Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1996, **30**, N°1, 41-45

ISOLEMENT DES PROTOPLASTES DE PELLICULES DE RAISIN ET OPTIMISATION DE LEUR RENDEMENT

ISOLATION OF BERRY SKIN PROTOPLASTS AND IMPROVEMENT OF THEIR PRODUCE

K. AMRANI JOUTEI*. et Y. GLORIES**

*Novo Nordisk Ferments détaché à la Faculté d'Œnologie
**Faculté d'Œnologie, 351 cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

Mots clés : Protoplastes, Pellicule, Isolement, Procyanidines
Key words : Protoplasts, Berry skin, Isolation, Procyanidins

INTRODUCTION

L'isolement des protoplastes a joué un grand rôle en biologie végétale notamment pour l'étude des organites cellulaires. Cette technique a été très développée dans la plupart des espèces végétales (BINDING et *al.*, 1982) et dans la majorité des organes de la plante : racines (LIN et *al.*, 1984), hypocotyle (ZRYD, 1988). Dans la vigne, des protoplastes ont été isolés à partir des différents organes de la plante (YIN, 1989). HRAZDINA et MOSKOWITZ (1980) ont étudié les composés responsables de la couleur des raisins à partir des protoplastes de la pellicule de De Chaunac. Dans les cépages rouges bordelais comme le Cabernet franc, le Cabernet-Sauvignon et le Merlot, une telle étude n'a jamais été réalisée sur la pellicule fraîche qui est une partie très importante en vinification en rouge puisqu'elle contient les substances responsables de la couleur et de la saveur des vins. On sait en outre que les composés phénoliques et particulièrement les procyanidines, qui se trouvent en quantité relativement importante dans les pellicules, possèdent une grande affinité vis-à-vis des protéines et donc sont susceptibles d'inhiber quelques activités enzymatiques ; c'est la raison pour laquelle nous avons étudié dans ce travail, l'isolement des protoplastes de la pellicule de Cabernet franc et tenté d'améliorer leur rendement en déterminant l'influence de quelques facteurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'isolement des protoplastes de la pellicule de raisin de Cabernet franc est réalisé essentiellement en accord avec la méthode de WAGNER et SIEGELMAN (1975) avec quelques modifications. Ainsi, pour faciliter la pénétration des enzymes dans les tissus, la cuticule recouvrant l'épicarpe est partiellement éliminée par abrasion à l'aide d'un scalpel puis l'épicarpe est découpé en très petits morceaux. Le matériel (1 g de matière fraîche par boîte) est placé dans des boites de Petri en plastique et plasmolysé durant 60 min dans un milieu E contenant du sorbitol comme agent plasmolysant et du M.E.S [2-(N-Morpholino) acide éthanesulfonique] à 0,5 p. cent comme tampon à pH 5,6. Le milieu de plasmolyse est ensuite éliminé à l'aide d'une pipette et remplacé par 10 ml de solution permettant la digestion enzymatique et contenant de la cellulase Onozuka R-10 (extraite de *Trichoderma viride*) et la macérozyme Onozuka R-10 (extraite de *Rhizopus sp.*). La technique de purification comprend la séparation des protoplastes réalisée dans notre cas par pipetage, suivie de différents lavages. Le comptage des protoplastes s'effectue en microscopie optique à l'aide d'une cellule de Malassez. Le nombre de protoplastes N exprimé en nombre de cellules par gramme de matière fraîche (MF), est calculé d'après la formule suivante :

$$N = X / K \,.\, 10^5 \text{ ml}^{-1}$$

où X = nombre de protoplastes comptés
K = nombre de rectangles utilisés

Les résultats qui représentent la moyenne de quatre expérimentations sont proches et les variations entre le nombre de cellules déterminées pour chaque essai sont faibles, les cœfficients de variation sont toujours inférieurs à 10 p. cent.

RÉSULTATS

I — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE L'OSMOTICUM

Des pressions osmotiques variables correspondant à des concentrations molaires en « osmoticum » (sorbitol) comprises entre 0,7 et 1,8 M ont été essayées (tableau I). Quelle que soit la pression osmotique des solutions utilisées, on obtient une digestion de la paroi. Toutefois, à des concentrations comprises entre 0,7 et 1 M, la digestion est incomplète et on obtient quelques cellules isolées mais qui ont gardé leur structure initiale avec paroi cellulaire bien distincte et une forme polyédrique caractéristique des cellules végétales (figure 1). La concentration donnant une digestion optimale et les meilleurs rendements est de 1,4 M.

A des concentrations plus élevées, le nombre de protoplastes diminue très légèrement.

