Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1995, **29**, N°4, 213-225

PLASTES, AMIDON ET CHLOROPHYLLE DANS LA BAIE DE *VITIS VINIFERA* L. AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT

PLASTIDS, STARCH AND CHLOROPHYLL IN *VITIS VINIFERA* L. BERRY DURING ITS ONTOGENESIS

Monique FOUGÈRE-RIFOT, H.S. PARK, Monique CHERRAD, G. DARNÉ et J. BOUARD

Institut de la Vigne de Bordeaux, Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence cedex (France)

Résumé : Une étude structurale et ultrastructurale de l'évolution des plastes dans les tissus de la baie de *Vitis vinifera* L. a été entreprise couplée avec des dosages d'amidon et de chlorophylle, de la nouaison à la maturité des baies. Pendant toute cette période, des chloroplastes, de l'amidon et de la chlorophylle sont présents dans la baie de raisin.

Au cours de la période herbacée du développement de la baie des chloroplastes amylifères sont bien développés et la chlorophylle abondante. La forte teneur en amidon semble montrer que, pendant cette phase, les baies participent activement à la synthèse de leurs glucides.

Ensuite, pendant la période de maturation, la teneur en chlorophylle baisse fortement et les glucides solubles, qui s'accumulent massivement dans la baie, proviennent essentiellement des feuilles. La diminution de la teneur en amidon et sa disparition quasi totale à maturité concorde avec les observations microscopiques.

Abstract : Structural and ultrastructural investigations on plastidial ontogenesis in the tissues of *Vitis vinifera* berry are realised in narrow association with starch and chlorophyll dosages from the stage of fruit setting till berry ripeness. During the whole of that period, some chloroplasts, starch and chlorophyll are noted in grape berry.

Well developed starch chloroplasts and a great deal of chlorophyll are present in herbaceous stage of berry development. A large starch content perhaps seems to show that berries are involved in their own glucides synthesis during this stage.

After that, during ripening stage, chlorophyll content strongly decreases and soluble glucides that accumulate in the berry are essentially derived from leaves.

Mots clés : plastes, amidon, chlorophylle, *Vitis vinifera*
Keywords : plastids, starch, chlorophyll, *Vitis vinifera*

De la nouaison à la maturité, le gynécée de la fleur de vigne grossit énormément, change de couleur et subit diverses modifications cellulaires, notamment au niveau des plastes. Ces modifications étant toujours mal connues, nous avons été amenés à suivre l'évolution plastidiale dans les tissus de la baie au cours de son ontogenèse et à réaliser pendant cette même période des dosages d'amidon et de chlorophylle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — ÉTUDE STRUCTURALE ET ULTRASTRUCTURALE DES PLASTES

Des prélèvements de *Vitis vinifera* L. var. Merlot ont été effectués à Couhins près de Bordeaux du 15 juin à la fin septembre. Aussitôt prélevés, les échantillons sont fixés par le glutaraldéhyde à 2,5 p. cent dans le tampon phosphate de Sörensen à pH 7,5 et à 4°C pendant 2 heures, puis, après plusieurs rinçages, postfixés par le tétroxyde d'osmium à 1 p. cent dans le même tampon et dans les mêmes conditions. Après déshydratation éthylique, les objets sont progressivement inclus dans l'épon, puis portés dans une étuve à 60°C. Au bout de cinq jours, la résine époxy est polymérisée. Les inclusions ainsi réalisées permettent d'effectuer des coupes semi-fines (de 1 à 1,5 µm) ou des coupes fines (500 à 800Å).

Les coupes semi-fines sont, soit colorées par le lugol et une solution de bleu de toluidine, soit traitées par le test PAS (acide periodique - Schiff) afin de mettre en évidence les polysaccharides, puis observées en microscopie photonique. Les coupes fines sont classiquement contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb et observées en microscopie électronique à transmission (microscope JEOL 1200 EX ou microscope JEOL 100 S).

II — DOSAGE DE L'AMIDON

Des grappes de rang 1 ont été récoltées sur les rameaux principaux de deux cépages, le Merlot et le Cabernet Sauvignon, cultivés dans la même parcelle, et immédiatement plongées dans de l'azote liquide afin d'inhiber l'action des enzymes susceptibles de dégrader l'amidon. Ces prélèvements ont été effectués, durant deux années consécutives (1993 et 1994), aux stades suivants du cycle annuel de la vigne : nouaison (mi-juin), grains de la taille d'un petit pois (fin juin), fermeture de la grappe (mi-juillet), mi-véraison (mi-août), maturité (fin septembre).

