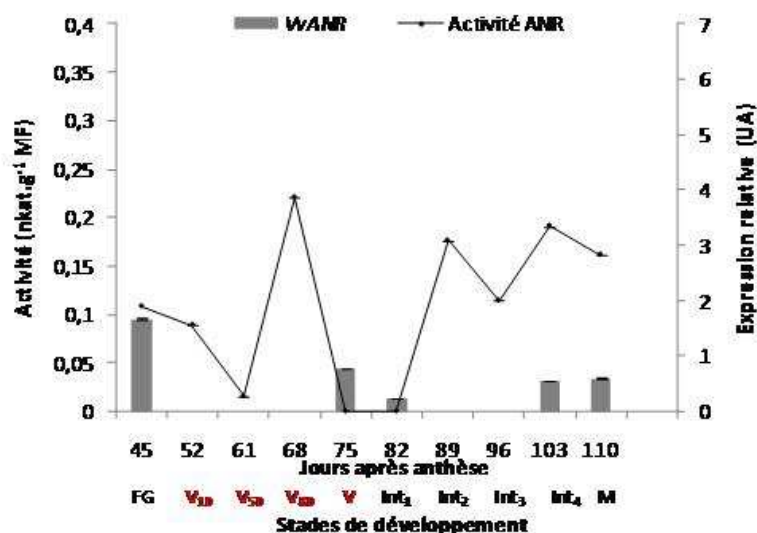
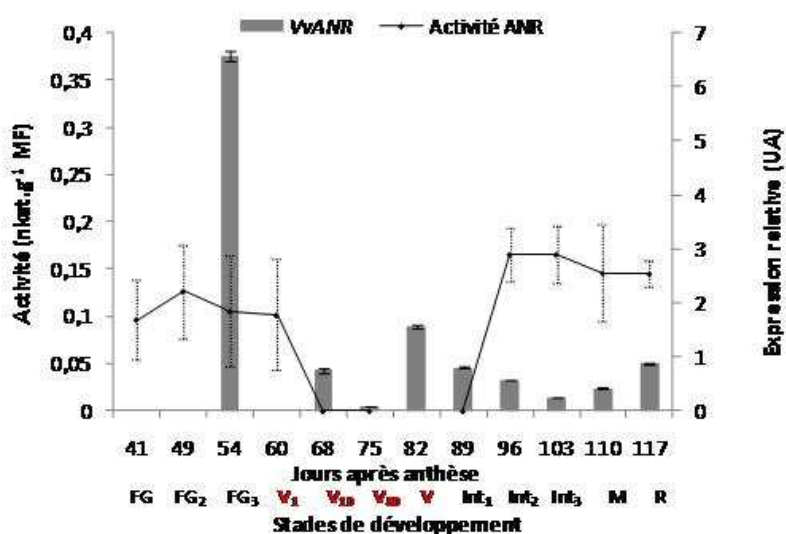
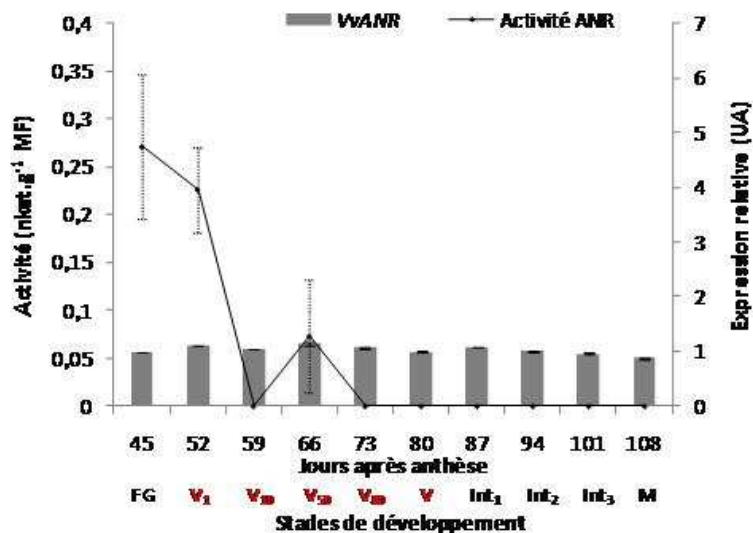
- En 2009, alors que l'expression de *VvLAR2* est constante au cours du développement, le transcrit *LAR1* n'est détecté qu'au cours de la véraison avec un niveau d'expression très élevé, similaire à celui de *VvLAR1* dans les pellicules de baies vertes de 2008.

## **II.2 L'anthocyanidine réductase (ANR)**

L'anthocyanidine réductase catalyse la réduction d'anthocyanidines en 2,3-*trans*-flavanols comme la (-)-épicatéchine. Chez la vigne, un seul gène *VvANR* code pour cette enzyme.

### **II.2.a Etude de l'activité ANR**

La Figure 52 présente les activités ANR pour les trois millésimes (2007, 2008 et 2009). Quelle que soit l'année, cette activité est importante dans les baies vertes et décroît pendant la première phase de véraison. Par la suite, les profils diffèrent légèrement selon les millésimes : en 2007 et 2009, elle présente un pic entre mi et fin véraison alors qu'en 2007 et 2008 elle est fortement active pendant la fin de la phase de maturation. Le niveau d'activité mesuré est similaire pour les trois millésimes.

200720082009

**Figure 52 :** Évolution de l'activité ANR, exprimée en nkat.g<sup>-1</sup> de matière fraîche (MF) et de l'expression de VvANR, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes. Les résultats de l'expression sont normalisés par rapport à l'expression des gènes UBI et EF1.

## **II.2.b Etude de l'expression du gène ANR**

Comme pour l'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, le profil de la courbe de la synthèse du transcrit *ANR* est similaire entre 2007 et 2008 mais diffère pour 2009 (Figure 52). Lors des deux premières années d'étude, le transcrit est majoritairement détecté au stade vert, puis en fin de véraison et à l'approche de la récolte alors qu'en 2009, l'expression du gène codant pour l'ANR est stable tout au long de la période de prélèvement.

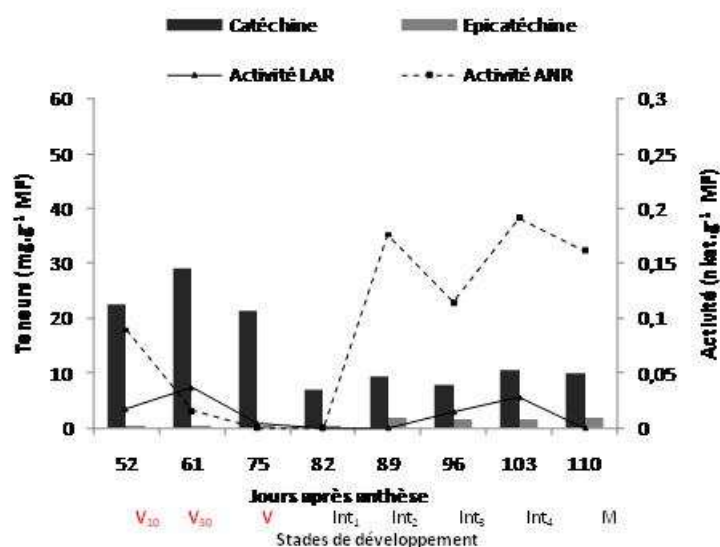
## **II.3 Evolution des teneurs en flavanols dans la pellicule**

L'évolution des teneurs en flavanols de la pellicule totale a été suivie au cours des trois millésimes 2007, 2008 et 2009. Les produits de la réaction de la LAR, la (+)-catéchine et de l'ANR, la (-)-épicatéchine ont été dosés sur l'ensemble des stades étudiés et comparés aux profils d'activité des enzymes (Figure 53).

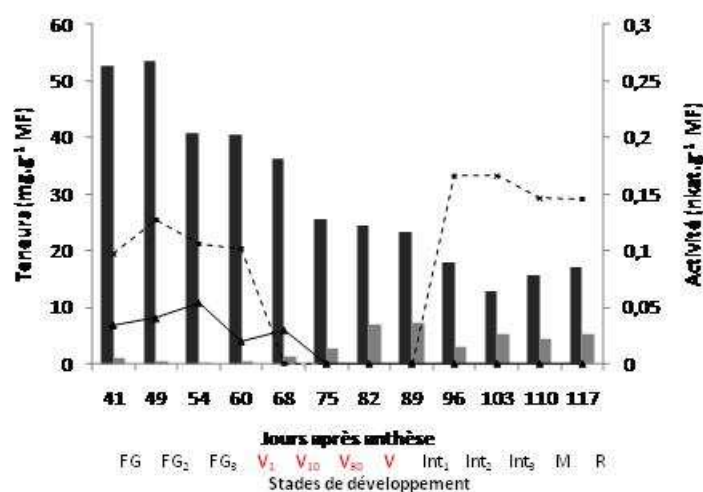
Globalement, pour les trois millésimes, les teneurs en catéchine évoluent parallèlement à l'activité LAR. De manière générale, les teneurs en catéchine, importantes dans la baie verte, diminuent jusqu'à la fin de la véraison puis ré-augmentent légèrement au cours de la fin de la maturation. Au niveau des quantités, elles sont similaires en 2007 et 2009 mais plus importantes en 2008.

Pour l'épicatéchine, les profils d'accumulation correspondent à l'évolution de l'activité ANR en 2007 et 2008 avec une accumulation d'épicatéchine dans les pellicules à partir de la fin véraison en même temps que la seconde phase d'activité de l'enzyme. En revanche, pour les baies de 2009 (Figure 53), l'épicatéchine s'accumule dans les pellicules alors que l'activité ANR n'est plus détectée.

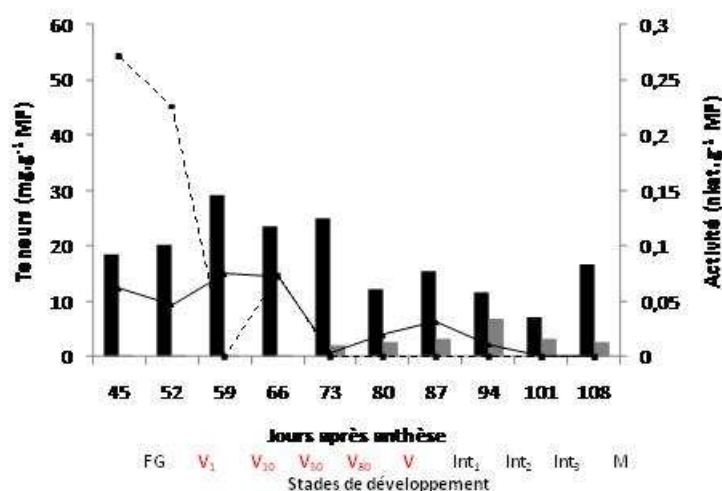
2007



2008



2009



**Figure 53** : Teneurs en catéchine et épicatechine, exprimées en mg.g<sup>-1</sup> de matière fraîche (MF), dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes.



## II.4 Discussion

Cette étude a permis de compléter les travaux précédents sur l'expression et l'activité des enzymes LAR et ANR, ainsi que sur l'accumulation des sous-unités principales des PA. L'étude sur 3 années consécutives présentant des caractéristiques climatiques différentes (2007 et 2008 fraîches et humides, 2009 chaude et sèche) et des prélèvements à partir de stades précoces (40 jours après anthèse) confirme une mise en place de la biosynthèse dès le début de la croissance des baies (Gagné *et al.*, 2009), fortement régulée par des facteurs de transcription (Bogs *et al.*, 2005 ; Delluc *et al.*, 2006 et 2008 ; Gagné *et al.*, 2009 ; Hichri *et al.*, 2010) mais également par des régulateurs hormonaux, tels que l'ABA (Lacampagne *et al.*, 2010), dont l'action est influencée par des facteurs environnementaux (Constantini *et al.*, 2006).

### II.4.a Teneurs en catéchine, expression et activité de la LAR

Pour les trois millésimes étudiés, les transcrits *LAR1* et *LAR2* sont exprimés dans les baies vertes ainsi qu'au cours de la véraison en relation avec l'activité LAR et les teneurs en catéchine qui sont élevées pendant ces phases de développement. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment au laboratoire en 2005 et 2006 (Gagné *et al.*, 2009 ; Lacampagne *et al.*, 2010). Néanmoins, si ces premiers travaux avaient permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'activité LAR était liée au transcrit *LAR1* dans les baies vertes et au transcrit *LAR2* au cours de la véraison, certaines différences observées entre les millésimes 2007, 2008 et 2009 ne nous permettent pas de confirmer cette hypothèse.

En effet, en 2007 et 2008, les transcrits *LAR1* et *LAR2* dans les pellicules de baies sont à la fois exprimés dans les baies vertes et au cours de la véraison. En 2007, contrairement aux résultats de Gagné *et al.* (2009), le transcrit *LAR2* est plus fortement exprimé que *VvLAR1*. Nos résultats se rapprochent plus de ceux obtenus par Fujita *et al.*, en 2007, qui montrent que dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon, les deux transcrits *LAR1* et *LAR2* sont présents à chaque stade de développement, *VvLAR2* étant toujours plus abondant. Par contre, en 2008, comme Gagné *et al.* (2009), *VvLAR1* est toujours plus fortement exprimé que *VvLAR2* excepté à maturité. Nous pouvons également noter que deux pics d'expression des ARNm codant pour la LAR sont détectés dans la baie verte et durant la véraison, ces deux pics correspondent à l'activité de la LAR. Cependant, de la fin véraison à la récolte, alors que les transcrits *LAR1* et *LAR2* sont exprimés, l'activité LAR n'a pas pu être détectée. Enfin, en

2009, il est encore plus difficile d'établir une corrélation entre l'expression des gènes et l'activité de l'enzyme LAR. Comme l'ont démontré Bogs *et al.* (2005) dans les pellicules de baies de Syrah et Fujita *et al.* (2007) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, VvLAR2 est détecté à tous les stades considérés avec de faibles variations dans le niveau d'expression (entre 0,82 et 1,18 UA), ne permettant pas d'expliquer les pics d'activités en début de véraison et en début de maturation. Cependant, VvLAR1 est très fortement exprimé, 12 fois plus que VvLAR2, à la fin de la véraison mais n'est pas détecté dans les autres stades. Ces différences entre millésimes pourraient s'expliquer par le fait que l'expression des gènes codant pour la LAR est régulée en partie par l'ABA (Lacampagne *et al.*, 2010). En effet, les conditions climatiques en 2009 (été sec et chaud), très différentes de celles de 2007 et 2008, pourraient être responsables d'un stress hydrique, augmentant ainsi les teneurs en ABA des baies (Constantini *et al.* 2006) favorisant alors la forte expression de VvLAR1 en fin de maturation.

Les résultats obtenus au cours de ces trois années ainsi que les résultats obtenus par Gagné *et al.* (2009), nous permettent d'entériner le fait que l'enzyme LAR est active au début de développement des baies (fleurs, jeunes baies, baies vertes), au cours de la véraison et pendant la première phase de maturation. Ces résultats sont confirmés par les teneurs en catéchines des pellicules et les variations de teneurs peuvent s'expliquer par l'expression des transcrits qui est en partie régulée par l'équilibre hormonal.

#### **II.4.b Teneurs en épicatechine, expression et activité de l'ANR**

Comme pour la LAR, notre étude menée sur trois millésimes consécutifs ne confirme que partiellement les résultats obtenus précédemment par Bogs *et al.* (2005) et Gagné *et al.* (2009), selon lesquels l'enzyme ANR serait synthétisée et active uniquement durant la première phase de croissance de la baie. En effet, si l'ANR est bien synthétisée et active dès le stade vert et jusqu'à la véraison, nous avons pu observer l'expression de VvANR au cours de la maturation en 2007 et 2008. Ces résultats sont confirmés par une accumulation croissante de l'épicatechine au cours de la maturation. En 2009, de la même manière que le transcrit LAR2, la synthèse de VvANR est constante au cours des différents stades étudiés alors que l'activité ANR n'est plus détectée. Comme pour la LAR, l'hypothèse d'une stimulation de l'expression des gènes de l'enzyme par l'ABA, fortement accumulé dans les baies au cours du millésime 2009, est émise, confirmant ainsi la possibilité d'une co-régulation de la LAR et de l'ANR par l'équilibre hormonal (Lacampagne *et al.* 2010).

***Nos résultats montrent que l'activation de la LAR et de l'ANR dans la baie de raisin est variable selon les millésimes mais se divise globalement en trois phases : une première phase d'activation dans les baies vertes, une seconde au cours de la véraison et une dernière en fin de maturation. L'évolution des teneurs en catéchine et épicatechine des pellicules est fortement corrélée aux profils d'expression et d'activités des deux enzymes mais dépend également des conditions climatiques, et notamment de l'état hydrique de la plante (via l'accumulation d'acide abscissique) qui semble être un facteur clé dans la régulation de cette voie de biosynthèse.***

### **III. Localisation cellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavanols de la pellicule**

Si les modes d'action des deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse sont aujourd'hui connues et si des hypothèses concernant le transport des tannins dans la pellicule existent, le principe de polymérisation des sous-unités tanniques reste obscur. La connaissance des lieux de synthèse des flavanols et donc la localisation des enzymes LAR et ANR sont capitales pour compléter le schéma de biosynthèse des tannins dans la pellicule de la baie de raisin. Pour apporter ces nouveaux éléments, la localisation cellulaire des enzymes LAR et ANR par la microscopie électronique en transmission a été entreprise. Par comparaison à la microscopie photonique, plus couramment utilisée aujourd'hui pour la localisation des protéines, cette technique permet d'une part une localisation cellulaire ultrastructure et non tissulaire des protéines grâce à un immunomarquage couplé à l'or, mais également de supprimer l'autofluorescence des tannins qui crée un bruit de fond empêchant alors la détection des anticorps secondaires fluorescents utilisés pour l'immunolocalisation en microscopie photonique.

Notre étude porte sur la localisation des isoformes LAR1 et LAR2 de la protéine LAR ainsi que la protéine ANR des pellicules des baies de Cabernet-sauvignon de la parcelle 3. Trois stades de développement ont été choisis (Fermeture de grappe, 80% véraison et récolte) en fonction des résultats obtenus lors de l'étude de l'expression et de l'activité de ces enzymes. Les observations ont été réalisées sur des baies prélevées en 2008 et 2009.

### III.1 Localisation de la protéine LAR1

Les observations réalisées sur les coupes de pellicules de Cabernet-sauvignon en 2008 ont été confirmées aux trois stades étudiés par des observations effectuées sur les pellicules de 2009.

Selon le stade, la localisation de la protéine varie :

\* Dans les pellicules de baies vertes, les particules d'or représentant la localisation de la LAR1 ont été détectées dans le noyau (Figure 54 **A**) des cellules épidermiques mais également dans les plastes des quatre premières assises cellulaires de la pellicule (Figure 54 **B**).

\* Fin véraison, la protéine LAR1 est localisée dans les cellules épidermiques et hypodermiques (les trois premières assises) associée à des structures fibrillaires dans le cytoplasme (Figure 54 **C**), au niveau des vésicules d'exocytose (Figure 54 **D** et **E**) mais également dans les parois cellulaires (Figure 54 **C** et **E**).

\* A maturité, le matériel cellulaire est en dégénérescence. Ainsi, quelques particules sont localisées dans les cellules mais il est difficile de les associer à une structure cellulaire spécifique (Figure 54 **F**). Néanmoins, l'intégrité des cellules épidermiques étant mieux conservée, il est possible de localiser principalement les protéines LAR1 dans le cytoplasme et associées à la membrane plasmique mais également dans les parois cellulaires à plus faible intensité (Figure 54 **G**).

### III.2 Localisation de la protéine LAR2

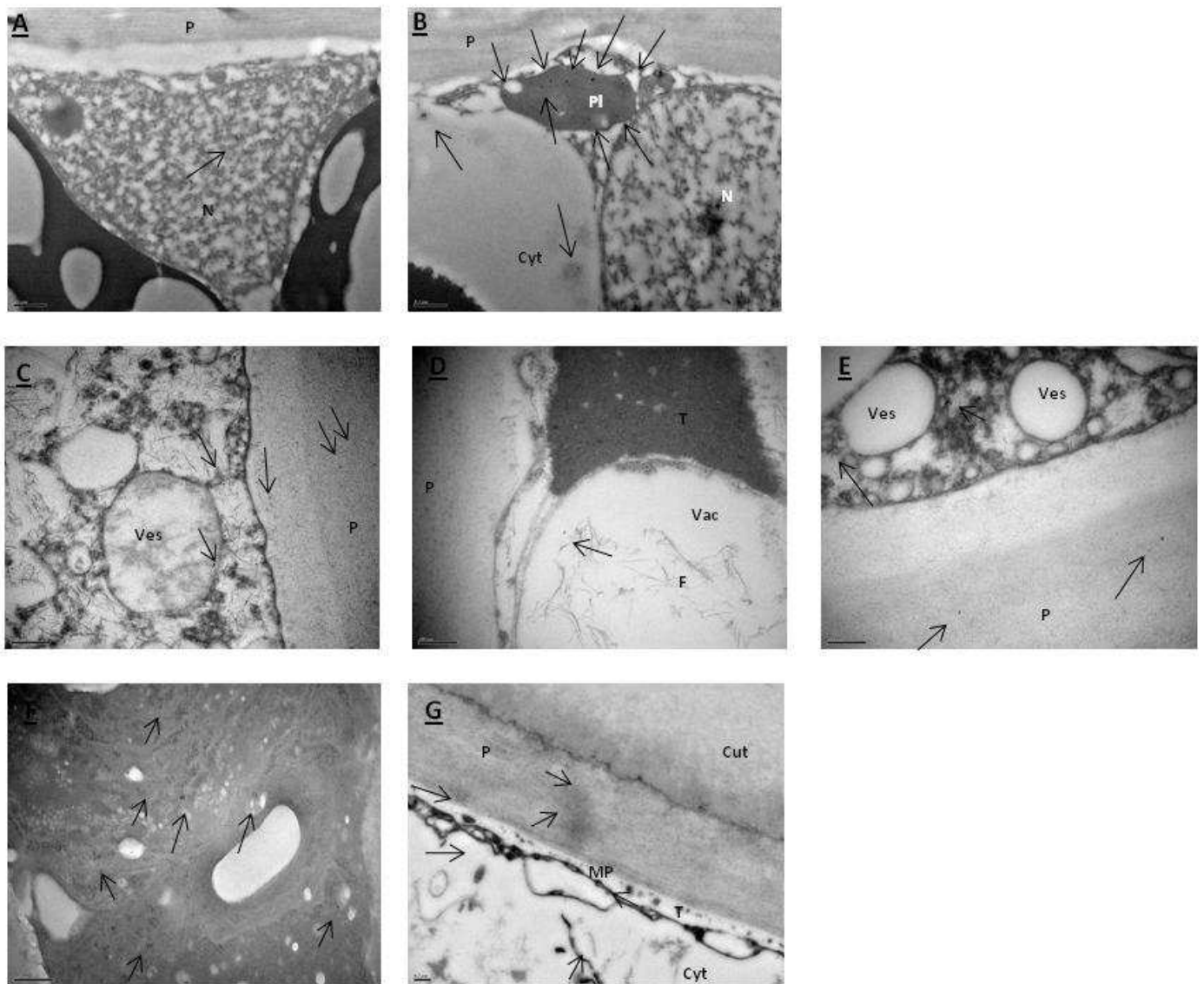
De la même manière que pour la protéine LAR1, la localisation de la protéine LAR2 a été entreprise pour les trois stades de développement.

Dans les cellules des baies vertes, la protéine LAR2 a été localisée dans les plastes (Figure 55 **A**).

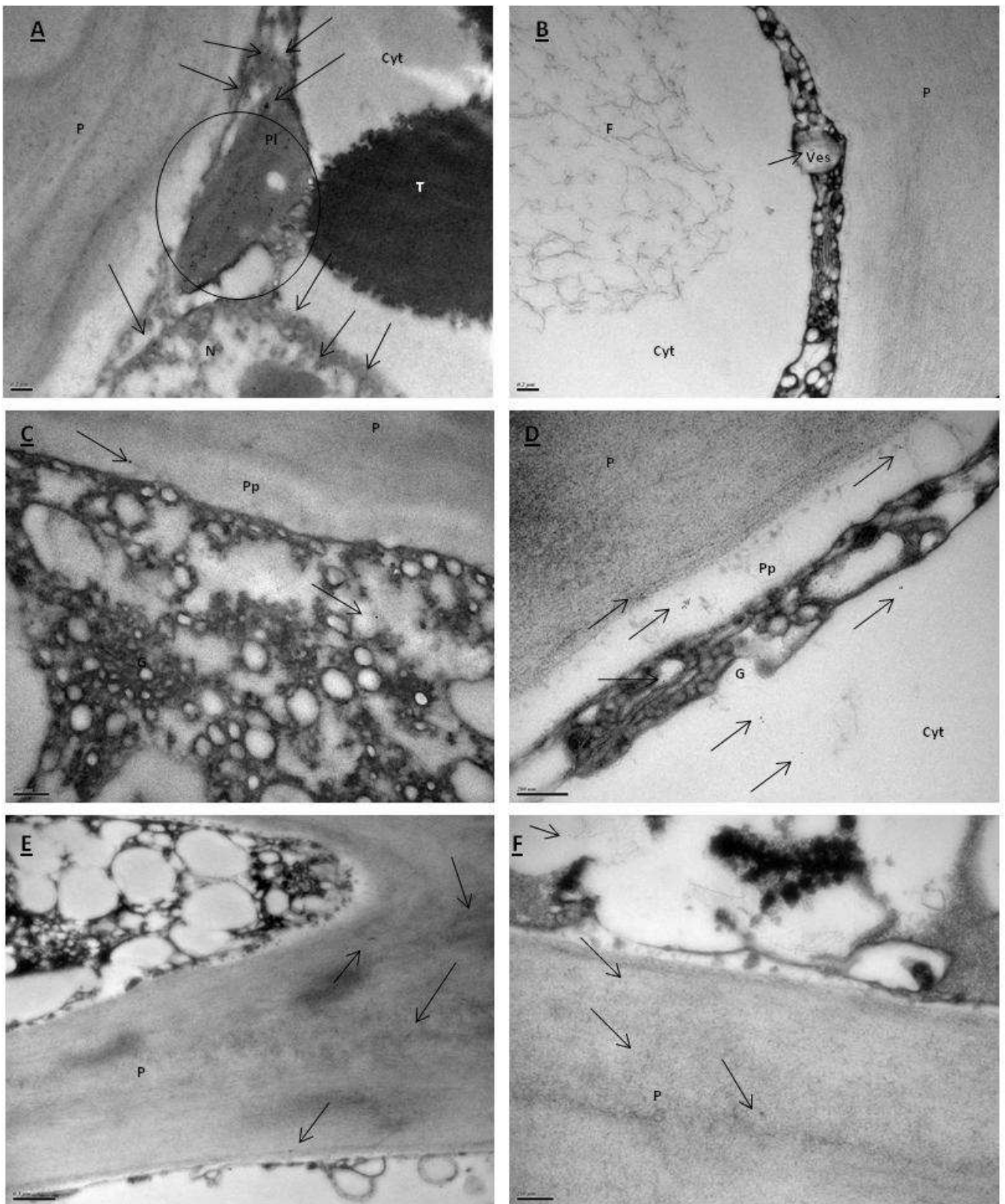
En fin de véraison, les particules d'or représentant les protéines LAR2 ont été détectées dans des vésicules à proximité des appareils de Golgi (Figure 55 **B**, **C** et **D**), dans l'espace périplasmique des cellules ainsi que dans le cytoplasme (Figure 55 **C** et **D**) où la

protéine est souvent associée à des structures fibrillaires (Figure 55 **D**). Quelques particules sont également observées dans les parois des cellules (figure 55 **D**).

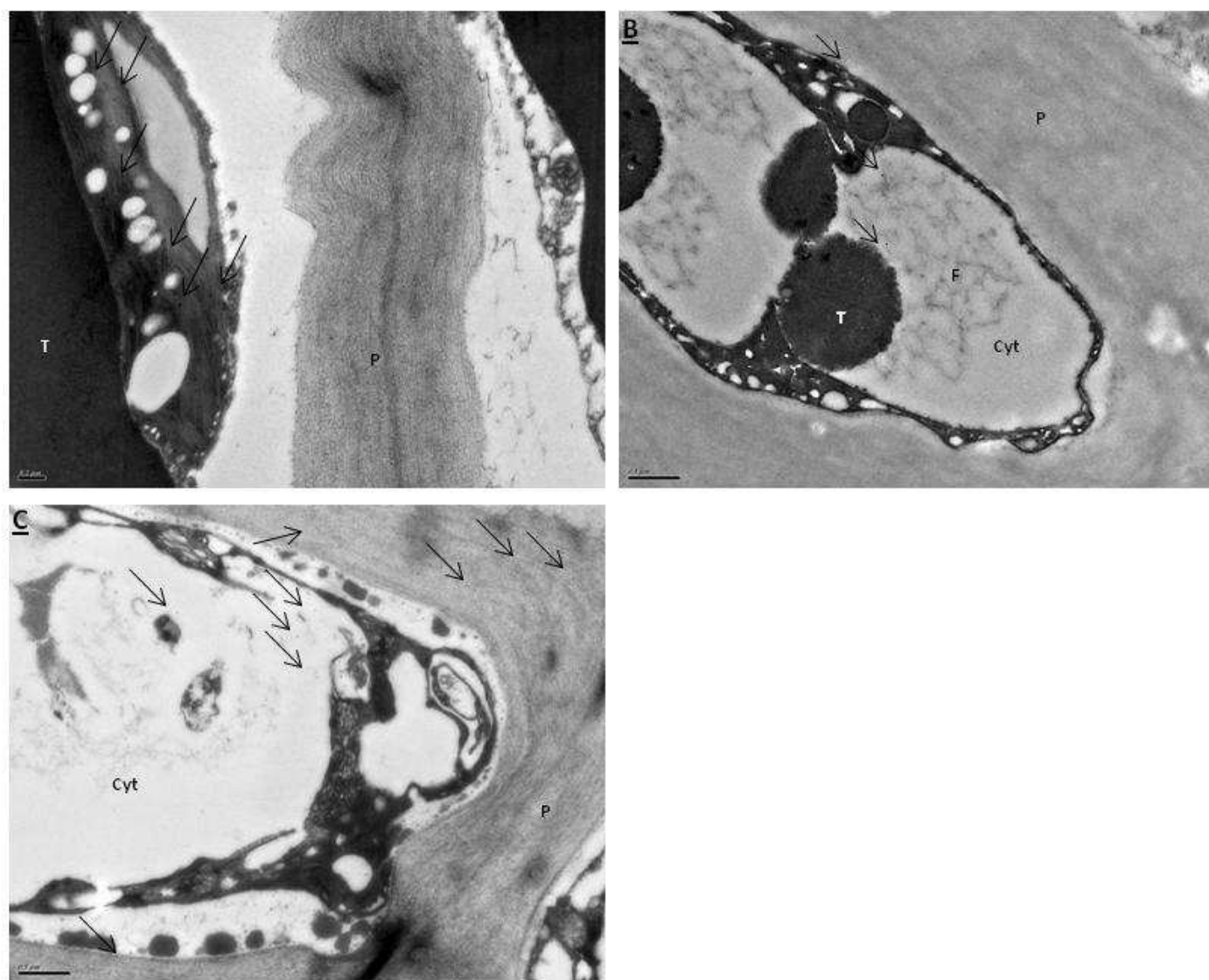
A maturité, quelques particules sont détectées dans le cytoplasme (Figure 55 **F**) mais la majorité est localisée dans les parois des cellules et ce quelle que soit l'assise cellulaire observée (Figure 55 **E** et **F**).



**Figure 54** : Localisation de la protéine LAR1, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**, **B**) fermeture de grappe, (**C**, **D**, **E**) 80% véraison et (**F**, **G**) maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine LAR1. Abréviations: *Cut*, cuticule; *P*, paroi cellulaire; *Cyt*, cytoplasme; *N*, noyau; *Pl*, plaste; *F*, structures fibrillaires; *Ves*, vésicules; *Vac*, vacuole; *T*, tannins. Echelle: *a*, *b*, 0,5 µm; *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, 200 nm.



**Figure 55** : Localisation de la protéine LAR2, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (A) fermeture de grappe, (B, C, D) 80% véraison et (E, F) maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine LAR2. Abréviations: Cut, cuticule; P, paroi cellulaire; Cyt, cytoplasme; N, noyau; Pl, plaste; Pp, périplasm; F, structures fibrillaires; Ves, vésicules; Vac, vacuole; T, tannins. Echelle: a, b, 0,5  $\mu$ m; c, d, e, f, g, 200 nm.



**Figure 56** : Localisation de la protéine ANR, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : **(A)** fermeture de grappe, **(B)** 80% véraison et **(C)** maturité. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine ANR. Abréviations: *Cut*, cuticule; *P*, paroi cellulaire; *Cyt*, cytoplasme; *N*, noyau; *Pl*, plaste; *F*, structures fibrillaires; *Ves*, vésicules; *Vac*, vacuole; *T*, tannins. Echelle: *a*, 0,2  $\mu$ m; *b*, *c*, 0,5  $\mu$ m.



### III.3 Localisation de la protéine ANR

La protéine ANR, comme les protéines LAR1 et LAR2, a été localisée dans les plastes des cellules pelliculaires des baies vertes (Figure 56 **A**).

En fin de véraison, l'ANR est principalement localisée dans le cytoplasme des cellules associée aux structures fibrillaires (Figure 56 **B**). Quelques particules d'or ont pu être détectées à proximité des parois cellulaires, dans le périplasme (Figure 56 **B**).

A maturité, l'ANR est présente dans tous les compartiments cellulaires : dans le cytoplasme sous forme libre ou associée à des fibrilles, au niveau de la membrane plasmique à proximité des tannins liés à celle-ci ainsi que dans les parois cellulaires (Figure 56 **C**).

### III.4 Discussion

Notre travail a permis pour la première fois d'observer la localisation des enzymes LAR et ANR *in situ* dans la pellicule de raisin au cours de son développement montrant ainsi des spécificités en fonction des stades de développement mais également des enzymes.

Les résultats du chapitre précédent avaient pu montrer une évolution dans la localisation des tannins au sein du tissu pelliculaire en fonction des stades étudiés : dans la baie verte les tannins sont majoritairement situés dans le compartiment intracellulaire, associés aux membranes et dans les vacuoles alors qu'à maturité les parois cellulaires vont s'enrichir en tannins aux dépens des vacuoles et de la membrane plasmique.

Avant la véraison, dans les baies encore vertes, les protéines LAR1, LAR2 et ANR sont principalement détectées dans les plastes. Malgré cette localisation inattendue, plusieurs auteurs ont montré la présence de protéines de la voie des phénylpropanoïdes dans ces organites confirmant ainsi nos observations. D'après Chen *et al.* (2006) et Tian *et al.* (2008), la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la cinnamate-4-hydroxylase (C4H), la 4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL), la chalcone synthase (CHS) mais également la chalcone isomérase (CHI) seraient localisées dans les chloroplastes de cellules pelliculaires de baie verte (30 JAA) de Cabernet-sauvignon. A ce stade là, le métabolisme cellulaire est intense et cette localisation particulière des protéines pourrait être le siège d'une régulation post-transcriptionnelle des ARNm codant pour ces protéines. En effet, la plupart des gènes codant pour les protéines plastidiales sont nucléaires puis traduites dans le cytoplasme et transloquées

vers les plastes grâce à une machinerie d'importation de protéines contenue dans la membrane de l'enveloppe des plastes, expliquant ainsi la localisation plastidiale de l'ANR et de la LAR. De plus, la construction récente d'une base de données de protéines plastidiales, AT\_Chloro, recense des protéines de *Vitis vinifera* non identifiées orthologues aux facteurs de transcription d'*Arabidopsis thaliana* (de type Myb-bHLH) (Ferro *et al.*, 2010), ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse d'une régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle de la LAR et de l'ANR dans les plastes. D'après Ibrahim *et al.* (1992), la présence de flavonoïdes et principalement de flavonols (démontrés dans ce travail par la localisation de la LAR et de l'ANR) dans le noyau et les plastes serait directement reliée à la régulation de l'expression de certains gènes par les flavonols. Sharma *et al.* en 1999, ont mis en évidence un complexe anthocyane-ADN impliqué dans la protection contre l'oxydation.

Au cours de la véraison, des protéines LAR et ANR sont localisées en partie dans les vésicules golgiennes et dans les parois cellulaires, mais également dans le cytoplasme où elles sont associées à des structures fibrillaires, décrites par Amrani-Joutei (1993) pour être des fibrilles de cellulose. A ce stade, les cellules sont riches en dictyosomes, structures présentes en grand nombre dans les cellules végétales. La présence des protéines dans les vésicules golgiennes marque la fin de la maturation des protéines et le transport de celles-ci vers leur site d'activité, qui pourrait être en partie la paroi, au vu du grand nombre de particules d'or détectées. En effet, les trois protéines sont retrouvées en grand nombre dans les parois cellulaires, évoquant pour la première fois la possibilité d'une biosynthèse *in situ* des sous-unités flavanols ailleurs que dans le cytoplasme comme décrit par Winkel *et al.* (2004) et Jorgensen *et al.* (2005). Ces résultats sont confortés par la localisation pariétale des enzymes situées en amont dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes : la PAL, la C4H, la 4CL, la CHS et la CHI (Chen *et al.*, 2006 ; Tian *et al.*, 2008). Enfin, l'association des protéines LAR et ANR aux structures fibrillaires pourrait conforter l'hypothèse du transport protéique vers la paroi cellulaire. Ces structures fibrillaires, de par leur localisation dans des vésicules golgiennes, pourraient être composées de pectines et de cellulose puisque selon Staehelin et Moore (1995) et Western (2006) l'appareil de Golgi pourrait être un site majeur de synthèse de glucides, notamment des hémicelluloses et des pectines. Leur transport vers la membrane plasmique se ferait dans des vésicules sous la forme de polymères hautement méthylestérifiés qui seraient ensuite insérés dans la paroi cellulaire (Carpita et Gibeault, 1993 ; Liners *et al.*, 1994).

Ces résultats sont confirmés par les observations obtenues sur les pellicules de baies à maturité. A ce stade, les protéines sont localisées dans les parois mais également dans le cytoplasme des cellules en dégradation.

La localisation des protéines LAR et ANR, responsables de la biosynthèse des sous-unités monomériques des tannins, ainsi que les résultats obtenus dans le chapitre précédent concernant la localisation des tannins dans les compartiments intracellulaires et pariétaux de la pellicule de raisin au cours de sa maturation, étayent l'hypothèse de la biosynthèse *in situ* des tannins. Ainsi, dans la baie verte, la localisation des protéines LAR et ANR, au niveau des organites de la cellule indiquerait une synthèse intracellulaire des tannins. Une partie de ces tannins pourrait être exportée dans les parois par les mécanismes de transport vésiculaires et membranaires. Au cours de la véraison, la LAR et l'ANR sont présentes dans les deux compartiments cellulaires : au niveau des vésicules golgiennes et des structures fibrillaires mais également dans les parois. Cette localisation vésiculaire des enzymes permet d'émettre l'hypothèse d'un transport de ces protéines vers la paroi. Ainsi, l'hypothèse d'une synthèse pariétale des tannins semblent être étayée par ces résultats. Enfin, à maturité, les teneurs en tannins des vacuoles sont négligeables par rapport à la richesse tannique de la paroi ce qui est corrélé à la localisation de la LAR et de l'ANR.

***L'évolution de la localisation des enzymes LAR et ANR au cours de la maturation de la pellicule du raisin à travers les compartiments intracellulaire et pariétaux confirmerait l'hypothèse d'une synthèse in situ des tannins pariétaux.***

Nos résultats apportent des informations nouvelles sur la biosynthèse et l'accumulation des tannins dans la pellicule des baies de raisin et complètent ceux de Winkel *et al.* (2004), Jorgensen *et al.* (2005), Chen *et al.* (2006) et Tian *et al.* (2008).

Les enzymes de la voie de biosynthèse des tannins, la LAR et l'ANR sont activées précocement, dès le bouton floral (Gagné *et al.*, 2009) et s'accumulent dans les vacuoles durant la première phase de croissance active des baies. La synthèse intracellulaire des tannins explique le stockage des tannins dans les vacuoles et en amas au niveau de la membrane plasmique dans un premier temps. Les mécanismes de transport membranaire et vésiculaire permettent l'adressage des tannins vers la paroi dans une seconde phase.

Ensuite, au cours de la véraison, les enzymes connaissent une seconde période d'activation qui, malgré une diminution des teneurs totales en tannins de la pellicule, s'explique par une synthèse des sous-unités flavanols dans les parois cellulaires. Cependant, nous avons vu précédemment que les dosages biochimiques ne permettent pas d'extraire la totalité des tannins pelliculaires et notamment les tannins pariétaux. Ainsi les résultats obtenus en microscopie confocale ne montrent pas une diminution de la détection de l'intensité de l'autofluorescence des tannins pelliculaires mais une évolution dans leur localisation. A ce stade, les enzymes LAR et ANR sont exportées vers les parois cellulaires, accentuant l'enrichissement en tannins de ces parois. La biosynthèse des tannins est alors cytoplasmique et pariétale.

A maturité, les vacuoles s'appauvrissent en tannins au profit des parois. Complémentairement aux différents mécanismes de transport des tannins mis en place par la cellule, la localisation pariétale des enzymes explique les fortes teneurs en tannins pariétaux.

Ces données nouvelles complètent les données bibliographiques. Ainsi, les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes seraient localisées sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (RE) et organisées en complexes multi-enzymatiques associés aux enzymes du cytochrome P450 dont la cinnamate 4-hydroxylase, la flavonoïde 3'-hydroxylase et la flavonoïde 3',5'-hydroxylase (Winkel *et al.*, 2004 ; Jorgensen *et al.*, 2005). L'assemblage de ces complexes à la surface du RE serait assuré par des interactions protéines-protéines (Winkel *et al.*, 2004). Cette localisation permettrait de faciliter l'acheminement des flavonoïdes vers leurs lieux de stockage tels que les vacuoles, membranes plasmiques ou paroi cellulaire (Amrani-Joutei, 1993) par un transport membranaire. Cependant, certaines enzymes de la voie de biosynthèse des tannins ont également été co-localisées dans le noyau et au niveau du tonoplaste (Winkel *et al.*, 2004 ; Saslowsky *et al.*, 2005). Cette diversité dans la localisation des complexes enzymatiques faciliterait l'acheminement ou le décalage de la biosynthèse des tannins en réponse à des exigences physiologiques de la plante (Winkel *et al.*, 2004 ; Jorgensen *et al.*, 2005). La localisation pariétale des enzymes situées en amont dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (PAL, C4H, 4CL, CHS et CHI) par Chen *et al.* (2006) et Tian *et al.* (2008), confortent nos résultats.