TABLEAU I

Influence de la concentration de l'osmoticum sur la quantité de protoplastes libérés

Sorbitol (M)	Protoplastes (x 10^4 / g MF)	Cœfficient de variation (%)
0,7	0	—
0,9	0	—
1,1	0,97 ± 0,07	7
1,3	1,55 ± 0,11	7
1,4	2,95 ± 0,15	5
1,6	2,47 ± 0,10	4
1,8	2,35 ± 0,09	3,8



Fig. 1 — Cellule avec paroi cellulaire isolée de la pellicule de raisin - cw = paroi cellulaire

II — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION ENZYMATIQUE

Pour une concentration en sorbitol de 1,4 M, un mélange de cellulase ONOZUKA R 10 (2 p. cent) et de Macérozyme ONOZUKA R 10 (0,4 p. cent) constitue la combinaison enzymatique permettant d'obtenir le meilleur rendement (tableau II). L'effet de la concentration enzymatique sur ce paramètre est variable : l'augmentation en parallèle des concentrations de cellulase et de Macérozyme au-delà, respectivement de 2 p. cent et de 0,4 p. cent, entraîne une diminution de la viabilité. Au contraire, si l'on utilise des concentrations trop faibles, l'attaque enzymatique est peu importante et dirigée exclusivement vers les couches superficielles de la pellicule.

TABLEAU II

Influence de la concentration enzymatique sur la libération des protoplastes

Concentration enzymatique	Protoplastes (x 10^4/g MF)	Coefficient de variation (%)
C 1% + M 0,2%	1,11 ± 0,09	8
C 2% + M 0,4%	2,99 ± 0,11	3,6
C 2,5% + M 0,8%	1,67 ± 0,10	6

III — INFLUENCE DE LA DURÉE DE L'INCUBATION ENZYMATIQUE

Des mesures de rendement ont été faites au bout de 2, 4, 6 et 8 h de digestion enzymatique. Le taux de libération des protoplastes n'est pas constant au cours de la période d'incubation. Il passe par un maximum au bout de 4 heures puis diminue légèrement (tableau III). Si, après 4 heures, on remplace le milieu d'incubation (tableau IV) par une solution enzymatique fraîche, on constate que le rendement final obtenu en additionnant les deux rendements successifs est supérieur au rendement obtenu en 8 h dans le même milieu non renouvelé.

TABLEAU III

Influence de la durée d'incubation sur l'isolement des protoplastes

Temps d'incubation (h)	Protoplastes (x 10^4/g MF)	Cœfficient de variation (%)
1	0	—
2	0	—
4	2,72 ± 0,08	3
6	2,45 ± 0,10	4
8	2,21 ± 0,09	4

IV — INFLUENCE DES PROCYANIDINES SUR L'ISOLEMENT DES PROTOPLASTES

L'addition dans le milieu d'incubation de très faibles quantités de procyanidines oligomères isolées de pépins

de raisins rouges (tableau V), affecte largement la libération des protoplastes puisqu'à des doses de 0,05 p. cent, seuls 60 p. cent des protoplastes sont obtenus. Ce pourcentage diminue quand la quantité de procyanidines ajoutée dans le milieu d'incubation atteint 0,1 p. cent.

TABLEAU IV

Influence de la durée d'incubation sur l'isolement des protoplastes après changement du milieu enzymatique

Temps d'incubation (h)	Protoplastes (x 10^4/g MF)	Cœfficient de variation (%)
1	0	—
2	0	—
4	2,61 ± 0,08	3
6	2,95 ± 0,10	3,4
8	3,22 ± 0,13	4
0,305 ± 0,016	0,18 ± 0,011	0,087 ± 0,008

TABLEAU V

Influence des procyanidines sur les activités enzymatiques utilisées pour la libération des protoplastes

Nombre de protoplastes (x 10^4/g MF)		
Témoin	+ Procyan (0,05 %)	+ Procyan (0,1 %)
0,32	0,18	0,08
0,28	0,20	0,08
0,30	0,18	0,09
0,32	0,17	0,10
0,305 ± 0,016	0,18 ± 0,011	0,087 ± 0,008

DISCUSSION ET CONCLUSION

La pellicule de raisin de Cabernet franc nécessite donc un milieu assez concentré (1,4 M de sorbitol) contrairement aux autres organes qui ont besoin d'une concentration assez faible. Cela est dû à la pression osmotique qui existe à l'intérieur des vacuoles. En effet, les raisins sont des organes qui accumulent des sucres durant toute la période de maturation. La plasmolyse des cellules de leurs pellicules nécessite donc un milieu hypertonique. La libération des protoplastes dans un milieu hypotonique est très faible et ces protoplastes éclatent rapidement ne laissant dans le milieu que les cellules qui ont gardé leur paroi cellulaire.