L'amidon a été dosé dans les baies entières aux deux premiers stades, puis uniquement dans les péricarpes (pellicules et pulpes) à partir du stade fermeture de la grappe.

Après lyophilisation, réduction en poudre, extraction et analyse des glucides solubles (DARNÉ et MADERO-TAMARGO, 1979), le dosage de l'amidon a été réalisé suivant le protocole établi par MOING et GAUDILLERE (1992). La matière végétale est d'abord soumise à un traitement hydrothermique - nécessaire à la dispersion des grains d'amidon (THIVEND et *al.*, 1965) -, effectué par un passage à l'autoclave pendant une heure (135°C, pression : 2 bars). Le dosage de l'amidon repose sur la spécificité d'une enzyme, l'amyloglucosidase. La quantité de glucose libérée par l'action de l'amyloglucosidase est ensuite déterminée par la méthode de KUNST et *al.* (1984). Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de trois répétitions.

III — DOSAGE DES CHLOROPHYLLES a ET b

1) Prélèvement et préparation du matériel végétal

Des grappes de rang 1 de Chardonnay (cépage blanc), de Merlot et de Cabernet Sauvignon (cépages noirs) ont été régulièrement prélevées à Couhins, une fois par semaine, de la nouaison (fin juin) à la chute des feuilles (octobre). Ces prélèvements ont toujours été effectués au coucher du soleil.

Les lots de baies prélevées ont été directement placés dans un récipient isotherme maintenu à une température suffisamment basse (8°C ± 2°C) pour limiter les modifications biochimiques pendant les quinze minutes nécessaires à leur transport au laboratoire.

Le poids frais des baies entières, puis celui des pellicules, rapidement isolées par un écrasement manuel pour sortir la pulpe et les pépins, ont été rapidement déterminés.

2) Extraction et dosages

Les chlorophylles des pellicules ont été immédiatement extraites (extracteur de Poter) par une solution aqueuse à 80 p. cent d'acétone additionnée de 0,5 g de $CaCO_3$ par litre ; on opère en lumière tamisée pour éviter la formation de phéophytines dont les absorptions moléculaires sont différentes. Pour être totale, l'extraction nécessite plusieurs broyages successifs du même échantillon végétal dans, chaque fois, 5 ml de solvant neuf. Elle est terminée lorsque les deux dernières fractions acétoniques restent limpides.

Les différentes fractions acétoniques sont filtrées rapidement au-dessus d'une fiole jaugée de 50 ml. Après avoir été ajusté à 50 ml avec le même solvant, le contenu des fioles est homogénéisé par agitation, puis immédiatement soumis au dosage des chlorophylles par spectrophotométrie d'absorption moléculaire selon la technique de MACKINNEY (1941) : l'absorption moléculaire (D) doit être mesurée sous 1 cm de trajet optique à 663 nm (chlorophylle a), 645 nm (chlorophylle b) et 652 nm (chlorophylle totale), et les quantités de chlorophylles exprimées en µg/50 ml sont ensuite calculées en utilisant les formules de conversion ci-dessous :

$$\text{Chlorophylle a} = (635 \times D_{663\ nm}) - (134{,}5 \times D_{645\ nm})$$

$$\text{Chlorophylle b} = (1145 \times D_{645\ nm}) - (234 \times D_{663\ nm})$$

$$\text{Chlorophylle totale} = 1388{,}9 \times D_{652\ nm}$$

(après correction du coefficient, cf. §3.c.)

Les coefficients : 635 - 134,5 - 1145 - 234 et 1388,9 traduisent l'importance relative de l'absorption de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et de la chlorophylle totale aux longueurs d'onde utilisées. Ils sont spécifiques du solvant employé (ici, acétone à 80 p. cent).

