

ÉVOLUTION DE DIVERSES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES AU COURS DU MÉTABOLISME ANAÉROBIE DE LA BAIE DE RAISIN

C.G. ROMIEU, F.X. SAUVAGE, J.P. ROBIN et C. FLANZY

INRA, Institut des Produits de la Vigne,
Laboratoire de Biochimie Métabolique et Technologie,
2, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1 (France)

Résumé : *Les modifications de diverses activités enzymatiques ainsi que la viabilité des mitochondries de raisins correspondant à différentes vendanges successives ont été suivies en fonction de la durée d'une anaérobiose carbonique. Malgré une grande variabilité des réponses selon l'année de vendange considérée, les résultats indiquent qu'il y a une diminution quasi générale tant des activités enzymatiques que de la viabilité mitochondriale, avec cependant une période de stabilisation ou même de regain temporaire d'activité suggérant la mise en place de remaniements cellulaires en réponse au stress provoqué par l'anaérobiose.*

INTRODUCTION

Peu de recherches ont à notre connaissance, été publiées quant à l'effet de l'anaérobiose sur les activités enzymatiques dans la baie de raisin, alors que les voies métaboliques utilisées sont relativement connues (FLANZY, 1978; NICOL *et al.*, 1988; ROMIEU *et al.*, 1988). On peut toutefois citer des travaux réalisés dans le contexte de thèse ou de DEA, comme celui de GARCIA (1975) sur l'évolution de l'activité de l'enzyme malique ou de DAWERITZ (1985) sur celle de l'alcool déshydrogénase. De telles études sont pourtant indispensables pour acquérir une meilleure compréhension des processus biochimiques impliqués dans la macération carbonique. En effet, le suivi de certaines activités enzymatiques comme celle de l'aspartate transcarbamylase, peut indiquer si le métabolisme anaérobie (MA) du raisin est lié ou non à un mécanisme d'adaptation ou d'induction provoqué par le stress hypoxique affligeant les cellules de la baie; de tels cas ont été décrits chez le riz (MOCQUOT *et al.*, 1987) et chez l'orge (RICARD et PRADET, 1989). Il est par ailleurs important de savoir jusqu'à quel degré d'anaérobiose sont conservées les capacités fonctionnelles d'organites cellulaires comme les mitochondries et des enzymes qui y sont associées; enfin, l'évolution de ces activités enzymatiques peut argumenter les hypothèses permettant d'expliquer l'arrêt du métabolisme anaérobie que l'on observe lorsque les baies de raisin sont maintenues par exemple à 32° C sous CO₂, pendant une huitaine de jours (FLANZY, 1978).

L'étude qui est rapportée ici présente les résultats obtenus *in vitro* sur les évolutions en cours d'anaérobiose d'une part, des activités d'enzymes dites solubles telles que enzyme malique (EM, EC 1.1.1.40), malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), aspartase (EC 4.3.1.1), aspartate transcarbamylase (ATC, EC 2.1.3.2) et alcool déshydrogénase (ADH, EC 1.1.1.1), d'autre part des activités d'enzymes marqueurs des mitochondries telles que succinate déshydrogénase (SDH, EC 1.3.99.1), et fumarase (EC 4.2.1.2). L'évolution des couplages respiratoires des mitochondries au cours du traitement anoxique des baies est également étudiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — MATÉRIEL VÉGÉTAL

Trois variétés de raisin ont été utilisées pour cette étude : deux raisins noirs, le Carignan récolté en 1986, 1987, 1988 et 1989 à la Station Expérimentale de l'IPV-INRA à Pech-Rouge, Narbonne, et le Cardinal du commerce, en provenance de l'Hérault (1988), et un raisin blanc, le Sémillon récolté en 1988 sur le domaine du Chapitre, INRA Montpellier.

II — PROTOCOLE D'ANAÉROBIOSE

Les raisins sains fraîchement vendangés sont lavés et échantillonnés suivant le protocole préconisé par FLANZY (1969) ; des lots de 550 g pour le raisin Carignan ou de 660 g pour le raisin blanc sont introduits dans des bocaux et maintenus sous CO₂, à 32° C et à l'obscurité, pendant des durées allant jusqu'à 11 jours. La saturation en CO₂ est contrôlée quotidiennement par chromatographie en phase gazeuse selon CHAMBROY (1981) d'une aliquote de l'atmosphère des bocaux ; lorsque le taux de saturation est inférieur à 99 p. 100 une resaturation des enceintes est réalisée.