L'incubation des tissus avec les enzymes pendant 8 h entraîne la diminution du rendement des protoplastes. Dans ces conditions, on est en mesure de confirmer avec certitude que le contact prolongé des tissus avec la solution enzymatique de départ altère les protoplastes isolés pendant les premières heures d'incubation par dégradation et éclatement, diminuant ainsi le rendement dans le cas où on ne renouvelle pas le milieu enzymatique. Le même phénomène est obtenu avec l'augmentation des concentrations enzymatiques dans le milieu de macération; un effet toxique dû à de fortes concentrations en enzymes n'est donc pas à exclure. Ainsi, pour éviter la dégradation des protoplastes déjà isolés, ils sont séparés après 4 heures d'incubation, remis dans la solution E et la solution enzymatique est ensuite renouvelée. L'influence des composés phénoliques, et particulièrement des procyanidines, sur l'isolement des protoplastes est très nette. Les procyanidines sont des substances qui sont localisées dans les pellicules et peuvent être sous forme libre dans les vacuoles (AMRANI JOUTEI et *al.*, 1994). Elles sont en outre très réactives vis-à-vis des protéines. Elles sont donc capables de se lier avec les enzymes et, ainsi, d'inhiber certaines activités enzymatiques. L'activité ß glucosidase de la cellulase diminue avec l'augmentation de la concentration en procyanidines (AMRANI JOUTEI, 1993). Ainsi, l'éclatement des protoplastes entraîne la libération de tanins dans le milieu d'incubation. Ces tanins sont susceptibles de se lier aux enzymes et provoquer leur inactivation.

La détermination des conditions expérimentales favorisant à la fois le rendement et la viabilité des protoplastes est particulièrement importante. Aussi, les fragments de pellicules sont préalablement rincés dans l'eau distillée pendant quelques secondes et mis à plasmolyser dans le milieu E (osmoticum) pendant 60 à 90 min tout en changeant toutes les 15 min ce milieu. En plus du rôle plasmolysant, ce milieu sert également au rinçage. Ensuite, les fragments sont transférés dans le milieu enzymatique pendant quelques minutes (15 à 20 min) toujours pour rincer et ainsi éliminer les composés phénoliques éventuellement libérés. Il est éliminé et remplacé par un autre (10 ml) qui servira de milieu de digestion proprement dit. Dans ces conditions, la solution enzymatique finale reste intacte et dépourvue de toute trace de composés phénoliques, susceptibles d'inhiber les activités enzymatiques. La contamination de ce milieu par des tanins provenant de l'éclatement accidentel de certains protoplastes est à exclure puisque la libération dans le milieu de ces molécules est toujours accompagnée par celle des anthocyanes, or le spectre en milieu acide de cet extrait n'a jamais montré de maximum à 520 nm.

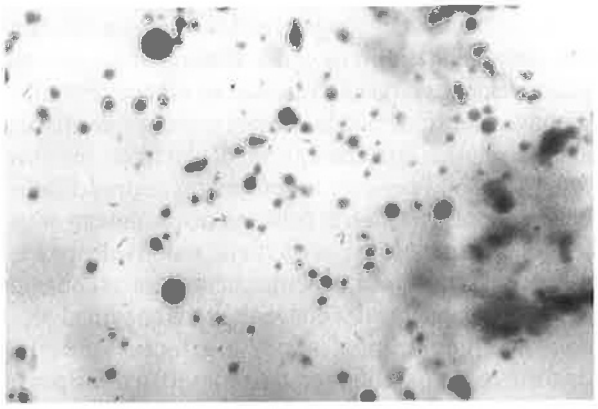


Fig. 2 — Protoplastes isolés de la pellicule de raisin

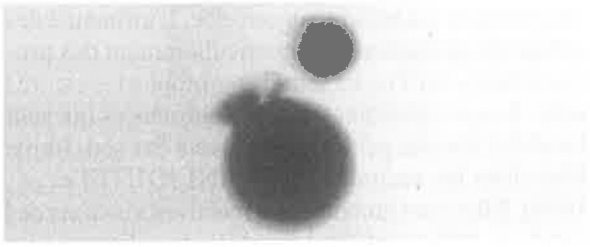


Fig. 3 — Protoplastes de la pellicule de raisin ne contenant pas de tache foncée



Fig. 4 — Protoplaste de la pellicule de raisin contenant une tache foncée

Dans les conditions mises en évidence précédemment pour la digestion enzymatique des parois cellulaires, la préparation des protoplastes nous a permis d'obtenir environ 3.10^4 à $3{,}2.10^4$ cellules par gramme de matière fraîche ayant un diamètre qui varie de 10 µm à 70 µm. Ces protoplastes (figure 2) se présentent sous forme d'une sphère contenant une vacuole qui occupe la quasi-totalité de la cellule et qui est remplie d'anthocyanes. Le cytoplasme contenant les organites se trouve rejeté dans une petite partie de la cellule. Notons qu'en fonction de l'intensité de leur couleur, on distingue des protoplastes dont la couleur varie du rose clair au rouge foncé et que cette différence est indépendante de la taille des protoplastes. En outre, si le pH cytoplasmique des cellules végétales est proche de la neutralité ou légèrement acide (NOUGAREDE, 1969), les valeurs des pH vacuolaires sont très diverses ; des cellules voisines d'un même tissu peuvent posséder des vacuoles de pH différents. Sachant que la couleur des anthocyanes est sensible aux variations de pH, la différence de couleur observée dans les préparations peut être attribuée au pH du suc vacuolaire, mais peut également avoir d'autres origines, en particulier la nature des pigments, leur concentration et leur copigmentation dans la vacuole