3) Remarques

Le protocole original (MACKINNEY, 1941) nous

donnant parfois des résultats aberrants, nous avons été conduit à l'améliorer sur trois points précis (PARK, 1995) :

a) En modifiant la préparation de la solution d'extraction :

Au lieu d'ajouter extemporanément un poids de $CaCO_3$ correspondant à 10 p. cent du poids de pellicules (i.e. un poids de $CaCO_3$ différent à chaque date et pour chaque lot) dans la solution acétonique, nous avons préparé une solution aqueuse à 80 p. cent d'acétone contenant systématiquement le même poids de $CaCO_3$: 0,5 g par litre).

b) En dosant les chlorophylles d'un lot donné de pellicules immédiatement après leur extraction. On limite ainsi les modifications de l'extrait liées d'une part à l'évaporation - constatée - d'une fraction de l'acétone et, d'autre part, à des dégradations des pigments qui semblent se produire assez rapidement.

c) En corrigeant la formule de calcul de la chlorophylle totale :

L'utilisation des coefficients de conversion donnés par Mac KINNEY (1941), et repris par HOLDEN (1965), HARBORNE (1973) et LAVAL-MARTIN et MAZLIAK (1979) fait apparaître un écart très net entre la teneur en chlorophylle totale et la somme des teneurs déterminées pour la chlorophylle a et la chlorophylle b. En utilisant les même données bibliographiques, nous avons recalculé tous ces coefficients et constaté que celui donné pour calculer la teneur en chlorophylle totale était inexact, vraisemblablement à la suite d'une erreur typographique dans la publication originale. Le coefficient correct est : 1388,9 et non pas 1449,5.

RÉSULTATS

I — ULTRASTRUCTURE DES PLASTES

1) Les plastes à l'époque de la nouaison de la baie (figures 1, 7)

Les différents tissus du gynécée, décrits par ailleurs, (BOUARD et *al.*, 1994 ; FOUGÈRE-RIFOT et *al.*, 1995) renferment des chloroplastes de grande taille, souvent amiboïdes. Leur forme étirée, parfois sinueuse, donne, selon les plans de coupe, des illusions d'inclusions cytoplasmiques. En plus du système lamellaire, formé de longs thylakoïdes empilés sans formation nette de granas bien individualisés, et des vésicules membranaires périphériques, nombreuses et petites, les plastes contiennent quelques inclusions d'aspect lipidique de taille supérieure à celle des plastoglobules habituels à tout plaste.

Immédiatement après la nouaison, donc dans des fleurs juste nouées, plusieurs gros globules d'amidon (PAS positifs) sont présents dans les plastes de l'épiderme et de l'hypoderme (figure 1) mais plus rares et plus petits dans ceux du parenchyme profond ; les plastes y sont moins importants et dans l'ensemble très peu amylifères (figure 7). Les plastes ont un stroma très dense.

En quelques jours, l'amidon apparaît dans les petits plastes du parenchyme profond situé à l'intérieur du cercle de faisceaux conducteurs déjà définis (BOUARD et *al.*, 1994 ; FOUGÈRE-RIFOT et *al.*, 1995).

2) Les plastes de la jeune baie en croissance (figures 2, 3, 8)

Durant les semaines de croissance qui précèdent la véraison, les plastes de l'épiderme, de l'hypoderme et ceux de la pulpe en formation sont des chloroplastes amylifères. Cette affirmation est cependant à nuancer car les plastes amylifères sont essentiellement cantonnés dans les cellules dépourvues de tanins et plus spécialement dans les cellules de la partie profonde de l'hypoderme déjà devenues cellules de pulpe et situées à l'extérieur des faisceaux vasculaires (figure 8). Certaines n'ont pas encore acquis tous les caractères de cellules de pulpe et conservent quelques tanins sous forme de fins granules dispersés dans une grande vacuole (figure 8) ; par contre, leurs parois se sont déjà considérablement amincies.

A l'échelle ultrastructurale, les chloroplastes des cellules épidermiques ou hypodermiques ont un système lamellaire bien formé avec des granas constitués d'un grand nombre de saccules. Ils renferment à la fois des granules d'amidon et des lipides sous forme de gros globules légèrement osmiophiles (figure 2). Les globules lipidiques des plastes ont le même aspect que les nombreux et volumineux oléosomes présents dans le cytoplasme (figure 2). De plus, dans les cellules pauvres en tanins vacuolaires ou dans celles qui en sont totalement dépourvues, le cytoplasme est particulièrement riche en travées de réticulum endoplasmique rugueux et en système golgien.