III — PRÉPARATION DES EXTRAITS

Enzymes solubles. Chaque lot de raisin Carignan est rapidement broyé, à 4° C, sous bullage d'azote, à l'aide d'un presse-purée, dans 100 ml d'un tampon Tris-HCl 1M, pH 8,5, contenant 20 mM de 2-mercaptoéthanol, 10 mM d'EDTA, 20 p. cent (v/v) de glycérol, 2 p. cent (p/v) de polyvinyl-pyrrolidone (PVP 25, Serva), 20 mM de CaCl₂ et 3 p. cent (p/v) de Triton X-100. Après passage sur toile à bluter (porosité 40 μ) pour éliminer les débris pelliculaires et les pépins, le surnageant obtenu après centrifugation sous 10.000 g pendant 20 min. à 4° C, constitue l'extrait enzymatique.

Enzymes mitochondriales. Le protocole d'extraction des mitochondries de raisin est celui décrit par ROMIEU et FLANZY (1988) : chaque lot de raisin blanc est broyé dans un tampon contenant les agents protecteurs contre les polyphénols ainsi que les adjuvants nécessaires aux maintiens de la neutralité et de l'osmolalité. Un culot de fraction mitochondriale brute est obtenu après potterisation et centrifugation différentielle ; après reprise par un tampon phosphate 10 mM, pH 7,2, contenant 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 0,1 p. cent (p/v) de serum albumine bovine, 0,5 M de mannitol et 0,3 M de saccharose, l'extrait enzymatique servant de base à la mesure des activités mitochondriales est obtenu.

IV — MESURE DES ACTIVITÉS

L'activité de la GOT est mesurée selon le principe de la méthode proposée par KARMEN *et al.*, (1955), consistant à suivre à 340 nm la réaction de transamination par une réaction indicatrice mettant en œuvre la malate déshydrogénase en présence de NADH. Les activités MDH et enzyme malique sont mesurées en suivant à 340 nm respectivement l'oxydation du NADH en présence d'oxaloacétate et la réduction du NADP⁺ en présence de malate et de Mn²⁺ (OCHOA, 1955). L'activité ADH est mesurée selon MOLINA *et al.*, (1986), en suivant la disparition à 340 nm du NADH, au cours de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol. Les activités aspartase et aspartate transcarbamylase sont mesurées par méthode radiochimique dérivant de celle proposée par PORTER *et al.*, (1969).

L'apparition du fumarate due à l'activité fumarase est suivie à 240 nm après solubilisation des mitochondries dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,2, contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 p. cent de Triton X-100, en présence de 50 mM de malate.

Toutes les mesures d'activité sont exprimées en μ mole de substrat consommé ou de produit apparu, par minute et par kg de raisin.

V — MESURE DE QUELQUES CARACTÉRISTIQUES MITOCHONDRIALES

L'intensité et les couplages respiratoires sont mesurés selon ESTABROOK (1967) à l'aide d'un oxygraphe GILSON. muni d'une cellule de CLARK, à 30°C. Le milieu de mesure est le milieu de BONNER (1967) enrichi en osmoticum (ROMIEU, 1987).

VI — DOSAGE DES PROTÉINES

La quantité de protéines est estimée selon la méthode de LOWRY (1951) modifiée par CLARK et JAKOBY (1970).

RÉSULTATS

Les niveaux correspondant aux activités initiales des enzymes «solubles» considérées sont indiqués pour le raisin Carignan vendangé en 87, 88 et 89 dans le tableau I.