Abréviations: AVI, inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes; PVC, Structures prévacuolaires; PSV, vacuoles de stockage de protéines; TGN, réseau trans-Golgien. PAL: phénylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; 4CL, 4-coumarate: coenzyme A ligase; CHI, chalcone isomérase; CHS, chalcone synthase; LAR1, leucoanthocyanidine réductase 1; LAR2, leucoanthocyanidine réductase 2; ANR, anthocyanidine réductase.

*Pour résumer, selon les tannins considérés et leur localisation définitive, leur synthèse serait assurée par des complexes enzymatiques localisés à proximité de leurs sites d'accumulation (Figure 57) :*

- pour les tannins intracellulaires et une partie des tannins pariétaux au cours de la première phase de croissance active, la synthèse semblerait être localisée au niveau du complexe RE-noyau et des plastes*
- pour les tannins pariétaux observés pendant la maturation, l'hypothèse d'une synthèse in situ dans la paroi semble être privilégiée.*

*Ainsi, si la synthèse et la localisation des tannins dans les parois semblent confirmées, l'organisation de ces macromolécules dans le réseau polysaccharidique pariétal reste méconnue. Le chapitre suivant a donc pour objectif d'étudier les mécanismes d'évolution de la paroi cellulaire afin de vérifier si les modifications structurales du maillage polysaccharidique affectent l'agencement des tannins dans la paroi.*

## **Chapitre 5 : Etude et localisation des mécanismes impliqués dans la réorganisation pariétale de la pellicule**

---

Les résultats présentés dans les chapitres précédents nous ont permis de montrer que les tannins pelliculaires pouvaient, d'une part être localisés dans la paroi et d'autre part, être synthétisés directement dans ce compartiment cellulaire grâce à la présence des deux dernières enzymes connues de leur biosynthèse (la LAR et l'ANR).

Si nous pouvons maintenant admettre que cette famille de molécules puisse s'intégrer dans le matériel pariétal, peu d'informations sont à notre disposition pour comprendre comment sont organisés les tannins dans le maillage pariétal et quelles sont les conséquences des mécanismes de l'évolution des parois sur l'organisation et l'agencement de ces molécules. Pour pouvoir apporter des éléments nouveaux, il nous a semblé indispensable de faire, pour la première fois, une étude complète de l'évolution de la structure pariétale des cellules de pellicules en combinant trois approches :

- une approche transcriptomique et métabolomique pour estimer le niveau des activités des enzymes impliquées dans les mécanismes de dégradation pariétale,
- une approche microscopique pour évaluer les modifications structurales en comparaison des activités,
- une approche d'immunomarquage pour localiser les enzymes pectolytiques et observer leurs effets sur la structure pariétale.

Après un bref rappel bibliographique sur les mécanismes impliqués dans la dégradation pariétale et la régulation des deux principales enzymes étudiées (la pectine méthyl estérase (PME) et la polygalacturonase (PG)), les résultats concernant les activités, l'expression des gènes et leur localisation cellulaire seront présentés et discutés en relation avec les observations microscopiques réalisées sur la structure pariétale.

## I. Rappels bibliographiques

La composition et la structure de la paroi cellulaire changent continuellement pendant le développement de la cellule végétale impliquant une série coordonnée de processus biochimiques dont la biosynthèse des composants de la paroi cellulaire (pectines, cellulose, hémicellulose) pendant la phase de croissance de la cellule puis leur dégradation pendant la phase de maturation du fruit (Goulao, 2008).

Pendant la phase de croissance, l'épaisseur des parois cellulaires de l'épiderme externe augmente et les parois des cellules hypodermiques externes s'épaississent considérablement (Hardie *et al.*, 1996). Au début de la véraison, le ramollissement des pellicules de raisin est dû à l'hydratation et au gonflement des parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques tandis que la dégradation de la lamelle moyenne dans les assises cellulaires sous-jacentes crée un mouvement d'« ondulation » de la paroi cellulaire (Rajei, 1987 ; Huang *et al.*, 2005). Certaines cellules hypodermiques de ces assises évoluent en cellules de la pulpe au cours du développement de la baie de raisin. De nombreux travaux (Fougère-Rifot *et al.*, 1996 ; Ollat *et al.*, 2002 ; Huang *et al.*, 2005), décrivent l'évolution des parois cellulaires en deux phases : dans un premier temps, les parois des cellules hypodermiques perdent leurs polysaccharides mais maintiennent leur épaisseur puis, dans un second temps, les parois s'affinent pour devenir aussi fines que les parois des cellules de la pulpe. Ces changements structurels, comme pour les autres fruits charnus, seraient liés à l'action des enzymes de dégradation des parois cellulaires.

Au cours de la maturation de la baie de raisin, la déméthyl-estérification des pectines a lieu *in muro* par la Pectine Méthylestérase (PME) (Barnavon *et al.*, 2001). La diminution du degré de méthylation semble augmenter les zones de jonctions des chaînes homogalacturoniques par la formation d'interactions de type « *egg box* » avec les ions calcium (Rees, 1982). Le degré de méthylation modulant l'accessibilité des pectines apparaît réguler l'activité d'enzymes impliquées dans le ramollissement du fruit dont l'activité polygalacturonase (PG). Le transcrit du gène *pme* a été identifié dans la pellicule de Cabernet sauvignon et ce gène s'exprime de la fermeture de grappe à la maturité avec une augmentation de l'expression à maturité (Deytieux *et al.*, 2008). L'activité PME a été détectée par différents auteurs dans tous les tissus de la baie : les pellicules de Muscat Gordo Blanco (Nunan *et al.*,



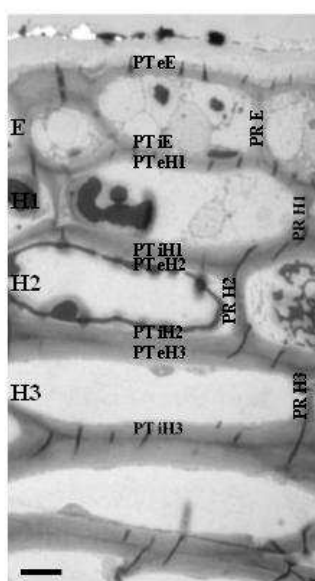
2001) à tous les stades de développement, le péricarpe de l'Ugni blanc (Barnavon *et al.*, 2001), la pulpe et la pellicule de Cabernet-sauvignon (Deytieux, 2005 ; Deytieux *et al.*, 2008). Chez le Cabernet sauvignon, cette activité chute fortement à la véraison dans les deux tissus, puis augmente à nouveau. A maturité, l'activité PME est maximale dans la pellicule et minimale dans la pulpe. Son expression tout au long du développement et la diminution constante du degré de méthylestérification des pectines insolubles étayent l'hypothèse de l'implication de la PME dans la maturation de la baie de raisin (Barnavon *et al.*, 2001).

Chez le raisin, les résultats des études concernant l'activité de la protéine PG sont très variables. En effet, Cabanne et Donèche (2001) ont montré une activité polygalacturonase croissante au cours de la maturation de la baie de raisin de cépage Sauvignon alors que Nunan *et al.* (2001) et Deytieux *et al.*, (2008) n'ont pas détecté d'activité. Concernant l'expression des gènes *pg*, Deytieux *et al.* (2008) ont caractérisé l'expression des transcrits *Vvpg1* et *Vvpg2* dans la pellicule de baie de raisin de cépage Cabernet-sauvignon : *pg1* est temporellement exprimé avec le déclenchement de la véraison alors que *pg2* est exprimé uniquement au stade fermeture de grappe et un peu avant la récolte. Leur appartenance à deux groupes distincts souligne que ces deux protéines sont impliquées, si elles sont traduites, dans des mécanismes physiologiques différents : *pg1* dans l'expansion pariétale et *pg2* dans la signalisation cellulaire grâce à la libération de résidus d'acide polygalacturonique, éliciteurs.

## II. Etude microscopique de l'ultrastructure des parois cellulaires de la pellicule au cours du développement

Afin d'étudier l'évolution de l'ultrastructure des parois cellulaires, l'épaisseur des parois des cellules a été mesurée en des millésimes 2008 et 2009 (Figure 58). Ces mesures ont été réalisées sur les parois tangentielles (PT) et radiales (PR) de l'épiderme (E) et des trois premières assises cellulaires de l'hypoderme (H1, H2, H3). Pour chaque millésime, les stades fermeture de grappe, 80% véraison et récolte ont été analysés. En 2009, les mesures ont également été réalisées sur un stade supplémentaire et intermédiaire correspondant à un prélèvement 15 jours après la fin de la véraison.

L'objectif est d'évaluer les modifications physiques de la paroi en lien avec la texture de la pellicule et en lien avec les activités enzymatiques de dégradation pelliculaire.



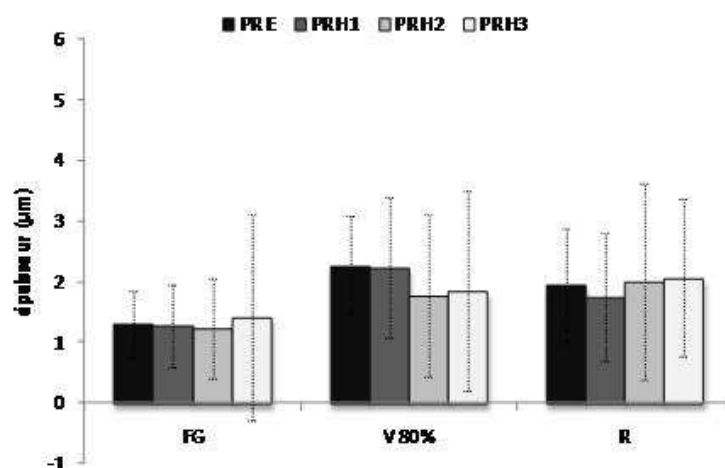
**Figure 58 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin, sections pariétales mesurées.

*E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PR E : paroi radiale de l'épiderme ; PR H1 : paroi radiale de H1 ; PR H2 : paroi radiale de H2 ; PR H3 : paroi radiale de H3 ; PTeE : paroi tangentielle externe de l'épiderme ; PTiE : paroi tangentielle interne de l'épiderme ; PTeH1 : paroi tangentielle externe de H1 ; PTiH1 : paroi tangentielle interne de H1 ; PTeH2 : paroi tangentielle externe de H2 ; PTiH2 : paroi tangentielle interne de H2 ; PTeH3 : paroi tangentielle externe de H3 ; PTiH3 : paroi tangentielle interne de H3 ; N.B. : (PTiE + PTeH1) = PTE-H1 ; (PTiH1 + PTeH2) = PTH1-H2 ; (PTiH2 + PTeH3) = PTH2-H3. Echelle : 1 µm.*

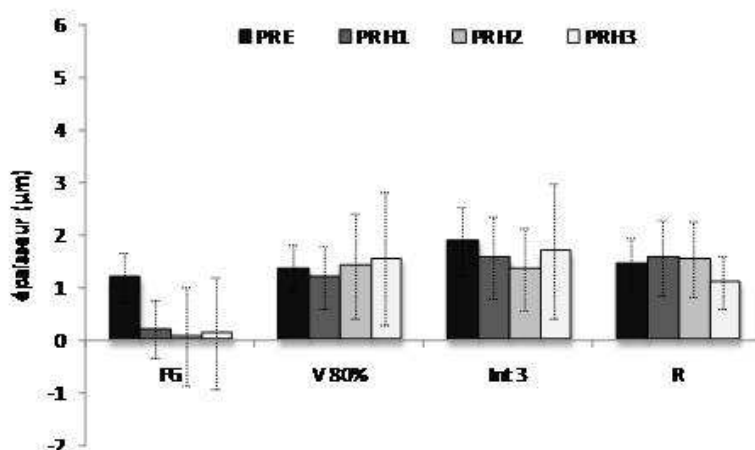
## II.1 Evolution de l'épaisseur des parois radiales des pellicules

La Figure 59 présente les résultats de l'évolution de l'épaisseur des parois radiales de la pellicule au cours des deux millésimes étudiés.

2008



2009



**Figure 59 :** Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin. Mesures de l'épaisseur des parois cellulaires (μm) radiales, aux différents stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 80%, 80% véraison ; Int3, véraison + 15 jours ; R, récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type des mesures réalisées sur 16 sections avec 2 à 4 mesures par section.

Abréviations utilisées : E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PR E : paroi radiale de l'épiderme ; PR H1 : paroi radiale de H1 ; PR H2 : paroi radiale de H2 ; PR H3 : paroi radiale de H3.

L'évolution de l'épaisseur des parois est très minime et malgré le grand nombre de mesures (16 sections de pellicules ont été observées pour chaque stade et 2 à 4 mesures ont été réalisées pour chacune des sections), l'analyse statistique des valeurs par la méthode des écarts-types n'a pas permis d'établir de différences significatives. Par contre, l'établissement des valeurs des p-values par le Test t de Student, a permis de laisser apparaître une tendance

générale pour les deux millésimes puisque l'épaisseur des parois radiales semble augmenter du stade fermeture de grappe à la fin de la véraison puis se stabiliser jusqu'à la récolte (Figure 59, Tableaux X et XI).

Ainsi pour 2008, au stade fermeture de grappe, l'épaisseur des parois radiales ne varie pas, quelle que soit l'assise cellulaire étudiée présentant des valeurs comprises entre 1,23 et 1,4  $\mu\text{m}$ . Au cours de la véraison, l'épaisseur semble augmenter significativement sur l'ensemble des quatre assises cellulaires (Test t de Student, p-value = 0,014 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XII) par rapport au premier stade étudié et les parois radiales des deux premières assises cellulaires sont plus épaisses (2,27  $\mu\text{m}$  et 2,23  $\mu\text{m}$ ) que celles des couches plus profondes (1,77 et 1,84  $\mu\text{m}$ ). A la récolte, l'épaisseur moyenne des parois radiales reste constante par rapport au stade précédent (Test t de Student, p-value = 0,928 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XII) avec une légère diminution de l'épaisseur de E et H1 (1,94 et 1,74  $\mu\text{m}$ ) et une légère augmentation de celle de H2 et H3 (1,99 et 2,06  $\mu\text{m}$ ).

**Tableau X :** Epaisseur moyenne des parois cellulaires, en  $\mu\text{m}$ , des quatre premières assises cellulaires de la pellicule à différents stades de développement pour le millésime 2008 : fermeture de grappe (FG), 80% véraison et récolte. Pour chaque stade, les moyennes représentent 2 à 4 mesures pour 16 sections observées. Les moyennes sont exprimées avec leurs écarts-types.

Abréviations utilisées : E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PR E : paroi radiale de l'épiderme ; PR H1 : paroi radiale de H1 ; PR H2 : paroi radiale de H2 ; PR H3 : paroi radiale de H3 ; PT E-H1 : paroi tangentielle entre E et H1 ; PT H1-H2 : paroi tangentielle entre H1 et H2 ; PT H2-H3 : paroi tangentielle entre H2 et H3.

|          | FG                                    | 80% Véraison                          | Récolte                               |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Paroi    | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-type | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-type | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-type |
| PR E     | 1,3 $\pm$ 0,56                        | 2,27 $\pm$ 0,82                       | 1,94 $\pm$ 0,94                       |
| PR H1    | 1,27 $\pm$ 0,69                       | 2,23 $\pm$ 1,15                       | 1,74 $\pm$ 1,06                       |
| PR H2    | 1,23 $\pm$ 0,82                       | 1,77 $\pm$ 1,33                       | 1,99 $\pm$ 1,62                       |
| PR H3    | 1,41 $\pm$ 1,69                       | 1,84 $\pm$ 1,65                       | 2,06 $\pm$ 1,3                        |
| PT E-H1  | 1,55 $\pm$ 0,42                       | 2,62 $\pm$ 0,96                       | 1,95 $\pm$ 0,57                       |
| PT H1-H2 | 2,32 $\pm$ 0,71                       | 3,57 $\pm$ 1,46                       | 2,49 $\pm$ 0,7                        |
| PT H2-H3 | 2,73 $\pm$ 0,87                       | 3,88 $\pm$ 1,48                       | 2,71 $\pm$ 0,9                        |

**Tableau XI :** Epaisseur moyenne des parois cellulaires, en  $\mu\text{m}$ , des quatre premières assises cellulaires de la pellicule à différents stades de développement pour le millésime 2009 : fermeture de grappe (FG), 80% véraison, 100% véraison et récolte. Pour chaque stade, les moyennes représentent 2 à 4 mesures pour 6 sections observées. Les moyennes sont exprimées avec leurs écarts-types.

Abréviations utilisées : E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PR E : paroi radiale de l'épiderme ; PR H1 : paroi radiale de H1 ; PR H2 : paroi radiale de H2 ; PR H3 : paroi radiale de H3 ; PT E-H1 : paroi tangentielle entre E et H1 ; PT H1-H2 : paroi tangentielle entre H1 et H2 ; PT H2-H3 : paroi tangentielle entre H2 et H3.

|          | FG                                        | 80%<br>Véraison                           | 100%<br>Véraison                          | Récolte                                   |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Paroi    | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-<br>type | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-<br>type | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-<br>type | Epaisseur<br>moyenne $\pm$ écart-<br>type |
| PR E     | 1,18 $\pm$ 0,47                           | 1,36 $\pm$ 0,45                           | 1,87 $\pm$ 0,66                           | 1,43 $\pm$ 0,5                            |
| PR H1    | 0,2 $\pm$ 0,55                            | 1,2 $\pm$ 0,59                            | 1,58 $\pm$ 0,78                           | 1,56 $\pm$ 0,72                           |
| PR H2    | 0,08 $\pm$ 0,94                           | 1,4 $\pm$ 1                               | 1,36 $\pm$ 0,78                           | 1,53 $\pm$ 0,72                           |
| PR H3    | 0,13 $\pm$ 1,05                           | 1,55 $\pm$ 1,26                           | 1,69 $\pm$ 1,28                           | 1,11 $\pm$ 0,5                            |
| PT E-H1  | 1,84 $\pm$ 0,52                           | 1,85 $\pm$ 0,46                           | 1,76 $\pm$ 0,48                           | 1,39 $\pm$ 0,36                           |
| PT H1-H2 | 2,66 $\pm$ 0,83                           | 2,46 $\pm$ 0,7                            | 2,17 $\pm$ 0,65                           | 1,75 $\pm$ 0,53                           |
| PT H2-H3 | 2,85 $\pm$ 0,98                           | 2,88 $\pm$ 1,35                           | 2,23 $\pm$ 0,64                           | 1,74 $\pm$ 0,56                           |

**Tableau XII :** Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2008 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

| Millésime | FG                                  | V 80%                               | R                                  |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 2008      | <i>1,303 <math>\pm</math> 0,095</i> | <i>1,947 <math>\pm</math> 0,248</i> | <i>1,93 <math>\pm</math> 0,168</i> |
| FG        | -                                   | 0,014                               | 0,005                              |
| V 80%     | 0,014                               | -                                   | 0,928                              |
| R         | 0,005                               | 0,928                               | -                                  |

Pour le millésime 2009, l'évolution de l'épaisseur des parois radiales est similaire à celle de 2008 avec une augmentation significative jusqu'à véraison (Test t de Student, p-value = 0,0003 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XIII) et une stabilisation jusqu'à la récolte. Au stade fermeture de grappe, l'épaisseur des parois radiales de l'épiderme (1,18  $\mu\text{m}$ ) est largement supérieure à celle de H1, H2, H3 (0,2 ; 0,08 ; 0,13  $\mu\text{m}$ ) alors qu'au cours de la véraison, l'épaisseur des parois radiales de l'hypoderme augmente considérablement (1,2 ; 1,4 ; 1,55

$\mu\text{m}$ ) et devient équivalente à celle de l'épiderme ( $1,36 \mu\text{m}$ ). Deux semaines après véraison, l'épaississement se poursuit pour les parois de E et H1 par rapport à celles des couches cellulaires plus profondes. A la récolte, l'épaisseur des parois radiales diminue légèrement mais ne diffère pas significativement des deux stades précédents (Test t de Student, p-value = 0,93 et 0 au seuil  $\alpha = 0,458$ , tableau XIII).

**Tableau XIII** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2009 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

| Millésime    | FG                                        | V 80%                                      | Int 3                                      | R                                        |
|--------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>2009</b>  | <i><b>0,137 <math>\pm</math> 0,06</b></i> | <i><b>1,383 <math>\pm</math> 0,176</b></i> | <i><b>1,543 <math>\pm</math> 0,163</b></i> | <i><b>1,4 <math>\pm</math> 0,252</b></i> |
| <b>FG</b>    | -                                         | <b>0,0003</b>                              | <b>0,0002</b>                              | <b>0,001</b>                             |
| <b>V 80%</b> | <b>0,0003</b>                             | -                                          | 0,318                                      | 0,930                                    |
| <b>Int 3</b> | <b>0,0002</b>                             | 0,318                                      | -                                          | 0,458                                    |
| <b>R</b>     | <b>0,001</b>                              | 0,930                                      | 0,458                                      | -                                        |

En comparant 2008 et 2009, les parois radiales des pellicules 2008 sont significativement plus épaisses que celles du millésime 2009 (Tableau XIV) puisqu' au cours du développement des baies, l'épaisseur des parois évolue entre  $1,303 \mu\text{m}$  et  $1,947 \mu\text{m}$  en 2008 et entre  $0,137 \mu\text{m}$  et  $1,543 \mu\text{m}$  en 2009.

**Tableau XIV** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois radiales des pellicules du millésime 2008 et 2009 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                   | FG 2008                         | V 80% 2008   | R 2008                          |
|-------------------|---------------------------------|--------------|---------------------------------|
| <b>FG 2009</b>    | <b><math>\leq 0,0001</math></b> | <b>0</b>     | <b><math>\leq 0,0001</math></b> |
| <b>V 80% 2009</b> | 0,526                           | <b>0,033</b> | <b>0,018</b>                    |
| <b>Int 3 2009</b> | 0,097                           | <b>0,020</b> | <b>0,048</b>                    |
| <b>R 2009</b>     | 0,528                           | 0,055        | <b>0,038</b>                    |

## II.2 Evolution de l'épaisseur des parois tangentielles des pellicules

De manière générale, pour les deux millésimes étudiés, l'épaisseur des parois tangentielles des cellules de la pellicule augmente durant la phase de croissance végétative et diminue durant la phase de maturation.

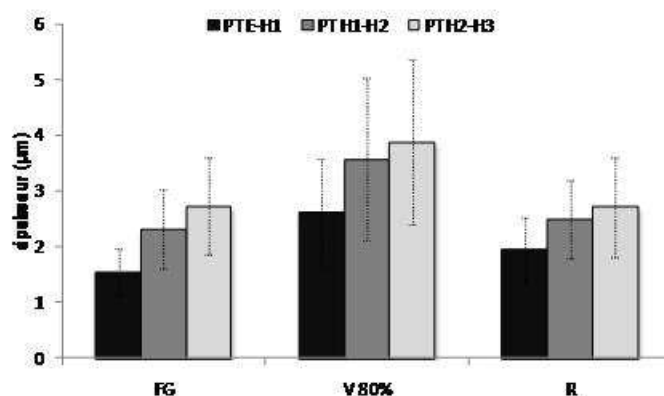
La Figure 60 montre que pour chacun des stades étudiés en 2008, l'épaisseur des parois augmente de l'extérieur vers l'intérieur de la baie. Les parois tangentielles H2-H3 sont toujours plus épaisses que H1-H2, elles mêmes plus importantes que E-H1. De plus, l'épaisseur des parois entre chaque assise cellulaire augmente significativement entre le stade fermeture de grappe et fin de la véraison (Test t de Student, p-value = 0,043 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XV), l'épaisseur moyenne des parois tangentielles augmentant de près de 50%. Par contre, au cours de la maturation, les parois tangentielles s'affinent significativement (Test t de Student, p-value = 0,027 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XV) pour atteindre une épaisseur moyenne de 2,6  $\mu\text{m}$ , semblable à celle du premier stade étudié.

**Tableau XV** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2008 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

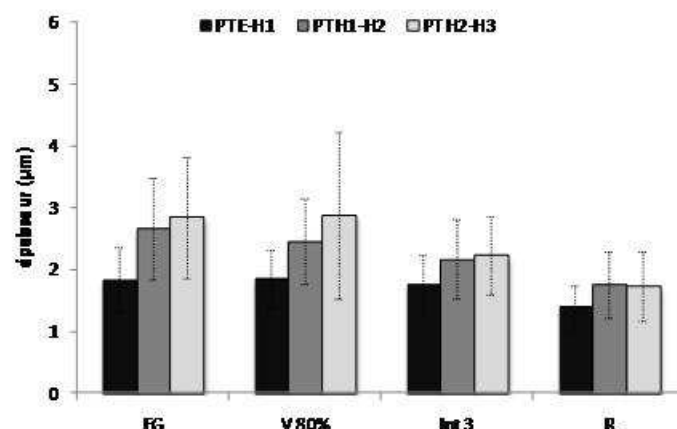
| Millésime    | FG                                 | V 80%                               | R                                 |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>2008</b>  | <i>2,525 <math>\pm</math> 0,29</i> | <i>3,725 <math>\pm</math> 0,219</i> | <i>2,6 <math>\pm</math> 0,156</i> |
| <b>FG</b>    | -                                  | 0,043                               | 0,778                             |
| <b>V 80%</b> | 0,043                              | -                                   | 0,027                             |
| <b>R</b>     | 0,778                              | 0,027                               | -                                 |

Les parois tangentielles des pellicules des baies du millésime 2009 (Figure 60) présentent les mêmes caractéristiques que celles de 2008. Pour chaque stade étudié, les parois tangentielles des assises cellulaires les plus profondes sont plus épaisses que celles des couches cellulaires superficielles. Néanmoins, au cours du millésime 2009, l'évolution de l'ultrastructure générale des parois est moins marquée qu'en 2008. En effet, les parois, épaisses au début du développement (2,755  $\mu\text{m}$ ), s'affinent durant la phase de maturation avec une perte significative de près de 40% d'épaisseur (Test t de Student, p-value = 0,009 au seuil  $\alpha = 0,05$ , Tableau XVI).

2008



2009



**Figure 60** : Etude de l'ultrastructure de la pellicule de raisin. Mesures de l'épaisseur des parois cellulaires (μm) tangentielle, aux différents stades de développement de la baie étudiés : FG, fermeture de grappe ; V 80%, 80% véraison ; Int3, véraison + 15 jours ; R, récolte, au cours des millésimes 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type des mesures réalisées sur 16 sections avec 2 à 4 mesures par section.

Abréviations utilisées : E : épiderme ; H1 : première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2 : seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3 : troisième assise cellulaire de l'hypoderme ; PT E-H1 : paroi tangentielle entre E et H1 ; PT H1-H2 : paroi tangentielle entre H1 et H2 ; PT H2-H3 : paroi tangentielle entre H2 et H3.



**Tableau XVI** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2009 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

| Millésime    | FG                                         | V 80%                                     | Int 3                                    | R                                          |
|--------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>2009</b>  | <i><b>2,755 <math>\pm</math> 0,134</b></i> | <i><b>2,67 <math>\pm</math> 0,297</b></i> | <i><b>2,2 <math>\pm</math> 0,042</b></i> | <i><b>1,747 <math>\pm</math> 0,007</b></i> |
| <b>FG</b>    | -                                          | 0,748                                     | <b>0,031</b>                             | <b>0,009</b>                               |
| <b>V 80%</b> | 0,748                                      | -                                         | 0,157                                    | <b>0,048</b>                               |
| <b>Int 3</b> | <b>0,031</b>                               | 0,157                                     | -                                        | <b>0,004</b>                               |
| <b>R</b>     | <b>0,009</b>                               | <b>0,048</b>                              | <b>0,004</b>                             | -                                          |

Comme pour les parois radiales, les parois tangentielles des pellicules de 2008 sont plus épaisses que celles du millésime 2009. Ainsi, en 2008, l'épaisseur pour les quatre premières assises cellulaires varie entre 2,525 et 3,725  $\mu\text{m}$  tandis qu'en 2009, elle fluctue entre 1,747 et 2,755  $\mu\text{m}$ . Ces résultats sont confirmés par les tests statistiques (Tableau XVII).

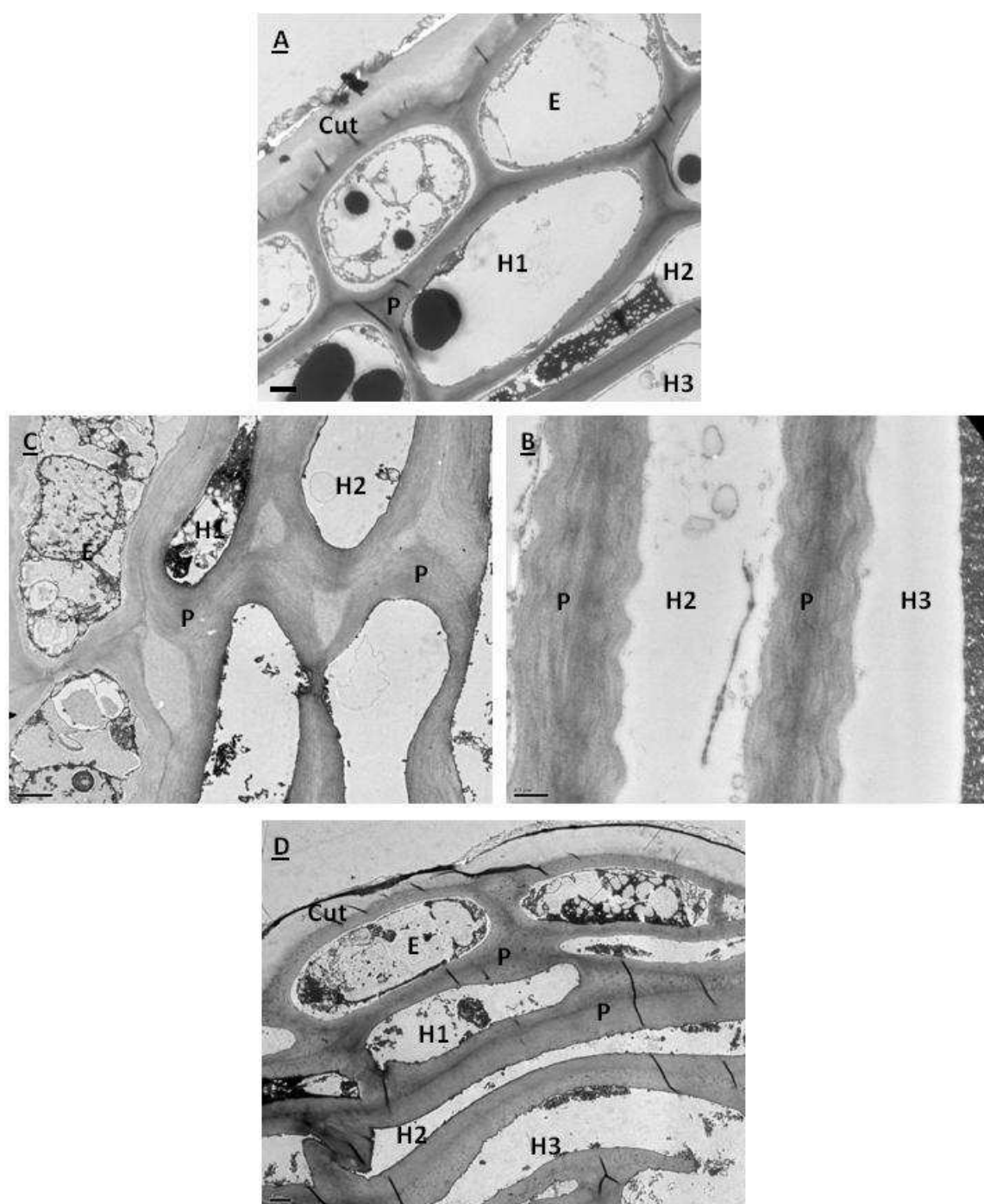
**Tableau XVII** : Valeurs des p-values déterminées par le Test t de Student pour les parois tangentielles des pellicules du millésime 2008 et 2009 au seuil  $\alpha = 0,05$ . En italique, les moyennes  $\pm$  écarts-types des 4 assises cellulaires en  $\mu\text{m}$ . En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                   | <b>FG 2008</b> | <b>V 80% 2008</b> | <b>R 2008</b> |
|-------------------|----------------|-------------------|---------------|
| <b>FG 2009</b>    | <b>0,0416</b>  | <b>0,033</b>      | 0,398         |
| <b>V 80% 2009</b> | 0,67           | 0,056             | 0,796         |
| <b>Int 3 2009</b> | 0,257          | <b>0,011</b>      | 0,073         |
| <b>R 2009</b>     | 0,063          | <b>0,006</b>      | <b>0,016</b>  |

### II.3 Discussion

L'étude de l'ultrastructure des parois de pellicules des baies de raisin a révélé une augmentation de l'épaisseur des parois, de la baie verte à la véraison, liée à une augmentation à la fois, des parois radiales et tangentielles. D'après Rajei (1987) et Huang *et al.* (2005), ce phénomène s'expliquerait par l'hydratation des parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques entraînant leur gonflement. Ces auteurs ont également décrit un mouvement parallèle d'ondulation de la paroi cellulaire lié à la dégradation de la lamelle moyenne dans les assises cellulaires sous-jacentes qui pourrait entraîner une modification de l'orientation des feuilletts polysaccharidiques et ainsi augmenter le volume. Nous avons confirmé ce phénomène dans notre étude (Figure 61) en observant des ondulations très marquées au stade fin véraison.

Notre étude confirme aussi que l'épiderme et la première assise cellulaire de l'hypoderme présentent des parois radiales plus épaisses que les autres assises et ce, jusqu'à la récolte. Cette différence d'épaisseur peut s'expliquer par les mécanismes de croissance cellulaire qui diffèrent au cours du développement et qui exerceraient des pressions différentes sur les parois en fonction de la profondeur des assises. Ainsi, avant la floraison, l'épiderme de l'ovaire se compose de cellules à parois minces qui forment la surface extérieure du gynécée. L'organisation longitudinale des cellules épidermiques est orientée parallèlement à l'axe long du pistil. Après la floraison, l'élargissement du pistil est accompagné par une vague de divisions anticlinales des cellules de l'épiderme qui présentent alors une forme cubique (Considine et Knox, 1979 et 1981) avec des parois minces et d'épaisseur équivalente sur toutes les surfaces de la cellule. Au cours de la première phase de croissance active, la taille de la baie augmente en raison d'une première étape de multiplication cellulaire puis d'une seconde phase pendant laquelle le taux de multiplication des cellules diminue laissant place à des phénomènes de grandissement cellulaire. Ce mécanisme de transformation des cellules de l'hypoderme en cellule de pulpe exerce alors une pression sur les parois longitudinales ce qui provoque prioritairement leur amincissement (Fougère-Rifot *et al.* 1996). Ainsi, avant la véraison, les cellules de l'épiderme et de l'hypoderme externe possèdent des parois (radiales et tangentielles) très épaisses et riches en polysaccharides par opposition aux parois des cellules de l'hypoderme profond, qui dans un premier temps perdent des polysaccharides tout en conservant leur épaisseur, puis deviennent fines et peu polysaccharidiques pour évoluer en cellules de pulpe (Fougère-Rifot *et al.*, 1996).



**Figure 61 :** Evolution de l'ultrastructure des pellicules de baies de Cabernet-sauvignon, en microscopie électronique en transmission, à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**, **C**) 80% véraison et (**D**) récolte.

*Abréviations : Cut, cuticule ; P, paroi cellulaire ; E, épiderme ; H1, première assise cellulaire de l'hypoderme ; H2, seconde assise cellulaire de l'hypoderme ; H3, troisième assise cellulaire de l'hypoderme. Echelle: A, C, D : 2  $\mu$ m ; B : 0,5  $\mu$ m.*

Au cours de la maturation (seconde phase de croissance active), les cellules ne se divisent plus : elles s'allongent, ce qui modifie la morphologie des cellules de l'épiderme : les cellules épidermiques sont rectangulaires et plus larges tangentiellement que radialement (Alleweldt *et al.*, 1981). Les mécanismes de pression exercés avant véraison sont accentués pendant cette dernière phase.

A l'inverse, nous avons également noté que les parois tangentielles des cellules hypodermiques étaient plus épaisses que celles des cellules épidermiques. Ces observations sont en accord avec les résultats précédents de Fougère-Rifot *et al.*, 1996 ; Ollat *et al.*, 2002 ; Huang *et al.*, 2005 . Ces différents auteurs ont largement décrit l'évolution des parois cellulaires hypodermiques qui débute au cours de la croissance de la baie verte par une perte en polysaccharides tout en conservant leur épaisseur, puis dans un second temps qui s'affinent pour devenir aussi fines que les parois des cellules de la pulpe.

Les différences d'épaisseur entre les millésimes peuvent s'expliquer par les conditions climatiques différentes. En effet, les conditions climatiques en 2009 (été sec et chaud), très différentes de celles de 2007 et 2008, pourraient être responsables d'un stress hydrique, augmentant ainsi les teneurs en ABA des baies (Constantini *et al.* 2006). Les travaux de Deytieux en 2005, montre que l'ABA et l'AIA (acide indole-3-acétique) agissent simultanément dans la maturation des baies de raisin. Lorsque les teneurs en ABA sont élevées, les teneurs en AIA sont faibles et inversement. L'AIA est une auxine naturelle couramment rencontrée chez les végétaux et impliquée dans l'élongation cellulaire selon la théorie de la croissance acide (Rayle et Cleland, 1992) : en présence d'auxines, les cellules excrètent des protons dans l'apoplasme des parois entraînant une diminution du pH apoplastique et activant des enzymes impliquées dans l'expansion pariétale (ex : expansines). Dans ses travaux, Deytieux (2005) a montré que l'apport exogène d'ABA inhibe l'activité de la PME et que l'apport exogène d'AIA régule positivement l'expression de la PME. L'effet positif de l'AIA sur la PME a également été démontré chez la fraise (Aharoni *et al.*, 2002). Or la dégradation des pectines par la PG n'est possible qu'après leur déméthylation par la PME. Dans notre étude, de la fin de véraison à la maturité, les parois radiales et tangentielles des baies de 2008 sont plus épaisses que celles des pellicules du millésime 2009 ce qui peut être dû à une modification de la régulation des activités PME et PG via l'équilibre hormonal. Ainsi, en 2008, alors que l'été a été frais et humide favorisant les mécanismes de croissance et

l'absence de stress hydrique, les teneurs en AIA auraient été importantes permettant ainsi un épaississement des parois lié au grandissement cellulaire plus intense au cours de la croissance végétative. Au contraire, en 2009, les conditions climatiques chaudes et sèches ont entraîné un stress hydrique suffisant pour augmenter significativement les teneurs en ABA et ainsi limiter l'expansion pariétale en inhibant les activités des enzymes impliquées dans la réorganisation de la paroi au cours de la croissance végétative.

*Ces observations ont permis d'évaluer les modifications structurales des parois cellulaires de la pellicule au cours du développement de la baie. L'épaisseur des parois est liée au stade de développement et aux pressions exercées lors des phases de croissance mais dépend également des conditions climatiques et notamment de l'état hydrique de la plante qui, via l'équilibre hormonal (ABA/AIA) semble être un facteur clé dans la régulation des mécanismes impliqués lors de l'arrangement du maillage pariétal.*

### **III. Etude de l'activité et de l'expression des enzymes de dégradation des parois cellulaires (PG et PME)**

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'évolution structurale des parois cellulaires de la pellicule de raisin, nous avons étudié deux enzymes responsables de cette dégradation : la PME et la PG.

L'étude de l'expression des gènes codant pour ces deux enzymes, VvPME et VvPG1, a été réalisée sur les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon prélevées au cours des millésimes 2007, 2008 et 2009. L'étude de l'activité PME a été conduite sur les mêmes échantillons, malheureusement le dosage de l'activité PG n'a pas pu être réalisé, les protocoles ne permettant pas d'obtenir des résultats reproductibles.

Afin de préciser le rôle de ces enzymes dans l'évolution des parois, nous avons entrepris, la localisation par immunomarquage à l'or en microscopie électronique, des protéines PME et PG1. Pour valider la localisation de la protéine PME, des immunomarcages ont été réalisés avec des anticorps spécifiques des pectines déméthylées :

JIM 5 et JIM 7 (JIM5 marquant les pectines faiblement méthylées, JIM7 marquant les pectines fortement méthylées).

### III.1 Activité PME

La Figure 62 présente les activités PME pour les trois millésimes (2007, 2008 et 2009). 2007 et 2008, présentent des profils similaires : l'activité augmente pendant la première période de la seconde phase de croissance (entre FG et mi véraison) puis diminue au cours de la fin véraison pour se stabiliser pendant la maturation. En 2009, l'activité PME n'est pas détectée avant la fin de la véraison. Pour les 3 millésimes étudiés, à la récolte, les valeurs mesurées sont très faibles.

Le niveau d'activité est similaire pour les trois années, il fluctue entre 0,1 et 0,3 nkatal.g<sup>-1</sup> de matière fraîche (MF) hormis pour le millésime 2008 où l'activité présente un pic une semaine avant la récolte (0,65 nkatal.g<sup>-1</sup> de MF).

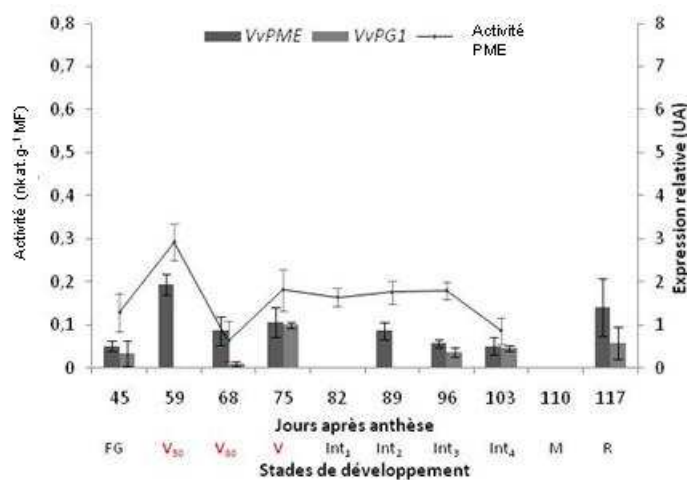
### III.2 Suivi de l'expression de VvPME

Pour les trois millésimes étudiés, le gène VvPME est exprimé dans la baie verte, au cours de la véraison et à la récolte. Il est également exprimé au cours de la maturation pour les millésimes 2007 et 2009 (Figure 62)

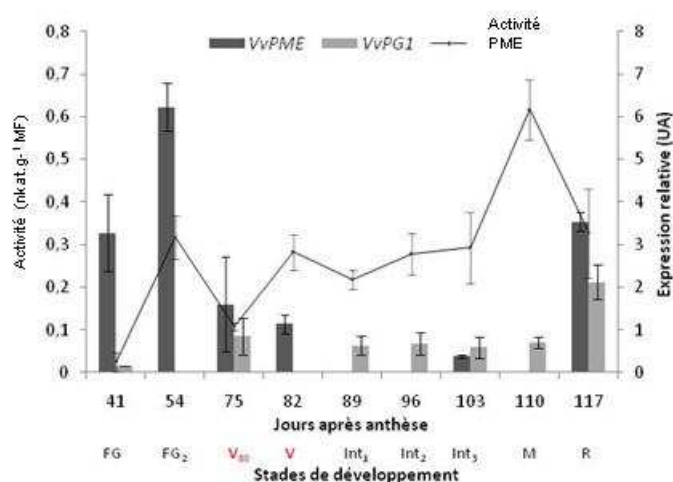
En 2007, le transcrit du gène VvPME est détecté au stade fermeture de grappe, dans la seconde phase du changement de couleur de la baie, au cours de la maturation ainsi qu'à la récolte. Le profil d'expression de ce gène augmente jusqu'à mi-véraison puis diminue jusqu'à la fin de la véraison. L'expression se stabilise ensuite lors de la maturation et réaugmente à la récolte.