Dans certaines espèces végétales, les plastes ont la particularité de posséder, en périphérie du stroma, des vésicules dilatées comparables à celles du réticulum

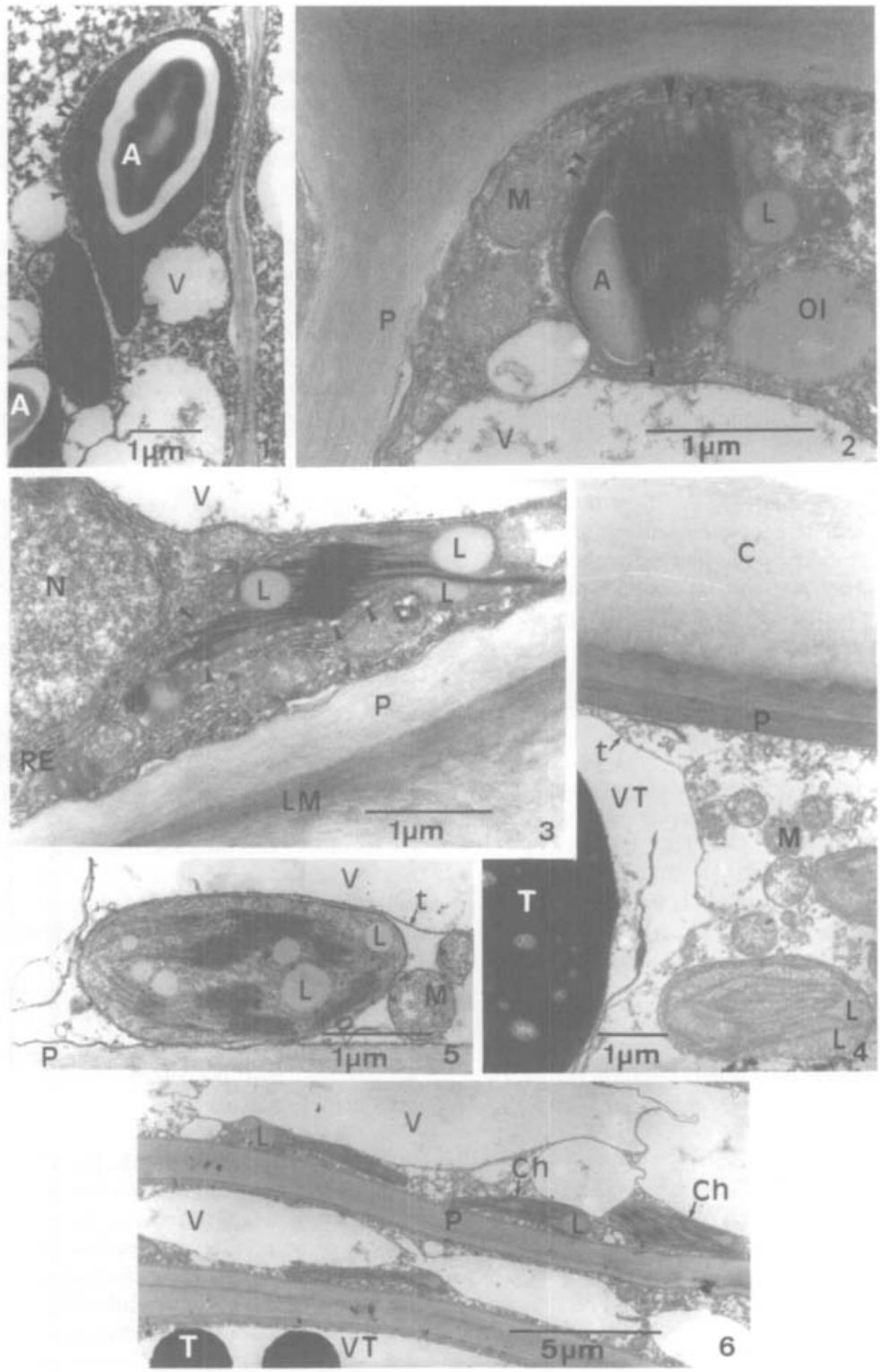


Fig. 1 — Stade de la nouaison. Microscopie électronique. Chloroplastes amylifères de l'hypoderme de la très jeune baie. Présence de vésicules membranaires périphériques (petites têtes de flèches).