Pour ces trois vendanges, l'évolution des activités au cours du métabolisme anaérobie est illustrée par la figure 1. On constate, que dans la plupart des cas, l'anaérobiose se traduit par une diminution d'activité dès le début du traitement. Il apparaît toutefois, que toutes les activités ne sont pas affectées dans les mêmes proportions, ceci pouvant également dépendre de l'année. Si l'activité de la MDH semble être la moins sensible, surtout en 87, l'activité de la GOT apparaît être, pour les trois années, la plus touchée par l'anaérobiose. Lorsque l'activité de cette dernière enzyme, exprimée sous la forme du rapport $A_0/(A_0 - A_1)$ (A_0 et A_1 étant respectivement l'activité au temps zéro et au temps t d'anaérobiose), est portée en fonction de l'inverse de la durée d'anaérobiose, des droites ne s'extrapolant pas à 1 sur l'axe des ordonnées sont obtenues (figure 2). Un tel résultat semblerait indiquer qu'une inhibition de type non réversible interviendrait au cours de l'anaérobiose, la concentration de l'inhibiteur étant pro-

TABLEAU I

Activités enzymatiques du raisin Carignan frais.

Enzyme	Activités en $\mu \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$		
	1987	1988	1989
GOT	58	165	380
MDH	2980	7214	4630
EM	141	192	135
Aspartase	7	10	—
ATC	0,6	0,4	—
ADH	—	—	2962

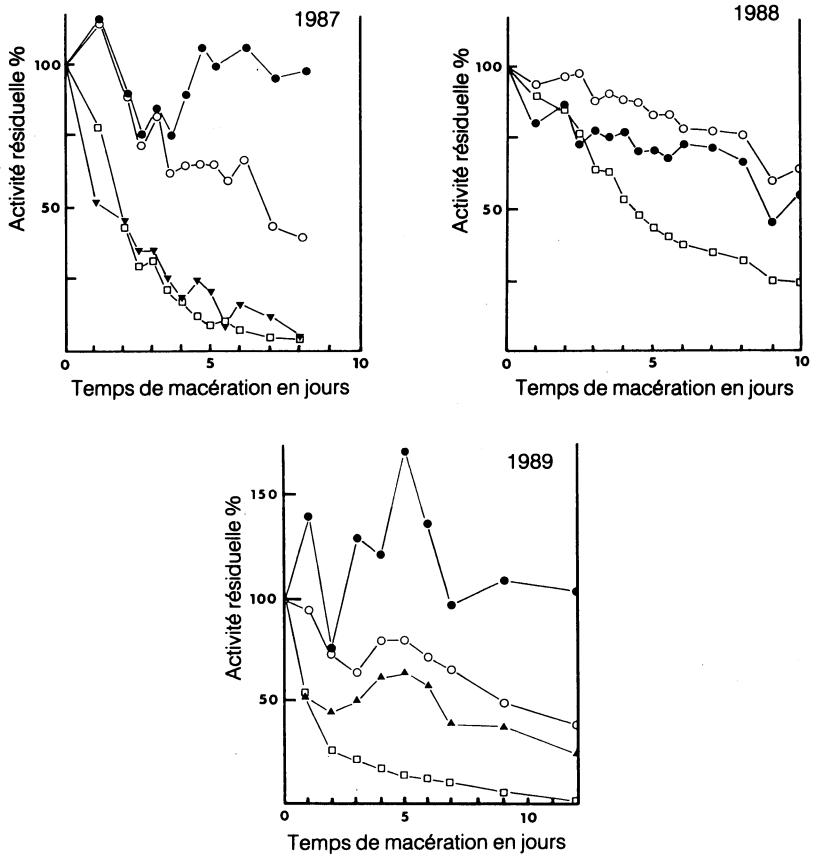


Fig. 1. — Évolution des activités MDH (●), EM (○), GOT (□), aspartase (▼) et ADH (▲) au cours du métabolisme anaérobie, pour trois années de vendange de raisin Carignan.