En 2008, le gène VvPME est exprimé du stade fermeture de grappe à fin véraison, puis son expression est quasi nulle au cours de la maturation pour être de nouveau détectée à la récolte. De la même manière qu'en 2007, l'expression augmente en début de développement puis diminue jusqu'à fin véraison pour devenir nulle. Le transcrit est de nouveau détecté 2 semaines avant la récolte et connaît un second pic d'expression à la récolte.

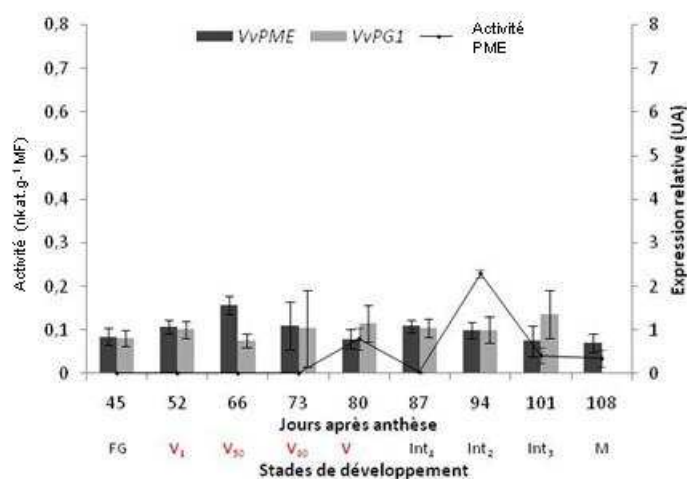
**2007**



**2008**



**2009**



**Figure 62 :** Évolution de l'activité PME, exprimée en nkat.g<sup>-1</sup> de matière fraîche (MF) et de l'expression de VvPME et VvPG1, exprimée en unités arbitraires (UA) dans les pellicules des baies de Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes. Les résultats de l'expression sont normalisés par rapport à l'expression des gènes UBI et EF1.

En 2009, *VvPME* est détecté à tous les stades du développement étudiés. Son expression augmente jusqu'à fin véraison puis diminue durant la maturation de la baie et réaugmente trois semaines avant la récolte pour diminuer de nouveau.

Les niveaux d'expression des millésimes 2007 et 2009 sont similaires (entre 1 et 2 UA) alors que ceux de 2008 sont largement supérieurs (1,5 à 6,5 UA).

### **III.3 Suivi de l'expression de *VvPG1***

Les profils d'expression du gène *VvPG1* diffèrent chaque année et son niveau d'expression est faible (Figure 62).

En 2007, le transcrit *VvPG1* est détecté dans la baie verte, en fin de véraison, au cours de la maturation et à la récolte. Son expression augmente de la fermeture de grappe à la fin véraison, est nulle en début de maturation, puis faiblement détectée en fin de la seconde phase de croissance active pour augmenter à nouveau jusqu'à la récolte.

En 2008, *VvPG1* est faiblement transcrit au stade fermeture de grappe. Son expression augmente jusqu'au début de la véraison, diminue au cours de la maturation puis réaugmente à la récolte.

En 2009, le gène *VvPG1* est exprimé de manière constante au cours du développement de la baie.

### **III.4 Discussion**

Cette étude a permis de caractériser l'activité de la PME et l'expression des gènes *VvPME* et *VvPG1*, enzymes impliquées dans la dégradation des parois, afin de mieux comprendre l'évolution de la structure pariétale.

Pour les millésimes 2007 et 2008, l'expression du gène *VvPME* peut être corrélée au profil de la courbe d'activité de l'enzyme : augmentation de l'expression et de l'activité avant et au début du changement de couleur puis expression et activité constantes pendant la seconde période de maturation. Pour le millésime 2009, l'activité n'est détectée que durant la



maturation alors que le gène est exprimé à tous les stades de développement. Ces résultats contradictoires selon les millésimes montrent combien ces activités peuvent être sensibles à différents paramètres comme les conditions climatiques, le cépage ou les conditions culturales. En effet, dans la bibliographie, les données rapportées sur le métabolisme de la PME sont très divers et parfois contradictoires : d'après Nunan *et al.*, (2001), la PME est active à tous les stades de développement dans les pellicules de Muscat Gordo Blanco alors que d'après Deytieux *et al.* (2008) cette activité chute fortement à la véraison, puis augmente à nouveau pour être maximale à maturité chez le Cabernet sauvignon. Dans tous les cas, nous retrouvons l'activité PME aux moments où les parois semblent le plus évoluer (juste avant la reprise de croissance des baies et pendant la phase de début de ramollissement du fruit). Ainsi, nos résultats confortent l'idée que la PME est une enzyme clé, intervenant au début des mécanismes de modification pariétale en agissant *in muro* sur la déméthyl-estérification des pectines, comme l'ont déjà décrit Barnavon *et al.* (2001). Ainsi, la diminution du degré de méthylation semblerait augmenter les zones de jonctions des chaînes homogalacturoniques par la formation d'interactions de type « *egg box* » avec les ions calcium (Rees, 1982) et le degré de méthylation modulant l'accessibilité des pectines, pourrait par la suite réguler l'activité d'enzymes impliquées dans le ramollissement du fruit dont l'activité polygalacturonase (PG).

L'expression du gène VvPG1 est, pour tous les millésimes, détectée durant la seconde phase de croissance active des baies. Son expression en fin de véraison est concordante avec les données de la bibliographie (Deytieux *et al.*, 2008). De plus, son expression au cours de la maturation confirmerait son implication dans l'expansion pariétale. D'après Fisher et Bennet (1991), l'action de la PME serait préalable à celle de la PG en rendant le substrat de cette dernière plus accessible. Ainsi, l'activité PG serait dépendante du degré de méthylestérification des pectines et serait d'autant plus forte que le degré de méthylation est faible. La PG catalyserait les réactions d'hydrolyse des unités et des chaînes d'acides galacturoniques induisant la désorganisation du maillage pectique.

Nos résultats confirment les hypothèses de Fisher et Bennet (1991), selon lesquelles ces deux enzymes agiraient en synergie. Ainsi le décalage de l'expression de VvPG1 par rapport à la PME se justifierait par l'action de cette enzyme sur les pectines déméthylées. Au cours de la première phase de développement de la baie de raisin, les pectines pariétales

seraient déméthylées par la PME. Durant la seconde phase de croissance, l'action de la PME se prolongerait rendant les sites d'action de la PG, les chaînes polygalacturoniques, accessibles à l'hydrolyse, permettant ainsi la désorganisation du maillage pectique.

En 2009, l'activité PME n'est pas détectée durant la première phase de croissance active ni au cours de la véraison. Les conditions climatiques en 2009 (été sec et chaud), très différentes de celles de 2007 et 2008, pourraient être responsables d'un stress hydrique, augmentant ainsi les teneurs en ABA des baies (Constantini *et al.* 2006) et inhibant l'activité de la PME (Deytieux, 2005). Par conséquent, l'inhibition de la PME aurait limité la déméthylation des pectines et donc l'hydrolyse des chaînes polygalacturoniques qui conduisent à la perte polysaccharidique des parois, permettant le relâchement du maillage pectique observé entre la fin de la croissance végétative et le début de la maturation. Par contre, l'activité PME est détectée en fin de phase de maturation parallèlement à l'expression du gène de la PG fragilisant le maillage pectique et ainsi la diminution de l'épaisseur des parois.

*Ainsi, si l'on compare ces résultats à l'évolution de la structure des parois, l'épaississement des parois du stade fermeture de grappe à la fin de la véraison pourrait s'expliquer en partie par l'action de la PME qui est seule à agir pendant cette période. Par son action de déméthylestérification des chaînes homogalacturoniques, la PME libérerait des groupements carboxyles qui interagiraient avec les ions calcium et créeraient un gel pectique entraînant un épaississement et un renforcement de la paroi étayé par des dépôts de callose et de lignine (Carpin *et al.*, 2001 ; Dunand *et al.*, 2002). Par la suite, la perte d'épaisseur pariétale observée au cours de la maturation semblerait être corrélée avec l'activité et l'expression concomitantes de la PME et de la PG. En effet, la PME en déméthylant les pectines libère des groupements carboxyles qui deviennent accessibles à la PG. Les enzymes PG entreraient alors en compétition avec les ions calcium pour hydrolyser les unités et les chaînes galacturoniques des homogalacturonanes. La digestion du réseau pectique par l'action combinée de ces deux enzymes permettrait l'amincissement des parois cellulaires.*

#### IV. Localisation des enzymes PME et PG

Si les modes d'action de ces deux enzymes ont été étudiés chez la vigne, leur localisation cellulaire n'a, à ce jour, pas été réalisée. Pour la PME, les seules études disponibles sont des études d'immunoempreinte permettant une localisation tissulaire sur l'orange, la tomate et le citron (Christensen *et al.*, 1998 ; Blumer *et al.*, 1999 ; Nielsen et Christensen, 2002). Ces études ont été complétées récemment par les travaux sur la pomme de Guillemain *et al.*, (2008). La localisation de la PME dans les parois de cellules de pomme a été confirmée par un marquage des pectines fortement méthylées, par l'anticorps JIM7 : le marquage de pectines fortement méthylées décroît en présence de la protéine PME. Chez *Arabidopsis thaliana*, Verhertbruggen *et al.* (2009), confirment la spécificité des anticorps commerciaux JIM5 et JIM7, marquant respectivement les pectines faiblement et fortement méthylées pour évaluer la dégradation du maillage pectique permettant ainsi d'utiliser des anticorps pour valider l'activité de la PME.

Concernant la protéine PG, sa localisation cellulaire a été réalisée uniquement chez la plante à fleur *Zinnia elegans* (Nakashima *et al.*, 2004).

C'est dans ce contexte scientifique que la localisation des protéines PME et PG a été entreprise sur les pellicules de baie de Cabernet-sauvignon dans le but de mieux comprendre leur mode d'action et de le relier à l'évolution structurale des parois. Pour compléter ces résultats, l'immunomarquage des produits de la réaction de la PME a été réalisée avec les anticorps primaires JIM5 et JIM7.

Les marquages ont été réalisés à trois stades de développement : fermeture de grappe, fin véraison et récolte du millésime 2008 ; et répétés en 2009 pour valider les résultats. Seuls les clichés des baies issues du millésime 2008 sont présentés dans ce manuscrit.

#### IV.1 Localisation de la protéine PME

Selon le stade étudié, la localisation de la protéine varie :

~ Dans les pellicules de baies vertes, peu de protéines PME ont été détectées. les protéines sont localisées dans le noyau (Figure 63 **A**, **B** et **C**) des cellules épidermiques mais également dans les parois des trois premières assises cellulaires de la pellicule (Figure 63 **D**).

~ Fin véraison, la détection des protéines PME a fortement augmenté et est important dans les parois des cellules épidermiques et hypodermiques (les trois premières assises) (Figure 63 **E**, **F**, **G** et **H**). Un grand nombre de protéines associées à des structures fibrillaires est détecté dans le cytoplasme (Figure 63 **E** et **G**), ainsi qu'au niveau des vésicules d'exocytose (Figure 63 **H** et **G**).

~ A maturité, le matériel cellulaire est en dégénérescence. Quelques particules sont localisées dans les cellules au niveau de vésicules (Figure 63 **I**) ainsi que dans le cytoplasme (Figure 63 **J**).

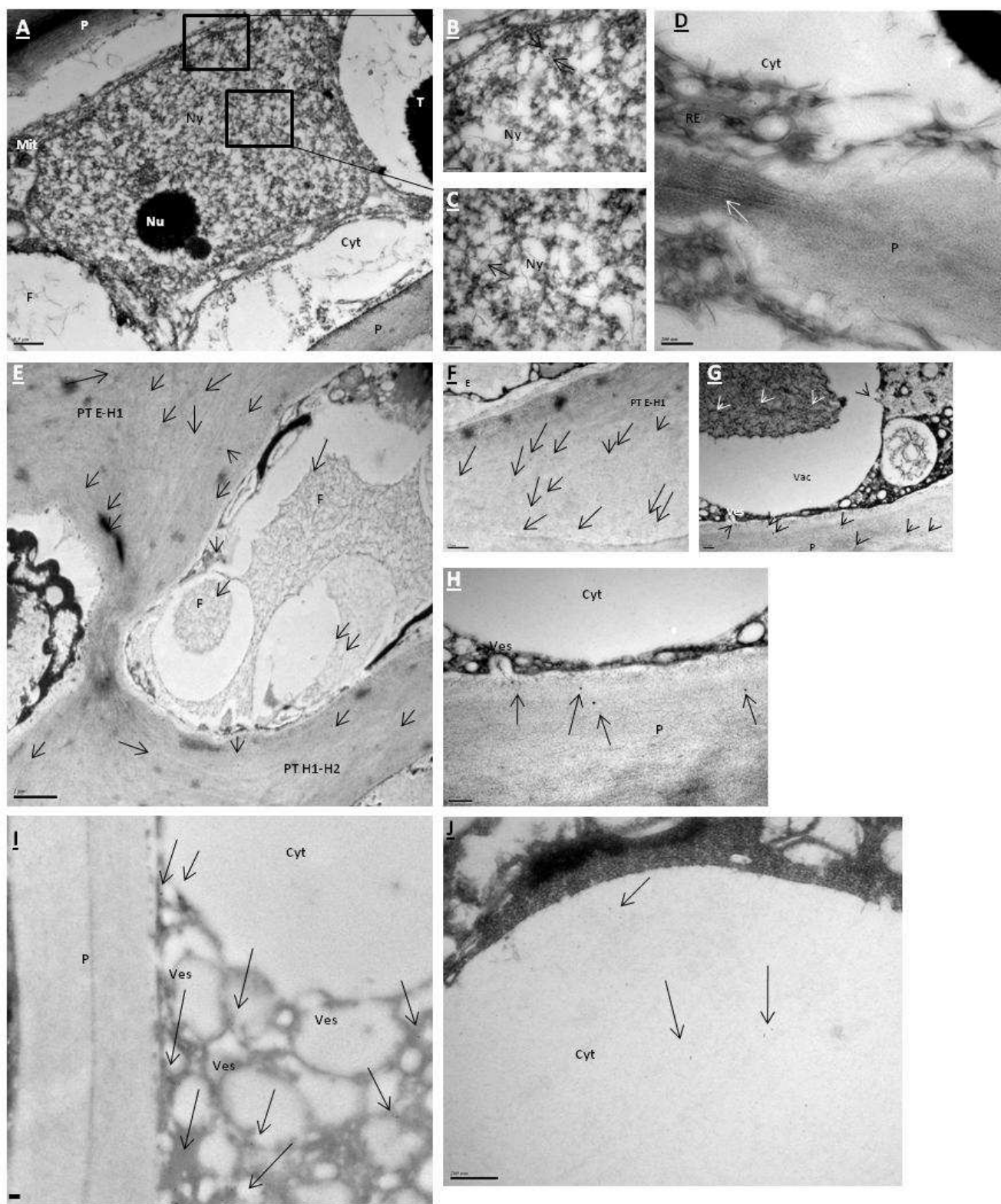
#### IV.2 Localisation de la protéine PG

De la même manière que la protéine PME, la protéine PG a été localisée aux trois stades de développement étudiés (Figure 64).

Dans les cellules des baies vertes, la protéine PG a été localisée dans le noyau (Figure 64 **A**), dans le cytoplasme (Figure 64 **B** et **C**) ainsi que dans l'espace périplasmique associée à la membrane plasmique (Figure 64 **C**).

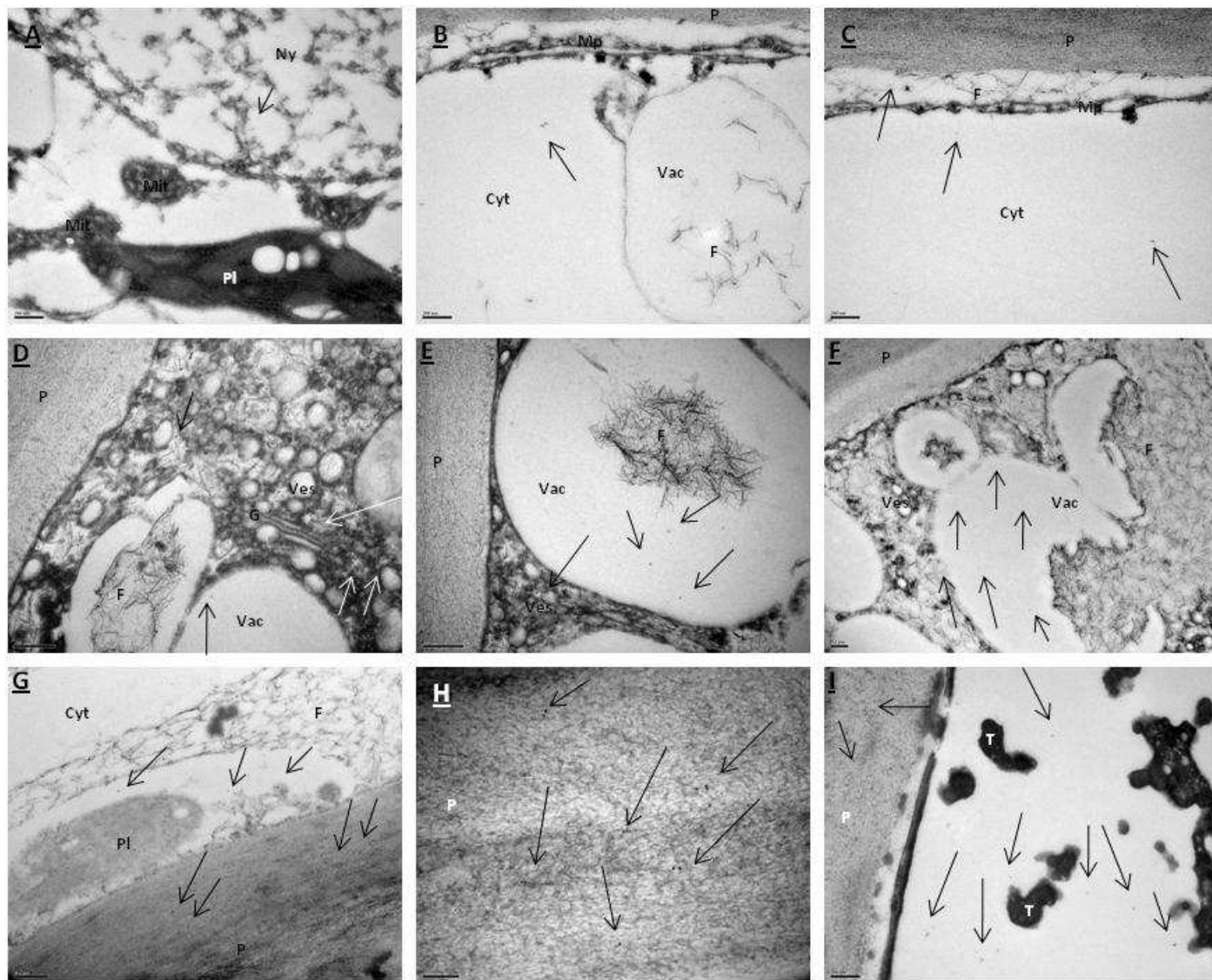
En fin de véraison, les protéines PG sont localisées dans des vésicules à proximité des appareils de Golgi (Figure 64 **D**) ainsi que dans les vacuoles libres ou associées à des structures fibrillaires (Figure 64 **E** et **F**).

A maturité, quelques protéines sont détectées dans le cytoplasme et dans les vacuoles (Figure 64 **G** et **I**) mais la majorité est localisée dans les parois des cellules et ce quelle que soit l'assise cellulaire observée (Figure 64 **G**, **H** et **I**).



**Figure 63** : Localisation de la protéine PME, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (A, B, C, D) fermeture de grappe, (E, F, G, H) fin véraison et (I, J) récolte. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine PME.

Abréviations: P, paroi cellulaire ; PT E-H1, paroi tangentielle ; E, épiderme ; H1-2, 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> assise cellulaire de l'hypoderme ; Cyt, cytoplasme ; N, noyau ; Nu, nucléole ; F, structures fibrillaires ; Ves, vésicules ; Vac, vacuole ; T, tannins. Echelle: E : 1 µm ; A, F : 0,5 µm ; D, H, G, I : 200 nm ; B, C : 100 nm.



**Figure 64** : Localisation de la protéine PG, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (A, B, C, D) fermeture de grappe, (E, F, G) fin véraison et (H, I) récolte. Les particules d'or (diamètre 6 nm) représentent la protéine PG.

Abréviations: P, paroi cellulaire ; Cyt, cytoplasme ; Ny, noyau ; Mp, membrane plasmique ; Mit, mitochondrie ; Pl, plastides ; G, golgi ; F, structures fibrillaires ; Ves, vésicules ; Vac, vacuole ; T, tannins. Echelle: A, B, C, D, E, F, G, I: 200nm ; H: 100nm.

### IV.3 Localisation des pectines diversement méthylées

Les anticorps JIM5 et JIM7 marquent respectivement les pectines faiblement et fortement méthylées. Les observations menées sur les trois stades de développement ont permis d'observer différents degrés de déméthylation des pectines (Figure 65 et 66).

Dans la baie verte, seuls les anticorps JIM5 sont présents dans les parois et dans l'espace périplasmique associés à des fibrilles (Figure 65 **A**).

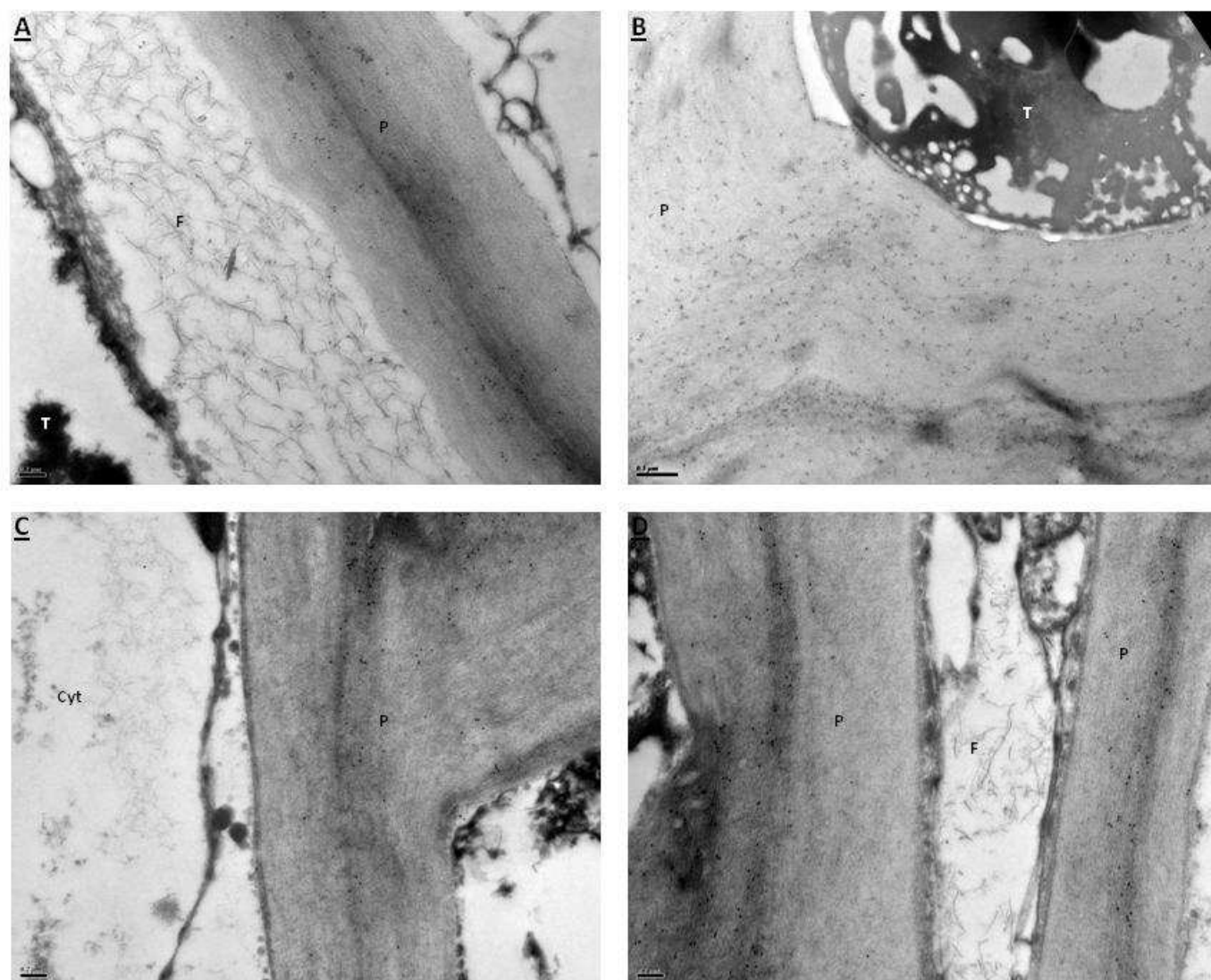
En fin de véraison, le nombre de particules JIM5 (Figure 65 **B** et **C**) et JIM7 (figure 66 **A**, **B** et **C**) est important. Elles sont essentiellement localisées dans les parois cellulaires mais également, et surtout pour JIM7, au niveau des structures fibrillaires dans les cellules.

A maturité, la localisation des particules d'or reconnaissant les anticorps primaires JIM5 et JIM7 est similaire à celle du stade fin véraison, mais le nombre de grains d'or est plus faible, traduisant une quantité plus faible de pectines méthylées.

### IV.4 Discussion

Notre travail a permis, pour la première fois, de localiser les protéines PME et PG chez la Vigne et en particulier dans les cellules de pellicules de baie. Selon les stades, la localisation varie (noyau, cytoplasme, vésicules, paroi) en relation avec l'expression et l'activité de ces enzymes. Ces résultats complètent les études précédentes menées sur les fleurs et les fruits d'orange, de pomme, de tomate et de citron qui avaient montré une localisation pariétale des enzymes PME et PG dans l'exopéricarpe, la pulpe ou les pépins (Christensen *et al.*, 1998 ; Blumer *et al.*, 2000 ; Nielsen et Christensen, 2002 ; Nakashima *et al.*, 2004 ; Guillemain *et al.*, 2008).

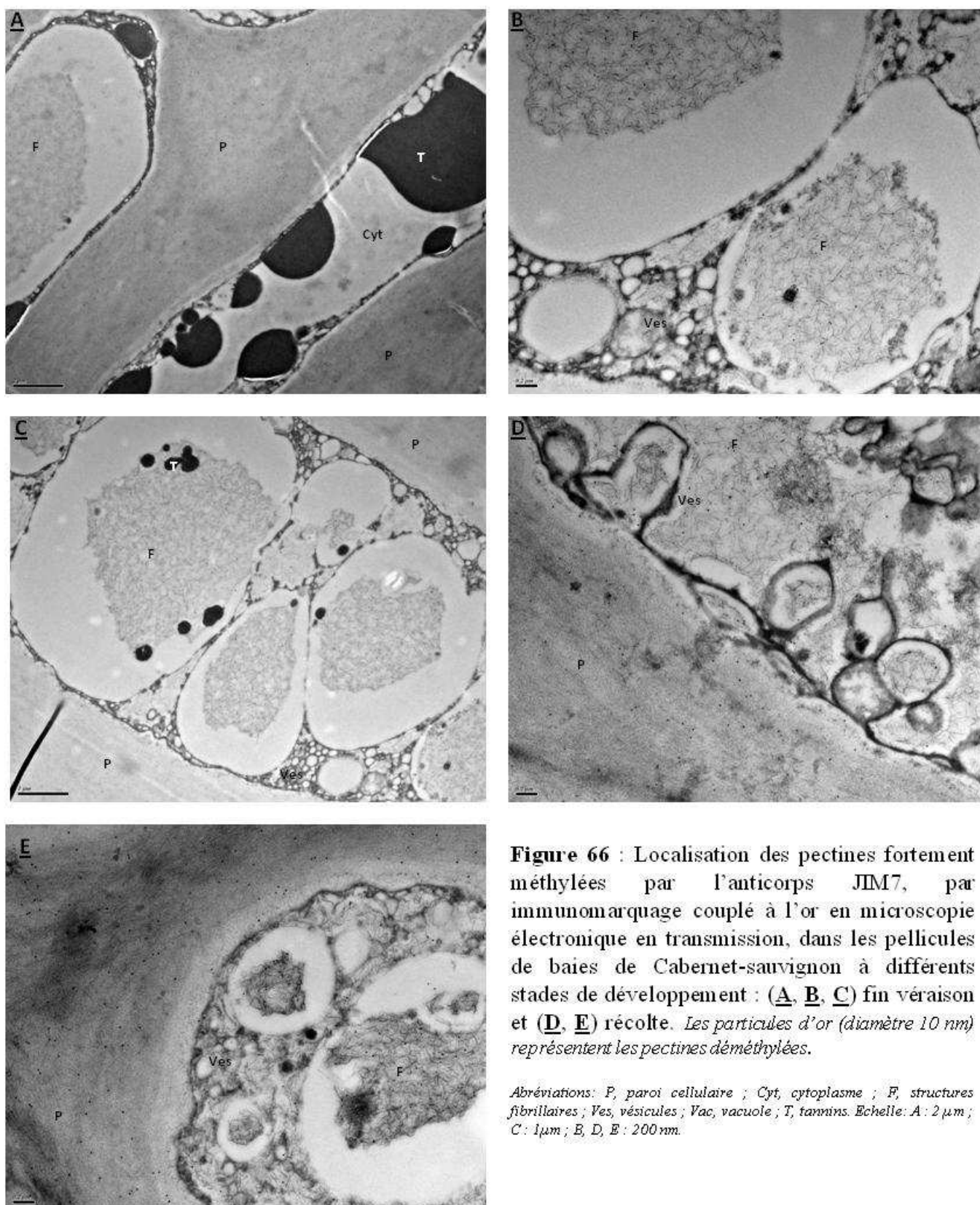
La première phase de croissance active de la baie, se divise en deux périodes : une première période correspondant à la formation et à la croissance de la baie, marquée par des divisions cellulaires intenses dont le pic se situe 8 à 10 jours après la floraison puis qui cessent 30 à 40 jours après l'anthèse, au stade fermeture de grappe (Jona et Botta, 1988) ; et une deuxième période marquée par un ralentissement de la croissance et un métabolisme cellulaire intense. Au stade fermeture de grappe, la pellicule commence à subir les pressions



**Figure 65 :** Localisation des pectines faiblement méthylées par l'anticorps JIM5, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (**A**) fermeture de grappe, (**B**, **C**) fin véraison et (**D**) récolte. Les particules d'or (diamètre 10 nm) représentent les pectines déméthylées.

Abréviations: P, paroi cellulaire; Cyt, cytoplasme; F, structures fibrillaires; T, tanins. Echelle: B : 0,5  $\mu$ m ; A, C, D : 200nm.





**Figure 66 :** Localisation des pectines fortement méthylées par l'anticorps JIM7, par immunomarquage couplé à l'or en microscopie électronique en transmission, dans les pellicules de baies de Cabernet-sauvignon à différents stades de développement : (A, B, C) fin véraison et (D, E) récolte. Les particules d'or (diamètre 10 nm) représentent les pectines déméthylées.

Abréviations: P, paroi cellulaire ; Cyt, cytoplasme ; F, structures fibrillaires ; Ves, vésicules ; Vac, vacuole ; T, tannins. Echelle: A: 2  $\mu$ m ; C: 1  $\mu$ m ; B, D, E: 200 nm.

mécaniques exercées par la transformation des cellules de l'hypoderme en pulpe et certaines modifications d'épaisseur des parois sont visibles. Par contre, les enzymes PME et PG ne sont pas encore présentes dans la paroi, elles sont localisées dans le noyau et le cytoplasme. Cette localisation nucléaire et cytoplasmique corrélée à une forte expression des transcrits de leurs gènes montre, d'une part, que le métabolisme est encore intense dans ces cellules à ce stade, et d'autre part, pourrait expliquer la mise en place des premiers processus de désorganisation de la paroi observés plus tardivement.

Par la suite, les observations réalisées à la fin de la véraison montrent la forte présence de structures fibrillaires dans des vésicules ou vacuoles cytoplasmiques. Le marquage de ces structures par les anticorps JIM5 et JIM7 confirme la présence de pectines plus ou moins méthylées dans ces ensembles et donc deux formes de PME (active et inactive). Ces pectines pourraient être en liaison avec le fait que l'appareil de Golgi puisse être un site majeur de synthèse de glucides, notamment des hémicelluloses et des pectines (Staehelin et Moore, 1995 ; Western, 2006). En effet, les études de Staehelin et Moore (1995) et Willats *et al.* (2000), par marquage avec les anticorps JIM5 et JIM7 notamment, suggèrent que la synthèse des chaînes homogalacturonanes (HG) et des rhamnogalacturonanes I (RG I) débiterait dans le cis-Golgi, se poursuivrait dans le Golgi médian et que des modifications majeures, correspondant à l'ajout de ramifications sur les chaînes polysaccharidiques en croissance, se produiraient dans le trans-Golgi. La méthylation des pectines interviendrait dans les Golgi médian et trans (Staehelin et Moore, 1995) et leur transport vers la membrane plasmique se ferait dans des vésicules sous la forme de polymères hautement méthylestérifiés qui seraient ensuite insérés dans la paroi cellulaire (Carpita et Gibeault, 1993 ; Liners *et al.*, 1994). D'après Micheli (2001), les pectines méthylestérases (PME) agiraient au niveau des parois pour d'une part désestérifier les pectines, facilitant la digestion des pectines par la PG, et d'autre part produire des chaînes homogalacturonanes plus acides (Li *et al.*, 1994), entraînant des modifications physico-chimique de la structure pariétale permettant aux cellules de résister à la pression de turgescence induite par le grandissement cellulaire (Rayle et Cleland, 1992, Cosgrove *et al.*, 2005).

Les gènes *pme* codent pour une pré-pro-protéine possédant une séquence d'adressage pour le réticulum endoplasmique. La pro-région située en N-terminal présente des homologies de séquence avec la protéine inhibitrice des PME, la PME1. Les isoformes

contenant ce domaine, ont été classées comme appartenant aux PME de type I tandis que celles de type II en sont exemptes (Micheli, 2001). Les protéines étudiées dans notre travail sont de type I. Selon l'hypothèse de Micheli (2001), le clivage de la pro-région de la protéine mature intervient soit avant, soit après l'excrétion de la PME dans l'apoplasme. Dans le cas d'un clivage avant l'expression de la PME, la pro-région est soit dégradée soit recyclée dans la cellule ou dans l'apoplasme. Les travaux de Bosch, en 2005, ont attribué ce domaine à l'adressage subcellulaire de la protéine mais aussi à une fonction inhibitrice. En effet, la pro-PME est sécrétée dans l'apoplasme via l'appareil de Golgi et la pro-région régulerait la libération des PME matures de l'appareil de Golgi (Wolf *et al.*, 2009). De plus, les études menées par Vian et Roland (1991) mettent en évidence la présence de pectines désestérifiées dans le réseau trans-Golgien, suggérant l'insertion de pectines désestérifiées dans la paroi cellulaire. Nos travaux ont permis de localiser la protéine PME dans des vésicules associées aux structures fibrillaires. Ces résultats confirment dans un premier temps le transport de la protéine PME par la voie golgienne durant la phase de changement de couleur ; d'un autre côté, le fort marquage des structures fibrillaires par l'anticorps JIM7 montre la présence de pectines fortement méthylées, confirmant l'hypothèse d'un transport de la PME vers les parois cellulaires sous une forme inactive (Micheli, 2001). Néanmoins, le faible marquage des structures fibrillaires dans la cellule par JIM5, révélant la présence de pectines faiblement méthylées, permet de confirmer les travaux de Vian et Roland (1991), mais également d'étayer la seconde hypothèse de Micheli (2001) selon laquelle la pro-région de la protéine pourrait être clivée à la sortie du Golgi, permettant une activation de la PME dans la cellule et ainsi la déméthylation d'une partie des pectines avant leur adressage dans la paroi cellulaire.

Concernant la protéine PG, à la fin de la véraison, sa localisation vésiculaire et cytoplasmique permet d'émettre l'hypothèse d'un transport similaire à celui de la protéine PME par les vésicules golgiennes. Ces résultats sont étayés par ceux de Nakashima *et al.* (2004), qui décrivent également une localisation golgienne et cytoplasmique de la PG. De plus, la transcription des gènes codant pour les protéines PME et PG ayant lieu au cours de la véraison confirme les observations microscopiques selon lesquelles la fin de la véraison correspondrait à la phase de maturation et d'adressage de ces protéines vers leur lieu d'activité : la paroi cellulaire.

A ce stade (fin véraison), nous observons également la présence des protéines PME dans les parois cellulaires. Ces observations confirment les données bibliographiques qui, quels que soient l'espèce fruitière et le stade de développement, localisent la PME dans les parois cellulaires (Christensen *et al.*, 1998 ; Blumer *et al.*, 2000 ; Nielsen et Christensen, 2002 ; Nakashima *et al.*, 2004 ; Guillemin *et al.*, 2008). De plus, c'est à ce stade de développement, fin véraison, que le marquage de la PME est le plus intense dans les pellicules de baie de raisin. Chez la tomate, l'étude de la localisation tissulaire de la PME par immunoempreinte, conforte nos observations en révélant un fort marquage de l'exopéridome au cours du changement de couleur du fruit (Blumer *et al.*, 2000). Enfin, la localisation de la PME est corrélée avec les profils d'activité de la protéine et témoigne de la reprise de son activité enzymatique: les pectines faiblement méthylées (marquage JIM5) sont essentiellement présentes dans les parois tandis que les pectines fortement méthylées (JIM7) sont présentes à la fois, dans les parois mais également, dans la cellule.

A maturité, la dégénérescence cellulaire débute, rendant difficile la reconnaissance de structures cellulaires spécifiques. Les protéines PME sont essentiellement détectées dans le cytoplasme ou dans des structures assimilées à des vésicules de lyse. La diminution de l'intensité de marquage des pectines méthylées (JIM5 et JIM7) dans les parois cellulaires est cohérente avec l'activité de la PME, montrant une forte déméthylation des pectines au cours de la seconde phase de maturation. En ce qui concerne la protéine PG, sa localisation, importante à ce stade dans le cytoplasme, mais surtout dans les parois conforte le pic d'expression du transcrit VvPG1 en fin de maturation. Les pectines déméthylées permettent l'action de digestion des chaînes homogalacturoniques par la PG et ainsi une fragilisation des parois cellulaires. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de l'épaisseur des parois cellulaires observée en microscopie entre la fin de la véraison et la récolte.

***Ainsi, pour la première fois, la PME et la PG ont été localisées dans la baie de raisin. Ces résultats permettent de mieux comprendre les phénomènes de réorganisation de la paroi au cours du développement du fruit en confirmant les hypothèses de transport des enzymes via l'appareil de Golgi et le squelette fibrillaire, ainsi que l'existence de deux formes de PME (active et inactive) et d'une action obligatoirement conjointe de la PME et de la PG.***

## V. Conclusions

Pour la première fois, chez le raisin, une étude complète sur l'évolution de l'ultrastructure des parois cellulaires de la pellicule, au cours de la maturation de la baie a été réalisée. Ce travail, par une étude de l'évolution de l'ultrastructure des parois, du suivi de l'activité et de l'expression des gènes et de la localisation cellulaire des protéines en partie responsables de la dégradation des structures pariétales tente d'expliquer les modifications physiques de la pellicule de raisin de la baie verte à la récolte.

La croissance de la baie verte se divise en deux périodes: la formation de la baie et la croissance de la baie. Notre étude débute au cours de la deuxième période, au stade fermeture de grappe au moment où les divisions cellulaires diminuent et le grandissement cellulaire débute. Le métabolisme des cellules est actif se traduisant par des teneurs en ADN élevées et l'expression d'un grand nombre de gènes dont la PME et la PG. La localisation nucléaire et cytoplasmique de ces protéines traduit ce phénomène.

Entre la fin de la phase de croissance végétative de la baie et la seconde phase de la maturation, les concentrations en solutés (notamment en acides tartrique et malique) sont maximales et l'accumulation des sucres et des anthocyanes (Boss *et al.*, 1996) débute : c'est la véraison. L'étude de l'ultrastructure des parois cellulaires nous a permis d'observer un épaissement des parois radiales et tangentielles au cours de cette phase. A ce stade, les structures fibrillaires dans les vésicules Golgiennes, dans le cytoplasme mais aussi dans l'espace périplasmique augmentent en accord avec les travaux de Staehelin et Moore (1995) et Willats *et al.* (2000). Le marquage par les anticorps JIM5 et JIM7, permet également d'étayer l'hypothèse selon laquelle l'épaississement des parois au cours de la véraison serait lié à une synthèse accrue de pectines et une migration de ces polymères dans les parois.

Entre le stade fermeture de grappe et la fin de la véraison, il y a un pic d'activité et d'expression du gène codant pour la protéine PME. Selon sa localisation, cette protéine peut être active ou inactive dans le compartiment intra-cellulaire. La co-existence de pectines plus ou moins méthylées a été confirmée par le marquage aux JIM5 et JIM7. L'observation du marquage des pectines par l'anticorps JIM5, montre la présence de pectines faiblement méthylées dans les parois cellulaires et par conséquent traduit l'activité de la PME. A ce

stade, la protéine PG a peu ou pas été détectée dans les parois cellulaires. Or, nous avons pu voir que l'action de la PME facilite d'une part, la digestion des pectines par la PG et produit d'autre part, des chaînes d'homogalacturonanes plus acides. Ces résultats permettent donc, d'émettre l'hypothèse que l'acidification des parois par la déméthylestérification des pectines sous l'action de la PME, entre la fermeture de grappe et la fin de la véraison, entraînerait des modifications physico-chimiques de la structure pariétale augmentant l'élasticité du maillage pectique et permettant aux cellules de résister à la pression de turgescence induite par le grandissement cellulaire.