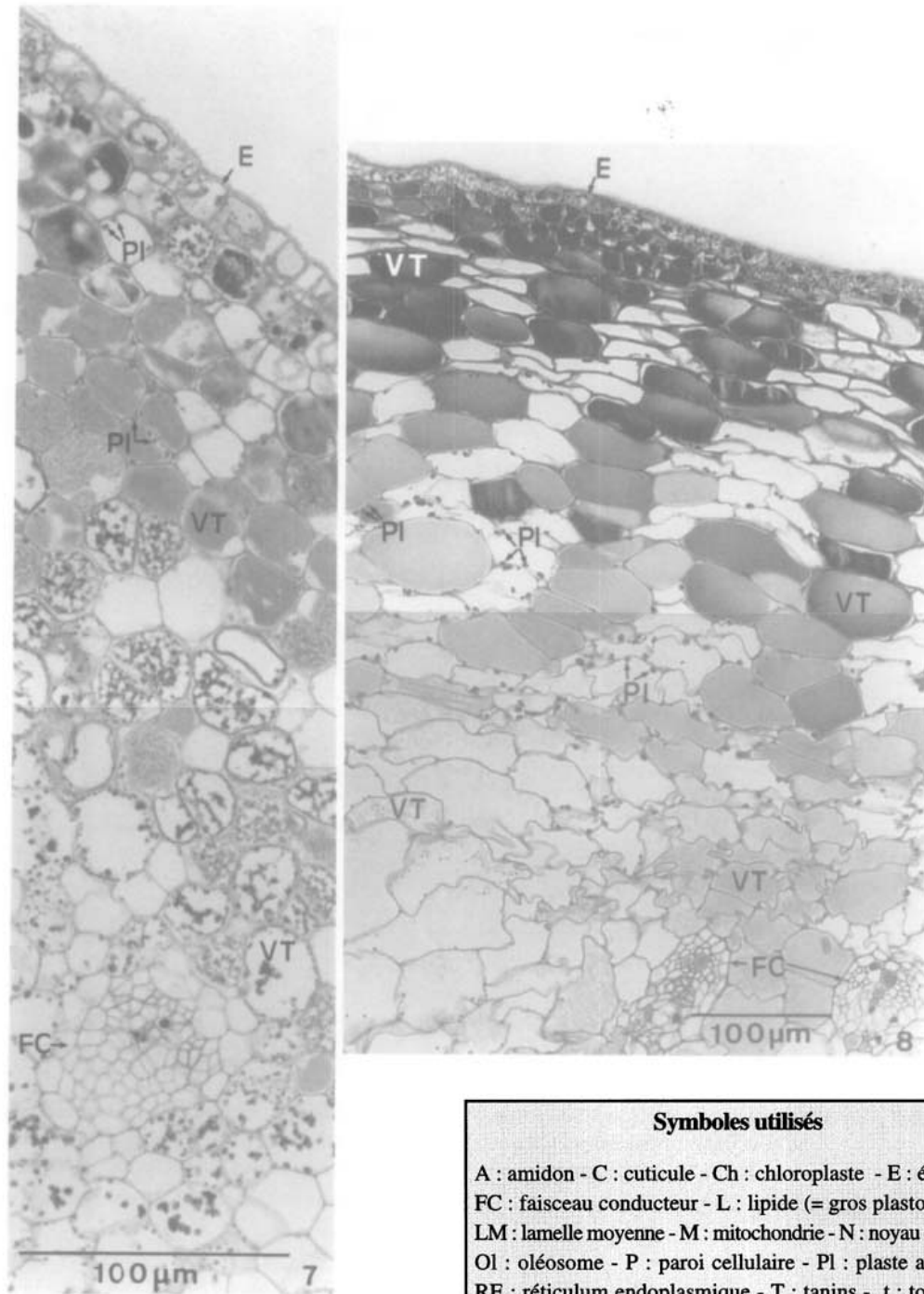
Fig. 2 et 3 — Stade de la baie en croissance. Microscopie électronique. Les chloroplastes de l'épiderme ont un système lamellaire bien constitué. Ils sont amylifères (fig. 2), renferment de très gros globules lipidiques (fig. 2 et 3) et ont la particularité de posséder un système de vésicules membranaires périphériques (fig. 2 et 3, têtes de flèches). Le cytoplasme contient de gros oléosomes (fig. 2).

Fig. 4, 5 et 6 — Stade de la maturité de la baie. Microscopie électronique.

Fig. 4 — Chloroplaste de l'épiderme. Le système lamellaire est essentiellement constitué de longs thylakoïdes ; peu de granas sont bien différenciés.

Fig. 5 — Choroplaste de la pulpe. Présence de gros globules lipidiques intraplastidiaux.

Fig. 6 — Chloroplastes de l'hypoderme. Chloroplastes différenciés avec gros globules lipidiques intrastromatiques.