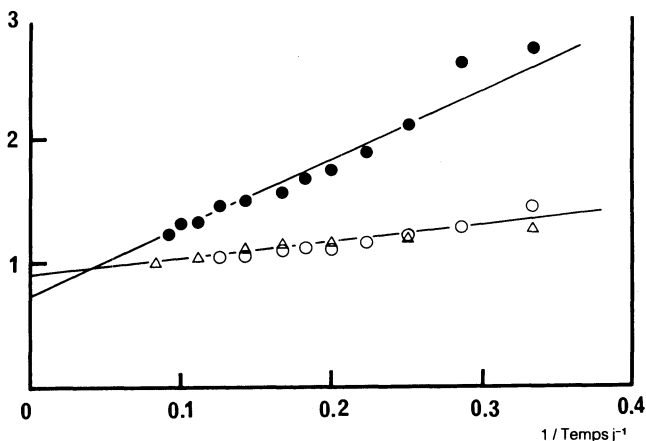


Fig. 2. — Évolution du rapport $A_0 / (A_0 - A_1)$ relatif à l'activité GOT, en fonction de l'inverse de la durée d'anaérobiose, pour le raisin Carignan vendangé en 87 (○), en 88 (●) et en 89 (△).

TABLEAU II

Caractéristiques respiratoires des mitochondries extraites de raisin Sémillon ayant subi ou non un traitement d'anaérobiose.

	Raisin frais	4 j. à 30°C sous air	4 j. à 30°C sous CO ₂
Respiration* (μ mol O ₂ .min ⁻¹ .kg ⁻¹)	12.3	12.9	10.5
Contrôle respiratoire**	1.2	1.5	1.2
P/O***	1.0	1.1	0.9

* *Respiration* : vitesse de réduction de l'oxygène en présence de succinate 10 mM et d'ADP.

** *Contrôle respiratoire* : rapport de la vitesse de la respiration mesurée en présence d'ADP sur la vitesse de respiration mesurée lorsque cet ADP a été phosphorylé en ATP.

*** *P/O* : rapport du nombre de liaisons riches en énergie formées à partir de l'ADP, sur la quantité d'oxygène atomique consommé pendant la phosphorylation.

portionnelle au temps d'anaérobiose, à partir de 3 ou 4 jours. L'apparition en cours d'anaérobiose d'un inhibiteur de la GOT a effectivement été démontrée (SAUVAGE, 1989).

L'activité aspartase suivie en 1987 évolue de façon comparable à celle de la GOT ; cependant, la figure 3 indique que l'évolution de cette activité peut présenter un regain temporaire vers 5 jours d'anaérobiose, la chute se poursuivant au-delà. Un tel phénomène déjà observé en 85, n'a pu être mis en évidence en 87. Par contre, il est visible pour les activités MDH et ADH en 1989 (figure 1). Comparativement, l'évolution de l'activité ATC suivie en 86 (figure 2) n'indique pas un tel regain. Il est à noter que les erreurs relatives calculées ($\pm 10\%$) ne permettent pas d'expliquer les fluctuations observées, en particulier pour l'activité MDH.

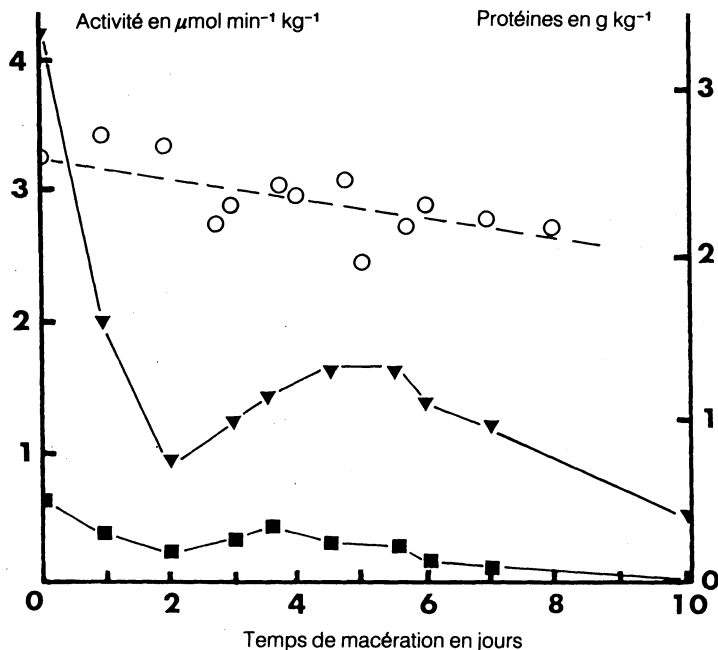


Fig. 3. — Évolution des activités aspartase (▼) et ATC (■), ainsi que de la teneur en protéines (○) estimée par la méthode de LOWRY, au cours du métabolisme anaérobie, pour le raisin Carignan vendangé en 86.