A la fin de la maturation, l'épaisseur des parois cellulaires diminue en lien avec la quantité de pectines plus ou moins méthylées. La PME est principalement cytoplasmique et la PG pariétale. Parallèlement, les résultats biochimiques et transcriptomiques montrent une activité de la PME ainsi qu'une transcription des gènes PG au cours de la seconde phase de maturation. Ces résultats confirment l'action concomitante de ces enzymes : la protéine PME en déméthylant les pectines faciliterait leur digestion par la PG, entraînant la dégradation du réseau pectique du maillage pariétal et donc le ramollissement du fruit.

***Ainsi, les résultats présentés dans ce chapitre nous permettent de mieux comprendre le déroulement des étapes de réorganisation de la paroi au cours de la maturation. La PME et la PG agissent conjointement pour modifier l'agencement du maillage pariétal, la PME devant agir en amont de la PG. L'action de ces enzymes, plus ou moins modulée par les conditions climatiques via l'équilibre hormonal, va impacter directement l'épaisseur des parois des cellules de pellicule ainsi que les possibilités d'accessibilité des composés pariétaux pour d'éventuelles liaisons avec les tannins par exemple. Selon le déroulement chronologique de ces phases de réorganisation et le niveau de dégradation de la paroi, ces derniers pourraient être plus ou moins « intégrés » dans le maillage pariétal. Leur capacité à se lier aux parois cellulaires et la dégradation de celles-ci influenceraient donc leur extractibilité, leur diffusion dans le moût lors des premières étapes de vinification et la composante sensorielle tannique des moûts. Par une approche sensorielle, le chapitre 6 se propose donc d'estimer une possible adéquation entre l'état de dégradation pelliculaire (traduite par l'analyse de la texture de la baie) et le niveau de diffusion des tannins (traduite par l'extractibilité et l'évaluation de l'astringence et de l'amertume).***

## **Chapitre 6 : Etude de la texture de la pellicule de la baie de raisin au cours de la maturation**

---

La production de vins rouges de qualité constitue un enjeu économique important pour toutes les régions viticoles. Elle est directement liée à la qualité de la matière première, le raisin, qui doit contenir des teneurs suffisantes en composés d'intérêts œnologiques. Ces composés d'intérêts sont synthétisés dans la baie de raisin au cours de son développement et en partie accumulés dans la pellicule lors de la maturation, étape durant laquelle la baie de raisin connaît de nombreux changements physiologiques (grandissements cellulaires, accumulation de sucres et d'eau dans les vacuoles de la pulpe, modifications des constituants pariétaux conduisant à un ramollissement du fruit et à une augmentation de la sensibilité aux pathogènes).

La texture de la pellicule représente une part importante des caractéristiques organoleptiques de la baie et conditionne l'extractibilité des composés d'intérêt œnologique au cours des processus de vinification ainsi que leur teneur finale dans les vins.

Dans les chapitres précédents, nous avons pu démontrer et confirmer que les tannins étaient localisés et synthétisés à la fois dans le compartiment intracellulaire (vacuole principalement) mais également dans les parois des cellules de pellicule. Selon le déroulement chronologique des phases de réorganisation des parois et leur niveau de dégradation, la composante tannique varie et les tannins pourraient être plus ou moins « intégrés » dans le maillage pariétal. Leur capacité à se lier aux composés pariétaux et la dégradation de la paroi influenceraient donc leur extractibilité, la composante sensorielle tannique des raisins et leur diffusion dans le moût lors des premières étapes de vinification. Au cours de la maturation, les modifications de la composition et de la structure des parois cellulaires, pourraient déterminer la résistance mécanique et la texture du fruit (Hertog *et al.*, 2004 ; Abbott *et al.*, 2004 ;

Brummell *et al.*, 2001 et 2004 ; Deytieux *et al.*, 2008). L'étude des propriétés mécaniques de la pellicule est essentielle pour comprendre la maturation de la baie, sa résistance face aux attaques des agents pathogènes et la diffusion dans les vins des composés d'intérêts œnologiques tels que les arômes et les composés phénoliques.

A ce jour, les méthodes de détermination de la qualité du raisin et de sa maturité optimale sont plus ou moins complexes, longues et coûteuses et n'intègrent pas les paramètres de texture permettant de définir la fermeté du fruit pouvant être en lien avec la diffusion des composés d'intérêt œnologique. C'est dans ce contexte, que ce chapitre se propose d'estimer une possible adéquation entre l'état de dégradation pelliculaire (traduite par l'analyse de la texture de la baie) et le niveau de diffusion des tannins (traduite par l'extractibilité des composés phénoliques et l'évaluation de l'astringence et de l'amertume).

Pour cela, nous avons développé deux approches : une première approche basée sur des mesures physiques et analytiques de la pellicule et une seconde approche utilisant l'analyse sensorielle *via* la dégustation des baies de raisin. En comparant les résultats des deux approches, l'objectif de ce travail était :

- de développer de nouveaux outils permettant de mieux évaluer la maturité de la baie et en particulier de définir la texture et la composante tannique de la pellicule
- d'essayer de décrire quelques critères de typicité des raisins de Bordeaux.

Cette étude a été menée pendant 3 années (2007, 2008, 2009) sur 3 parcelles de Cabernet-sauvignon (parcelles 3, 4 et 5) et 3 parcelles de Merlot (parcelles 3, 4 et 5) issues du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux et représentatives de 3 zones d'appellations Bordelaises (parcelle 3 : Pessac-leognan, parcelle 4 : Entre Deux Mers et parcelle 5 : Libournais).

Après avoir caractérisé le profil tannique et la texture des pellicules par l'approche sensorielle et analytique, une comparaison des différentes approches sera réalisée et les indices d'estimation de la maturité pelliculaire testés dans ce travail (analyse sensorielle, mesures physiques) seront évalués pour essayer de caractériser des critères de typicité des raisins de Bordeaux et mettre au point de nouveaux outils d'aide à la décision pour le viticulteur.



## I. Caractérisation du profil tannique de la pellicule

Les tannins jouent un rôle important en œnologie pour la qualité et les caractéristiques organoleptiques des vins et plus particulièrement l'astringence et l'amertume. L'amertume est définie comme une saveur rude et désagréable tandis que l'astringence n'est pas décrite comme une saveur à proprement parler. En effet, l'astringence est une sensation mécanique décrite comme un phénomène qui resserre les tissus, (du latin *stringere*), entraînant une sensation d'assèchement de la bouche associée à une perte de lubrification (Bate-Smith, 1954 ; Breslin *et al.*, 1993).

L'amertume et la perception de l'astringence repose sur les interactions entre les tannins et les protéines salivaires. Certaines protéines de la salive, et plus particulièrement les protéines riches en proline (PRP), forment un précipité avec les tannins, leur faisant perdre leur propriétés tensio-actives conduisant, en bouche, à la précipitation de complexes tannins-protéines. Certains auteurs décrivent l'importance des associations entre les PRP et les tannins qui augmenteraient avec le degré de polymérisation et le pourcentage de galloylation (Ricardo Da Silva *et al.*, 1991 ; Yokotsuka et Singleton, 1995 ; Sarni-Manchado *et al.*, 1999). Le niveau d'hydroxylation des noyaux phénoliques A et B des tannins influence l'interaction tannins-protéines. Les prodelphinidines qui possèdent trois groupes hydroxyles sur le cycle B ont une plus grande affinité pour les protéines que leurs analogues procyanidines (Hagerman, 1992 ; Fernandez *et al.*, 2007). Ces auteurs ont montré que des vins issus de Carmenère, riche en proanthocyanidines et possédant un DPm très important, sont perçus moins astringents que des vins issus de Cabernet-sauvignon, dont les teneurs en proanthocyanidines et le DPm sont plus faibles. Le paradoxe a été expliqué par la richesse en prodelphinidines du Carmenère. Une étude récente a permis de mettre en évidence une corrélation entre le DPm et la perception de l'astringence des extraits de tannins issus de pellicules de Cabernet-sauvignon et de Merlot, du réseau parcellaire de la Faculté d'œnologie de Bordeaux (Chira, 2009). Dans cette étude, la perception d'amertume n'a pu être corrélée à aucune des caractéristiques de la composition tannique étudiée (DPm, pourcentage de galloylation et de prodelphinidines, teneurs totales...).

Ainsi, afin de définir l'évolution de la perception tannique des pellicules au cours de la maturation du raisin, nous avons menés en parallèles deux approches :

- une approche chimique permettant de définir l'évolution des teneurs en tannins, leur Degré de Polymérisation moyen ainsi que les pourcentages de galloylation par la technique de phloroglucinolyse.
- une approche sensorielle basée sur l'évaluation de la perte d'astringence et d'amertume des pellicules au cours de la maturation.

L'objectif final de ce travail était de vérifier si la technique actuelle de dégustation des baies utilisant comme critère de perception tannique l'astringence et l'amertume était corrélée à la composition tannique chimique. Pour cela, les analyses chimiques ont été effectuées sur des extraits phénoliques de pellicule totale pour les 6 parcelles étudiées, à partir du stade 80% véraison jusqu'à la récolte pour les millésimes 2007, 2008 et 2009. Concernant les analyses sensorielles, il a été demandé au panel de dégustateurs d'évaluer hebdomadairement, la diminution de la sensation d'astringence et d'amertume des pellicules des baies issues des 6 parcelles à partir du stade 80% véraison jusqu'à la récolte.

### **I.1 Caractérisation chimique de la composante tannique**

La détermination des critères concernant la composante tannique des pellicules a été mise au point en 2007. Des améliorations ont été réalisées en 2008 et seuls les résultats des millésimes 2008 et 2009, obtenus avec les mêmes critères, sont présentés dans ce travail.

#### **I.1.a Cabernet sauvignon**

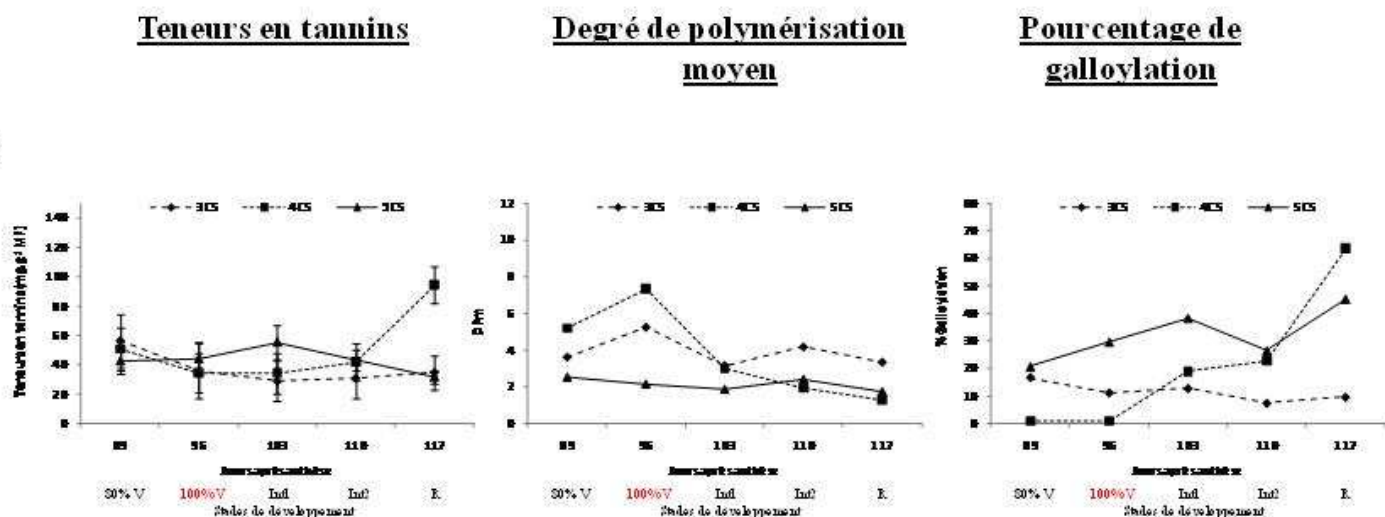
La Figure 67 présente l'évolution des teneurs en tannins, du degré de polymérisation moyen (DPM) et du pourcentage de galloylation (% Galloylation) des tannins des pellicules des parcelles de Cabernet-sauvignon des 3 appellations bordelaises étudiées (nommées 3, 4 et 5) au cours des millésimes 2008 et 2009.

Pour les deux millésimes étudiés, les teneurs en tannins, au cours de la maturation évoluent peu mais sont significativement différentes entre les parcelles. Ce critère permet de

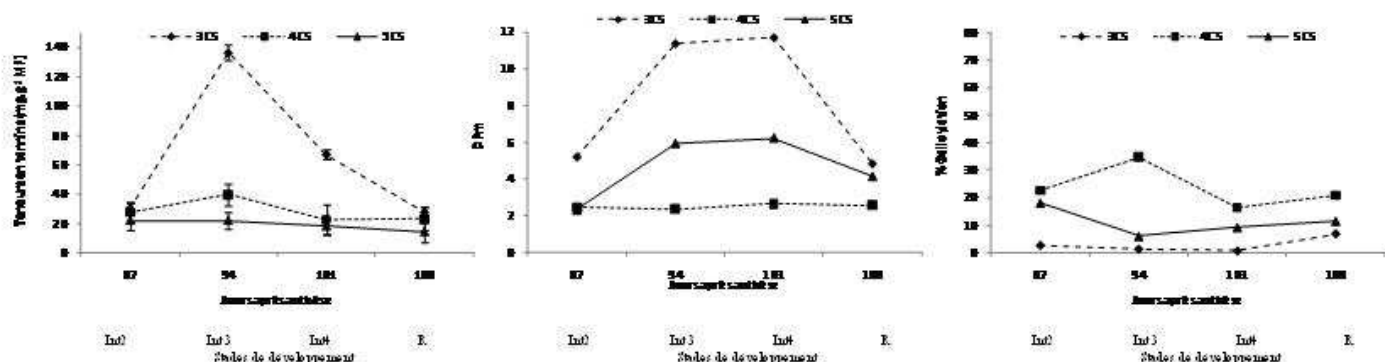
discriminer les parcelles de la région bordelaise entre elles : il semblerait que les différentes appellations étudiées possèdent une typicité en fonction de leurs teneurs en tannins.

Pour les 2 millésimes, le DPM a tendance à augmenter en début de maturation puis à diminuer alors que le % de galloylation augmente.

**2008**



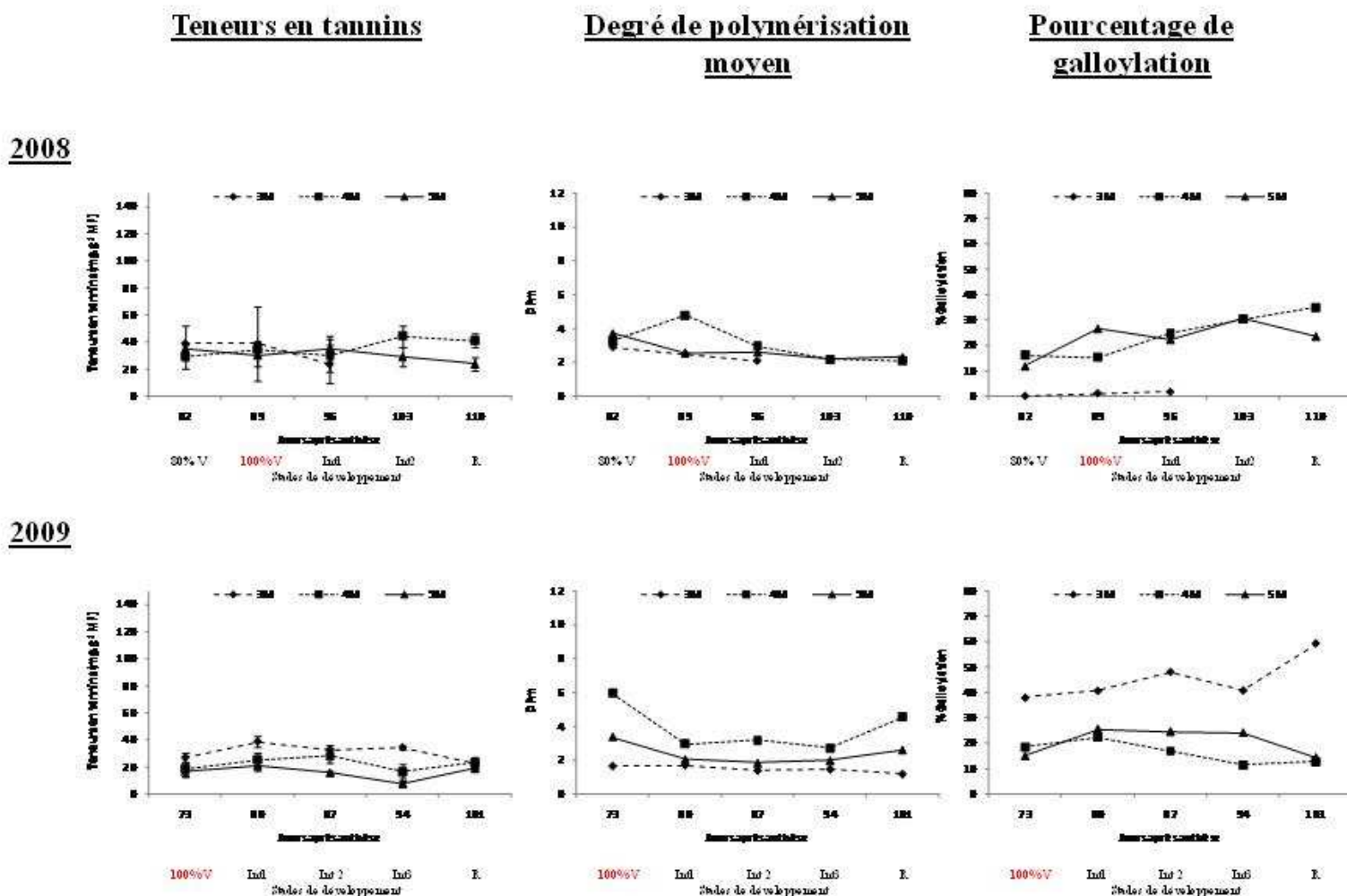
**2009**



**Figure 67 :** Teneurs en tannins (en  $\text{mg.g}^{-1}$  de matière fraîche (MF)), Degré de Polymérisation moyen (DPM) et pourcentage de galloylation (% galloylation) des pellicules des baies issues des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon, au cours de leur développement en 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes.

### I.1.b Merlot

La Figure 68 présente les résultats obtenus pour les parcelles de Merlot au cours des millésimes 2008 et 2009.



**Figure 68 :** Teneurs en tannins (en mg.g<sup>-1</sup> de matière fraîche (MF)), Degré de Polymérisation moyen (DPM) et pourcentage de galloylation (% galloylation) des pellicules des baies issues des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Merlot, au cours de leur développement en 2008 et 2009. *Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes.*

Comme pour les Cabernet-sauvignon, les teneurs en tannins évoluent peu au cours de la maturation et les DPM sont stables mais ne sont pas significativement différentes entre les parcelles. Quant au pourcentage de galloylation, comme pour les parcelles de Cabernet-sauvignon, il a tendance à augmenter.

### I.1.c Effet du millésime, du cépage et de la parcelle

Le Tableau XVIII présente les résultats des analyses de variance concernant les différences significatives de l'évolution des teneurs en tannins, du DPM et du pourcentage de galloylation en fonction du millésime, du cépage et de la parcelle au cours de la maturation

pelliculaire.

**Tableau XVIII :** Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation chimique de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                           | <u>Effet du millésime</u> |         | <u>Effet du cépage</u> |         | <u>Effet de la parcelle</u> |         |
|---------------------------|---------------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|                           | F                         | p       | F                      | p       | F                           | p       |
| <b>Teneurs en tannins</b> | 2,405                     | 0,12966 | 5,315                  | 0,02701 | 4,291                       | 0,02131 |
| <b>DPm</b>                | 0,615                     | 0,43788 | 20,731                 | 0,00006 | 2,867                       | 0,06993 |
| <b>% de galloylation</b>  | 8,593                     | 0,00583 | 17,034                 | 0,00021 | 1,645                       | 0,20725 |

D'après les résultats d'ANOVA, le cépage influence significativement l'ensemble des critères chimiques étudiés. Le DPm ( $F = 20,731$ ) est plus fortement influencé par le cépage que le pourcentage de galloylation ( $F = 17,034$ ) et les teneurs en tannins des pellicules étudiées. Nous pouvons également observer qu'il existe de légères différences significatives entre les teneurs en tannins ( $F = 4,291$ ) en fonction des parcelles étudiées. Les différences entre les millésimes ne sont significatives que pour le pourcentage de galloylation des tannins pelliculaires.

### I.1.d Discussion

En regard de ces résultats, pour les 2 cépages et les 2 millésimes, les teneurs en tannins sont globalement stables avec une légère augmentation en fin de maturation plus marquée chez le cépage Cabernet-sauvignon. Dans la bibliographie, l'évolution des tannins pelliculaires au cours de la maturation n'est pas clairement définie. En effet, les différentes méthodologies d'extraction et de dosage diffèrent et ne permettent pas d'établir un profil type d'évolution. Toutefois, nos résultats, présentent une légère augmentation des teneurs en fin de maturation et rejoignent ceux de Ribéreau-Gayon et Glories (1980) et d'Esteban *et al.* (2001) qui décrivent une augmentation des tannins pelliculaires au cours de la véraison. On remarque également que les teneurs en tannins du millésime 2009 sont légèrement plus faibles qu'en 2008. Au vu des conditions climatiques différentes entre ces millésimes et de la régulation de la voie de biosynthèse des tannins par l'ABA (Lacampagne *et al.*, 2010), il est possible d'envisager que le profil hormonal des baies du millésime 2009 explique cette diminution. En outre, de manière générale, pour les 2 millésimes et les deux cépages, on remarque que la

parcelle 4 dite technologiquement «moins mûre » que les autres (<http://www.bordeauxraisins.fr>), présente des teneurs en tannins supérieures aux autres. Ceci pourrait étayer l'hypothèse d'un lien entre le degré de maturation des pellicules et les profils tanniques, confirmant ainsi l'importance et l'implication des hormones tels que l'ABA à la fois dans les processus de maturation et dans la voie de biosynthèse des tannins.

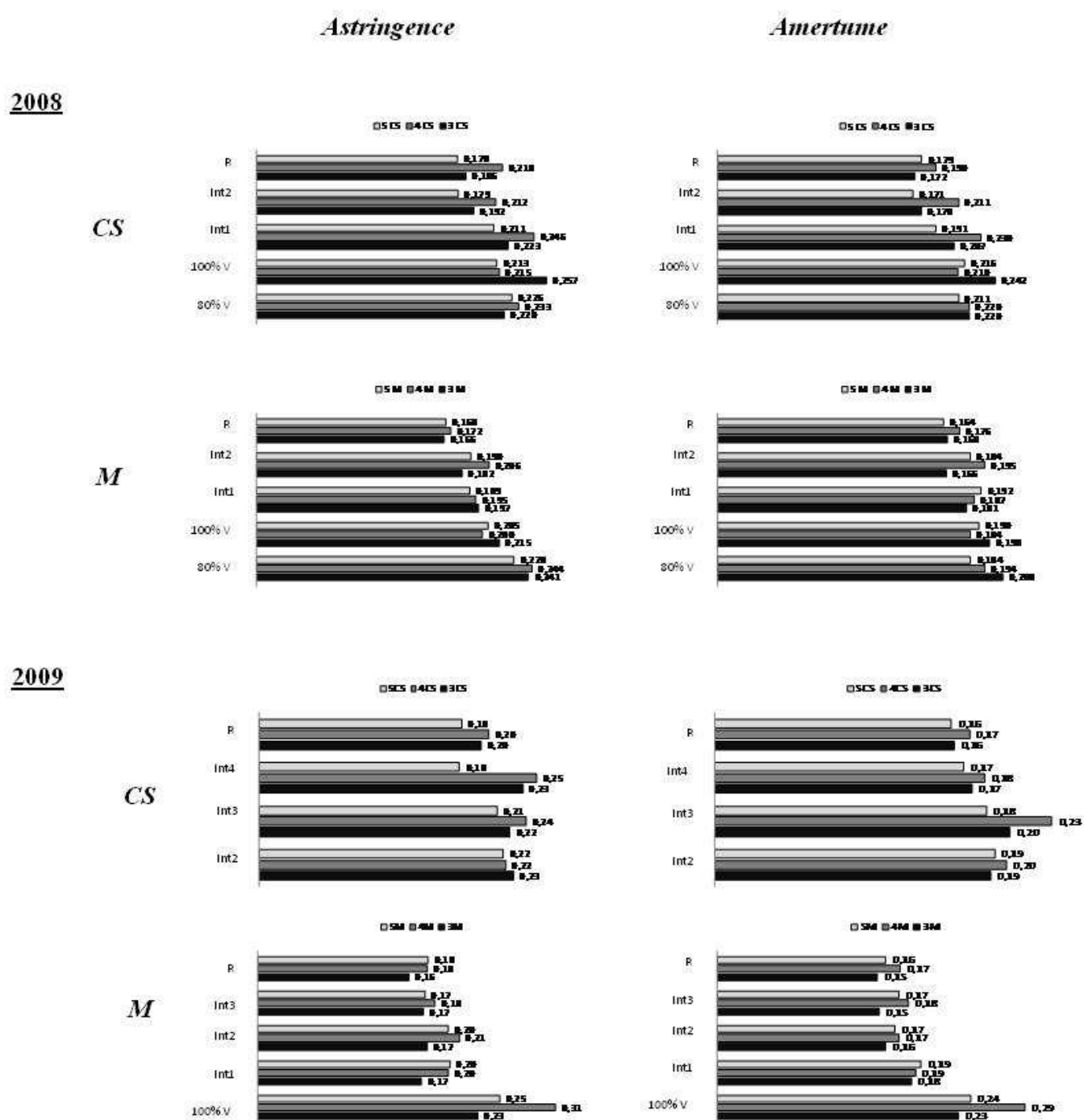
A propos de l'évolution du degré de polymérisation des tannins et de leur pourcentage de galloylation, nos résultats montrent que pour l'ensemble des parcelles et quel que soit le millésime et le cépage, ils évoluent dans le sens inverse au cours de la maturation : diminution du DPm et augmentation du pourcentage de galloylation. De la même manière que pour les teneurs en tannins, les données bibliographiques diffèrent sur ces paramètres et notamment sur le DPm. Ainsi, nos résultats semblent plutôt en accord avec ceux de Ribéreau-Gayon et Glories (1980) et Downey *et al.* (2003), décrivant une diminution au cours de la maturation contrairement à Kennedy *et al.* (2001 et 2002) qui observent une augmentation. Comme cela a été précisé auparavant, les données de la littérature diffèrent par la méthodologie d'extraction et de dosage. Or, nous avons vu dans les chapitres précédents qu'en fonction de leur localisation, vacuolaire ou pariétale, les teneurs et la polymérisation des tannins variaient. Il est donc possible de penser que les méthodes d'extraction jouent un rôle primordial dans l'évaluation du profil tannique de l'ensemble de la pellicule et que la limite des différentes méthodes d'extraction demeure dans l'extractibilité de la totalité des tannins pariétaux.

## **1.2 Caractérisation sensorielle de la composante tannique**

Pour évaluer la composante tannique des pellicules de raisin, 3 critères ont été demandés aux juges : la diminution de l'intensité tannique en 2007 puis la diminution de l'astringence et de l'amertume en 2008 et 2009. La Figure 69 présente l'évolution des critères évalués par notre panel au cours des millésimes 2008 et 2009 : astringence et amertume.

Dans un premier temps et comme pour les critères analytiques, les résultats obtenus à partir des descriptifs sensoriels ne permettent pas d'observer de différences entre les parcelles, les cépages et les millésimes. Cependant, nous pouvons observer une diminution de l'astringence et de l'amertume au cours de la maturation. Cette diminution est plus marquée au cours du millésime 2008, dont les teneurs en tannins et le pourcentage de galloylation sont supérieurs à ceux du millésime 2009. On note également que pour les deux millésimes, la parcelle 4CS et 4M, est perçue comme plus astringente et plus amère par les dégustateurs.

L'analyse chimique avait permis d'établir un profil tannique plus riche pour cette parcelle.



**Figure 69** : Evaluation sensorielle des critères tanniques (Astringence et Amertume) des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 (Cabernet-sauvignon et Merlot) au cours de la maturation du raisin en 2008 et 2009. Les données expriment le rapport inverse des notes des juges comprises entre 1 et 8.

Pour compléter ces résultats, une analyse ANOVA a été réalisée et les résultats sont

présentés dans le Tableau XIX.

**Tableau XIX** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation sensorielle de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                    | <u>Effet du millésime</u> |         | <u>Effet du cépage</u> |         | <u>Effet de la parcelle</u> |          |
|--------------------|---------------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------------|----------|
|                    | F                         | P       | F                      | p       | F                           | p        |
| <b>Astringence</b> | 0,435                     | 0,51372 | 24,4502                | 0,00002 | 3,390                       | 0,044766 |
| <b>Amertume</b>    | 7,497                     | 0,00955 | 7,893                  | 0,00797 | 3,061                       | 0,65916  |

Comme pour les critères chimiques, l'évaluation sensorielle de l'astringence et de l'amertume permet de différencier significativement ( $F = 24,4502$  et  $F = 7,893$ ), les pellicules en fonction du cépage. Le millésime joue un rôle sur la perception de l'amertume ( $F = 7,497$ ) comme pour le pourcentage de galloylation et la perception d'astringence semble être influencés par le type de parcelle étudiée ( $F = 3,390$ ) comme le sont les teneurs en tannins.

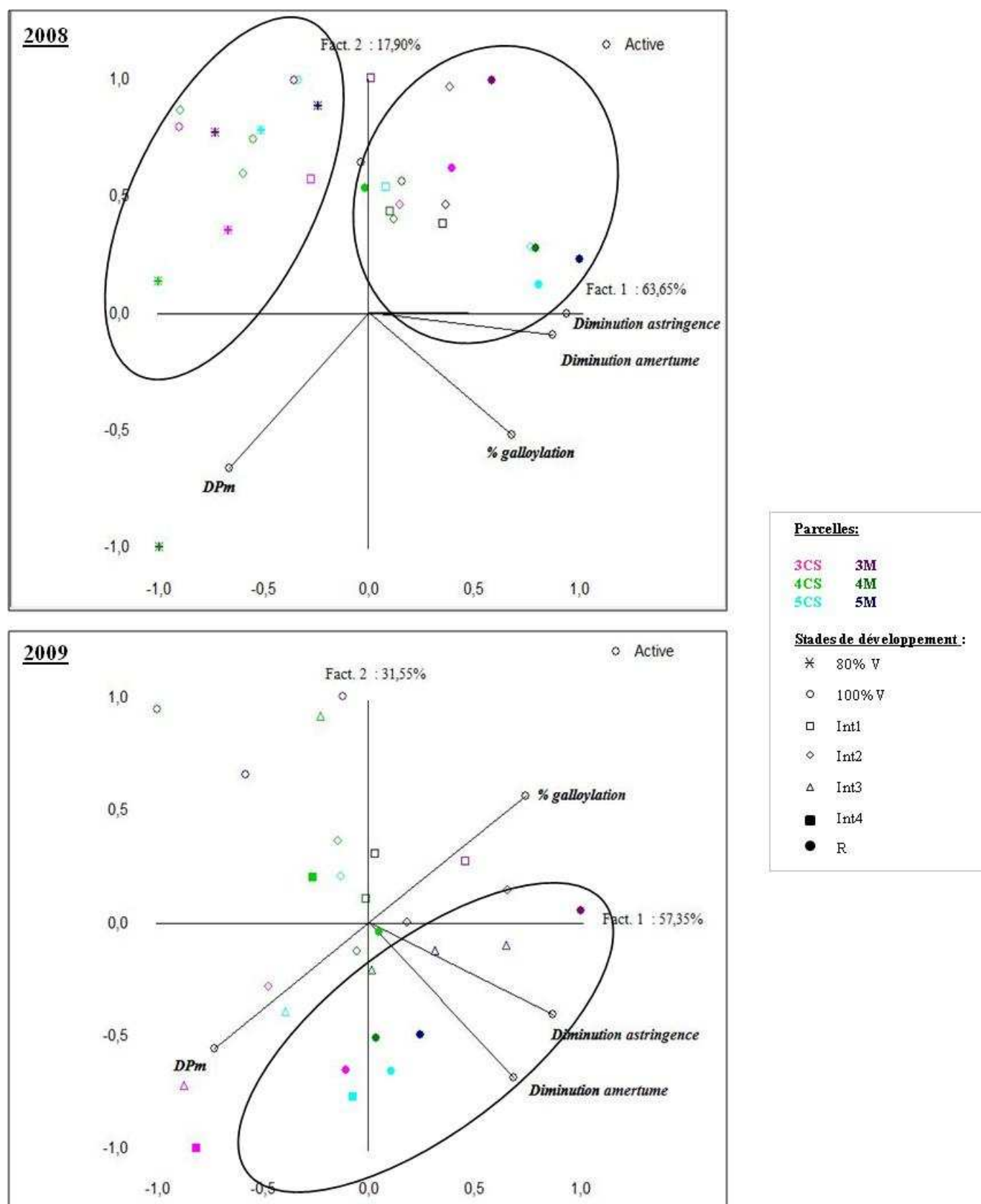
Afin de mieux visualiser, si les différences entre les variables chimiques et sensorielles pouvaient discriminer les parcelles ainsi que les stades de maturation de la baie, des Analyses à Composante Principale (ACP) ont été effectuées.

### I.3 Profil tannique chimique et sensoriel

La Figure 70 présente les ACP effectuées pour les 3 millésimes étudiés. Pour chacune des ACP, les variables étudiées correspondent aux critères sensoriels d'évaluation du potentiel tannique de la pellicule (diminution de la perception d'astringence et d'amertume) et aux critères chimiques (Dpm et pourcentage de galloylation).

En 2008, les deux premières composantes principales rassemblent 81,55% de la variance totale. Le premier axe représente 63,65% de la variance totale et le deuxième 17,90%. L'astringence et l'amertume sont fortement et positivement corrélées à l'axe 1 (0,939 et 0,874) alors que le pourcentage de galloylation est corrélé positivement à l'axe 1 (0,677) et négativement à l'axe 2 (-0,667) et que le Dpm est négativement corrélé à l'axe 1 (-





**Figure 70** : Représentation ACP des individus (80% V, 100%V, Int1, Int2, Int3, Int4 et R pour les 6 parcelles étudiées : 3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M) et des variables (Intensité tannique, diminution de l'astringence, diminution de l'amertume, DPm et pourcentage de galloylation) en 2008 et 2009.

0,662) ainsi qu'à l'axe 2 (-0,519). Le profil tannique chimique et sensoriel pourrait influencer la discrimination des individus en fonction de leur stade de développement : les stades 80% et 100% véraison sont préférentiellement localisés dans la partie gauche et supérieure alors que le stade intermédiaire 1, 2 et 3 et le stade maturité sont plutôt situés dans la partie droite et supérieure. Ainsi, l'axe 1 serait défini comme l'axe de « maturation phénolique de la pellicule » et l'axe 2 comme l'axe de « composition tannique » de la pellicule.

En 2009, les deux premières composantes principales rassemblent 88,9% de la variance totale. Le premier axe représente 57,35% de la variance totale et le deuxième 31,55%. L'astringence et l'amertume sont positivement corrélées à l'axe 1 (0,868 et 0,682) alors que le pourcentage de galloylation est corrélé positivement à l'axe 1 (0,737) et négativement à l'axe 2 (-0,558) et que le DPm est négativement corrélé à l'axe 1 (-0,728) ainsi qu'à l'axe 2 (-0,561). On note une dispersion des individus entre les deux axes mais les profils tanniques chimiques et sensoriels pourraient influencer la discrimination des individus en fonction de leur stade de développement : les stades intermédiaires 3, 4 et maturité sont plutôt situés dans la partie droite et inférieure indiquant qu'à partir de ces stades la diminution d'intensité de l'astringence et de l'amertume est perçue.

#### **I.4 Conclusion**

L'étude chimique et sensorielle du profil tannique a montré que le cépage influençait l'ensemble des critères chimiques et sensoriels d'évaluation de la composante tannique des pellicules. Il est donc possible par les mesures des teneurs en tannins, de leur DPm et du pourcentage de galloylation ainsi que par la perception de l'astringence et de l'amertume de la pellicule de différencier les deux cépages principaux de la région bordelaise : le Cabernet-sauvignon et le Merlot. Ces résultats sont corrélés aux observations de Chira en 2009, qui a démontré, sur des extraits de tannins de pellicules au stade récolte sur les parcelles 3, 4 et 5 du réseau de maturité de la Faculté d'œnologie de Bordeaux, une discrimination du DPm, du pourcentage de galloylation et de l'astringence en fonction du cépage.

Nos résultats montrent qu'il est difficile d'utiliser ces critères comme « descripteur type » car ils semblent avoir des « poids différents » : l'effet parcelle affecte uniquement les teneurs en tannins et la perception de l'astringence alors que le millésime affecte uniquement le pourcentage de galloylation des tannins et la perception d'amertume. Ces résultats sont en

accord avec ceux de Chira (2009) qui a démontré que le type de parcelle influençait la perception d'astringence et que l'effet millésime était le plus significatif sur la perception d'amertume.

Les ACP réalisées avec l'ensemble des critères chimiques et sensoriels utilisés pour caractériser la composante tannique des pellicules montrent également qu'il est possible par cette méthode de discriminer les différents stades de maturation des pellicules mais aucune corrélation dans ce sens n'a pu être établie dans ce travail.

*Ainsi en raison de ces nombreuses variations, la discrimination des échantillons pour l'évaluation de la maturité phénolique de la pellicule par l'analyse des critères chimiques et sensoriels n'est pas encore envisageable.*

*En effet, l'analyse chimique ne semble pas satisfaisante et le choix des critères chimiques peut être discuté puisque, dans la littérature, la contribution de ces composantes dans l'attribution de l'astringence et de l'amertume est très contestée. Ainsi, d'après Rossi et Singleton (1966), les flavan-3-ols monomères contribuent à l'astringence et l'amertume. Pour Thorngate et Noble (1995) et Kallithraka et al. (1997), l'(-)-épicatechine serait plus amère et astringente que la (+)-catéchine. Pour d'autres auteurs (Glories, 1978 ; Haslam, 1980), l'oxydation, la polymérisation et la complexation aux polysaccharides et aux anthocyanes entraîneraient une modification des propriétés sensorielles des tannins et seraient en partie responsables de l'assouplissement des vins. Enfin, selon Vidal et al. (2004), l'astringence augmentait linéairement avec la concentration en composés phénoliques des pépins de raisin alors que l'amertume ne serait pas influencée. Il faudrait donc développer de nouveaux marqueurs chimiques pour mieux apprécier ces critères sensoriels.*

*De plus, l'évaluation de la composante tannique de la pellicule par l'approche sensorielle s'avère délicate. Le premier critère choisi au début de cette étude était l'intensité tannique (critère empirique), mais les résultats obtenus en 2007, nous ont conduits à préciser ce critère en adoptant des critères plus spécifiques et utilisés habituellement dans la dégustation des vins. Mais, il semble encore que ces deux termes puissent être trop « flous » ou mal adaptés pour le dégustateur. En effet, selon Lesschaeve (observations inédites, 2003), les consommateurs utiliseraient le terme « amer » lorsqu'ils n'apprécient*

*pas le vin alors que la connotation du terme astringent est plus positive, puisqu'elle serait synonyme de « beaucoup de caractère » ou « une finale longue ». Malgré son entraînement, notre jury aura pu être influencé au moment de la dégustation de baies. Un second facteur peut être considéré : la matrice. En effet, notre panel a été entraîné sur des solutions alors que les dégustations ont été réalisées à partir de pellicule donc matrice solide. L'astringence est une sensation et non un goût, la solidité de la matrice pourrait influencer la perception de ce critère. Une méthode d'entraînement de la perception tannique dans des matrices de textures différentes semble indispensable à développer.*

## II. Evaluation de la texture de la pellicule

A travers les chapitres précédents, nous avons pu voir que texture de la pellicule de raisin (par l'évolution de son ultrastructure) et extractibilité des tannins étaient étroitement liées. A ce jour, peu d'études ont permis de définir les propriétés mécaniques de la pellicule de raisin, alors que, sur d'autres fruits (pomme, tomate, kiwi) la texture est une mesure couramment utilisée pour définir leur maturité, leur aptitude à la conservation ou à la transformation et en apprécier leur qualité (Zude *et al.*, 2005 ; Camps *et al.*, 2005).

Les principaux outils utilisés permettent d'étudier la compression du fruit et de mesurer la déformabilité de celui-ci. Plusieurs études chez la pomme (Méhinagic *et al.*, 2003 et 2004) ont mis en évidence une corrélation entre l'évolution de la texture du fruit, la composition chimique et l'évaluation sensorielle. En 2001, l'équipe de Grotte *et al.*, puis en 2007, celle de Le Moigne *et al.* ont montré que l'étude de la compression des baies de raisin était très pertinente pour suivre l'évolution des propriétés texturales au cours de la maturation en lien avec les descripteurs sensoriels et permettait de discriminer fortement le type de parcelle. Cependant, les textures sont différentes en fonction des années mais aussi des stades ; ainsi, à l'approche de la date de vendange, les textures se ressemblent et deviennent peu différenciables par cette méthode.

Dans notre étude, l'outil de mesure physique choisi pour évaluer la texture du fruit est le pénétromètre. Cet outil permet de mesurer la force nécessaire pour percer la pellicule et nous avons voulu voir si cette mesure permettait de déterminer l'état de maturité de la

pellicule de raisin. En parallèle, nous avons mesuré l'activité de l'eau libre ( $A_w$ , water availability) de la pellicule puisque des études précédentes au laboratoire, ont montré que cette mesure apportait des renseignements sur l'état de dégradation pelliculaire en lien avec l'état sanitaire de la baie (Deytieux *et al.* 2009). D'un point de vue sensoriel, quatre descripteurs : aptitude à l'égrenage, aptitude à l'écrasement, dilacération et adhérence pulpe-pellicule ont été utilisés par notre panel de dégustateurs pour évaluer la texture des pellicules au cours de la maturation des baies.