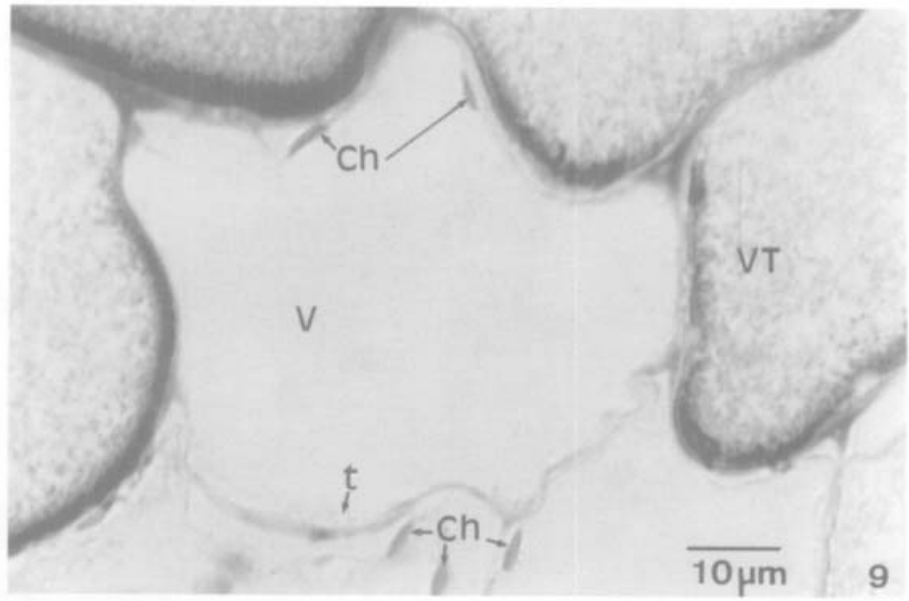


Symboles utilisés

A : amidon - C : cuticule - Ch : chloroplaste - E : épiderme
FC : faisceau conducteur - L : lipide (= gros plastoglobule)
LM : lamelle moyenne - M : mitochondrie - N : noyau cellulaire
Ol : oléosome - P : paroi cellulaire - Pl : plaste amylifère
RE : réticulum endoplasmique - T : tanins - t : tonoplaste
V : vacuole VT : vacuole tannique - tête de flèche : vésicule membranaire plastidiale

Fig. 7 — Stade de la nouaison. Coupe semi-fine. PAS. Coupe transversale dans la partie externe d'une très jeune baie. L'amidon des plastes est révélé par le PAS (coloration rouge) ; les tanins vacuolaires sont gris-brun ; les plastes amylifères sont présents dans les cellules à tanins et dans celles sans tanins. Remarquer au niveau de l'hypoderme des plages de cellule sans tanins.

Fig. 8 — Stade de la croissance de la baie. Coupe semi-fine. PAS. Coupe transversale dans la partie externe de la baie. Les cellules du parenchyme profond évoluent en cellules de pulpe. Les plastes amylifères sont localisés préférentiellement dans les cellules dépourvues de tanins situées à l'extérieur des faisceaux conducteurs. Il subsiste encore de l'amidon dans les plastes de quelques cellules tanniques.