TABLEAU III

Cinétiques de l'activité fumarase et des caractéristiques respiratoires des mitochondries extraites du raisin Cardinal, en fonction de la durée d'une anaérobiose carbonique, effectuée à 30°C.

Durée de l'anaérobiose	Acitivités mitochondriales			
	Fumarase	Respiration du succinate	CR*	P/O
0	129	12	1,53	1,20
2	127	15	1,28	1,12
4	128	10	1,21	0,62
6	123	14	ND*	ND*
8	125	7	1,21	0,60
10	104	9	1,10	0,71
23	20	2	1	0

* CR : contrôle respiratoire; ND : non déterminé.

En ce qui concerne les enzymes mitochondriales, les expériences précédentes ont déjà démontré qu'il ne semble pas y avoir d'évolution notable des activités liées aux chaînes respiratoires, ni de l'activité fumarase matricielle lorsque les baies produisent activement de l'éthanol. L'ensemble de ces activités chute ensuite brutalement, de façon simultanée à l'arrêt de la production d'éthanol (ROMIEU et *al.*, 1988). Outre une confirmation des résultats précédents, les tableaux II et III démontrent qu'un traitement anoxique préalable des baies n'affecte pas non plus sensiblement la capacité des mitochondries à former de l'ATP lors de l'oxydation du succinate en présence d'ADP.

On constate par ailleurs que la durée de la tenue des mitochondries à l'anaérobiose peut être variable : généralement de l'ordre de 3 à 4 jours, elle peut atteindre 8 à 10 jours (tableau III), sans corrélation apparente avec le cépage ou la maturité.

CONCLUSION

Pendant la période de formation de l'éthanol, les activités des enzymes solubles chutent plus ou moins alors que celles des enzymes mitochondriales restent stables. L'arrêt du MA correspond probablement à la mort cellulaire car alors, les mitochondries sont détruites et les activités enzymatiques totales très basses. Tant que les mitochondries peuvent former de l'ATP par phosphorylation oxydative, le MA, jugé par cette aptitude, serait réversible. On ne peut à l'heure actuelle donner les raisons de l'arrêt du MA alors que les réserves énergétiques du fruit sont encore importantes : la baisse des activités totales est-elle liée à une substance apparaissant *in vivo* au cours de l'anaérobiose et inhibant plus ou moins spécifiquement les diverses activités solubles, les activités mitochondriales étant momentanément protégées en raison de l'existence des membranes, ou bien, à une vitesse de synthèse protéique plus faible, les activités chutant plus ou moins vite selon leurs différents turnovers ?

Une hypothèse liée à l'ultrastructure de la baie peut également être formulée : il est bien connu que les végétaux qui résistent le mieux à l'anaérobiose sont ceux qui luttent efficacement contre l'acidification cytoplasmique (ROBERTS et *al.*, 1985). Il paraît donc raisonnable d'admettre, tant qu'aucun mécanisme n'a été trouvé, que l'augmentation de la concentration en éthanol, molécule reconnue pour perturber les perméabilités membranaires (HOEK et TARASHI, 1988), finisse par perturber l'intégrité de la vacuole, dont le contenu est à pH 3,3 et dont le volume est au moins cent fois plus élevé que celui du cytoplasme (STOREY, 1987). L'acidité libérée serait donc directement responsable de la mort cellulaire c'est-à-dire de l'arrêt de la synthèse de l'éthanol et de la destruction des mitochondries.

Bien qu'il soit probable, d'après les travaux de CHAMBROY (1981), que la baie de raisin se soit déjà adaptée à l'anaérobiose avant la vendange, du fait de l'effet de la température ou de la production de l'éthanol à l'air, des mécanismes d'adaptation ou d'induction à l'anaérobiose provoquée se traduisant par une augmentation de l'activité

ou du turnover de certaines enzymes, ne sont pas totalement à exclure pendant les premiers jours du métabolisme anaérobie.