Comme dans le paragraphe précédent, l'étude physique et sensorielle a été réalisée sur les 6 parcelles de Cabernet-sauvignon et de Merlot à partir du stade 80% véraison au cours du développement de la baie en 2007, 2008 et 2009.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la texture de la pellicule au cours de la maturation par deux approches, physique et sensorielle, et de voir si ces approches se révélaient être un bon outil pour évaluer la texture de la pellicule de raisin.

## **II.1 Mesures physiques**

### **II.1.a Pénétrométrie**

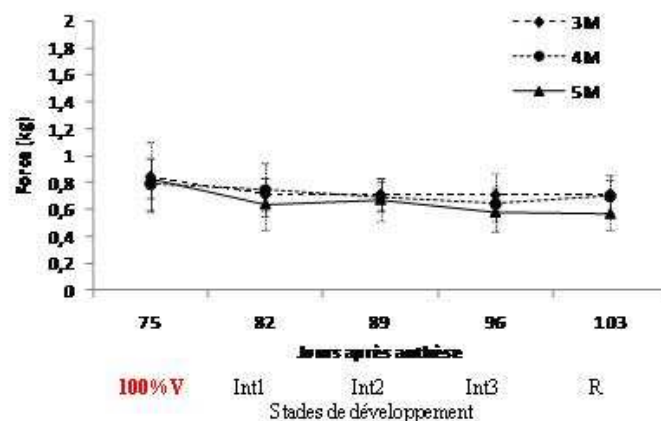
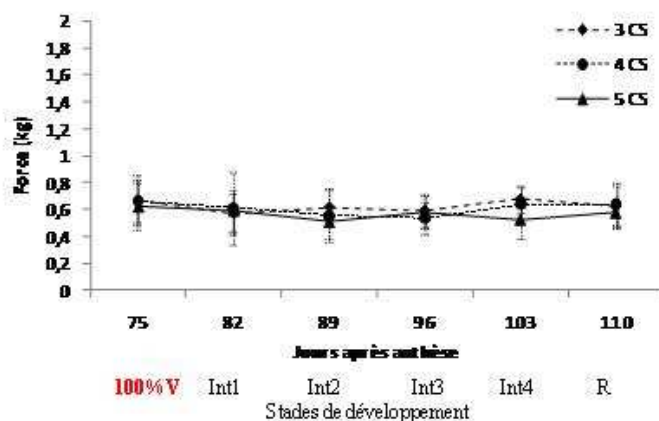
La figure 71 présente les résultats des mesures effectuées avec le pénétromètre. Les résultats sont exprimés en kg et correspondent à la force nécessaire pour percer la pellicule du raisin reflétant ainsi la fragilité de la pellicule. Pour chaque mesure, 30 baies ont été pénétrées.

De manière générale, on remarque que les écarts entre les mesures sont faibles mais diminuent significativement au cours de la maturation de la baie et ce quel que soit le cépage et la parcelle. L'analyse ANOVA effectuée (Tableau XX) montre qu'il est possible pas cet outil de différencier les parcelles, le cépage mais également le millésime.

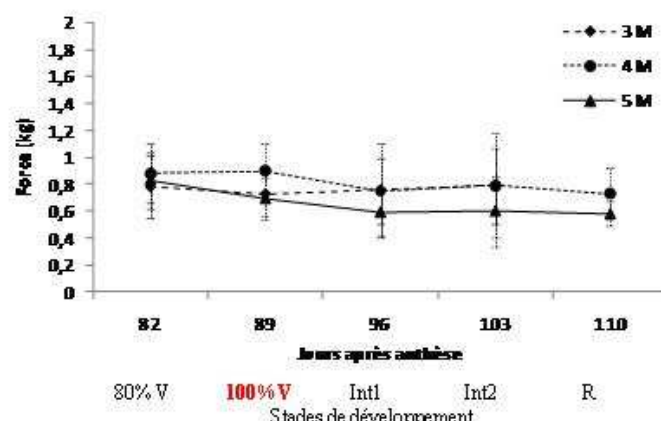
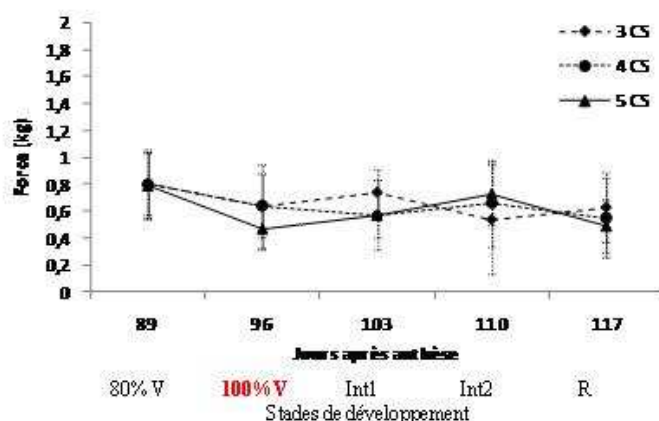
### Cabernet-sauvignon

### Merlot

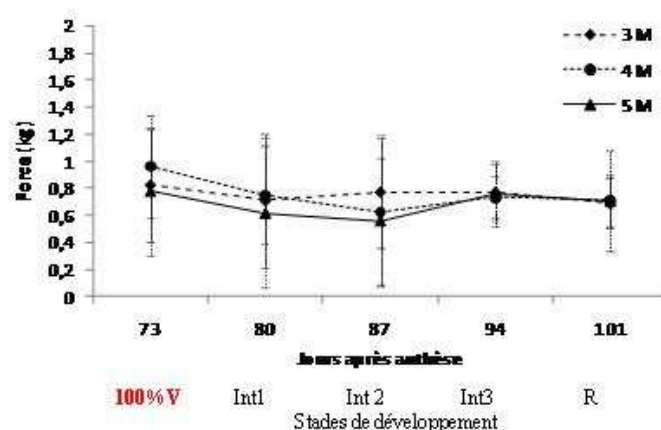
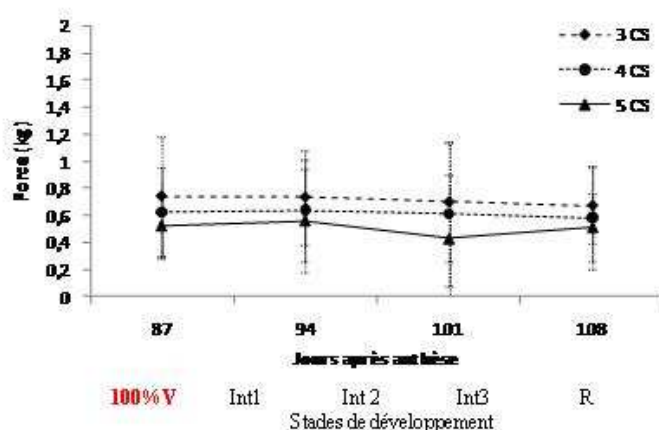
2007



2008



2009



**Figure 71 :** Forces de pénétration de la pellicule exprimées en kg. Les mesures ont été réalisées sur les pellicules de raisin des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon et Merlot, au cours de la maturation de la baie de raisin en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de la mesure de 30 baie.

**Tableau XX** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation physique par le pénétromètre de la texture des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                     | <u>Effet du millésime</u> |         | <u>Effet du cépage</u> |         | <u>Effet de la parcelle</u> |          |
|---------------------|---------------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------------|----------|
|                     | F                         | p       | F                      | p       | F                           | p        |
| <b>Pénétromètre</b> | 11,788                    | 0,00006 | 15,985                 | 0,00020 | 6,415                       | 0,003166 |

Cependant, nous pouvons constater que l'effet cépage est plus significatif ( $F = 15,985$ ) que l'effet millésime ( $F = 11,788$ ) lui-même plus significatif que l'effet parcelle ( $F = 6,415$ ).

### II.1.b Aw

La Figure 72 présente l'évolution de la mesure de l'Aw des baies des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot au cours du développement des baies de raisin en 2008 et 2009. Pour le millésime 2007, les mesures ont été effectuées sur les parcelles 3CS et 4CS ainsi que sur la parcelle 3M.

De manière générale, pour l'ensemble des parcelles et pour les 3 millésimes, l'Aw diminue au cours de la maturation. Les différences entre les stades sont plus importantes en 2007 et 2008 qu'en 2009, indiquant que la pellicule a moins évolué au cours de ce millésime.

De la même manière que pour l'étude des critères précédents, une analyse de variance a été effectuée (Tableau XXI).

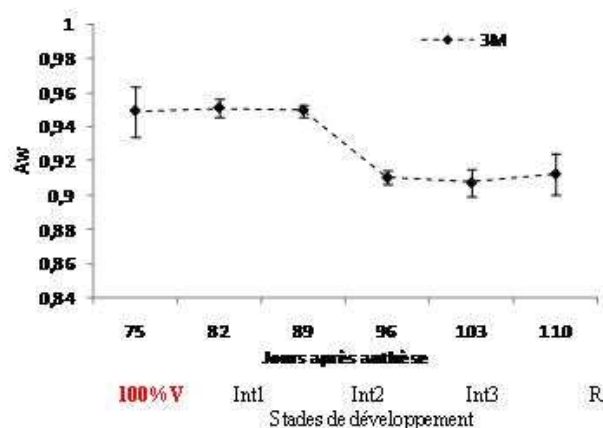
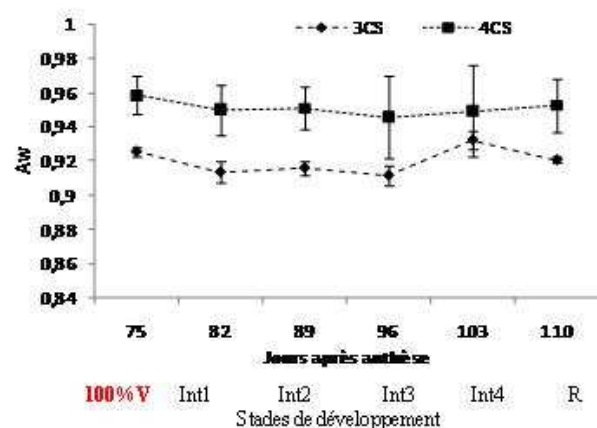
**Tableau XXI** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation physique par la mesure de l'Aw de la texture des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|           | <u>Effet du millésime</u> |         | <u>Effet du cépage</u> |         | <u>Effet de la parcelle</u> |         |
|-----------|---------------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|           | F                         | p       | F                      | p       | F                           | p       |
| <b>Aw</b> | 28,019                    | 0,00000 | 3,409                  | 0,06932 | 9,801                       | 0,00019 |

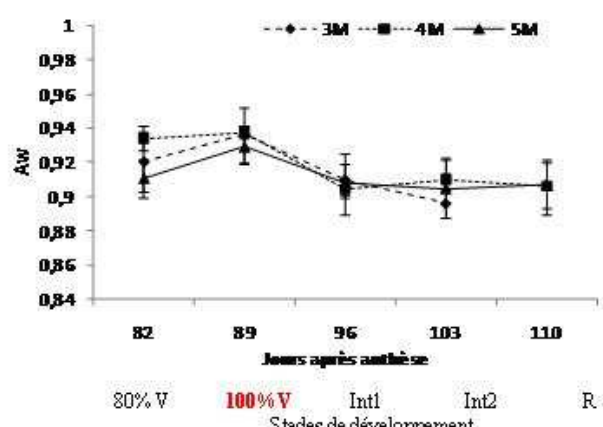
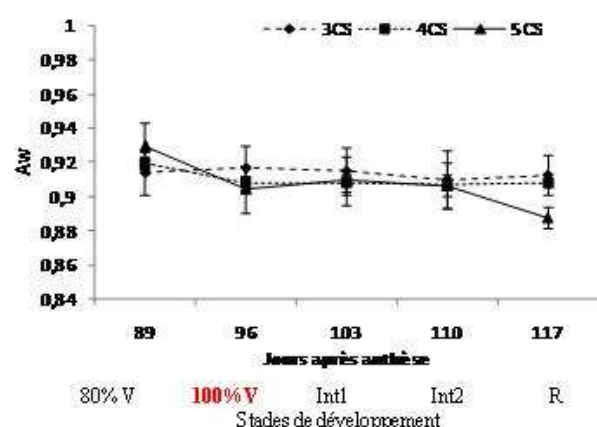
# Cabernet-sauvignon

# Merlot

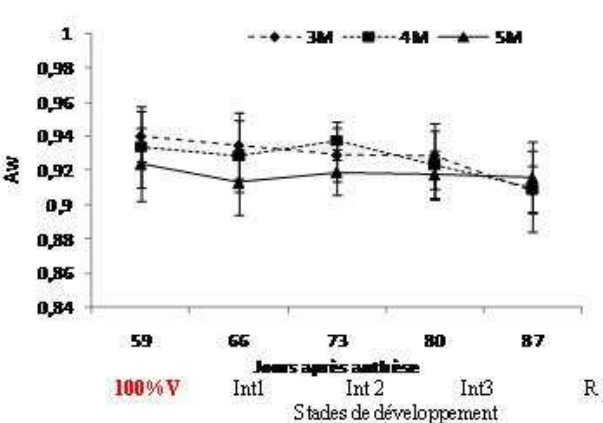
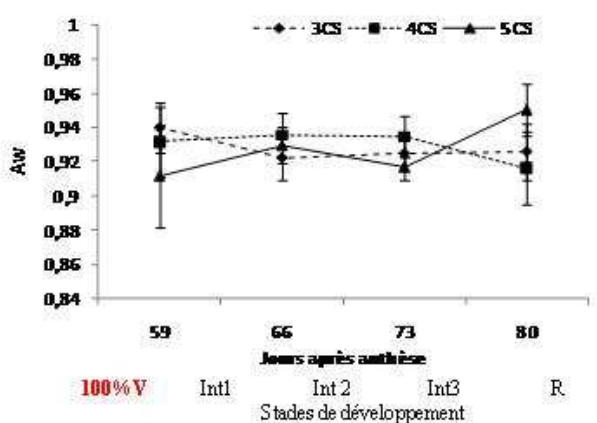
2007



2008



2009



**Figure 72 :** Mesure de l'activité de l'eau libre (Aw) à la surface des pellicules des baies au cours du développement du raisin des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon et Merlot en 2007, 2008 et 2009. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de la mesure de 10 baies.



Cette étude montre que les mesures de l'Aw sont fortement discriminées par l'effet millésime ( $F = 28,019$ ) et l'effet parcelle ( $F = 9,801$ ). Néanmoins, il reste impossible de séparer les parcelles en fonction du cépage avec les mesures d'Aw ( $F = 3,409$ ).

## II.2 Analyse sensorielle

L'évaluation de la texture de la pellicule par l'approche sensorielle a été réalisée grâce à l'utilisation de 4 critères :

- l'aptitude à l'écrasement
- l'aptitude à l'égrenage
- l'adhérence entre la pulpe et la pellicule
- dilacération

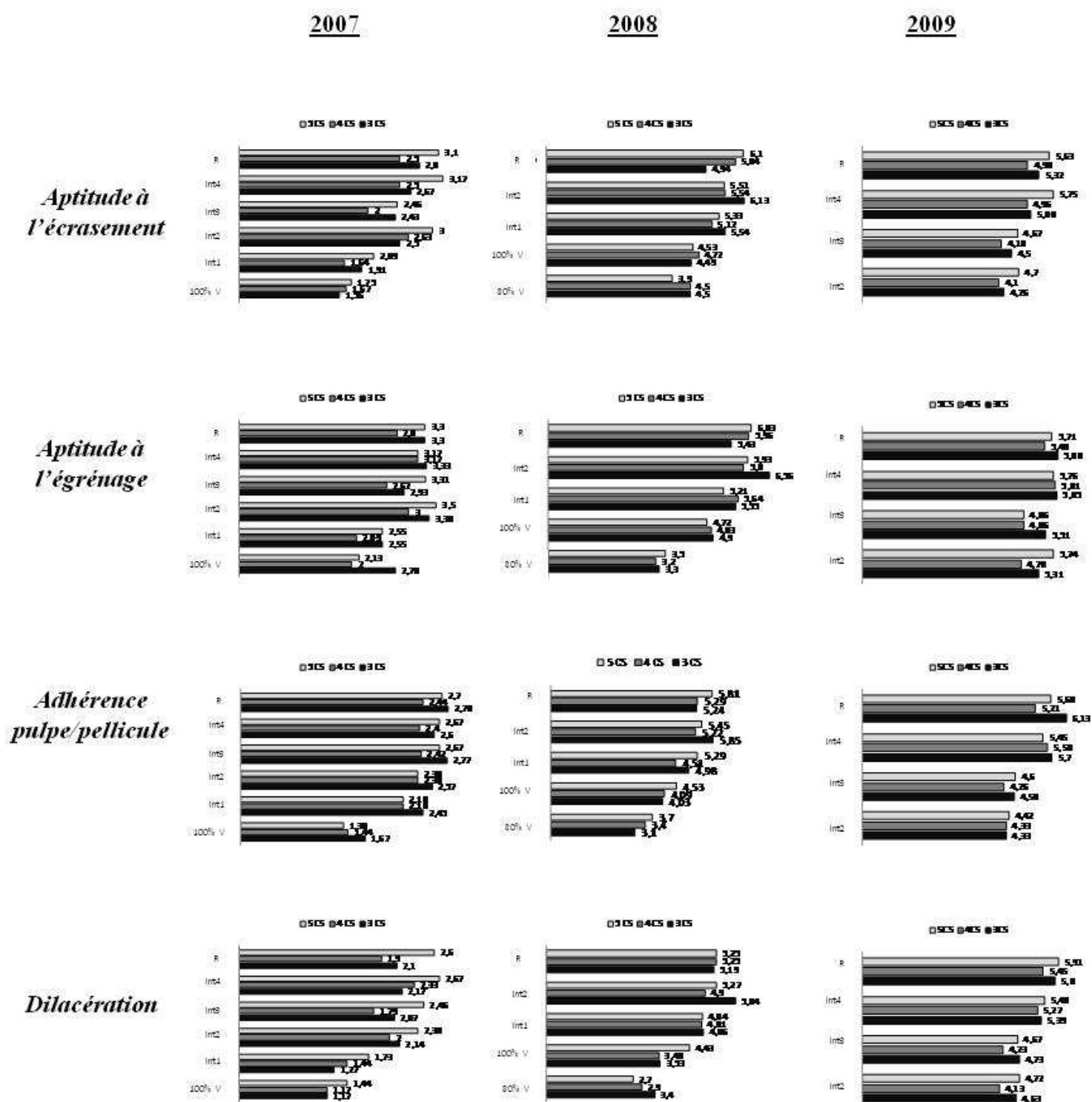
Les critères aptitude à l'écrasement, égrenage et dilacération sont évalués dans le sens d'une augmentation au cours de la maturation tandis que l'adhérence entre la pulpe et la pellicule consiste à juger la facilité à séparer la pulpe de la pellicule en bouche.

L'analyse sensorielle a été menée sur l'ensemble des parcelles 3, 4 et 5 de cépage Cabernet-sauvignon et Merlot au cours de la maturation des baies en 2007, 2008 et 2009.

Les résultats présentés dans les Figures 73 et 74, rapportent l'évolution des moyennes des résultats de l'évaluation de chacun des critères pour les parcelles de Cabernet-sauvignon (Figure 73) et de Merlot (Figure 74).

Pour chacun des millésimes et pour l'ensemble des parcelles, le panel de dégustateurs a noté une augmentation de l'aptitude à l'écrasement, c'est-à-dire une augmentation de la déformabilité de la baie et ainsi un ramollissement de celle-ci. On observe des résultats similaires pour le critère concernant l'aptitude à l'égrenage qui traduit ainsi une augmentation de la fragilité de la pellicule au niveau du pédicelle permettant un détachement plus aisé.

En ce qui concerne l'adhérence entre la pulpe et la pellicule, pour l'ensemble des parcelles et pour les trois millésimes, les juges perçoivent au cours de la maturation, une augmentation de la facilité à séparer ces deux tissus en bouche.



**Figure 73** : Evaluation sensorielle des critères de texture (Aptitude à l'écrasement, à l'égrénage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) des pellicules des parcelles 3, 4 et 5, de cépage Cabernet-sauvignon, au cours de la maturation du raisin en 2007, 2008 et 2009. Les notes des juges comprises entre 1 et 8.



Enfin, la dilacération augmente également au cours de la maturation. Ce phénomène traduit la fragilisation du tissu perçue comme « moins élastique » par les juges en fin de maturation.

Les résultats présentés dans le Tableau XXII montrent une influence du millésime sur l'ensemble des critères sensoriels de texture de la pellicule. Les critères utilisés dans cette étude ne permettent pas de différencier ni les parcelles ni le cépage des pellicules étudiées, hormis pour le critère égrenage influencé significativement par l'effet cépage.

**Tableau XXII** : Effet du millésime, du cépage et de la parcelle sur la caractérisation chimique de la composante tannique des pellicules des parcelles 3, 4 et 5 de Cabernet-sauvignon et de Merlot pour les millésimes 2008 et 2009. En rouge, valeurs reflétant des différences significatives avec un risque d'erreur inférieur à 5%.

|                                  | <u>Effet du millésime</u> |         | <u>Effet du cépage</u> |         | <u>Effet de la parcelle</u> |         |
|----------------------------------|---------------------------|---------|------------------------|---------|-----------------------------|---------|
|                                  | F                         | p       | F                      | p       | F                           | p       |
| <b>Dilacération</b>              | 146,342                   | 0,00000 | 3,530                  | 0,06468 | 2,094                       | 0,13131 |
| <b>Aptitude à l'écrasement</b>   | 111,366                   | 0,00000 | 5,080                  | 0,02752 | 0,168                       | 0,04543 |
| <b>Aptitude à l'égrenage</b>     | 164,188                   | 0,00000 | 2,173                  | 0,14523 | 1,427                       | 0,24740 |
| <b>Adhérence pulpe/pellicule</b> | 168,669                   | 0,00000 | 1,150                  | 0,28755 | 1,343                       | 0,26803 |

### II.3 Profil physique et sensoriel de la texture de la pellicule

La Figure 75 présente les ACP effectuées pour les 3 millésimes étudiés. Pour chacune des ACP, les variables étudiées correspondent aux critères sensoriels d'évaluation de la texture de la pellicule (Aptitude à l'écrasement et à l'égrenage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) et aux mesures physiques (pénétrromètre et Aw).

Ainsi, en 2007, les deux premières composantes principales rassemblent 78,51% de la variance totale. Le premier axe représente 61,26% de la variance totale et le deuxième 17,25%. L'Aw est fortement et positivement corrélée à l'axe 2 alors que le pénétrromètre est fortement et positivement corrélé à l'axe 1. Les quatre critères sensoriels sont, quant à eux, fortement et négativement corrélés à l'axe 1. Ces critères permettent, pour ce millésime, de discriminer certaines parcelles et plus fortement les stades de développement des pellicules étudiés. En effet, les individus des parcelles 3CS, 4CS et 3M sont situés dans la partie

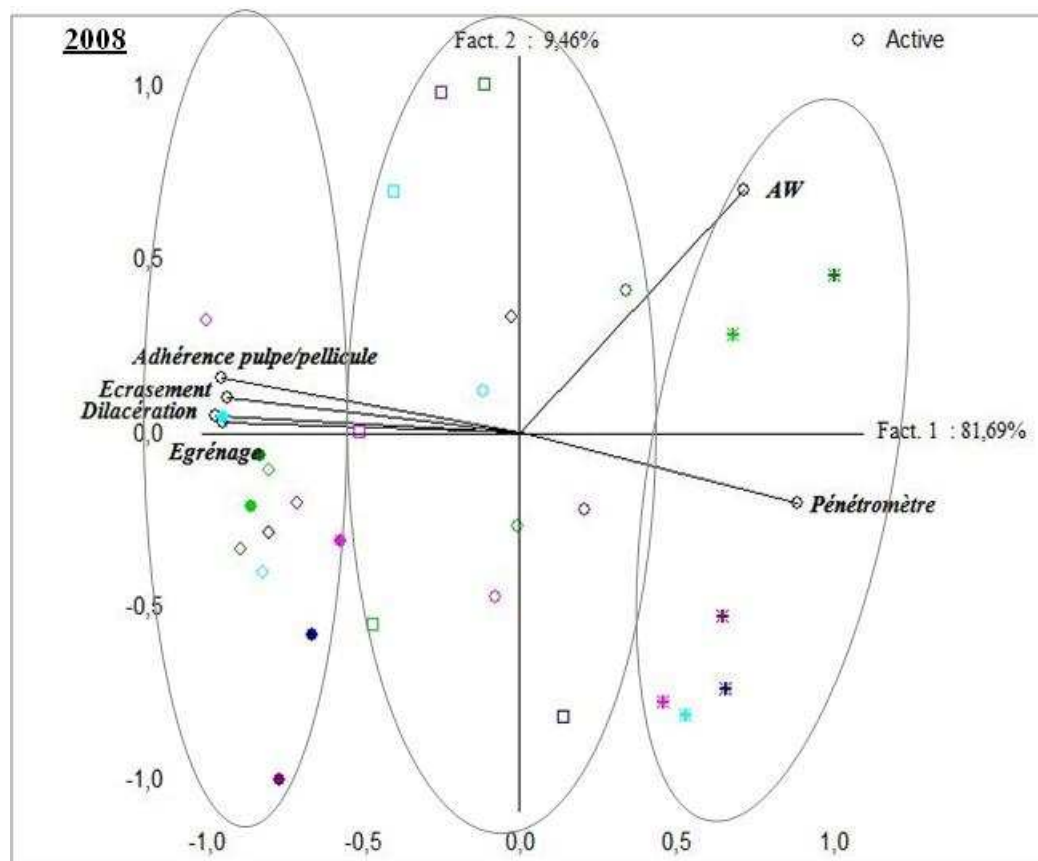
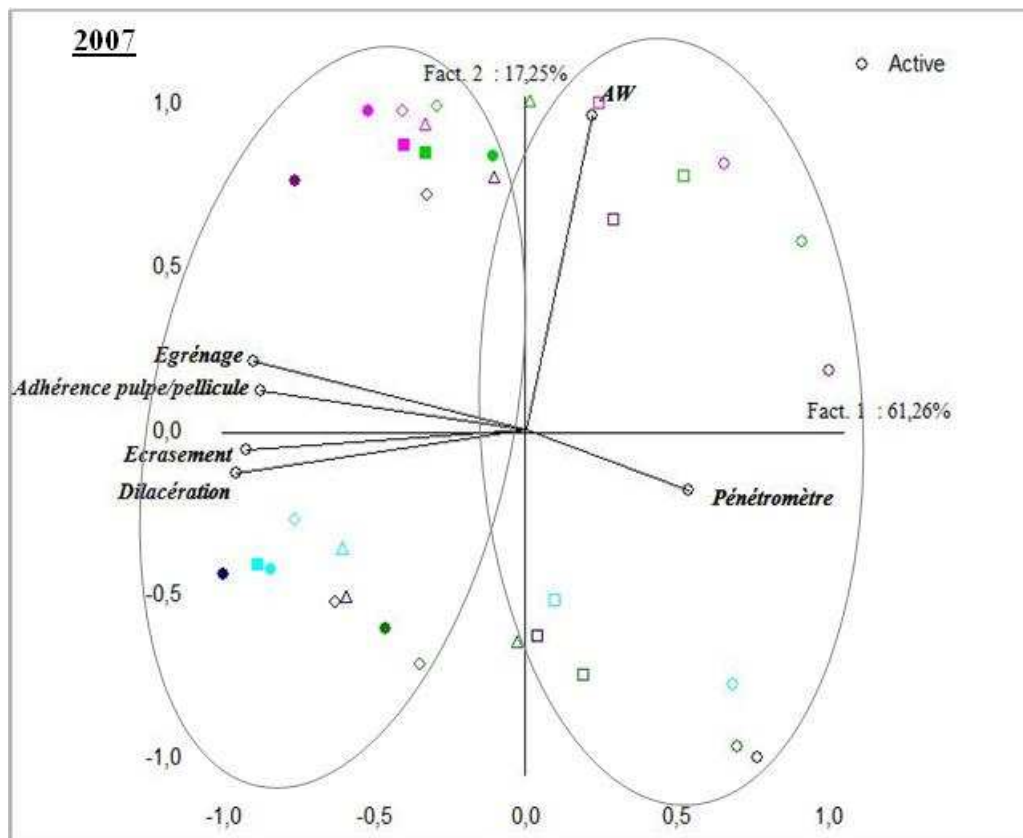
supérieure tandis que les individus des parcelles 5CS, 4M et 5M sont localisés dans la partie inférieure. Cependant, ces résultats sont à nuancer car les parcelles 3CS, 4CS et 3M sont corrélées au critère Aw. Or, les Aw des parcelles 5CS, 4M et 5M n'ont pas pu être mesurées pour ce millésime. En outre, la répartition des individus selon leur stade de développement est plus remarquable. Ainsi, les individus correspondant aux stades 100% véraison et Intermédiaire 1 sont situés dans la partie droite alors que les individus des stades intermédiaires 2, 3 et 4 et récolte sont localisés dans la partie gauche associés aux critères sensoriels.

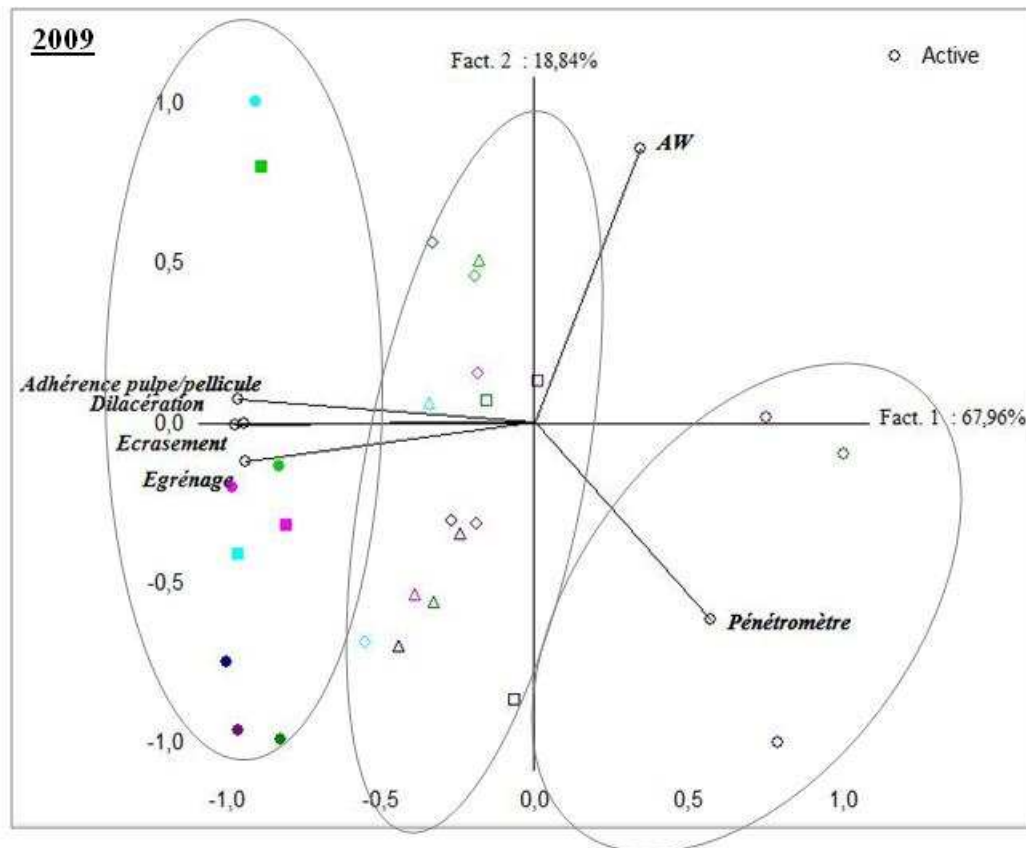
A partir de ces résultats, l'axe 1 semble définir l'axe de maturation des pellicules et l'axe 2 pourrait représenter la texture de la pellicule.

En 2008, les deux premières composantes principales rassemblent 91,15% de la variance totale. Le premier axe représente 81,69% de la variance totale et le deuxième 9,46%. L'Aw et le pénétromètre sont positivement corrélés à l'axe 1 alors que les critères sensoriels sont fortement et négativement corrélés à l'axe 1. Les critères physiques et sensoriels de texture pourraient influencer la discrimination des individus en fonction de leur stade de développement : les individus des stades 80% véraison sont préférentiellement localisés dans la partie droite, les individus des stades 100% véraison et intermédiaire 1 sont préférentiellement localisés au centre alors que les stades intermédiaires 2 et récolte sont plutôt situés dans la partie gauche. Les axes définis par les critères de texture permettent de discriminer les stades de développement et confirment l'impossible discrimination des parcelles.

En 2009, les deux premières composantes principales rassemblent 86,80% de la variance totale. Le premier axe représente 67,96% de la variance totale et le deuxième 18,84%. L'Aw et le pénétromètre sont positivement corrélés à l'axe 1 alors que les critères sensoriels sont fortement et négativement corrélés à l'axe 1. Les critères physiques et sensoriels de texture pourraient influencer pour ce millésime aussi, la discrimination des individus en fonction de leur stade de développement : les individus des stades 100% véraison sont préférentiellement localisés dans la partie droite, les individus des stades intermédiaire 1, 2 et 3 sont préférentiellement localisés au centre alors que les stades intermédiaires 4 et récolte sont plutôt situés dans la partie gauche. Pour ce millésime comme pour les précédents, les axes définis par les critères de texture permettent de discriminer les stades de

développement et confirment l'impossible discrimination des parcelles.





**Parcelles:**

3CS 4CS 5CS 3M 4M 5M

**Stades de développement :**

✕ 80% V ○ 100% V □ Int1 ◇ Int2 △ Int3 ■ Int4 ● R

**Figure 75 :** Représentation ACP des individus (80% V, 100%V, Int1, Int2, Int3, Int4 et R pour les 6 parcelles étudiées : 3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M) et des variables (Aptitude à l'écrasement, Aptitude à l'égrénage, Adhérence pulpe-pellicule et Dilacération) en 2007, 2008 et 2009.

## II.4 Conclusion

Cette étude physique et sensorielle de la texture a permis de mettre en évidence une corrélation entre les mesures physiques et les critères sensoriels indiquant que les outils et les descripteurs utilisés sont bien choisis. Nos résultats confirment ceux de Méhinagic *et al.* (2003). Néanmoins, l'utilisation de cette double approche permet d'appréhender la texture de la pellicule en fonction du millésime mais ne permet pas de discriminer les parcelles entre elles contrairement à Grotte *et al.* (2001) et Le Moigne *et al.* (2007). Par contre, les critères de mesures physiques permettent de différencier le cépage ainsi que les parcelles entre elles. De plus, ces résultats montrent une très bonne discrimination des stades de développement et ainsi de l'état de maturation de la pellicule.

***Ainsi en validant les outils de mesures de la texture, nous pouvons d'ores et déjà penser qu'en complétant ce travail par une augmentation du nombre de parcelles, le pénétromètre et l'Aw pourraient être proposés à terme comme de nouveaux critères d'évaluation de la maturation pelliculaire.***

***Afin de compléter cette approche, la recherche de critères d'évaluation de la texture nous a conduits à tester des outils permettant de cartographier les composants pelliculaires. Les essais menés dans cette perspective sont présentés dans le paragraphe suivant.***

### **III. Cartographie de composants pelliculaires**

L'objectif de cette étude est donc d'essayer de développer de nouveaux outils pour mieux caractériser les marqueurs de la maturation des pellicules de raisin. Une étude récente (Hamm *et al.*, 2010), portant sur l'analyse des phytoalexines à la surface des feuilles de *Vitis vinifera* a permis, par imagerie par spectrométrie de masse (IMS), de cartographier de petits composés organiques, localisés au niveau de sites spécifiques à la surface de la feuille de vigne, liés à l'infection de pathogène *Plasmopara viticola* ou soumis à un stress lumineux.

En collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie du Laser (LSMCL) de l'Université Paul Verlaine de Metz, nous avons essayé d'utiliser cette approche en vue d'identifier des marqueurs de maturité à la surface des pellicules de raisin. Pour cela, deux techniques ont été utilisées : l'Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS) et la Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS).

L'IMS utilise un laser couplé à un spectre de masse : le spot du laser (de diamètre 10  $\mu\text{m}$ ) ionise les ions et parcourt la surface à analyser. Pour l'obtention des spectres de masse, les paramètres de l'image de la surface à analyser sont importés dans le logiciel Flexcontrol qui pilote le spectromètre de masse. A chaque tir laser, un spectre de masse est généré. Le nombre de tirs laser est fonction de la résolution de l'image (nombre de pixels), sachant que pour chaque pixel, 50 tirs laser sont effectués. Le logiciel « AnalyseThis! » convertit tous les spectres en un fichier image qui sera exploité par le logiciel BioMap. Ce logiciel permet d'obtenir une image de chaque rapport  $m/z$  sélectionné pour la zone cartographiée.



La technique de SIMS est une technique d'analyse physico-chimique de l'extrême surface. Elle est basée sur la détection des particules chargées (ions secondaires) produits sous l'effet d'un bombardement d'ions incidents (ions primaires). La nature des ions secondaires émis est intimement liée à celle de la surface de l'échantillon. De plus, les ions secondaires ne peuvent provenir que de l'extrême surface (10Å) ce qui fait du SIMS une des techniques les plus sensibles à la surface. Le phénomène SIMS est suffisamment général pour pouvoir analyser tout type de surface, les seules contraintes concernent les échantillons non compatibles avec l'ultravide. Les applications du SIMS sont donc nombreuses : analyse élémentaire et moléculaire, profil en profondeur, imagerie ionique, identification chimique etc...

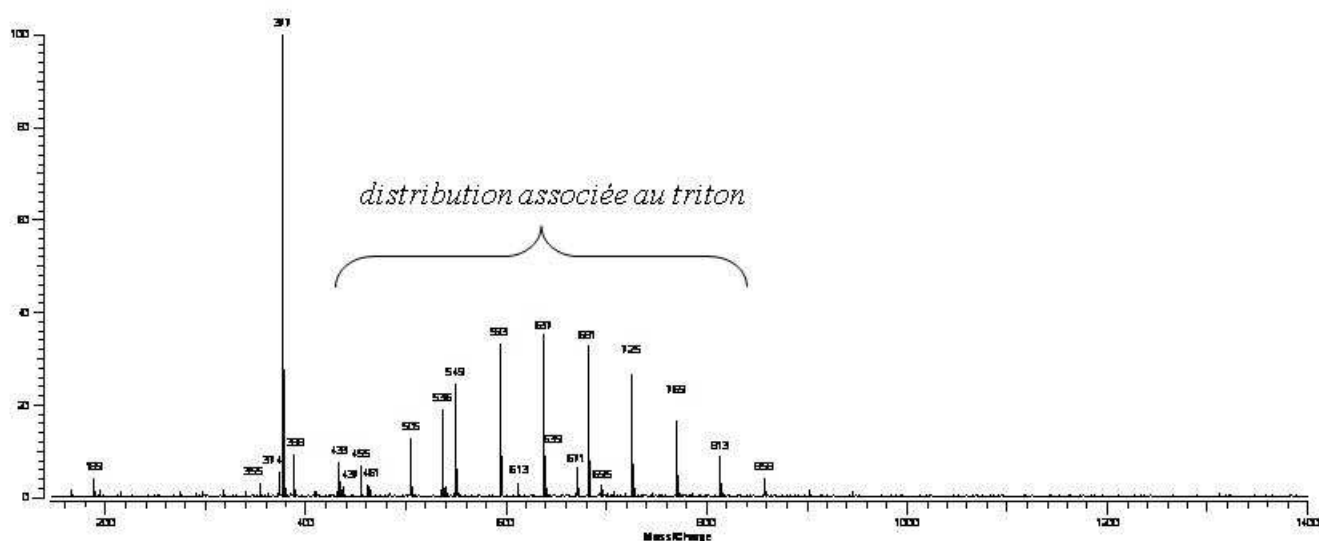
Avant d'étudier les pellicules entières et les coupes par IMS et SIMS, il a été envisagé d'établir une base de données des composants cellulaires et pelliculaires. Pour cela, des extraits de composés phénoliques de fraction pariétale et de pellicules entières ont été analysés par résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier (FTICR) couplée à un spectromètre de masse (MS) avec comme source d'ionisation l'électrospray (ESI). Par la suite l'IMS a été appliquée sur des pellicules de raisin de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon à 3 stades de développement (FG : fermeture de grappe, 80% V : 80% véraison et R : récolte) du millésime 2008 et la SIMS a été testée sur des coupes semi-fines de pellicules de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe du millésime 2008.

### **III.1 Analyse en ESI-FTICRMS**

#### **III.1.a Extraits pariétaux**

Les extraits de composés phénoliques pariétaux analysés correspondent au surnageant de la fraction pariétale c'est-à-dire aux composés solubles de cette fraction et au culot correspondant aux composés piégés dans la fraction pariétale. Dans chaque cas, un extrait témoin et un extrait digéré ont été analysés correspondant à trois stades (FG, 80% V et R) du millésime 2008 uniquement.

Les profils de spectres obtenus en mode négatif diffèrent entre les extraits issus du surnageant et du culot (Figures 76) mais tous présentent un ion intense de rapport  $m/z$  377 qui correspond à un adduit chloré de sucres (dissaccharide).



**Figure 76 :** Spectre du culot de la fraction pariétale digérée des pellicules de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon au stade 80% véraison en 2008.

Dans les extraits issus du culot, apparaît en plus une distribution polymérique, également sous forme d'adduits chlorés, qui correspond à du triton X-100. Ce composé n'est pas un composé naturel, c'est un tensioactif de type polyéthylène glycol qui est utilisé pour le lavage des fractions et qui malheureusement gêne dans la lecture du spectre car il peut être à l'origine du masquage d'autres composés par suppression ionique.

Dans les extraits issus des surnageants (spectres non montrés), des composés supplémentaires apparaissent mais en plus faible intensité. De plus, les profils des spectres diffèrent entre extraits témoins et les échantillons digérés, ces derniers présentant moins d'espèces. Ces composés n'ont pas pu être identifiés en MS/MS car trop faible en quantité dans la fraction. Seul un ion de rapport  $m/z$  355 (et 357 avec isotopie remarquable du chlore) est suffisamment intense pour qu'une expérience MS/MS ait pu être menée.

Ainsi, il a été possible d'identifier une perte de HCl (-36) à partir de l'ion parent laissant bien penser à une masse  $m/z$  319 pour l'ion moléculaire et la formule brute établie pour cet ion est  $C_{16}H_{15}O_7$ , pouvant faire penser à de l'acide p-coumaroyl shikimique (Figure 77) qui est un des précurseurs de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. La présence de ce précurseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes dans la fraction pariétale (Figure 78),

conforte les résultats du chapitre 3 portant sur la localisation des complexes multienzymatiques de la biosynthèse des tannins dans les parois cellulaires.