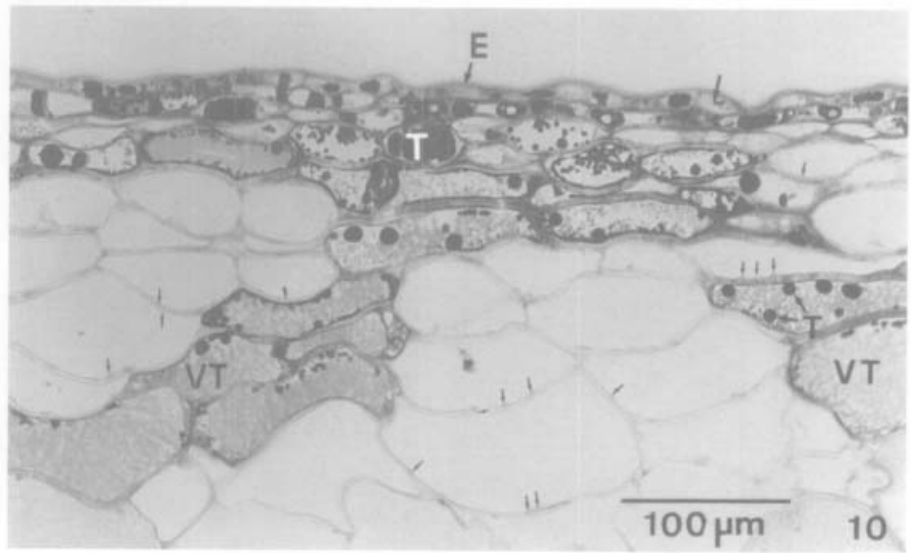


Fig. 9 — Stade de la véraison. Coupe semi-fine. PAS. Cellules de l'hypoderme évoluant en cellules de pulpe. Les cellules ont d'énormes vacuoles et leurs chloroplastes sont non amylifères. Elles perdent progressivement leurs tanins et les parois s'amincissent.

Fig. 10 — Stade de la maturité de la baie. PAS. La pellicule est réduite. Les plastes (flèches) sont non amylifères.

membranaire interne. Ces plastes sont des leucoplastes au système lamellaire réduit ou totalement absent, mais possédant certaines caractéristiques structurales : présence de réticulum périphérique interne en relation avec la membrane plastidiale interne et absence de ribosomes 70S (CHARON, 1983 ; CHENICLET, 1984 ; CARDE, 1984 ; CHENICLET et CARDE, 1985). Ces auteurs considèrent que ces leucoplastes particuliers participent directement à la synthèse d'hydrocarbures monoterpéniques. Dans certaines espèces, les sécrétats s'accumulent dans les plastes sous forme de gros globules légèrement osmiophiles (HEINRICH, 1970). Il semble y avoir exclusion entre la synthèse de terpènes et celle de l'amidon dans les plastes (CHARON, 1983).

Chez le Merlot, les plastes sont des chloroplastes normalement constitués avec formation lamellaire, amidon et plastoribosomes, et en périphérie un système de vésicules dilatées à contenu clair. Aucun plan de coupe ne nous permet de savoir avec certitude si elles sont en relation avec la membrane interne de l'enveloppe plastidiale (figure 2, grande tête de flèche). Dès le stade nouaison, des vésicules membranaires

sont présentes le long de la membrane plastidiale interne (cf. figure 1) ; elles prennent plus d'importance pendant la croissance (figures 2, 3, petites têtes de flèches), puis disparaissent dès le début de la véraison.

3) Les plastes de la baie à l'époque de la véraison (figure 9)

Dans les cellules épidermiques et dans celles des premières assises de l'hypoderme, les chloroplastes renferment quelques globules d'amidon PAS positifs ; par contre, l'amidon a disparu des cellules de la pulpe. Les lipides intrastromatiques sont bien représentés. Les oléosomes sont importants, aussi bien dans les cellules saines que dans celles qui sont déjà nécrosées.

4) Les plastes de la baie parvenue à maturité (figures 4, 5, 6, 10)

A l'époque de la maturité, les chloroplastes des cellules épidermiques ont un système lamellaire formé de grands thylakoïdes stromatiques et de granas à peine ébauchés constitués simplement par deux ou trois saccules granaires (figure 4). Dans l'hypoderme, les chloroplastes sont mieux différenciés avec thylakoïdes et empilements granaires (figure 6).

Lorsque la maturité complète est atteinte, l'amidon a pratiquement disparu de tous les tissus de la baie (figures 4, 5, 6, 10) ; la pulpe en est totalement dépourvue. Les cellules de la pulpe périphérique, proche de l'hypoderme ont des chloroplastes bien constitués et devenus non amylifères pour la plupart (figure 5) ; certains gardent encore quelques traces d'amidon.

Dans tous les tissus de la baie mûre, les chloroplastes renferment de gros globules lipidiques (figures 4, 5, 6).

En définitive, la baie de Merlot contient des chloroplastes amylifères durant toute son évolution de la