Ajoutons que des corps identifiés par MERLIN et *al.* (1985) dans les vacuoles des cellules pelliculaires du Pinot noir et par PECKET et SMALL (1980) dans les vacuoles des cellules du chou rouge et assimilés à des « anthocyanoplastes » ont été observés dans quelques uns de nos protoplastes (figure 4) ; la plupart en sont dépourvus (figure 3). Cependant, les observations en microscopie électronique sur des coupes de pellicules de Merlot à maturité (AMRANI JOUTEI, 1993) montrent que ces précipités sont tous de formes sphériques avec une teneur homogène et une surface irrégulière. Il n'a pas été possible de trouver des corps présentant des membranes les entourant ou ayant des structures internes les caractérisant en accord avec la définition générale de la compartimentation des organites cellulaires. En outre, l'existence d'organites à l'intérieur des vacuoles est contraire à la théorie de la compartimentation des cellules eucaryotiques (SCHNEPT, 1966 ; SITTE, 1978). Dans ces conditions, on ne peut pas confirmer la théorie de ces deux auteurs. Pour expliquer ce phénomène, on peut envisager la présence dans les vacuoles de gouttelettes de nature lipidique. En effet, des substances lipidiques ont été signalées dans les vacuoles des plantes supérieures et des champignons (MATILE et *al.,* 1970 ; LÖSECKE et *al.,* 1980). Ces constituants qui entraînent un déplacement bathochrome du maximum d'absorption des pigments anthocyaniques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMRANI JOUTEI K., 1993. Localisation des tanins et des anthocyanes dans le raisin, étude de leur extractibilité. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II. N° 238.

AMRANI JOUTEI K., GLORIES Y. et MERCIER M., 1994. Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, **33**, 133-138.

BINDING M., MEHLS R. and JORGENSEN J., 1982. *Protoplast regeneration in higher plants. In* : A. Fujiwara (Editor), Plant tissue culture. 1982. Jpn. Assoc. Plant tissue cult., Tokyo, pp. 575-578.

HRAZDINA G. and MOSKOWITZ A., 1980. Subcellular status of anthocyanins in grape skins.

U. C. D. Grape and Wine Centennial Symposium Proceedings. University of California, edit. Davis, (1982), 245-253.

LIN W., SCHMITH M.-R., MITZ W.-D. and GIAQUINTA R.-T. 1984. Sugar transport in isolated corn root protoplasts. *Plant Physiol.*, **76**, 894-897.

LÖSECKE W., NEUWMANN D., GRÖGER D. and SCHMAUDER H-P., 1980. Changes of the cytoplasmic ultrastructure during development of sclerotia in *Claviceps purpurea*.(Fr).*Tul. Arch. Microbiol.*, **125**, 251-257.

MATILE Ph., WIEMKEN A.and MOOR H., 1970. Vacuolar dynamics in synchronously yeast. *Arch. Microbiol.*, **70,** 89-103.

MERLIN J., STATOUA A. and BROUILLARD R., 1985. Investigation of the *in vivo* organisation of anthocyanins using resonance raman microspectrometry. *Phytochem.*, **24**, n°7, 1575-1581.

NOUGAREDE, 1969. *in : Biologie Végétale. I : Cytologie*. MASSON et Cie éditeurs.

PECKET R. C. and SMALL C.-J., 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochem.*, **19**, 2571-2576.

SCHNEPT E., 1966. Die kompartimentierung der zelle in morphologischer sicht. *Biol. Rundsch.*, **4**, 259-275.

SITTE P., 1978. Die lebende zelle als system, systemelement und Übersystem. *Nova Acta Leopoldina.*, **47**, 195-216.

WAGNER G.-J. and SIEGELMAN H.W., 1975. Large scale isolation of intact vacuoles and isolation of chloroplasts from protoplasts of mature plant tissues. *Science*, **190**, 1298-1299.

YIN K., 1989. Isolement et culture *in vitro* de protoplastes de vignes (*Vitis vinifera* L et *Vitis rupestris* Scheele). *Thèse de Doctorat*, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

ZRYD J-P., 1988. *Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques*. Presses Polytechniques Romandes, pp. 308.

Manuscrit reçu le 7 septembre 1995