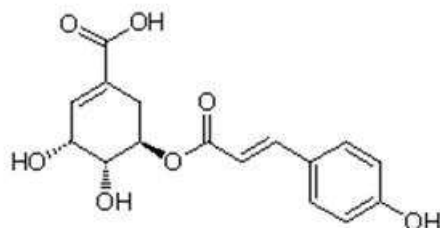


Figure 77 : Structure de l'acide p-coumaroyl shikimique.

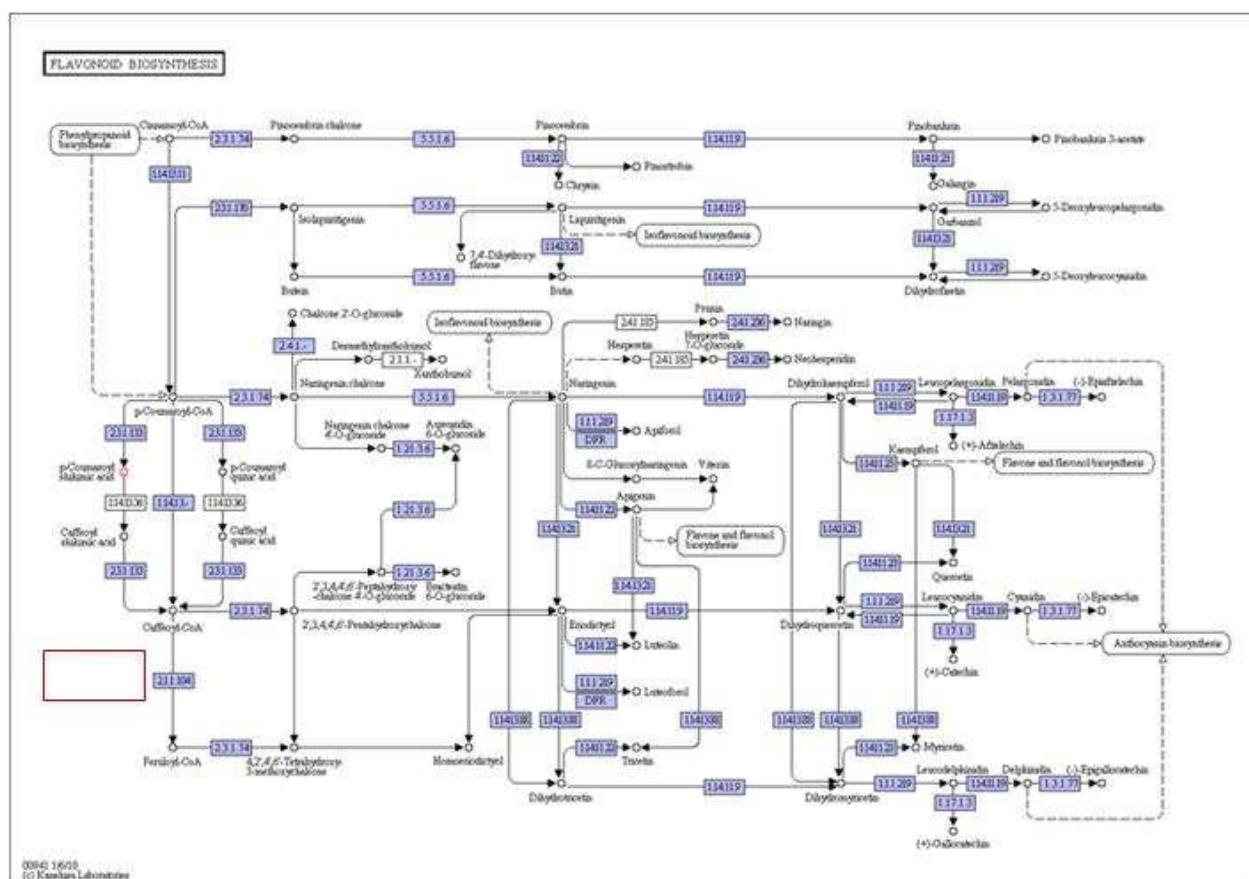


Figure 78 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes d'après Kegg Compounds. Identification d'un précurseur : l'acide p-coumaroyl shikimique.

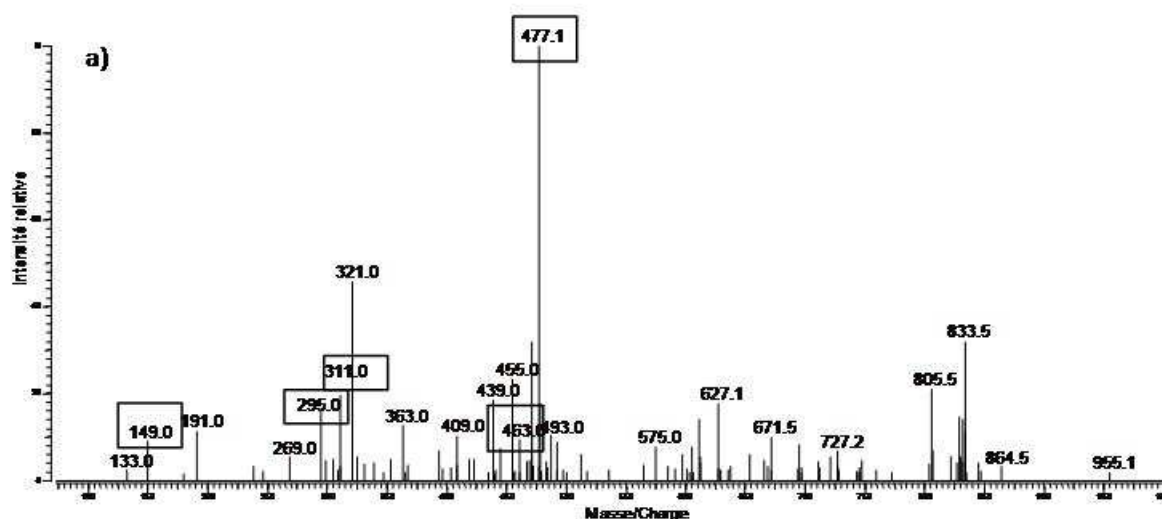
### III.1.b Extraits pelliculaires

Les extraits de composés phénoliques des pellicules entières étudiés correspondent aux stades fermeture de grappe, 80% véraison et récolte des millésimes 2008 et 2009. Différentes dilutions ont été nécessaires pour l'étude : les stades fermeture de grappe et 80% véraison ont été dilués 10 fois dans du méthanol et 100 fois pour le stade récolte.

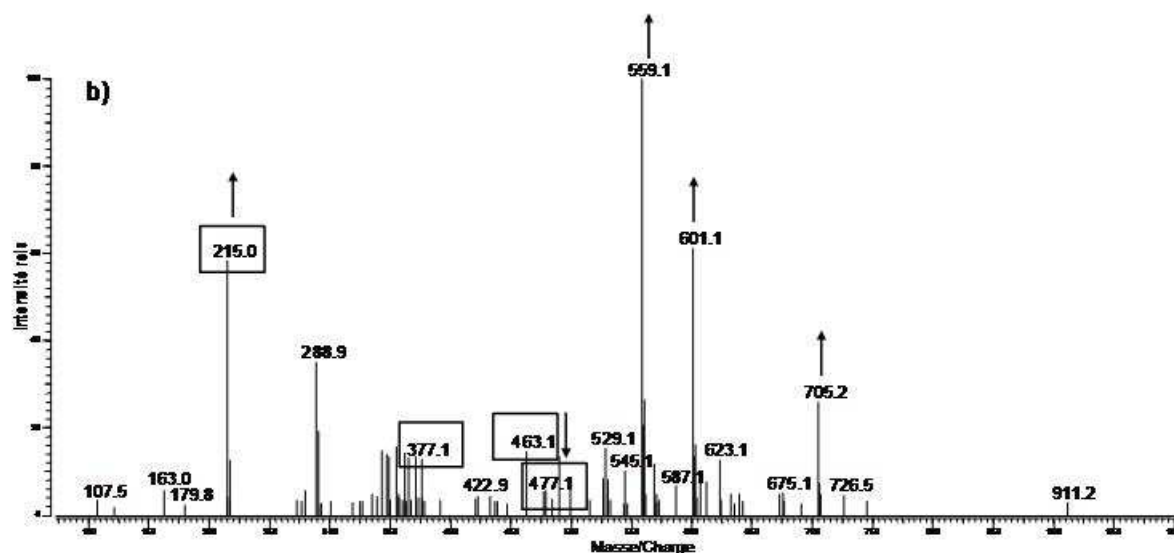
### III.1.b.i Etude en mode négatif

Dans un premier temps, les 6 échantillons ont été analysés dans le mode de détection négatif. Les Figures 79, 80 et 81 présentent les spectres ESI-FTICR correspondant respectivement au stade fermeture de grappe, 80% véraison et récolte de l'année 2009.

L'analyse des spectres montre que des espèces principalement déprotonées  $[M-H]^-$  ainsi que des adduits chlorures sont observables et que l'empreinte spectrale varie significativement d'un stade de développement à l'autre. Ainsi, au stade vert, on retrouve une distribution plus importante en haute masse (exemple :  $m/z$  805 et 833) qui a tendance à disparaître à la véraison, tout comme l'ion  $m/z$  477 formant le pic de base du spectre. Au cours de la maturation certains pics deviennent très intenses et certains de ces ions correspondent à des sucres ( $m/z$  251 et 377). De plus, les intensités des ions  $m/z$  559, 601 et 705 augmentent nettement à partir de la véraison (flèches montantes).

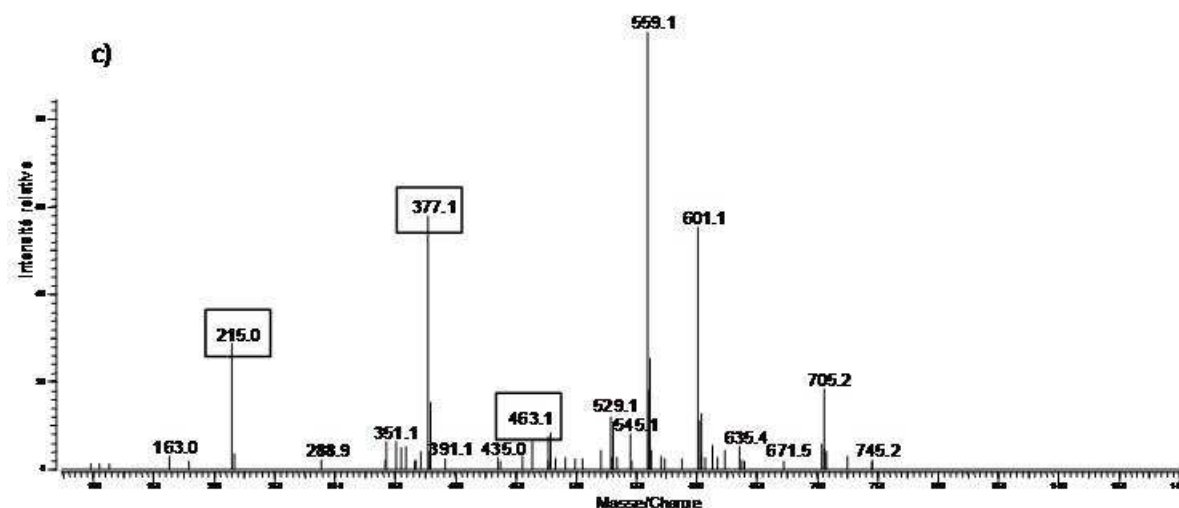


**Figure 79** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2009. Les ions encadrés correspondent à des composés identifiés.



**Figure 80** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade 80% véraison pour le millésime 2009.

*Les ions encadrés correspondent à des composés identifiés et les flèches montantes symbolisent les espèces qui augmentent fortement.*



**Figure 81** : Spectres ESI-FTICRMS en mode négatif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2009.

*Les ions encadrés correspondent à des composés identifiés.*

Les quantités étant suffisamment importantes, un certain nombre d'ions ont été identifiés (pics encadrés) par MS/MS. Les résultats sont consignés dans les Tableaux XXIII et XXIV et correspondent respectivement aux millésimes 2008 et 2009. Les identifications mettent en évidence la présence de plusieurs acides au stade fermeture de grappe (acides tartrique, coutarique et caftarique) et une quantité croissante de sucres au cours de la maturation (80% véraison et récolte). En revanche, on observe plus de différence entre le stade fermeture de grappe et 80% véraison qu'entre les stades 80% véraison et récolte, ces observations vont dans le sens d'un profil de maturation des baies. On retrouve également au sein des trois stades, quelques flavonoïdes tels que la myricétine et la quercétine substitués par des sucres (glucuronide ou rhamnose). Il semble exister des différences entre 2008 et 2009, mais en raison d'un problème technique entre les deux séances d'analyse (la séquence ayant dû être modifiée pour retrouver une sensibilité de détection correcte), il est difficile d'en tirer des conclusions définitives.

**Tableau XXIII : Espèces identifiées pour le millésime 2008.**

| Stade Fermeture de grappe |                          | Stade 80% véraison |                                | Stade Récolte |                                |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|
| m/z                       | Molécule                 | m/z                | Molécule                       | m/z           | Molécule                       |
| 149                       | acide tartrique          |                    |                                |               |                                |
|                           |                          | 215                | sucres + adduit chlorure       | 215           | sucres + adduit chlorure       |
| 289                       | catéchine                |                    |                                |               |                                |
| 295                       | acide coutarique         |                    |                                |               |                                |
| 311                       | acide caftarique         |                    |                                |               |                                |
|                           |                          | 377                | disaccharide + adduit chlorure | 377           | disaccharide + adduit chlorure |
|                           |                          |                    |                                |               |                                |
|                           |                          |                    |                                |               |                                |
| 463                       | myricétine-O-rhamnoside  | 463                | myricétine-O-rhamnoside        | 463           | myricétine-O-rhamnoside        |
| 477                       | quercétine-O-glucuronide | 477                | quercétine-O-glucuronide       |               |                                |

**Tableau XXIV : Espèces identifiées pour le millésime 2009.**

| Stade Fermeture de grappe |                          | Stade 80% véraison |                                | Stade Récolte |                                |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|
| m/z                       | Molécule                 | m/z                | Molécule                       | m/z           | Molécule                       |
| 149                       | acide tartrique          |                    |                                |               |                                |
|                           |                          | 215                | sucres + adduit chlorure       | 215           | sucres + adduit chlorure       |
| 295                       | acide coumarique         |                    |                                |               |                                |
| 311                       | acide caftarique         |                    |                                |               |                                |
|                           |                          | 377                | disaccharide + adduit chlorure | 377           | disaccharide + adduit chlorure |
|                           |                          | 447                | quercétine-rhamnoside          |               |                                |
| 461                       | dérivé acide caftarique  |                    |                                |               |                                |
|                           |                          | 463                | myricétine-O-rhamnoside        | 463           | myricétine-O-rhamnoside        |
| 477                       | quercétine-O-glucuronide | 477                | quercétine-O-glucuronide       | 477           | quercétine-O-glucuronide       |

En ce qui concerne les tannins pelliculaires, les monomères catéchine et/ou épicatechine ont pu être observés, à très faible intensité et uniquement sur l'extrait au stade fermeture de grappe du millésime 2008. La possibilité d'une compétition d'ionisation peut être évoquée laissant penser à une modification de la préparation de l'échantillon (par ajout d'une proportion d'eau) afin de favoriser l'ionisation de ces composés.

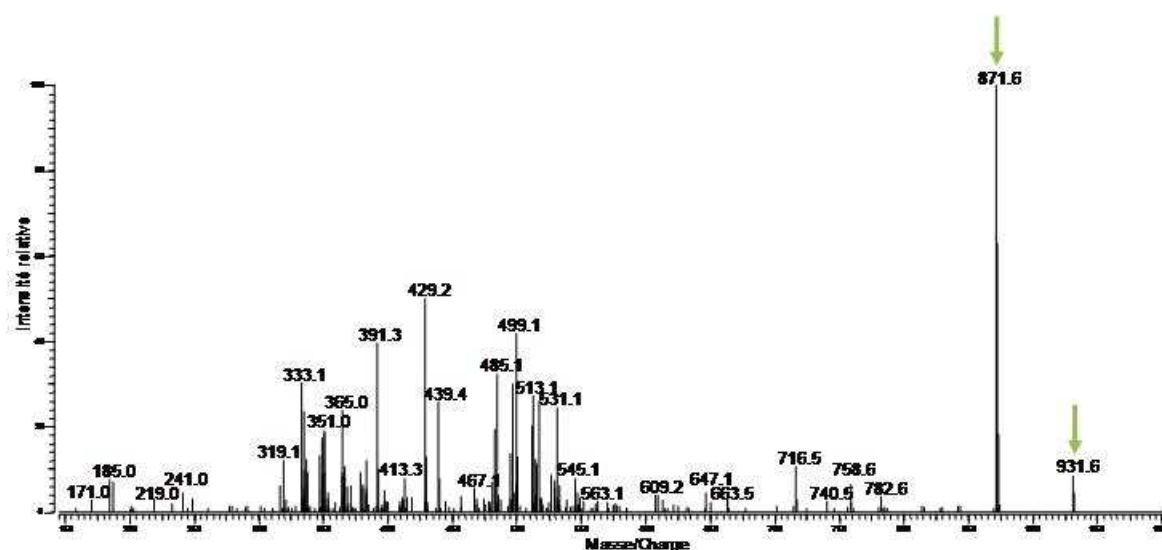
### III.1.b.ii Etude en mode positif

Dans un second temps, les échantillons des trois stades du millésime 2008 ont été étudiés en mode positif afin d'obtenir des informations complémentaires par rapport au mode négatif. En effet, certaines molécules s'ionisent plus facilement dans un mode que dans l'autre.

Les Figures 82, 83 et 84 présentent les spectres de masse ESI-FTICR correspondant respectivement aux stades fermeture de grappe, 80% véraison et récolte du millésime 2008.

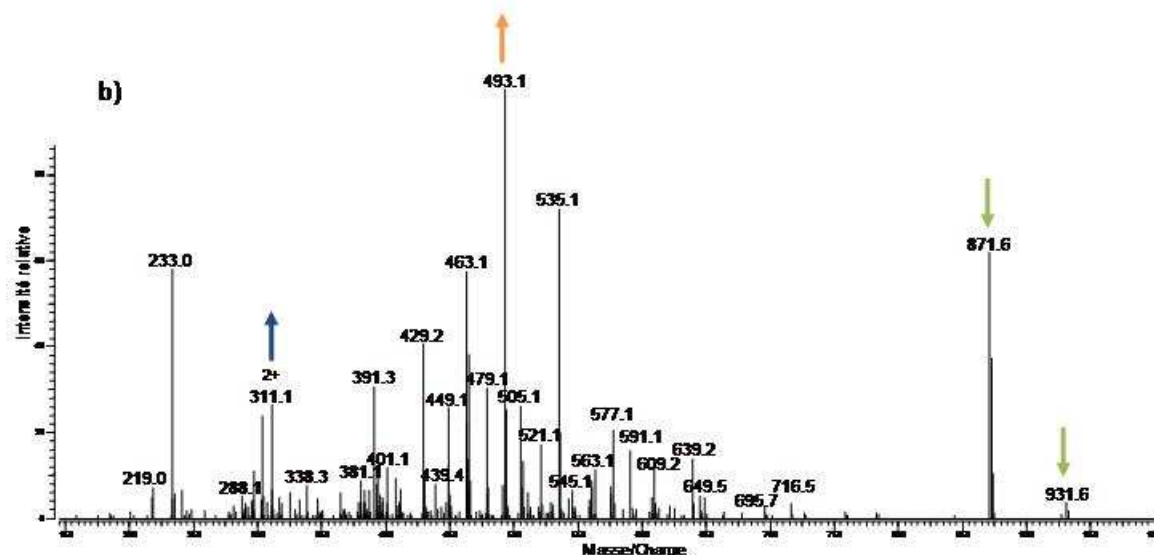
En mode positif, des espèces principalement protonées  $[M+H]^+$  ainsi que des ions dichargés ont été observés. Comme pour l'analyse en mode négatif, l'empreinte spectrale issue du mode positif varie significativement d'un stade à l'autre. Au cours de la maturation, certains ions deviennent très intenses alors que d'autres disparaissent :

- la malvidine-O-rhamnoside  $m/z$  493 (anthocyanines) apparaît à partir du stade véraison (flèches oranges, Figures 83 et 84), ce qui est cohérent avec la maturation du fruit.



**Figure 82 :** Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade fermeture de grappe pour le millésime 2008.

*Les flèches vertes indiquent les composés en hautes masses qui décroissent au fil des stades.*

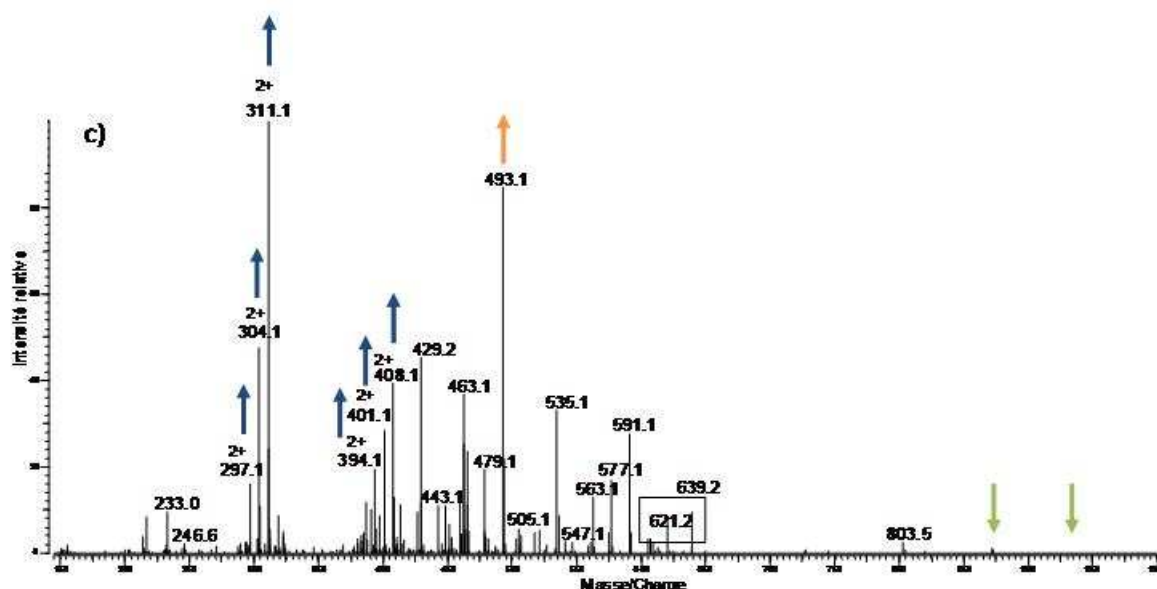


**Figure 83 :** Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade 80% véraison pour le millésime 2008.

*Les flèches vertes indiquent les composés en hautes masses qui décroissent au fil des stades ; les flèches oranges correspondent à l'anthocyanine ; les flèches bleues aux di-chargés.*



- l'apparition de composés di-chargés (flèches bleues avec le signe 2+, Figures 83 et 84) est remarquable au stade véraison et maturité. Le pic à **m/z 311** est l'ion chargé deux fois correspondant au pic **m/z 621** (masse encadrée, Figure 84). Pour une ionisation électrospray, pour de si petites molécules, ce comportement n'est pas commun. Il est donc possible de penser que cette molécule puisse présenter une petite séquence peptidique. Dans l'état actuel de nos connaissances, cette molécule ne semble pas être une molécule issue de la plante, mais plutôt une molécule soit issue d'un produit phytosanitaire dit « Bio » qui contiennent entre autre des lipopeptides extraits de l'ortie (par exemple la lipoxyline ou la lipotonine des produits de la gamme Ecobios®), soit un cyclopeptides provenant de bactéries comme par exemple *Bacillus subtilis* des produits de la gamme Serenade®. Des analyses additionnelles seraient à mener pour vérifier ces hypothèses.



**Figure 84** : Spectres ESI-FTICRMS en mode positif de l'extrait de pellicule de Cabernet-sauvignon, parcelle 3, au stade récolte pour le millésime 2008.

Les flèches vertes indiquent les composés en hautes masses qui décroissent au fil des stades ; les flèches oranges correspondent à l'anthocyanine ; les flèches bleues aux di-chargés.

- le pic à **m/z 871**, (flèches vertes, Figures 82, 83 et 84) est très intense au stade vert puis diminue en fin de véraison et disparaît à maturité. Le composé à **m/z 932** se comporte de la même manière mais à une intensité plus faible. Afin de vérifier si le composé à **m/z 871** pouvait constituer un marqueur du murissement de la baie, une étude de fragmentation MS/MS par SORI-CID visant à identifier cette espèce a été réalisée. Les résultats obtenus, ont permis de montrer que cette molécule avait un nombre important de

carbone (entre 50 et 60) et le candidat potentiel semble être la chlorophylle, plus précisément la phéophytine A. Celle-ci serait détectée sans ion magnésium qui serait libéré de sa structure porphyrine en milieu acide. Le spectre MS<sup>2</sup> obtenu est présenté Figure 85 et le schéma de fragmentation de l'ion m/z 871, Figure 86.

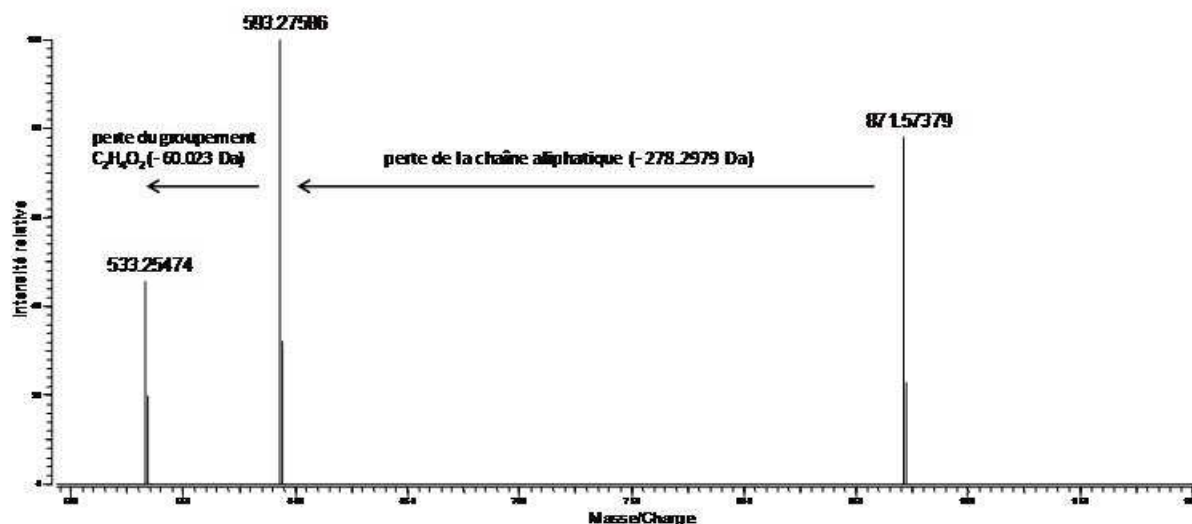


Figure 85 : Spectre ESI-FTICR MS/MS positif de l'ion m/z 871.

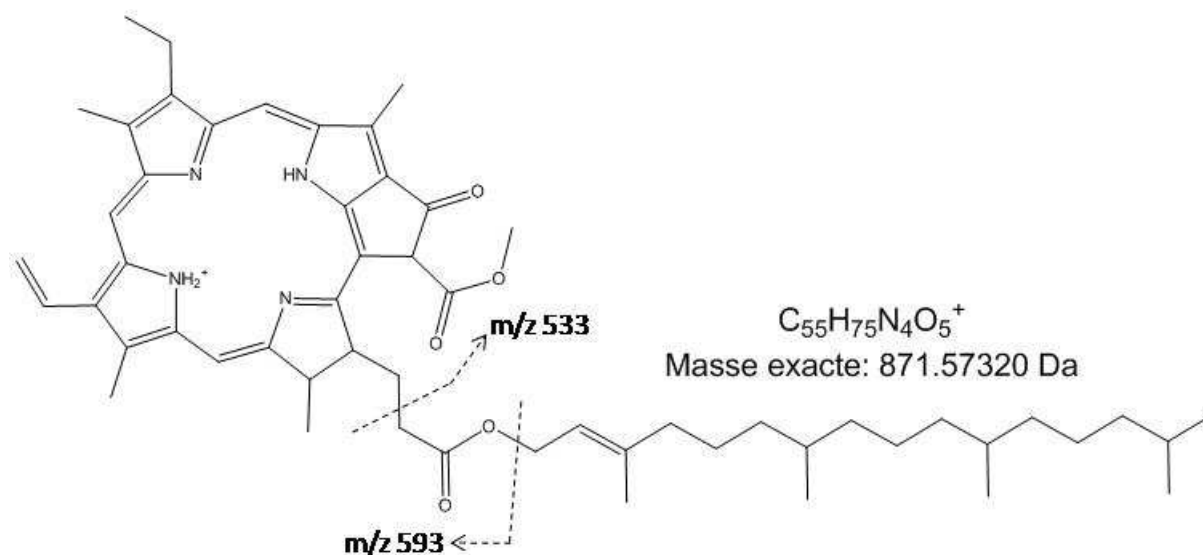
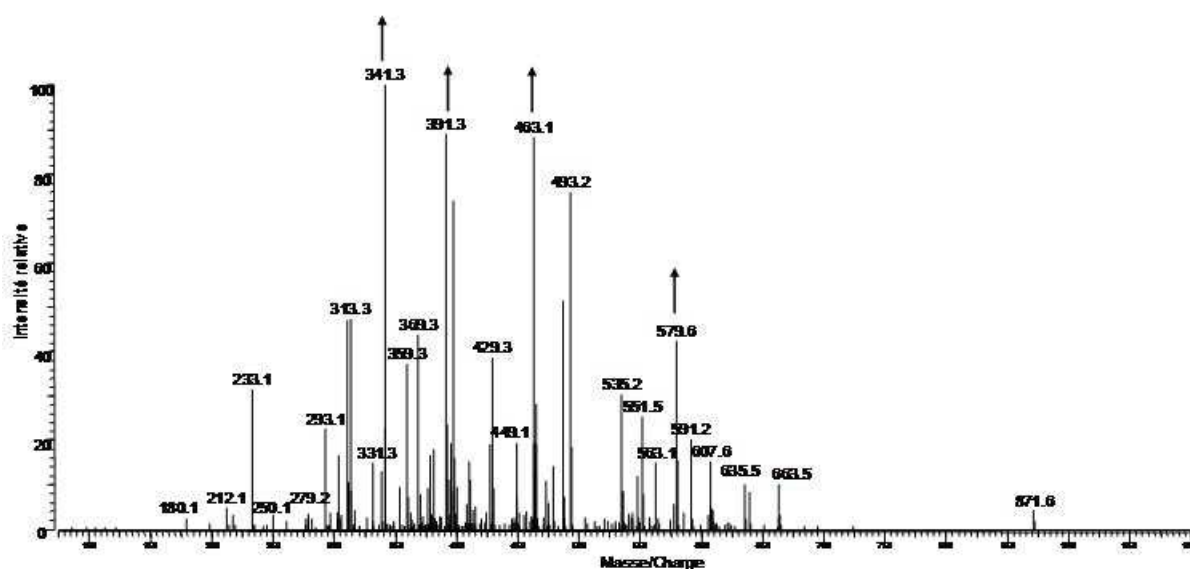


Figure 86 : Schéma du mécanisme de fragmentation de la phéophytine. La charge est placée de manière arbitraire, elle est délocalisée autour de la structure porphyrine.

En mode de fragmentation SORI-CID, il est difficile de fragmenter davantage ce composé, les structures de type porphyrine étant très stables. Comme l'a démontré Gauthier-Jaques *et al.* (2001), la perte du groupement  $C_2H_3O_2$  implique l'ajout d'une insaturation supplémentaire ce qui contribue à rendre la structure du fragment plus stable.

Pour favoriser l'ionisation d'espèces supplémentaires, la composition du solvant a été modifiée. Jusqu'ici le solvant était composé à 100% de méthanol, une phase d'acétate d'ammonium à pH=3, a été ajoutée. Ainsi, le solvant final est composé de 90% de méthanol et 10% d'acétate d'ammonium et le pH acide permet de favoriser le travail en ionisation positive car un plus grand nombre de protons sont disponibles. Un exemple de spectre de masse ESI-FTICRMS avec cette préparation de solvant est présenté Figure 87.



**Figure 87 :** Spectre ESI-FTICRMS mode positif stade récolte du millésime 2008.  
*Les flèches montantes indiquent les espèces devenues très intenses avec ce protocole.*

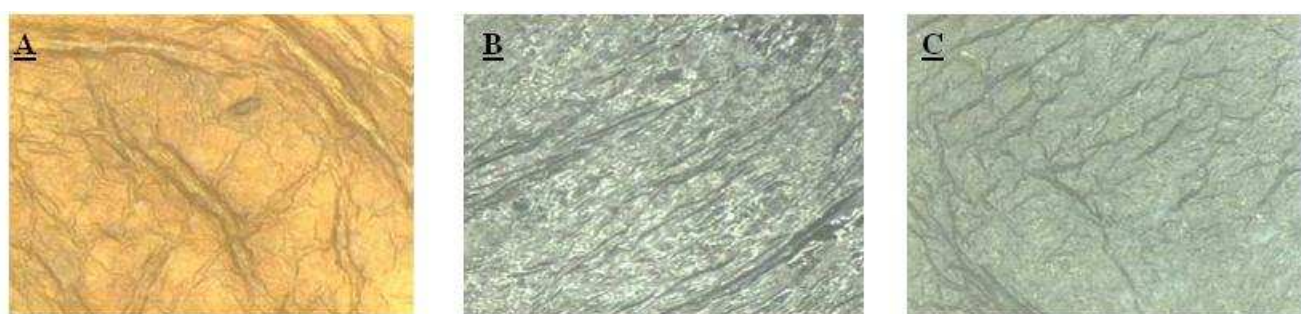
Grâce à ce changement, certaines espèces sont devenues très intenses telles que les ions **m/z 341, 391, 463** et **579**. On retrouve la phéophytine **m/z 871** sur l'échantillon maturité mais à très faible intensité et l'ion **m/z 493** qui correspond à la malvidine-3-O-glucoside. Les autres ions n'ont pas pu être identifiés, mais cette technique a permis d'augmenter l'intensité totale, une augmentation de 65% du courant ionique total (somme de toutes les amplitudes de tous les ions) a été enregistrée : passant de 365 à 605 (unité arbitraire) avec le même échantillon. Ainsi, ces résultats montrent que le solvant utilisé en électrospray a une influence significative sur le rendement d'ionisation et qu'il est possible de favoriser l'ionisation de

différentes espèces notamment en jouant sur le pH. Ceci pourrait permettre d'explorer davantage le métabolome de la pellicule.

*Par cette méthode, des changements significatifs d'empreinte spectrale ont pu être observés au cours de la maturation. Les deux modes d'ionisation, positif et négatif, ont permis d'obtenir des résultats différents et complémentaires. Dans le mode négatif, on retrouve des sucres, des acides hydroxycinnamiques et des flavonols, tandis que dans le mode positif, la malvidine (en partie responsable de la coloration) et la chlorophylle ont été détectées (sa structure a été confirmée par des études en MS/MS). L'influence du solvant a été démontrée, l'ajout d'une phase d'acétate d'ammonium a permis d'augmenter significativement l'intensité du courant ionique total permettant à terme une amélioration de la finesse de l'analyse. Néanmoins, dans le cadre de notre travail, la détection des tannins n'a pas été concluante mais de possibles marqueurs de la maturité ont pu être identifiés.*

### III.2 Analyse en Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS)

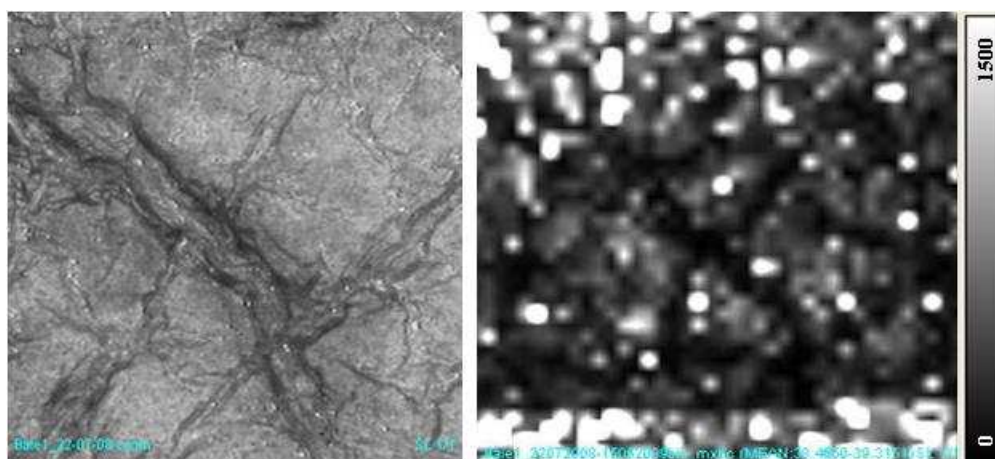
Les analyses ont été effectuées sur la face cuticule de la pellicule c'est-à-dire sur le côté extérieur de baies du millésime 2008 au trois stade de développement étudiés précédemment : fermeture de grappe, 80% véraison et récolte. La Figure 88 présente la comparaison visuelle entre les 3 stades de maturités.



**Figure 88** : Images optiques des pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (A), 80% véraison (B) et récolte (C) en 2008.

En fonction du stade de maturation, le premier aspect visuel de la pellicule constaté est son changement de couleur puis la modification de sa structure qui apparaît plus plissée et plus fine à maturité (Figure 88). L'analyse par IMS permet également de reconstituer l'image

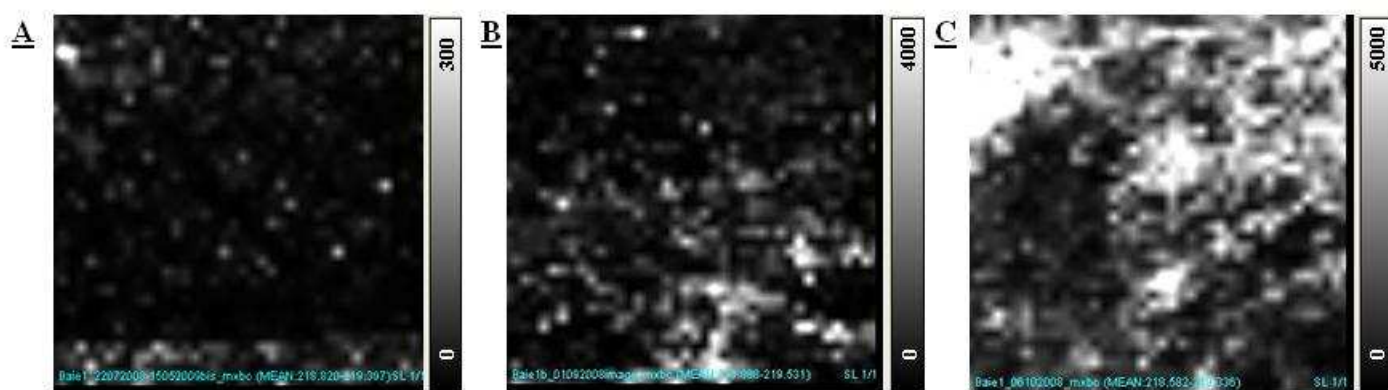
grâce à la distribution des ions calcium, potassium et magnésium en fonctions des différences de concentration et de répartitions des ions positifs. Ainsi, dans le cas du potassium (**m/z 38.9**), ion majeur de la pellicule, on peut observer une équivalence entre l'image optique et l'image par spectrométrie de masse (Figure 89).



**Figure 89** : Images de la répartition de l'ion m/z 38,9 ou potassium dans les pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (**A**), 80% véraison (**B**) et récolte (**C**) en 2008. L'échelle d'intensité de signal détecté figure à droite des images.

Cette technique permet également d'identifier la répartition de certains composés spécifiques de la maturation comme le glucose. La Figure 90 présente la répartition de l'ion m/z 219 correspondant au glucose avec un adduit potassium  $[M+K]^+$  dans les pellicules aux différents stades étudiés. Les imageries présentent, de gauche à droite, la pellicule de baie verte, de baie en fin de véraison et de baie à maturité. Ainsi, le glucose est peu présent au stade fermeture de grappe puis son intensité augmente à 80% véraison et est très forte à la récolte. Ces résultats loin d'être novateurs, montre surtout que la répartition du glucose n'est pas homogène sur toute la pellicule et qu'elle pourrait être la conséquence de phénomènes de maturation différentielle au sein de la baie. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude sur les différentes zones de la pellicule : à proximité du pédicelle, sur la zone équatoriale, sur les zones différemment exposées au soleil par exemple.





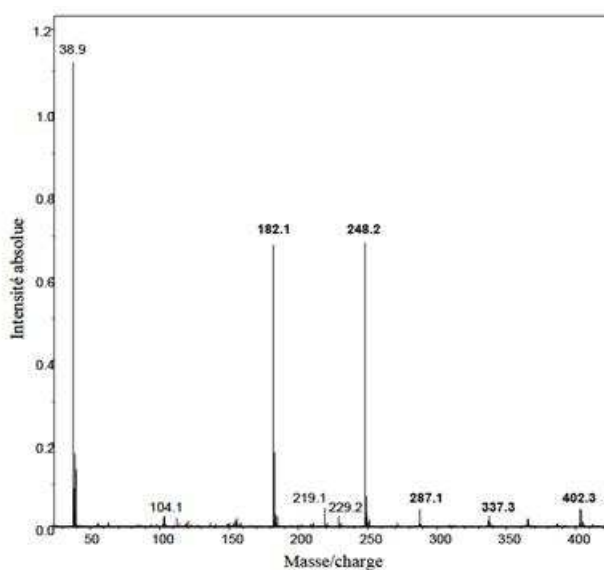
**Figure 90 :** Images de la répartition de l'ion  $m/z$  219 ou glucose dans les pellicules des baies aux stades fermeture de grappe (**A**), 80% véraison (**B**) et récolte (**C**) en 2008. L'échelle d'intensité de signal détecté figure à droite des images.

Enfin, outre le fait que les échantillons soient très riches en sodium et en potassium, certains autres ions ont présenté une répartition bien particulière et localisée pouvant laisser croire à un marquage spécifique (Figure 91).



**Figure 91 :** Répartition de l'ion  $m/z$  248,2 dans la pellicule au stade 80% véraison.

C'est pourquoi ces régions ont subi une analyse spectrale spécifique, la Figure 92 présente le spectre associé à l'un des pixels appartenant à cette région.