Manuscrit reçu le 4 décembre 1989; accepté pour publication le 28 décembre 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BONNER W.D. Jr, 1967. A general method for the preparation of plant mitochondria. *Methods in Enzymology*, **10**, 126-133.
- CHAMBROY Y., 1981. Étude du dégagement de gaz carbonique de baies de raisin placées en atmosphère appauvrie en oxygène. Thèse de 3^e cycle, Faculté des Sciences, Marseille-Luminy.
- CLARK J.F., JAKOBY W.B., 1970. Yeast aldehyde dehydrogenase. III. Preparation of three homogeneous species. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6065-6071.
- DAWERITZ I., 1985. Métabolisme anaérobie de la baie de raisin : influence sur l'activité alcool-déshydrogénase et la synthèse de composés aromatiques. D.E.A., Sciences Alimentaires, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- ESTABROOK R.W., 1967. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of P/O ratios. *Methods in Enzymology*, **10**, 41-47.
- FLANZY C., FLANZY M., ANDRÉ P. et CHAMBROY Y., 1969. Fixation à l'obscurité du ¹⁴CO₂ gazeux, dans les baies de raisin, en anaérobiose. II. Devenir du ¹⁴C au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. Agric.*, **18**, N° 4, 307-325.
- FLANZY C., 1978. Étude sur le métabolisme anaérobie de la baie de raisin. Thèse de Doctorat d'État. Faculté des Sciences Marseille-Lumigny.
- GARCIA P., 1975. Contribution à l'étude de l'enzyme malique du raisin, L-malate : NADP oxydoreductase (decarboxylating EC 1.1.1.40). Thèse 3^e cycle, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- HOEK J.B. et TARASHI T.F., 1988. Cellular adaptation to ethanol. *TIBS*, **13**, 269-274.
- KARMEN A., WROBLEWSKI F. et LADUE J.S., 1955. Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**, 126-133.
- LOWRY D.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MOCQUOT B., RICARD B. et PRADET A., 1987. Rice embryos can express heat shock genes under anoxia. *Biochimie*, **69**, 677-681.
- MOLINA I., NICOLAS M. et CROUZET J., 1986. Grape alcohol dehydrogenase. I. Isolation and characterization. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, n° 3, 169-173.
- NICOL M.Z., ROMIEU C., FLANZY C., 1988. Catabolisme de l'aspartate et du glutamate dans les baies de raisin en anaérobiose. *Sci. Aliments*, **8**, N° 1, 51-65.

- OCHOA A., 1955. Malic enzyme. *Methods in Enzymology*, **1**, 739-748.
- PORTER R.W., MODEBE M.O. et STARK G.R., 1969. Aspartate transcarbamylase kinetic studies of the catalytic subunits. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1846-1859.
- STOREY R. 1987. Potassium localization in the grape berry pericarp by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, N° 4, 301-309.
- RICARD B. et PRADET A., 1989. Anaerobic protein synthesis in different organs of germinating rice seeds. *Plant. Physiol. Biochem.*, **27**, N° 5, 761-768.
- ROBERTS J.K., ANDRADE F.H. et ANDERSON I.C., 1985. Further evidence that cytoplasmic acidosis is a determinant of flooding intolerance in plants. *Plant Physiol.*, **77**, 492-494.
- ROMIEU C., 1987. Étude du cycle tricarboxylique dans les mitochondries et les baies entières de raisin (*Vitis vinifera* L.) en anaérobiose. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- ROMIEU C., FLANZY C., 1988. Extraction des mitochondries de baies de raisin (*Vitis vinifera* L.). *Plant. Physiol. Biochem.*, **26**, n° 5, 589-596.
- ROMIEU C., ROBIN J.P., NICOL M.Z. et FLANZY C., 1988. Métabolisme mitochondrial au cours de l'anaérobiose de la baie de raisin. *Sci. Aliments*, **8**, N° 2, 213-226.
- SAUVAGE F.X., 1989. La glutamate oxaloacétate transaminase (EC 2.6.1.1.) du raisin : purification et quelques propriétés, influence de l'anaérobiose. Mémoire du Conservatoire National des Arts et Métiers, Montpellier.