**Figure 92 :** Spectre issu de la zone d'intérêt.

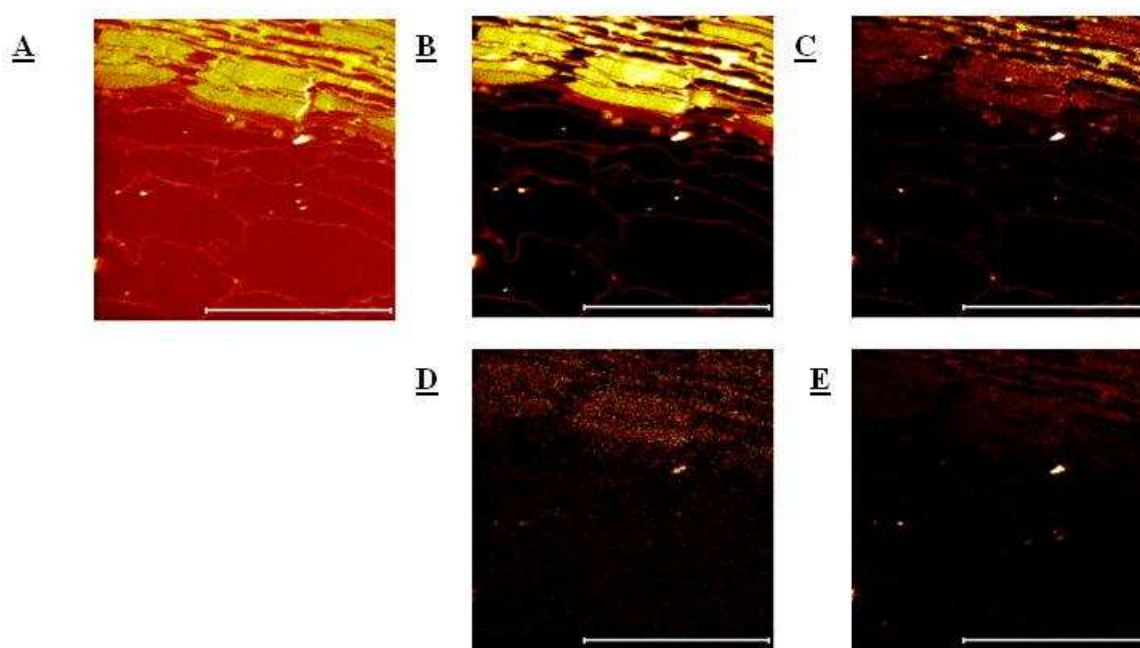
Les analyses montrent que les pics à **m/z 182.1 ; 248.2 ; 287.1 ; 337.3 et 402.3** correspondent aux cinq espèces qui apparaissent co-localisées. Une co-localisation similaire a été détectée dans une zone différente de la pellicule mais aucune référence de cette empreinte n'a été retrouvée dans la littérature. L'ion de rapport **m/z 38,9** correspond au potassium et l'ion **m/z 219,1** est lié au glucose avec un adduit potassium. L'ion **m/z 104,1** quant à lui n'a pas pu être identifié.

*Ce travail a permis de montrer que l'imagerie par spectrométrie de masse était une technique innovante et intéressante pouvant être adaptée à notre matériel végétal. Elle permet de travailler plusieurs aspects car on peut retrouver l'image de l'échantillon avec la distribution de certaines espèces et certaines espèces co-localisées peuvent observées en même temps. Cependant, peu d'informations sont disponibles concernant l'étude de pellicules de raisin et pour cette raison, l'attribution de structures moléculaires des ions a été difficile. Dans le futur, il est donc envisagé de mettre au point un système de calibration adapté aux pellicules pour faciliter l'identification de ces composés.*

### III.3 Analyse par Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS)

Cette technique a été testée pour étudier la présence de composants cellulaires sur des coupes semi-fines de pellicules au stade fermeture de grappe de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon en 2008. Grâce à ce travail, différents types d'ions et les résultats sont présentés dans les Figures 93, 94 et 95.

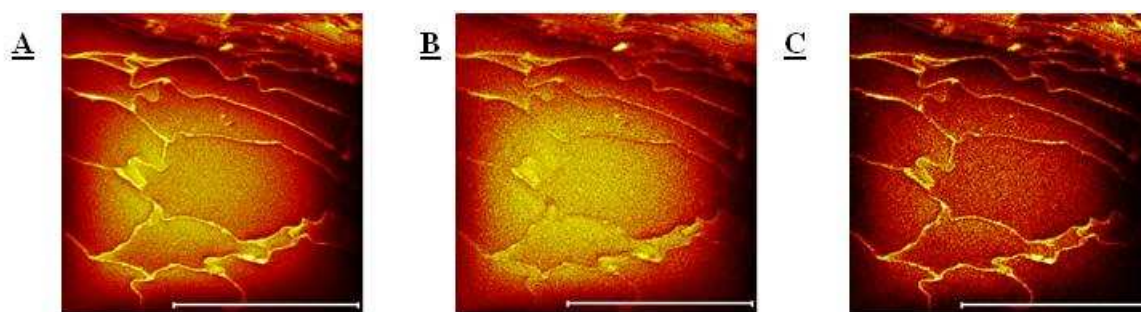
Ainsi, les ions positifs sont répartis sur l'ensemble des assises cellulaires de la pellicule et au sein des cellules on les retrouve dans le compartiment intracellulaire et les parois (Figure 93 **A**). Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont préférentiellement localisés dans les compartiments intracellulaires (Figure 93 **B** et **D**) tandis que les ions  $\text{Ca}^+$  et  $\text{Mg}^+$  sont plutôt pariétaux (Figure 93 **C** et **E**). On note également une différence d'intensité de détection entre les  $\text{Ca}^+$  et  $\text{Na}^+$  qui fortement détectés et les ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Mg}^+$  plus faiblement détectés à ce stade.



**Figure 93** : Images de la répartition des ions positifs sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008. **A** : total des ions positifs ; **B** :  $\text{Na}^+$  ; **C** :  $\text{Ca}^+$  ; **D** :  $\text{K}^+$  ; **E** :  $\text{Mg}^+$ .

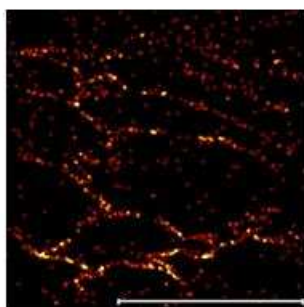


De manière similaire, cette technique a permis de détecter des ions négatifs  $O^-$  et  $OH^-$  dans les parois cellulaires (Figure 94).



**Figure 94 :** Images de la répartition des ions négatifs sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008. **A** : total des ions négatifs ; **B** :  $O^-$  ; **C** :  $OH^-$ .

Enfin, d'autres composants tels que les acides palmitique et stéarique ont pu être détectés en faible intensité à proximité des parois cellulaires (Figure 95).



**Figure 95 :** Images de la répartition des acides palmitique et stéarique sur des coupes semi-fines de pellicule de la parcelle 3, Cabernet-sauvignon, au stade fermeture de grappe en 2008.

*Ce travail, qui ne constitue qu'une première approche, se révèle très intéressant et particulièrement innovant car il permet facilement de localiser les composés et notamment les ions. Ainsi, en travaillant sur des coupes semi-fines de pellicules, les résultats obtenus par la technique de SIMS peuvent conforter certaines observations réalisées en microscopie et donc à la même échelle. Ainsi, par cette technique, il serait intéressant d'évaluer les teneurs en  $Ca^+$  et  $Mg^+$  de la pellicule, les résultats pouvant servir d'indicateurs sur l'état de dégradation des parois et par extrapolation sur l'extractibilité des tannins pariétaux.*

## IV. CONCLUSION

Les méthodes de détermination de la qualité du raisin et de sa maturité optimale sont plus ou moins complexes, longues et coûteuses et n'intègrent pas les paramètres de texture permettant de définir la fermeté du fruit pouvant être en lien avec la diffusion des composés d'intérêt œnologique. C'est dans ce contexte que cette étude a été menée, avec pour objectif d'estimer une possible adéquation entre l'état de dégradation pelliculaire (traduite par l'analyse de la texture de la baie) et le niveau de diffusion des tannins (traduite par l'extractibilité des composés phénoliques et l'évaluation de l'astringence et de l'amertume).

Pour cela, nous avons développé deux approches : une première approche basée sur des mesures physiques et analytiques de la pellicule et une seconde approche utilisant l'analyse sensorielle *via* la dégustation des baies de raisin. En comparant les résultats des deux approches, l'objectif de ce travail était :

- de développer de nouveaux outils permettant de mieux évaluer la maturité de la baie et en particulier de définir la texture et la composante tannique de la pellicule
- d'essayer de décrire quelques critères de typicité des raisins de Bordeaux.

Nos résultats ont montré qu'en ce qui concerne la composante tannique, l'analyse chimique et sensorielle en tant qu'outil pratique de définition de la maturité ne peut pas être à ce jour utilisable, alors que les mesures physiques peuvent décrire de manière fine l'évolution de la texture de la pellicule au cours de la maturation.

La discrimination des échantillons pour l'évaluation de la maturité phénolique de la pellicule par l'analyse des critères chimiques et sensoriels n'est pas encore envisageable. En effet, nos résultats montrent qu'il est difficile d'utiliser ces critères comme « descripteur type » car ils semblent avoir des « poids différents » : l'effet parcelle affecte uniquement les teneurs en tannins et la perception de l'astringence alors que le millésime affecte uniquement le pourcentage de galloylation des tannins et la perception d'amertume. Les ACP réalisées avec l'ensemble des critères chimiques et sensoriels montrent qu'il est possible par cette méthode de discriminer les différents stades de maturation des pellicules mais aucune corrélation dans ce sens n'a pu être établie dans ce travail. Par contre, l'étude chimique et

sensorielle du profil tannique a montré que le cépage influençait l'ensemble des critères : il est donc possible par les mesures des teneurs en tannins, de leur DPM et du pourcentage de galloylation, la perception de l'astringence et de l'amertume, de différencier les deux cépages principaux de la région bordelaise : le Cabernet-sauvignon et le Merlot.

L'analyse chimique ne semble pas satisfaisante, il est donc nécessaire de développer de nouveaux marqueurs chimiques pour mieux apprécier l'astringence et l'amertume des pellicules. De la même manière, une amélioration des critères sensoriels de la composante tannique est à envisager : l'astringence étant plus une sensation qu'un goût, la dureté de la matrice pourrait influencer la perception de ce critère. Une méthode d'entraînement de la perception tannique dans des matrices de textures différentes semble indispensable à développer.

L'étude physique et sensorielle de la texture a permis de mettre en évidence une corrélation entre les mesures physiques et les critères sensoriels indiquant que les outils (pénétrömètre et Aw) et les descripteurs utilisés (aptitude à l'écrasement et à l'égrenage, adhérence pulpe-pellicule et dilacération) sont bien choisis. Par contre, les critères de mesures physiques permettent de différencier le cépage ainsi que les parcelles entre elles. Nos résultats montrent une très bonne discrimination des stades de développement et de la texture en fonction du millésime. La différenciation des cépages et des parcelles n'est possible qu'avec les mesures physiques. Ainsi en validant ces outils de mesures, nous pouvons d'ores et déjà penser qu'en complétant ce travail par une augmentation du nombre de parcelles, le pénétrömètre et l'Aw pourraient être proposés à terme comme de nouveaux critères d'évaluation de la maturation pelliculaire.

La recherche de critères d'évaluation de la texture nous a conduits à tester de nouveaux outils permettant de cartographier les composants pelliculaires. Les analyses des extraits pelliculaires en ESI-FTICRMS ont permis d'initier la construction d'une base de données de composants pelliculaires à chaque étape clef du développement de la baie pour à terme utiliser imagerie par spectrométrie de masse pour cartographier les composants pelliculaires. Nous avons pu identifier certains marqueurs de maturité potentiels, mais déjà connus (chlorophylles, anthocyanes...), et ainsi valider la méthode pour la transférer aux composés phénoliques pour la poursuite de cette thèse. Les essais menés avec la technique

SIMS, qui ne constitue qu'une première approche, se révèlent également très intéressants et particulièrement innovants car cette technique permet facilement de localiser les composés et notamment les ions. Ainsi, en travaillant sur des coupes semi-fines de pellicules, les résultats obtenus par la technique de SIMS peuvent conforter certaines observations réalisées en microscopie et donc à la même échelle. Ainsi, par cette technique, il serait intéressant d'évaluer les teneurs en  $\text{Ca}^+$  et  $\text{Mg}^+$  de la pellicule, les résultats pouvant servir d'indicateurs sur l'état de dégradation des parois et par extrapolation sur l'extractibilité des tannins pariétaux.

*Les résultats obtenus dans ce chapitre ne nous ont pas permis de définir une typicité des raisins au sein de la région bordelaise mais nous ont permis de valider de nouveaux outils de mesure de la maturité pelliculaire et de texture. L'association du pénétromètre, de l'Aw et du DPm des tannins pelliculaires confortent les résultats obtenus dans les chapitres précédents selon lesquelles l'évolution de l'ultrastructure de la pellicule et sa composition tannique et notamment pariétale, diffèrent en fonction du millésime et du degré de maturité des baies. Néanmoins, la caractérisation de la maturité pelliculaire et le développement d'outils pour la mesurer constitue un domaine de recherche vaste et complexe. L'exploration de techniques innovantes montre qu'il serait possible à terme de définir des nouveaux marqueurs de maturité pelliculaire prenant en compte l'état de dégradation de la pellicule et son potentiel tannique dans le but de déterminer une qualité optimum du fruit au moment de la vendange.*

## Conclusions générales et Perspectives

---

L'objectif premier de ce travail était d'approfondir les connaissances sur les tannins pelliculaires : définir leur localisation spécifique dans la cellule, apporter des éléments nouveaux sur leur synthèse et sur la localisation cellulaire de cette voie, déterminer de possibles modes de liaison avec d'autres composés cellulaires et notamment les composés pariétaux. Pour cela, l'étude de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires au cours de la maturation du raisin se révélait être un élément clef pour mener à bien ce travail, comprendre l'extractibilité des tannins pariétaux et en évaluer l'impact sur la qualité du fruit.

Pour répondre à toutes ces questions, nous avons choisi une approche multi-échelles et multi-disciplines faisant appel à des techniques moléculaires, biochimiques, microscopiques, physiques et sensorielles. Cette multi-approche nous a permis d'apporter des éléments nouveaux sur l'évolution des tissus épidermiques du raisin au cours de la maturation et conduit à la validation de nouveaux outils permettant de mieux déterminer la texture et le potentiel tannique de la pellicule de raisin.

A travers cette conclusion générale, les points essentiels de ce travail sont rappelés afin de pouvoir rassembler les informations capitales sur la compréhension des mécanismes de la maturation pelliculaire.

### ~ Biosynthèse des tannins

Les deux dernières enzymes, connues et identifiées, de la voie de biosynthèse des tannins, la leucoanthocyanidine réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) ont été étudiées précédemment au laboratoire. Leur activité ainsi que leur expression génique avaient été suivies de la fleur à la baie mûre et certains modes de régulations via les régulateurs

hormonaux tels que l'acide abscissique (ABA) avait été mis en évidence. Ces résultats nous avaient permis d'obtenir des informations nouvelles sur les mécanismes de biosynthèse des tannins mais ils restaient incomplets. La littérature étant relativement mal documentée, la localisation de la voie de biosynthèse et le transport des tannins vers leurs différents lieux de stockage observés (vacuole, membrane plasmique, paroi) n'étaient qu'hypothèses.

Nos résultats apportent des informations nouvelles sur la biosynthèse et l'accumulation des tannins dans la pellicule des baies de raisin et complètent ceux de Winkel *et al.* (2004), Jorgensen *et al.* (2005), Chen *et al.* (2006) et Tian *et al.* (2008). Ainsi, nous avons démontré que l'activation de la LAR et de l'ANR dans la baie de raisin était variable selon les millésimes mais se divisait globalement en trois phases : une première phase d'activation dans les baies vertes, une seconde au cours de la véraison et une dernière en fin de maturation. L'évolution des teneurs en catéchine et épicatechine des pellicules est fortement corrélée aux profils d'expression et d'activités des deux enzymes, mais dépend également des conditions climatiques, et notamment de l'état hydrique de la plante qui semble être un facteur clé dans la régulation de cette voie de biosynthèse via l'accumulation d'acide abscissique.

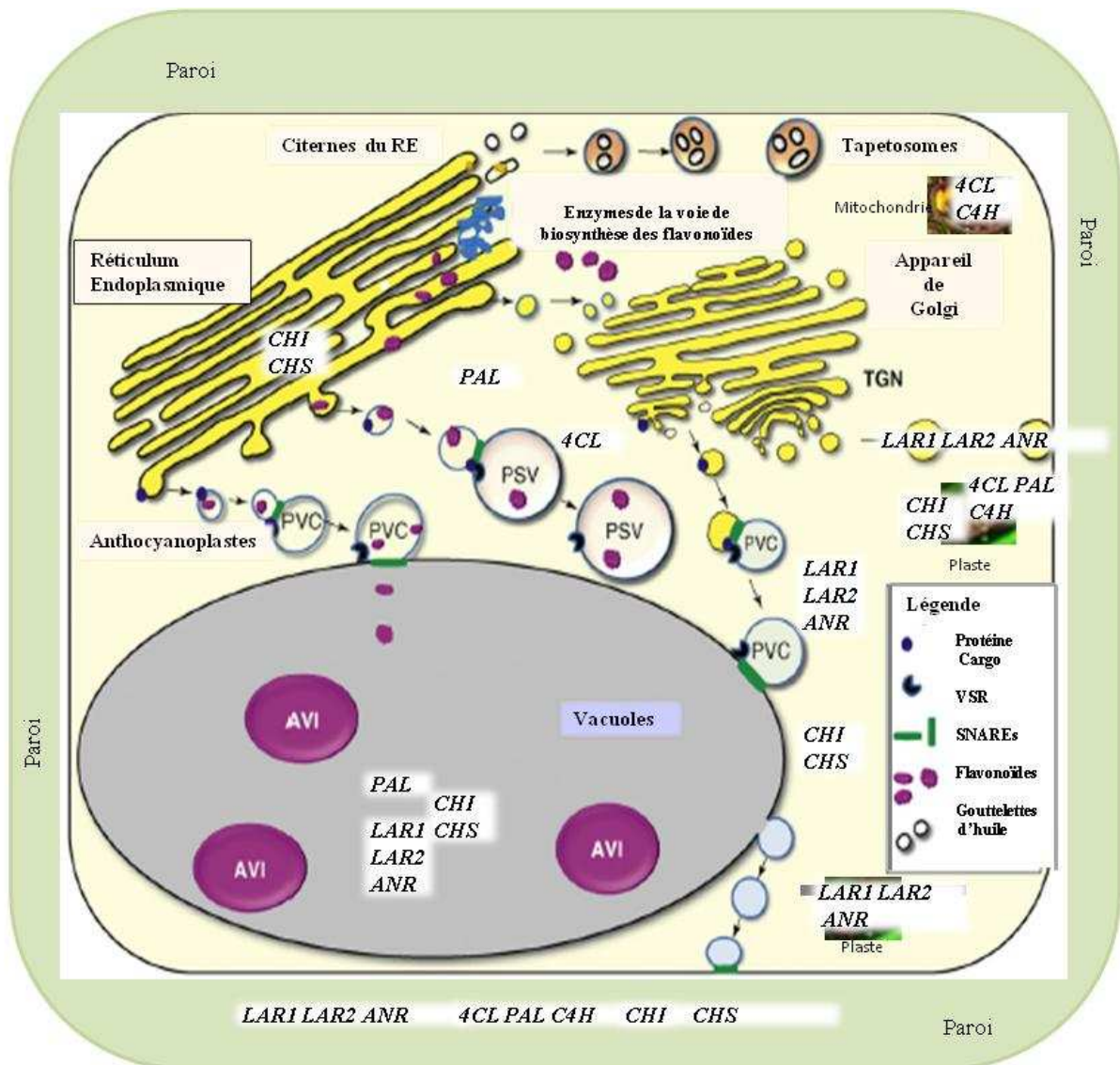
Pour la première fois, grâce à des techniques d'immunolocalisation, nous avons observé la localisation des deux dernières enzymes de la voie des phénylpropanoïdes : la LAR et l'ANR. L'évolution de cette localisation au cours de la maturation de la pellicule du raisin à travers les compartiments intracellulaires et pariétaux confirme l'hypothèse d'une synthèse *in situ* des tannins pariétaux.

Ainsi, selon les tannins considérés et leur localisation définitive, leur synthèse serait assurée par des complexes enzymatiques localisés à proximité de leurs sites d'accumulation (Figure 96) :

- pour les tannins intracellulaires et une partie des tannins pariétaux accumulés au cours de la première phase de croissance active, la synthèse semblerait être localisée au niveau du complexe RE-noyau et des plastes. Les tannins synthétisés dans la cellule pourraient être exportés plus tard dans les parois par les mécanismes de transport vésiculaires et membranaires : au cours de la véraison, la localisation de la

LAR et de l'ANR au niveau des vésicules golgiennes et des structures fibrillaires confirme cette hypothèse d'un transport vésiculaire vers la paroi.

- pour les tannins pariétaux observés pendant la maturation, l'hypothèse d'une synthèse *in situ* dans la paroi semble être privilégiée puisque les enzymes sont très majoritairement localisés dans ce compartiment.



**Figure 96** : Schéma du modèle de transport des flavonoïdes par des vésicules membranaires, d'après Zhao et Dixon (2009) et localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Abbreviations: AVI, inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes; PVC, Structures prévacuolaires; PSV, vacuoles de stockage de protéines; TGN, réseau trans-Golgien. PAL: phénylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate-4-hydroxylase; 4CL, 4-caumarate: coenzyme A ligase; CHI, chalcone isomérase; CHS, chalcone synthase; LAR1, leucoanthocyanidine réductase 1; LAR2, leucoanthocyanidine réductase 2; ANR, anthocyanidine réductase.

## ~ Localisation pariétale des tannins

L'objectif de ce chapitre était d'étudier les tannins pariétaux en combinant une approche biochimique et microscopique afin d'apporter des éléments nouveaux sur les modes de liaison des tannins avec certains composés pariétaux et de mieux appréhender les mécanismes qui pourraient influencer leur extractibilité et leur diffusion dans les moûts. Les résultats obtenus apportent des données nouvelles concernant la localisation des tannins pelliculaires, leur évolution à travers les différents compartiments cellulaires au cours de la maturation de la baie, leur complexation avec les composants pariétaux et ainsi leur extractibilité.

L'approche en microscopie confocale nous a permis, pour la première fois, de montrer la présence de tannins dans les parois cellulaires chez le raisin. Au cours du développement de la baie, la répartition des tannins au sein de la pellicule évolue : les tannins sont localisés en quantité importante dans les vacuoles des assises profondes au début de la maturation puis localisés préférentiellement dans la paroi des assises les plus externes en fin de maturation. Cette technique a également permis d'estimer les proportions des tannins entre les compartiments cellulaires étudiés. Si les proportions estimées sont peu différentes entre les tannins vacuolaires et les tannins pariétaux dans la baie verte, il n'en est pas de même à maturité où les tannins pariétaux peuvent représenter 90% du pool tannique total.

L'approche biochimique montre qu'au « cœur de la paroi cellulaire », une partie des tannins, faiblement ou moyennement polymérisés, sont piégés entre les fibrilles de cellulose et d'hémicellulose, composés qui constituent la trame rigide de la paroi. Un second groupe de tannins, un peu plus gros que les précédents, est complexé avec les pectines et la trame rigide de la paroi. L'association de ces tannins semble dépendre fortement de l'activité des enzymes pectolytiques. Enfin, la majorité des tannins, les plus polymérisés, semblent être localisés en périphérie du maillage pariétale. Ainsi, il semblerait que les teneurs en tannins de la paroi soient directement liées à l'ultrastructure pariétale.



## ~ Ultrastructure de la paroi et enzymes pectolytiques (PME et PG)

Pour la première fois, chez le raisin, une étude complète portant sur l'évolution de l'ultrastructure des parois cellulaires de la pellicule au cours de la maturation de la baie a été réalisée. Ce travail, par une analyse de l'évolution de l'ultrastructure des parois, du suivi de l'activité et de l'expression des gènes et de la localisation cellulaire des protéines en partie responsables de la dégradation des structures pariétales avait pour objectif d'expliquer les modifications physiques de la pellicule de raisin de la baie verte à la récolte.

Nos observations ont permis d'évaluer les modifications structurales des parois cellulaires de la pellicule au cours du développement de la baie. L'épaisseur des parois est liée au stade de développement et aux pressions exercées lors des phases de croissance mais dépend également des conditions climatiques et notamment de l'état hydrique de la plante qui, via l'équilibre hormonal (ABA/AIA), semble être un facteur clé dans la régulation des mécanismes impliqués lors de l'arrangement du maillage pariétal.

Notre étude débute au cours de la croissance de la baie, au stade fermeture de grappe au moment où les divisions cellulaires diminuent et le grandissement cellulaire commence. Le métabolisme des cellules est actif se traduisant par des teneurs en ADN élevées et l'expression d'un grand nombre de gènes dont la PME et la PG. La localisation nucléaire et cytoplasmique de ces protéines traduit ce phénomène. Entre le stade fermeture de grappe et la fin de la véraison, nos résultats montrent un pic d'activité et d'expression du gène codant pour la protéine PME. La localisation de cette protéine dans les vésicules golgiennes et au niveau de structures fibrillaires nous a permis de confirmer le schéma d'export de cette protéine vers la paroi proposé par Micheli en 2001. De plus, le marquage de ces structures par les anticorps JIM5 et JIM7 confirment, d'une part la synthèse accrue de pectines durant cette période et d'autre part la présence de deux formes, active et inactive de la PME dans le compartiment intracellulaire. A ce stade, la protéine PG a peu ou pas été détectée dans les parois cellulaires. Or, nous avons pu voir que l'action de la PME facilitait d'une part, la digestion des pectines par la PG et produisait également des chaînes d'homogalacturonanes plus acides. Ces résultats permettent donc, d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'acidification des parois par la déméthylestérification des pectines sous l'action de la PME, entre la fermeture de grappe et la fin de la véraison, entraînerait des modifications physico-chimiques de la structure pariétale

augmentant l'élasticité du maillage pectique et permettant aux cellules de résister à la pression de turgescence induite par le grandissement cellulaire. Ainsi, l'épaississement des parois radiales et tangentielles constaté du stade fermeture de grappe à la fin de la véraison pourrait s'expliquer en partie par l'action de la PME : en déméthylestérifiant les chaînes homogalacturoniques, la PME libèrerait des groupements carboxyles qui interagiraient avec les ions calcium et créeraient un gel pectique entraînant un épaississement et un renforcement de la paroi étayé par des dépôts de callose et de lignine (Carpin *et al.*, 2001 ; Dunand *et al.*, 2002).

A la fin de la maturation, l'épaisseur des parois cellulaires diminue en lien avec la quantité de pectines plus ou moins méthylées. La PME est principalement cytoplasmique et la PG pariétale. Parallèlement à ces observations microscopiques, nos résultats biochimiques et transcriptomiques montrent une activité de la PME ainsi qu'une transcription des gènes PG au cours de la seconde phase de maturation. Cela confirme l'action concomitante de ces enzymes : la protéine PME en déméthylant les pectines faciliterait leur digestion par la PG, entraînant la dégradation du réseau pectique du maillage pariétale et donc le ramollissement du fruit. Sachant que la déméthylation des pectines par la PME, augmente les zones de jonctions des chaînes homogalacturoniques en favorisant la formation d'interactions de type « *egg box* » avec les ions calcium (Rees, 1982) renforçant ainsi la cohésion pariétale, la compétition entre les ions calcium et la PG expliquerait que peu de tannins soient piégés entre les pectines et la trame rigide de la paroi composée de cellulose et d'hémicellulose.

Ces résultats confirment donc l'action conjointe de la PME et de la PG pour modifier l'agencement du maillage pariétal, la PME devant agir en amont de la PG. L'action de ces enzymes, plus ou moins régulée par les conditions climatique via l'équilibre hormonal, va impacter directement l'épaisseur des parois des cellules de pellicule ainsi que les possibilités d'accessibilité des composés pariétaux pour d'éventuelles liaisons avec les tannins par exemple.

~ Une évaluation de la texture par une double approche : physique et sensorielle

Nous avons pu observer à travers l'étude fondamentale une évolution de la structure et de la composition de la pellicule de raisin au cours de sa maturation à l'échelle microscopique, moléculaire et biochimique. L'objectif final de ce travail était de savoir si ces modifications pouvaient être perceptibles à l'échelle macroscopique et s'il était possible de proposer aux viticulteurs des outils permettant d'évaluer la texture du fruit et sa qualité au moment de la vendange.

Les méthodes de détermination de la qualité du raisin et de sa maturité optimale proposés aujourd'hui aux professionnels, sont plus ou moins complexes, longues et coûteuses et n'intègrent pas les paramètres de texture permettant de définir la fermeté du fruit pouvant être en lien avec la diffusion des composés d'intérêt œnologique. Pour essayer de proposer de nouveaux outils permettant de mieux évaluer la maturité et la texture de la pellicule, nous avons développé deux approches : une première approche basée sur des mesures physiques de la pellicule et une seconde approche utilisant l'analyse sensorielle *via* la dégustation des baies de raisin.

Nos résultats ont montré que les mesures physiques et l'analyse sensorielle pouvaient décrire de manière fine l'évolution de la texture de la pellicule au cours de la maturation.

L'étude physique et sensorielle de la texture a permis de mettre en évidence une corrélation entre les mesures physiques et les critères sensoriels indiquant que les outils (pénétrömètre et  $A_w$ ) et les descripteurs utilisés (aptitude à l'écrasement et à l'égrenage, adhérence pulpe-pellicule et dilacération) étaient bien choisis. Avec les deux approches, nos résultats montrent une très bonne discrimination des stades de développement et de la texture en fonction du millésime. Par contre, la différenciation des cépages et des parcelles n'est possible qu'avec les mesures physiques.

~ Perception tannique des parois

De manière similaire à l'étude de la texture de la pellicule, nous avons voulu voir s'il était possible par une double approche, sensorielle et analytique, d'évaluer le potentiel

tannique des pellicules et de déterminer une éventuelle typicité des raisins de la région bordelaise.

Nos résultats ont montré qu'en ce qui concerne la composante tannique, l'analyse chimique et sensorielle en tant qu'outil pratique de définition de la maturité ne peut pas être à ce jour utilisable puisque la discrimination des échantillons s'avère insuffisante.

Ainsi, il est difficile d'utiliser ces critères comme « descripteur type » car ils semblent avoir des « poids différents » : l'effet parcelle affecte uniquement les teneurs en tannins et la perception de l'astringence alors que le millésime affecte uniquement le pourcentage de galloylation des tannins et la perception d'amertume. Les ACP réalisées avec l'ensemble des critères chimiques et sensoriels montrent qu'il est possible par cette méthode de discriminer les différents stades de maturation des pellicules mais aucune corrélation dans ce sens n'a pu être établie dans notre travail. Par contre, l'étude chimique et sensorielle du profil tannique a montré que le cépage influençait l'ensemble des critères : il est donc possible par les mesures des teneurs en tannins, de leur DPm et du pourcentage de galloylation, la perception de l'astringence et de l'amertume, de différencier les deux cépages principaux de la région bordelaise : le Cabernet-sauvignon et le Merlot mais il est impossible de différencier les appellations bordelaise entre elles.

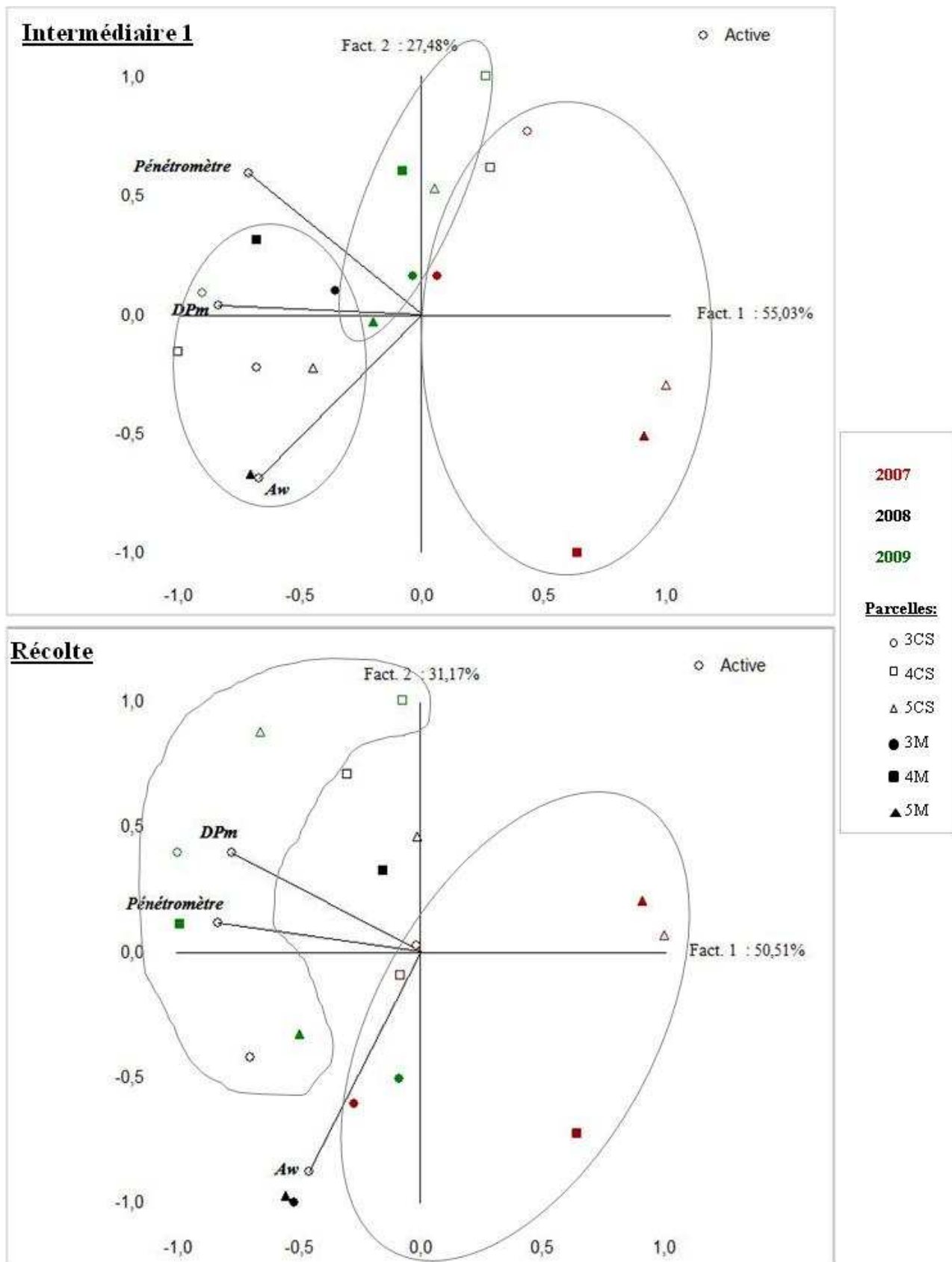
#### ~ Relation texture et Degré de Polymérisation (DPm) des tannins

L'ensemble de notre travail a démontré que selon le déroulement chronologique des phases de réorganisation des parois et leur niveau de dégradation, les tannins pouvaient être plus ou moins « intégrés » dans le maillage pariétal et ce, en fonction de leur degré de polymérisation. Leur capacité à se lier aux parois cellulaires et la dégradation de celles-ci influenceraient donc leur extractibilité et la composante sensorielle tannique. L'analyse sensorielle et chimique de la composante tannique laissant penser que les descripteurs utilisés pouvaient être influencé par la texture de la matrice, une étude des corrélations possibles entre les mesures physiques de texture et le DPm des tannins a été entreprise. Cette étude a été menée pour les trois millésimes, à deux stades de développement : le premier stade dit intermédiaire après la fin de la véraison et le second à la récolte. La Figure 97 présente les ACP effectuées pour les 2 stades étudiés : intermédiaire 1 et récolte. Pour chacune des ACP,

les variables étudiées correspondent aux mesures physiques d'évaluation de la texture de la pellicule (pénétrömètre et  $A_w$ ) et au degré de polymérisation. Aux deux stades étudiés, stade intermédiaire et maturité, les deux premières composantes principales rassemblent respectivement 82,67% et 81,68% de la variance totale. Les trois variables utilisées corrèlent négativement avec l'axe 1, et permettent une discrimination des parcelles en fonction du millésime.

La mise en relation des mesures physiques de la texture et du DPM des tannins semble permettre de discriminer les millésimes entre eux et donc de rendre compte du potentiel tannique de la pellicule et ainsi de l'extractibilité des tannins en prenant en compte les variations de la texture de la pellicule et en fonction des conditions climatiques du millésime. Ces résultats rejoignent les observations de l'ensemble de notre étude selon lesquelles, l'évolution de l'ultrastructure de la pellicule et sa composition tannique et notamment pariétale, diffèrent en fonction du millésime et du degré de maturité des baies à la récolte.

Nous avons pu constater à travers l'étude fondamentale, qu'en fonction du **millésime**, le DPM des tannins pariétaux était variable et qu'il semblait être liée au niveau de cohésion des parois par son association entre les pectines et la trame rigide. Il pourrait être envisagé que l'association de tannins aux composés pariétaux jouent un rôle dans la texture de la pellicule en modifiant l'accessibilité des sites d'action des enzymes pectolytiques et ainsi la cohésion pariétale et la « dureté pelliculaire ». En effet, les tannins fortement polymérisés, de part leur localisation plutôt externe au maillage pariétal, pourraient bloquer les sites d'action des enzymes pectolytiques et empêcher la désorganisation des polysaccharides. Au contraire, lorsque ces tannins sont moins polymérisés, ils sont localisés à l'intérieur du maillage pectique. Les sites d'action des enzymes pectolytiques seraient ainsi plus accessibles et l'action de la PME et de la PG facilitée. De plus, le DPM des tannins étant impliqué dans la **sensation** d'astringence en augmentant les interactions avec les protéines de la salive, on peut se demander si l'évaluation de ce critère n'est pas plus proche du registre de l'évaluation de la texture que de celui de la composante tannique. En entraînant un panel sur l'évaluation de l'astringence, ce critère pourrait à terme, être corrélée aux outils de mesures physiques de la texture, dans le but d'évaluer, **par la texture** de la pellicule, son potentiel tannique et par extrapolation l'extractibilité des tannins.



**Figure 97 :** Représentation ACP des individus (3CS, 4CS, 5CS, 3M, 4M, 5M en 2007, 2008 et 2009) et des variables (DPm, Pénétromètre et Aw) en 2007, 2008 et 2009.

## ~ Perspectives

Notre travail a permis d'apporter des éléments nouveaux mais de nombreuses questions restent en suspens et différents prolongements, au niveau fondamental ou appliqué, peuvent être envisagés.

Le choix du réseau parcellaire de la Faculté d'œnologie de Bordeaux pour notre étude avait pour objectif de mettre en évidence une typicité des raisins pour chacune des appellations bordelaises. A travers l'étude sensorielle de la composante tannique, nous avons pu constater que la dégustation des baies ne permettait pas de différencier les parcelles au sein de la région bordelaise. Une des caractéristiques des vins de bordeaux reposant sur une identité tannique, une étude élargie sur différentes régions viticoles en France pourrait valider ou infirmer la notion de typicité régionale pour les raisins. Cependant, pour qu'une telle étude soit envisagée, il semble important de préciser et de redéfinir les critères chimiques et sensoriels de la composante tannique de la pellicule. Plusieurs pistes sont envisageables. Les critères chimiques pourraient être élargis au pourcentage de flavan-3-ols et plus particulièrement de (+)-catéchine et d'(-)-épicatéchine, mais aussi aux teneurs en dimères, trimères et oligomères. Un entraînement du jury sur la perception d'astringence et d'amertume sur des matrices solides pourrait également être envisagé : plusieurs fruits ou légumes sont définis comme fortement amer ou astringent, l'évaluation de ces critères sur du pamplemousse, des feuilles d'endives ou d'épinards pourrait être mis en place. Ce travail permettrait en plus de mieux relier l'analyse sensorielle des critères tanniques à la définition de la texture.

Concernant l'évaluation de la texture de la pellicule, les valeurs données par le pénétromètre s'avèrent être de bons indicateurs. Son faible coût, sa facilité d'utilisation et sa performance font de cet appareil un outil pratique à développer auprès des professionnels pour évaluer la texture de la pellicule au cours de la maturation.

La recherche de marqueurs de maturité pelliculaire nous a conduits à tester la cartographie de composants cellulaires à travers deux techniques : l'IMS et la SIMS. La mise au point d'un système de calibration adapté aux pellicules pour faciliter l'identification de

composés par l'IMS est en cours. Concernant la technique SIMS, les résultats obtenus sur des coupes semi-fines de pellicules peuvent conforter certaines observations réalisées en microscopie et donc à la même échelle. Ainsi, par cette technique, il serait intéressant d'évaluer les teneurs en  $\text{Ca}^+$  et  $\text{Mg}^+$  de la pellicule, les résultats pouvant servir d'indicateurs sur l'état de dégradation des parois et par extrapolation sur l'extractibilité des tannins pariétaux.

L'étude des tannins pariétaux par la microscopie confocale mériterait d'être poursuivie. En effet, les différences dans les spectres d'émission des différents constituants des polymères tanniques font de cette technique une méthode potentielle de caractérisation des tannins pariétaux. A l'échelle cellulaire, il serait possible, en jouant sur les différentes longueurs d'onde d'excitation et d'émission, de différencier les vacuoles contenant des tannins de celles contenant des anthocyanes, ce qui à ce jour est impossible en microscopie électronique.

L'étude du transport des tannins *via* la microscopie confocale peut être envisagée. A ce jour, les études menées nécessitent la genèse de transformant le plus souvent en systèmes hétérologues. L'étude en vidéo-confocale sur culture cellulaire de vigne serait une approche différente mais également intéressante.

L'étude de la voie de biosynthèse des tannins pourrait être complétée par la localisation des acteurs situés en amont de la LAR et l'ANR, comme la dihydroflavanol réductase ou la leucoanthocyanidine dioxygénase. Ces informations confirmeraient ou infirmeraient la présence de complexes multienzymatiques à proximité des sites d'accumulation des tannins et particulièrement dans les parois.

Pour finir, il serait intéressant d'étudier les tannins pelliculaires des raisins de cépage blanc comme nous l'avons fait sur le Cabernet-sauvignon. Les différences observées complèteraient les connaissances actuelles sur leur biosynthèse, leur localisation et leur extractibilité.



## Références bibliographiques

- Abrahams S., Tanner G.J., Larkin P.J., Ashton A.R. **2002**. Identification and Biochemical Characterization of Mutants in the Proanthocyanidin Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **130**, 561-576.
- Abbott J.A. **2004**. Fresh quality assessment for fresh fruit and vegetables. In: *Quality of fresh and processed foods*. Ed. Kluweracademic, New York 265p..
- Aharoni A., Keizer L.C.P., Van Den Broeck H.C., Blanco-Portales R., Munoz-Blanco J., Bois G., Smit P., De Vos R.C.H., O'connell A.P. **2002**. Novel insight into vascular, stress and auxin-dependent and independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiology* **129**, 1019-1031.
- Ahmed A.E.R. et Labavitch J.M. **1978**. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry* **1**, 361-365.
- Allan A.C., Hellens R.P., Laing W.A. **2008**. MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Sciences* **13**, 99-102.
- Alleweldt G., Engel M., Gebbing H. **1981**. Histologische untersuchungen an weinbeeren. *Vitis* **20**, 1-7.
- Amrani Joutei K. **1993**. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin. Etude de leur extractibilité. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*. 125 pp.
- Amrani Joutei K., Glories Y. **1994**. Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **28**, 303-317.
- Amrani Joutei K., Glories Y., Mercier M. **1994**. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis* **33**, 133-138.
- Amrani Joutei K., Ouazzani Chahdi F., Bouya D., Saucier C., Glories Y. **2003**. Examen en microscopie électronique de l'influence d'activités enzymatiques purifiées sur les parois cellulaires des pellicules de raisins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **37** (1), 23-30.
- Atanasova V., Fulcrand H., Le Guerneve C., Cheynier V., Moutounet M. **2002**. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron letters* **43**, 6151-6153.
- Bakker J., Timberlake C.F. **1997**. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 35-43.
- Ban T., Ishimura M., Kobayashi S., Shiozaki S., Goto-Yamamoto N., Horiuchi S. **2003**. Absciscic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in "Kyoho" grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**, 586-589

- Barnavon L., Docco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin P. **2000**. Analysis of cell wall neutral sugar composition,  $\beta$ -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant physiology and Biochemistry* **38**, 289-300.
- Barnavon L., Doco T., Terrier N., Ageorges A., Romieu C., Pellerin. **2001**. Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. *Phytochemistry* **58**, 693-701.
- Bate-Smith E.C. **1954**. Astringency in foods. *Food* **23**, 419-429.
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weissar B., Lepiniec L. **2004**. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **39**, 366-380.
- Bautista A.B., Martinez A., Ros J.M., Lopez J.M., Gomez E. **2005**. Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology* **40**, 867-878.
- Bindon K.A., Smith P.A., Kennedy J.A. **2010**. Interaction between grape-derived proanthocyanidins and insoluble cell wall polysaccharides I. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2520-2528.
- Blount J.W., Korth K.L., Masoud S.A., Rasmussen S., Lamb C., Dixon R.A. **2000**. Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **122**, 107-116.
- Blumer J.M., Clay R.P., Bergmann C.W., Albersheim P., Darvill A. **1999**. Characterization of changes in pectin methylesterase expression and pectin esterification during tomato fruit ripening. *Canadian Journal of Botany* **78**, 607-618.
- Bogs J., Downey M.O., Harvey J.S., Ashton A.R., Tanner G.J., Robinson S.P. **2005**. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* **139**, 652-663.
- Bogs J., Jaffé F.W., Takos A.M., Walker A.R., Robinson S.P. **2007**. The grapevine transcription factor VvMYBPA1 regulates proanthocyanidin synthesis during fruit development. *Plant Physiology* **143**, 1347-1361.
- Borie B., Jeandet P., Parize A., Bessis R., Adrian M. **2004**. Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *American Journal of Enology and Viticulture* **55**, 60-64.
- Bosch M., Cheung A.Y., Hepler P.K. **2005**. Pectin Methylesterase, a Regulator of Pollen Tube Growth. *Plant Physiology* **138**, 1334-1346.
- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. **1996a**. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology* **111**, 1059-1066.

- Boss P.K., Davies C., Robinson S.P. **1996b**. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* **32**, 565-569.
- Braidot E., Zancani M., Petrussa E., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Macrì F., Vianello A. **2008**. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling and Behavior* **3** (9), 626-632.
- Breslin P.A.S., Gilmore M.M., Beauchamp G.K., Green B.G. **1993**. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* **18** (4), 405-417.
- Broquedis M. **1987**. Utilisation de la dialyse et de la chromatographie ultra-rapide pour le dosage de l'acide abscissique : Application à la Vigne. *Vitis* **26**, 19-26.
- Brummell, D.A., Dal Cin V., Crisosto C.H. and Labavitch J.M. **2004**. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* **55**(405), 2029-2039.
- Brummell D.A., Harpster M.H. **2001**. Cell wall metabolism in fruit softening and quality its manipulation in transgenic plant. *Plant Molecular Biology* **47**, 311-340.
- Buescher R.W. and Hobson G.E. **1981**. Role of calcium and chelation agents in regulating the degradation of tomato fruit tissue by polygalacturonase. *Journal of Food Biochemistry* **6**, 147-160.
- Cabanne C. and Donèche B. **2001**. Changes in polygalacturonase activity and calcium content during ripening of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 331-335.
- Cacace J.E., Mazza G. **2003**. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* **59**, 379-389.
- Calderón A.A., Pedrenó M.A., Muñoz R., Ros Barceló A. **1993**. Evidence for the non-vacuolar localization of anthocyanoplasts (anthocyanin-containing vesicles) in suspension cultured grapevine cells. *Phyton* **54**, 91-98.
- Camps C., Guillermin P., Mauget J.C., Bertrand D. **2005**. Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits. *Journal of Texture Studies* **36**, 387-401.
- Carpin S., Crevecoeur M., De Meyer M., Simon P., Greppin H., Penel C. **2001**. Identification of a Ca<sup>2+</sup>-pectate binding site on an apoplastic peroxidase. *Plant Cell* **13**, 511-520.
- Carpita N.G., and Gibeault D.M. **1993**. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* **3**, 1-30.
- Carrington C.M., Greve L.C. and Labavitch J.M. **1993**. Cell wall metabolism in ripening fruit. Effect of the antisense polygalacturonase gene on cell wall changes accompanying ripening in transgenic tomatoes. *Plant Physiology* **103**, 429-434.
- Chardonnet C. **1994**. Le calcium de la baie de raisin. Relation entre la cohésion des parois cellulaires et la sensibilité à *Botrytis cinerea*. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*, 239p..

- Chira K. **2009**. Structures moléculaires et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-sauvignon, Merlot) du Bordelais. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*, 228p..
- Chira K., Suh J., Saucier C., Teissedre P.L. **2008**. Les polyphénols du raisin. *Phytotherapie* **6** (2), 75-82.
- Chen J.Y., Wen P.F., Kong W.F., Pan Q.H., Wan S.B., Huang W.D. **2006**. Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology* **163**, 115-127.
- Christensen T.M.I.E., Nielsen J.E., Kreiberg J.D., Rasmussen P., Mikkelsen J.D. **1998**. Pectin methyl esterase from orange fruit: characterization and localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Planta* **206** (4), 493-503.
- Chervin C., El-Kereamy A., Roustan J.P., Latché A., Lamon J. and Bouzayen M. **2004**. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science* **167** (6), 1301-1305
- Chun J.P., Huber D.J. **1998**. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. *Plant Physiology* **117** (4), 1293-1299.
- Considine J.A. and 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.
- Considine J.A. and Knox R.B. **1981**. Tissue origins, cell lineages and patterns of cell division in the developing dermal system of the fruit of *Vitis vinifera* L. *Planta* **151**, 403-412.
- Constantini V., Bellincontro A., De Santis D., Botondi R., Mencarelli F. **2006**. Metabolic changes of Malvasia grapes for wine production during postharvest drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 3334-3340.
- Coombe B.G. **1962**. The effects of removing leaves, flowers and shoot tips on fruit set in *V. vinifera* L. *Journal of Horticultural Science* **37**, 1-15.
- Coombe B.G., Hale C.R. **1973**. The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* **51**, 629-634.
- Coombe, B.G. **1987**. Distribution of solutes within the developing grape berry in relation to its morphology. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 127-127.
- Conn S., Zhang W., Franco C. **2003**. Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L. (grapevine) suspension cultured grapevine cells. *Biological Letters* **25**, 835-839.
- Cosgrove D.J. **2005**. Growth of the plant cell wall. *Nature* **6** (11), 850-861.
- Dal Degan F., Child R., Svendsen I., Ulvskov P. **2001**. The cleavable N-terminal domain of plant endopolygalacturonases from clade B may be involved in regulated secretion mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35297-35304.
- Darné G. **1991**. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de Vigne. *Thèse de Doctorat d'Etat. Université Bordeaux I*. 206 pp.

- Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P. **1978**. Structure of plant cell walls-VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology* **62**, 418-422.
- daSilva L.L.P., Foresti O., Denecke J. **2006**. Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *Plant Cell* **10**, 1477-1497.
- De Freitas V.A.P., Carvalho E., Mateus N. **2003**. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* **81**, 503-509.
- De La Hera Orts M.L., Martinez-Cutillas A., Lopez-Lorca J.M., Perez-Prieto L.J., Gomez-Plaza E. **2005**. Effect of deficit irrigation on anthocyanin content of Monastrell grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **39**, 47-55.
- Delgado R., Martin P., Del Alamo M., Gonzalez M.R. **2004**. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**, 623-630.
- Deluc L., Barrieu F., Marchive C., Lauvergeat V., Decendit A., Richard T., Carde J.P., Merillon J.M., Hamdi S. **2006**. Characterization of a grapevine R2R3-myb transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **140**, 499-511.
- Deluc L., Bogs J., Walker A.R., Ferrier T., Decendit A., Merillon J.M., Robinson S.P., Barrieu F. **2008**. The transcription factor VvMYB5b contributes to the regulation of anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in developing grape berries. *Plant Physiology* **147**, 2041-2053.
- Detrimont et Klein. **2001**. <http://www.creaweb.fr/bv/cellule.html>.
- Devaux M.F., Barakat A., Robert P., Bouchet B., Guillon F., Navez B., Lahaye M. **2005**. Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology* **37**, 209-221.
- Devic M., Guillemot J., Debeaujon I., Bechtold N., Bensaude E., Koornneef M., Pelletier G., Delseny M. **1999**. The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant Journal* **19**, 387-398.
- Deytieux C. **2005**. La maturation du raisin : Etude de la relation entre l'équilibre hormonal et les facteurs impliqués dans l'évolution des parois cellulaires de la pellicule. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*. 224 pp.
- Deytieux-Belleau C., GénY L., Roudet J., Mayet V., Doneche B., Fermaud M. **2009**. Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **125** (4), 551-563.
- Deytieux-Belleau C., Vaillet A., Doneche B. and Geny L. **2008**. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiology and Biochemistry* **46** (7), 638-646.
- Dixon R.A. **2005**. Engineering plant natural product pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 329-336.
- Downey M.O., Harvey J.S., Robinson S.P. **2003**. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **9** (1), 15-27.

- Dunand C., Tognolli M., Overney S., von Tobel L., De Meyer M., Simon P., Penel C. **2002**. Identification and characterisation of Ca<sup>2+</sup>-pectate binding peroxidases in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1165-1171
- Eichhorn K.W., Lorenz D.H. **1977**. Phänologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrbl. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* **29**, 119-120.
- Esteban M.A., Villanueva M.J., Lissarrague J.R. **2001**. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 409-420.
- Ferro M., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Court M., Moyet L., Ramus C., Miras S., Mellal M., Le Gall S., Kieffer-Jaquinod S., Bruley C., Garin J., Joyard J., Masselon C., Rolland N. **2010**. AT\_CHLORO: A comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Molecular and Cellular Proteomics* **9** (1), 1063-1084.
- Fernandez K., Kennedy J.A., Agosin E. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 3675-3680.
- Feucht W., Treutter D., Polster J. **2004**. Flavanol binding of nuclei from tree species. *Physiology and Biochemistry* **22**, 430-436.
- Ficarra R., Tommasini S., Raneri D., Calabro M.L., Di Bella M.R., Rustichelli C., Gamberini M.C., Ficarra P. **2002**. Study of flavonoids/B-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FTIR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **29**, 1005-1014.
- Fischer R.B., Bennett A.B. **1991**. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* **42**, 675-703.
- Fougère-Rifot M., Cholet C., Bouard J. **1996**. Evolution des parois des cellules de l'hypoderme de la baie de raisin lors de leur transformation en cellules de pulpe. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **30** (2), 47-51.
- Fougère-Rifot, Park H.S, Bouard J, **1997** : Ontogenèse du péricarpe de la baie de *Vitis vinifera* var. merlot de la fécondation à la maturité. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **31**(3), 109-118
- Fry S. **1995**. Polysaccharides-modifying enzymes in the plant cell. *Annual Review of Plant Physiology* **46**, 497-520.
- Fujita A., Soma N., Goto-Yamamoto N., Mizuno A., Kiso K., Hashizume K. **2007**. Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **76**, 112-119.
- Fujita A., Soma N., Goto-Yamamoto N., Shindo H., Kakuta T., Koizumi T., Hashizume K. **2005**. Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of Flavan-3-ols in Grape Berry. *American Journal of Enology and Viticulture* **56**, 336-342

- Gagné S. **2007**. Implication de l'équilibre hormonal dans les mécanismes de maturation phénolique du raisin : étude du rôle de l'acide abscissique sur la composition et la biosynthèse des tannins de la pellicule. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*, 214p.
- Gagne S., Lacampagne S., Claisse O., GénY L. **2009**. Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase gene expression and activity in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-sauvignon during development. *Plant Physiology and Biochemistry* **47** (4), 282-290.
- Gagné S., Saucier C., GénY L. **2006a**. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet-sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 9465-9471.
- Gagné S., Estève K., Deytieux C., Saucier C., GénY L. **2006b**. Influence of abscisic acid in triggering "véraison" in grape berry skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **40**, 7-14.
- GénY L. **1997**. Les polyamines libres et conjuguées dans le modèle "Boutures fructifères" de Vigne. Influence de l'azote et du potassium et des inhibiteurs de la biosynthèse des polyamines. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux I*. 209 pp..
- GénY L., Broquedis M., Martin-Tanguy J., Bouard J. **1997**. Free, conjugated and wall bound polyamines on various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **48** (1), 80-84.
- GénY L., Saucier C., Bracco S., Daviaud F., Glories Y. 2003. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 8051-8054.
- Glories Y. **1978**. Recherche sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse de Doctorat. Université Bordeaux II*. 195 pp..
- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Llyod A.M. **2008**. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in Arabidopsis seedlings. *Plant Journal* **53**, 814-827.
- Goulao L.O., Oliveira C.M. **2008**. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology* **19**, 4-25.
- Gross K.C. et Sams C.E. **1984**. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* **23**, 2457-2461.
- Gross K.C., Wallner S.J. **1979**. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiology* **63**, 117-120
- Grotte M., Cadot Y., Poussier A., Loonis D., Pietri E., Duprat F., Barbeau G. **2001**. Détermination du degré de maturité des baies de raisin par des mesures physiques : aspects méthodologiques. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **35**, 87-98.
- Goodman C.D., Casati P., Walbot V. **2004**. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* **16**, 1812-1826.
- Guillemin A., Guillon F., Degraeve P., Rondeau C., Devaux M.F., Huber F., Badel E., Saurel R., Lahaye M. **2008**. Firming of fruit tissues by vacuum-infusion of pectin methylesterase: visualisation of enzyme action. *Food Chemistry* **109** (2), 368-378.

- Guymon J.F., Ough C.S. **1962**. A uniform method for total acid determination in wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **13**, 40-45.
- Guyot C., Dupraz P. **2004**. Déguster les baies pour suivre la maturité du raisin. *Revue suisse Viticole Arboricole Horticole* **36** (4), 231-234.
- Hafield K.A., Rose J.K.C., Yaver D.S., Brka R.M., Bennett A.B. **1998**. Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiology* **117**, 363-373.
- Hagerman A.E. **1992**. Tannin-protein interactions. In *Phenolic compounds in food and their effects on health I. Analysis, occurrence and chemistry*, Ho C.T., Lee C.Y., Huang M.T., Eds. American Chemical Society: Washington.
- Hamm G. 2010. Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques. *Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine Metz*.
- Hamm G., Carre V., Poutaraud A., Maunit B., Frache G., Merdinoglu D., Muller J.F. **2010**. Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communication Mass Spectrometry* **24** (3), 335-42.
- Han D.H., Lee S.M., Lee C.H., Kim S.B. **1996**. Effects of ABA and etephon treatments on coloration and fruit quality in Kyoho grape. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science* **37**, 416-420.
- Haslam E. **1980**. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **19**, 2577-2582.
- Hardie W.W., O'Brian T.P., Jaudzems V.G. **1996**. Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2**, 97-142.
- Hertog M.L.A.T.M., Ben-Arie R., Nicolai E. **2004**. Humidity and temperature effects on invasive and non-invasive measures. *Postharvest Biology and Technology* **33**, 79-91.
- Hichri I., Heppler S.C., Pillet J., Léon C., Czemmél S., Delrot S., Lauvergeat V., Bogs J. **2010**. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine. *Molecular Plant* **3** (3), 509-523.
- Hiratsuka S., Onodera H., Kawai Y., Kubo T., Itoh H., Wada R. **2001a**. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **90**, 121-130.
- Holoway P.J., Baker E.A. **1970**. The cuticles of some angiosperm leaves and fruits. *Annals of Applied Biology* **66**, 145-154.
- Huang X.M., Huang H.B., Wang H.C. **2005**. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae* **104**, 249-263.
- Huber D.J. **1984**. Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* **49**, 1310-1315.



- Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T.P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G., Schnitzler J.P. **1998**. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49** (323), 953-965.
- Ibrahim R.K. **1992**. Immunolocalization of flavonoid conjugates and their enzymes. In: *Stafford HA, Ibrahim RK, eds. Phenolic metabolism in plants*. New York; Plenum Press, 25-61.
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. **2002**. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2731-2741.
- Jeong S.T., Goto-Yamamoto O.N., Kobayashi S., Esaka M. **2004**. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* **167**, 247-252.
- Jiang Y., Joyce D.C. **2003**. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulators* **39**, 171-174.
- Jona R., Botta R. **1998**. Fruit set and early berry development in two grapevine cultivars. *Israel Journal of Botany* **37**, 203-216.
- Jørgensen K., Rasmussen A.V., Morant M., Nielsen A.H., Bjørnholt N., Zagrobelny M., Bak S., Møller B.L. **2005**. Metabolite formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Current Opinion Plant Biol* **8**, 280-291.
- Kallithraka S., Bakker J., Clifford M.N. **1997**. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* **12** (1), 25-37.
- Kataoka I., Sugiura A., Utsunomiya N., Tomata T. **1982**. Effect of abscisic acid and defoliation on anthocyanin accumulation in Kyoho grapes (*Vitis vinifera* L. x *V. labruscana* Bailey). *Vitis* **21**, 325-332.
- Kaul S. **2000**. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Kennedy J.A., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E.J., Jones G.P. **2001**. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5348-5355.
- Kennedy J.A., Hayasaka Y., Vidal S., Waters E.J., Jones G.P. **2001**. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5348-5355.
- Kim S.K., Kim J.T., Jeon S.H., Nam Y.S., Kim S.H. **1998**. Effects of ethephon and ABA application on coloration, content, and composition of anthocyanin in grapes. *Journal of the Korean Society of Horticultural science* **39**, 547-554.
- Kitamura S., Shikanozo N., Tanaka A. **2004**. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **37**, 104-114.

- Kliewer W.M. **1970**. Effect of time and severity of defoliation on growth and composition of "Thompson Seedless" grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **21**, 37-47.
- Knox J.P., Linstead P.J., King J., Cooper C., Roberts K. **1990**. Pectin esterification is spatially regulated both within cell walls and between developing tissues of root apices. *Planta* **181**, 512-521.
- Kobayashi S., Ishimaru M., Hiraoka K., Honda C. **2002**. *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924-933.
- Koundouras S., Marinos V., Gkoulioti A., Kotseridis Y., Van Leeuwen C. **2007**. Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5077-5086.
- Lacampagne S., Gagné S., GénY L. **2010**. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition, as well as leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **29** (4), 81.
- Lacampagne S., Gagné S., Deytieux-Belleaux C., L'Hyvernay A., Donèche B., GénY L. **2008**. Possible relationship between pectolytic enzyme activities and tannin polymerisation in grape skin during ripening process. *Wine And Compounds, Beaune, France, mars 2008*.
- Lea A.G.H., Arnold G.M. **1978**. The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**, 478-483.
- Le Bourvellec C., Guyot S., Renard C. **2004**. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part I: Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1672**, 192-202.
- Le Bourvellec C., Renard C. **2005a**. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et Biophysica Acta* **1725**, 1-9.
- Le Bourvellec C., Bouchet B., Renard C. **2005b**. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1725**, 10-18.
- Le Moigne M., Maury C., Bertrand D., Jourjon F. **2007**. Sensory and instrumental characterization of Cabernet franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference* **19**, 220-331.
- Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J.M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M. **2006**. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 405-430.
- Li Y.G., Tanner G., Larkin P. 1994. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**, 89-101.
- Liners, F., Van Cutsem, P. **1992**. Distribution of pectic polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells: an immunocytochemical study. *Protoplasma* **170**, 10-21

- Liners F., Gaspar T., Van Cutsem P. **1994**. Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* **192** (4), 545-556.
- Lipka V., Kwon C., Panstruga R. **2007**. SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 147–174.
- Loake G.J., Faktor O., Lamb C.J., Dixon R.A. **1991**. Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89** (19), 9230–9234.
- Mahalingam R., Wang G., Knap H.T. **1999**. Polygalacturonase and polalacturonase inhibitor protein: gene isolation and transcription in Glycine max-Heterodera glycines interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** (6), 490-498.
- Markham K.R., Gould K.S., Winefield C.S., Mitchella K.A., Bloora S.J., Boasec M.R. **2000**. Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower coloration. *Phytochemistry* **55**, 327-336.
- Marles M.A.S., Ray H., Gruber M.Y. **2003**. New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367-383.
- Matsushima J., Hiratsuka S., Taniguchi N., Wada R., Suzaki N. **1989**. Anthocyanin accumulation and sugar content in the skin of grape cultivar 'Olympia' treated with ABA. *Journal of the Japanese Society for the Horticultural Science* **58**, 551-555.
- McCann M.C., Wells B., Roberts K. **1990**. Direct visualization of cross-links in the primary wall. *Journal of Cell Science* **96**, 323-334.
- McCarthy M.G. **1999**. Weight loss from ripening berries of shiraz grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **5**, 10-16.
- Mehinagic E., Royer G., Bertrand D., Symoneaux R., Laurens F., Jourjon F. **2003**. Relationship between sensory analysis, penetrometry and visible NIR spectroscopy of apples belonging to different cultivars. *Food Quality and Preference* **14**, 473-484.
- Mehinagic E., Royer G., Symoneaux R., Bertrand D., Jourjon F. **2004**. Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements. *Postharvest Biology and Technology*. **34**, 257-269.
- Meyer A.S., Jepsen S.M., Sorensen N.S. **1998**. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2439-2446.
- Micheli, F. **2001**. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6**, 414-419.
- Micheli F., Holliger C., Goldberg R., Richard L. **1998**. Characterization of the pectin methylesterase-like gene AtPME3: A new member of a gene family comprising at least 12 genes in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **220**, 13-20.
- Mol J., Grotewold E., Koes R. **1998**. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* **3**, 212-217.

- Molendijk A.J., Ruperti B., Palme K. **2004**. Small GTPases in vesicle trafficking. *Current Opinion on Plant Biology* **7**, 694-700.
- Morata A., Gonzalez C., Suarez-Lepe J.A. **2007**. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *International Journal of Food Microbiology* **116**, 144-152.
- Mori K., Goto-Yamamoto N., Kitayama M., Hashizume K. **2007**. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1935-1945.
- Mori K., Sugaya S., Gemma H. **2005**. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* **105**, 319-330.
- Nakashima J., Endo S., Fukuda H. **2004**. Immunocytochemical localization of polygalacturonase during tracheary element differentiation in *Zinnia elegans*. *Planta* **218**, 729-739.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. **2000**. The TT8 locus encodes a bHLH domain protein required for the expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis siliques*. *Plant Cell* **12**, 1863-1878.
- Nielsen J.E., Christensen T.M.I.E. **2002**. Distribution of pectin methyl esterase and acetylesterase in the genus *Citrus* visualized by tissue prints and chromatography. *Plant Science* **162**(5), 799-807.
- Nunan K.J., Sims I.M., Bacic A., Fincher G.B. **1997**. Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta* **203**, 93-100.
- Nunan K.J., Sims I.M., Bacic A., Robinson S.P., Fincher G.B. **1998**. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology* **118** (3), 783-792.
- Nunan K.J., Davies C., Robinson S.P., Fincher G.B. **2001**. Expression of cell wall-modifying enzymes during grape berries development. *Planta* **214**, 257-264.
- Ollat N., Diakou-Verdin P., Carde J.P., Barrieu F., Gaudillère J.P., Moing A. **2002**. Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36** (3), 109-131.
- Ortega-Regules A., Romero-Cascales I., Ros-Garcia J.M., Lopez-Roca J.M., Gomez-Plaza E. **2006**. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractibility. *Analytica Chimica Acta* **563**, 26-32.
- Passamonti S., Vrhovsek U., Vanzo A., Mattivi F. **2003**. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters* **544**, 210-213.
- Peppi M.C., Fidelibus M.W., Dokoozlian N. **2006**. Absciscic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of "Flame seedless" grapes. *Horticultural Science* **42**, 1440-1445.
- Perez-Magarino S., Gonzalez-San Jose M.L. **2006**. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* **96**, 197-208.

- Pfeiffer J., Kühnel C., Brandt J., Duy D., P.A. Punyasiri N., Forkmann G., Fischer T.C. **2006**. Biosynthesis of flavan 3-ols by leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus x domestica* Borkh.) and other crops. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**, 323-334.
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S. **2006**. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* **17**, 579-590.
- Pirie A., Mullins M.G. **1976**. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiology* **58**, 468-472.
- Poutska F., Irani N.G., Feller A., Lu Y., Pourcel L., Frame K., Grotewold E. **2007**. A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein sorting route in Arabidopsis and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiology* **145**, 1323-1335.
- Prado F., Salinas M.R., Alonso G.L., Navarro G., Huerta M.D. **1999**. Effect of diverse enzyme preparations on the extraction and evolution of phenolic compounds in red wines. *Food Chemistry* **67**, 135-142.
- Punyasiri P.A.N., Abeysinghe I.S.B., Kumar V., Treutter D., Duy D., Gosch C., Martens S., Forkmann G., Fischer T.C. **2004**. Flavonoid biosynthesis in the tea plant *Camellia sinensis*: Properties of enzymes of the prominent epicatechin and catechin pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **431**, 22-30.
- Rajei 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. *Canadian Journal of Botany* **65**, 1343-1355.
- Ramsay N.A., Glover B.J. **2005**. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science* **10**, 63-70.
- Rayle D.L., Cleland R.E. **1992**. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* **99** (4), 1271-1274.
- Redgwell R.J., Fisher M., Kendal E., MacRea E.A. **1997**. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* **203**, 174-181.
- Rees D.A. **1982**. Polysaccharide conformation in solution and gels. Recent results on pectins. *Carbohydrates polymers* **2**, 254-263.
- Renard C.M., Baron A., Guyot S. and Drilleau J. **2001**. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules* **29**, 115-125.
- Revilla E., Ryan J.M., Martin-Ortega G. **1998**. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4592-4597.

- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. **1998**. Les composés phénoliques. In '*Chimie du vin - Stabilisation et traitements. Traité d'Oenologie*. Tome II.' (Ed. Dunod) pp. 163-237; Paris).
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y. **1980**. Structure of condensed phenolic compounds in vinifera grapes and wine. Influence of ripening and infection by *Botrytis cinerea* on phenolic content. *C.R. Colloque Centenaire, Davies* 228-234.
- Ribéreau-Gayon P., Stonestreet E. **1965**. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletins de la Société de Chimie* **9**, 2649-2652.
- Ricardo Da Silva J.M., Cheynier V., Souquet J.M., Moutonet M., Cabanis J.C., Bourzeix M. **1991**. Interaction of grape seed procyanidins with various protéins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **57**, 111-125.
- Richards L., QinbL.X., Goldberg R. **1996**. Clustered genes within the genome of *Arabidopsis thaliana* encoding pectin methylesterase-like enzymes. *Gene* **170**, 207-211.
- Ridley B.L., Malcolm A.O.N., Mohnen D. **2001**. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Riou V., Vernhet A., Doco T., Moutounet M. **2002**. Aggregation of grape seed tannins in model wine - effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **16**, 17-23.
- Roberts A.W., Lucas W.J. **1990**. Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology* **41**, 369-419.
- Robertson G.L., Eschenbruch R., Cresswell K.J. **1979**. Seasonal changes in the pectic substances of grapes and their implication on juice extraction. *American Journal of Enology and Viticulture* **31**, 162-164.
- Robertson D., Monaghan P., Clarke C., Atherton A.J. **1992**. An appraisal of low-temperature embedding by progressive lowering of temperature into Lowicryl HM20 for immunocytochemical studies. *Journal of Microscopy* **168** (1), 85-100.
- Roby G., Habertson J.F., Adams D.A., Matthews M.A. **2004**. Berry size and wine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **10**, 100-107.
- Rosli H.G., Civello P.M., Martinez G.A. **2004**. Changes in cell wall composition of three *Fragaria*×*ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 823-831.
- Ross G.S., Redgwell R.J., MacRae E.A. **1993**. Kiwifruit  $\beta$ -galactosidase: isolation and activity against specific fruit cell-wall polysaccharide. *Planta* **189**, 499-506.
- Rossi J.A.Jr., Singleton V.L. 1966. Flavor effects and absorptive properties of purified fractions of grape-seed phenols. *American Journal of Enology and Viticulture* **17** (4), 240-246.
- Rousseau J., Delteil D. **2000**. Présentation d'une méthode d'analyse sensorielle des raisins : principe, méthode et grille d'interprétation. *Revue Française d'œnologie* **183**, 10-13.

- Sanchez-Fernandez R. **2001**. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30231-30244.
- Saravanan R.S., Rose J.K.C. **2004**. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4**, 2522-2532.
- Sarni-Manchado P., Deleris A., Avallone S., Cheynier V., Moutounet M. **1999**. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* **50** (1), 81-86.
- Saslowsky D.E., Warek U., Winkel B.S. **2005**. Nuclear localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 23735-23740.
- Saulnier L., Brillouet J.M., Joseleau J.P. **1987**. Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydrates research* **182**, 63-78.
- Sharma R., Sarma A.D. **1999**. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* **52**, 1313-1318.
- Showalter A.M. **1993**. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5**, 9-23.
- Smith A.T. **2003**. *Arabidopsis* *ATGSTF2* is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant Journal* **36**, 433-442.
- Staehelin L.A., Moore I. **1995**. The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 261-288.
- Staudt G., Schneider W., Leidel J. **1986**. Phases of berry growth in *Vitis vinifera*. *Annals of Botany* **58**, 789-900.
- Su C.T., Singleton V.L. **1969**. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* **8**, 1553-1558.
- Sudo E., Teranishi M., Hidema, Taniuchi T. **2009**. Visualization of flavanols distribution in the abaxial epidermis of onion scales via detection of its autofluorescence in the absence of chemical processes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **73** (9), 2107-2109.
- Tanner G.J., Francki K.T., Abrahams S., Watson J.M., Larkin P.J., Ashton A.R. **2003**. Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31647-31656.
- Tian L., Wan S.B., Pan Q.H., Zheng Y.J., Huang W.D. **2008**. A novel plastid localization of chalcone synthase in developing grape berry. *Plant Science* **175**, 431-436.
- Tong C.B.S., Gross K.C. **1988**. Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Physiologia Plantarum* **74** (2), 365-370.
- Thorngate J.H., Noble A.C. **1995**. Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R (-)-epicatechin and 3S (+)-catechine. *Journal of food and Agriculture* **67** (4), 531-535.
- Verherbruggen Y., Marcus S.E., Haeger A., Ordaz-Ortiz J.J., Knox J.P. **2009**. An extended set of monoclonal antibodies to pectic homogalacturonan. *Carbohydrate research* **344** (14), 1858-62.

- Vian B., Roland J.C. **1991**. Primary cell wall expansion and its relation to surface expansion. *International Journal of Plant Science* **154**, 1-9.
- Vicenzi S., Curioni A. **2005**. Anomalous electrophoretic behavior of a chitinase isoform from grape berries and wine in glycol chitin-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Electrophoresis* **26**, 60-63.
- Vidal S., Williams P., O'Neill M.A., Pellerin P. **2000**. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **45**, 315-323.
- Vidal S., Courcoux P., Francis L., Kwiatkowski M., Gawel R., Williams P., Waters E., Cheynier V. **2004**. Use an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference* **15**, 209-217.
- Vincken J.P., Schols H.A., Oomen R.J., McCann M.C., Ulvskov P., Voragen A.G., Visser R.G. **2003**. If homogalacturonan were aside chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132**, 1781-1789.
- Vivas de Gaulejac N., Vivas N., Absalon C., Nonier M.F. **2001**. Identification of procyanidin A2 in grape and wine of *Vitis vinifera* L. cv. Merlot noir and Cabernet sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **35**, 51-56.
- Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. **2004**. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* **9** (4), 203-209.
- Wang Z.Y., Mac Rea E.A., Wright M.A., Bolitho K.M., Ross G.S., Atkinson R.G. **2000**. Polygalacturonase gene expression in kiwi fruit, relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Molecular Biology* **42** (2), 317-328.
- Waterhouse A.L., Lamuela-Raventos R.M. **1994**. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* **37**, 571-573.
- Weidner S., Amarowicz R., Karama M., Frczek E. **2000**. Changes in endogenous phenolic acids during development of *Secale cereale* caryopses and after dehydration treatment of unripe rye grains. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 595-602.
- Weidner S., Paprocka J. **1996**. Phenolic acids and dormancy in oat (*Avena sativa* L.) and rye (*Secale cereale* L.) caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum* **18**, 277-286.
- Weidner S., Paprocka J., Lukaszewicz D. **1996**. Changes in free, esterified and glycosidic phenolic acids in cereal grains during the after-ripening. *Seed Science and Technology* **24**, 107-114.
- Western T. L. **2006**. Changing Spaces: The Arabidopsis mucilage secretory cells as a novel system to dissect cell wall production in differentiating cells. *Canadian Journal of Botany* **84**, 622-630.
- Willats W.G.T., Limberg G., Buchholt H.C., van Alebeek G.J., Benen J., Christensen T.M., Visser J., Voragen A., Mikkelsen J.D., Knox J.P. **2000**. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Research* **327**, 309-320



- Willats W.G.T., Orfila C., Limberg G., Buchholt H.C., Van Alebeek G.-J.W.M., Voragen A.G.J., Marcus S.E., Christensen T.M.I.E., Mikkelsen J.D., Murray B.S. and Knox P.J. **2001**. Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 19404–19413.
- Winkel B.S.J. **2004**. Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 85-107.
- Winkel-Shirley B. **2001**. It takes a garden: how work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism. *Plant Physiology* **127**, 1399-1404.
- Wolf S., Mouille G., Pelloux J. **2009**. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant* doi: 10.1093/mp/ssp066.
- Xie D.Y., Sharma S.B., Dixon R.A. **2004**. Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**, 91-102.
- Xie D.Y., Sharma S.B., Paiva N.L., Ferreira D., Dixon R.A. **2003**. Role of anthocyanidin reductase, encoded by *banyuls* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**, 396-399.
- Xie D.Y., Dixon R.A., Sharma S.B. **2005**. Proanthocyanidins a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **165** (1), 9-28.
- Zhang H., Wang L., Derolles S., Bennett R., Davies K. **2006**. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* **6**, 29-43.
- Yadav D.N., Patki P.E., Srihari S.P., Sharma G.K., Bawa A.S. **2009**. Studies on polyphenol oxidase activity of heat stabilized whole wheat flour and its chapatti making quality. *International Journal of Food Properties* **13** (1), 142-154.
- Yokotsuka K., Singleton V.L. **1995**. Interactive precipitation between phenolic fractions and peptides in wine-like model solutions: turbidity, particule size, and residual content as influenced by pH, temperature and peptide concentration. *American Journal of Enology and Viticulture* **46** (3), 329-338.
- Zeiger E., Hepler P.K. **1979**. Blue light-induced, intrinsic vacuolar fluorescence in onion guard cells. *Journal of Cell Science* **37**, 1-10.
- Zeevaert J.A.D.T., Creelman R.A. **1988**. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology* **39**, 439-473.
- Zhao J., Dixon R.A. **2009**. The ‘in’ and ‘outs’ of flavonoid transport. *Trends in Plant Science* **15** (2), 72-80.
- Zude M., Herold B., Roger J.M., Bellon-Maurel V., Landahl S. **2005**. Non-destructive tests on the prediction of apple fruit flesh firmness and soluble solids content on tree and in shelf life. *Journal of Food Engineering* **77** (2), 254-260.

## Publications et communications scientifiques

### Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture:

- **S. Lacampagne**, A. Vallet, E. Gontier and L. GénY Cellular localization of tannins and subcellular localization of two enzymes of tannins pathway : Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in grape skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-sauvignon. (en préparation).
- C. Cholet, **S. Lacampagne**, E. Gontier, C. Deytieux-Belleaux, B. Donèche and L. GénY (2010). Involvement of pectin methyl esterase distribution in ultrastructural changes in grape skin during berry development. American Journal of Enology and Viticulture (soumis).
- **S. Lacampagne**, S. Gagné and L. GénY (2009). Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition, as well as leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. Journal of Plant Growth Regulation, 29 (4), 81.
- S. Gagné, **S. Lacampagne**, O. Claisse and L. GénY (2009). Leucoanthocyanidin reductase and Anthocyanidin reductase gene expression and activity in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-sauvignon during development. Plant Physiology and Biochemistry, 47 (4), 282-290

### Communications orales lors de congrès internationaux :

- **S. Lacampagne**, A. Vallet, E. Gontier and L. GénY (2010). Cellular localization of Leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in grape skins of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet-sauvignon during development. Macrowine, Turin, Italie, Juin 2010.

- **S. Lacampagne**, C. Lambert, C. Deytieux-Belleaux, A. L'Hyvernay, B. Donèche and L. GénY (2009). Expression, activity and cellular localization of Pectin MethylEsterase in grape berry skin during ripening. 6th International Postharvest Symposium, Antalya, Turquie, Avril 2009.

- S. Gagné, **S. Lacampagne** and L. Geny (2008). Tannin biosynthesis and accumulation in flowers, young berries and skins of *Vitis vinifera* L. during growth – Comparison between red and white cultivars (Cabernet sauvignon and Semillon). Macrowine, Montpellier, France, Juin 2008.

#### **Communications écrites lors de congrès internationaux :**

- **S. Lacampagne**, A. L'Hyvernay, B. Donèche and L. GénY (2008). Possible method to evaluate grape skin texture in relation with ripening process. 8th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Adelaïde, Australie, décembre 2008.

- **S. Lacampagne**, S. Gagné and L. GénY (2008). Involvement of ABA in the control of tannin biosynthesis in skin berry: new elements regarding the regulation of leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. 8th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Adelaïde, Australie, décembre 2008.

- C. Deytieux-Belleau, **S. Lacampagne**, A. L'Hyvernay, B. Donèche and L. GénY (2008). Possible links between cell-wall polysaccharides and tannins in ripening grape skin. 8th International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Adelaïde, Australie, décembre 2008.

- **S. Lacampagne**, S. Gagné, C. Deytieux-Belleaux, A. L'Hyvernay, B. Donèche and L. GénY (2008). Possible relationship between pectolytic enzyme activities and tannin polymerisation in grape skin during ripening process. Wine And Compounds, Beaune, France, mars 2007.

**Communications orales lors de congrès nationaux :**

- **S. Lacampagne** (2010). Mise en évidence de tannins dans les parois cellulaires de la pellicule du raisin par une double approche : biochimique et microscopique. Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale, Sciences de la Vie et de la Santé, Bordeaux 1 et 2. Arcachon, Avril 2010.

**Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux.**

La maturation de la pellicule du raisin est un phénomène complexe, caractérisé par de nombreux changements structuraux importants et par l'accumulation de composés œnologiques tels que les tannins. Malgré leurs propriétés biologiques et organoleptiques essentielles pour la qualité des fruits et des vins, peu de travaux concernent l'organisation et la localisation de ces composés au sein du tissu pelliculaire. Dans la pellicule, les tannins peuvent être plus ou moins liés aux constituants cellulaires modulant ainsi leur extractibilité lors des processus de vinification.

Notre travail, basé sur des approches biochimiques, moléculaires et microscopiques, apporte des données nouvelles sur la biosynthèse, la localisation et l'organisation des tannins dans la pellicule. Au sein de ce tissu, nous avons souligné l'importance des tannins pariétaux et montré que leurs caractéristiques physico-chimiques dépendaient entre autre des changements structuraux des parois. Ainsi, cette organisation caractérise en partie la texture de la pellicule et conditionne la qualité du fruit. Pour appréhender l'évolution des critères de texture de la pellicule au cours de la maturation du raisin, l'analyse sensorielle des baies et la mesure par pénétrométrie s'avèrent être des outils pertinents.

**Mots clés :** pellicule du raisin, tannins, biosynthèse, localisation, paroi cellulaire, texture, analyse sensorielle, pénétrométrie.

**Localization and characterization of grape skin tannins: impact of cell wall physicochemical organization on tannin component, fruit quality and typicality of the Bordeaux grapes.**

Skin grape maturation is a complex phenomenon, characterized by an important number of structural changes as well as by phenolic compounds accumulation (i.e. tannins). Despite their biological and organoleptic properties in fruit and wine quality, few studies report both tannins organization and localization in skin tissue. In skins, tannins may be more or less related with cellular components, modulating their extractability during winemaking process.

Our work, based on biochemical, molecular and microscopic approaches reveals new data on skin tannins biosynthesis, localization and organization. Within this tissue, we highlighted the parietal tannins importance, we evidenced that their physicochemical characteristics depend among other structural changes on cell walls. Thus, this organization partially characterized the skin texture and affects fruit quality. To understand the evolution criteria for skin texture during grape berry ripening, sensory analysis and measurements by penetrometer proved to be relevant tools.

**Keywords:** grape skin, tannins, biosynthesis, localization, cell wall, texture, sensory analysis, penetrometer.