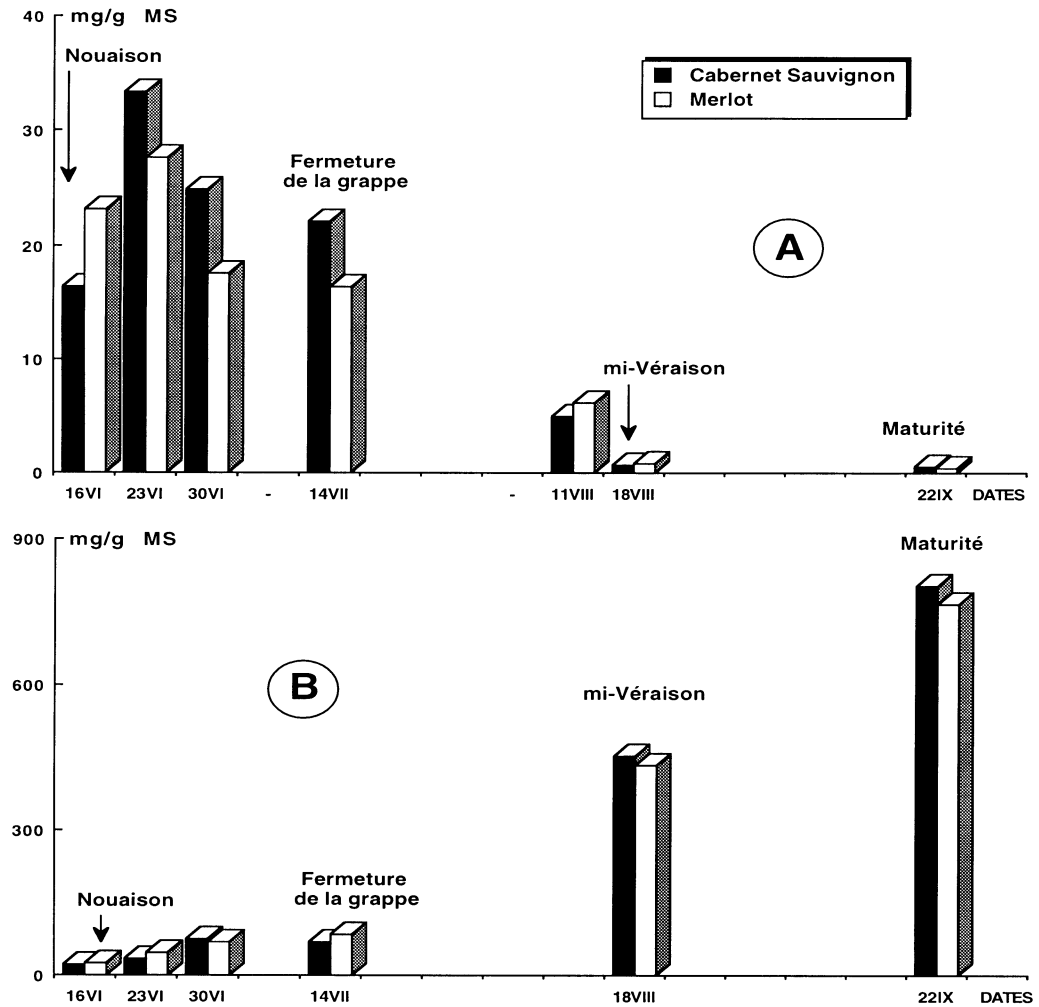


Fig. 11 — Teneurs en amidon (A) et en glucides solubles totaux (B) des baies de Cabernet Sauvignon et de Merlot (en mg/g de matière sèche) à différentes étapes de leur développement.

nouaison à la maturité. Dès la nouaison, puis durant la phase de croissance et jusqu'à la maturité, la teneur en amidon baisse considérablement. Les chloroplastes possèdent, de la nouaison à la fin de la croissance, un ensemble de vésicules claires comparable au réticulum périphérique interne.

La présence de nombreux et importants globules intraplastidiaux d'aspect lipidique, ainsi que de nombreux oléosomes, évoquent la possibilité d'une activité sécrétrice.

Par ailleurs, il faut souligner la présence de chloroplastes dans les cellules épidermiques, chloroplastes qui se différencient au cours de l'ontogenèse de la baie. Il est classique d'affirmer qu'il n'y a pas de chloroplastes dans les épidermes des plantes chlorophylliennes sauf chez les Ptéridophytes, les Orchidées et les plantes aquatiques. *Vitis vinifera* var. Merlot est à ranger parmi les exceptions.

II — ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN AMIDON (figures 11, 12)

Les observations microscopiques précédentes ont mis en évidence la présence de grains d'amidon dans les baies à tous les stades de leur développement, mais surtout pendant leur phase de croissance : la grappe se comporte alors comme un organe chlorophyllien et le grain de raisin lui-même réalise la photosynthèse. Il assure ainsi au moins une partie de ses besoins.

A notre connaissance, aucune recherche quantitative n'avait été effectuée sur le contenu en amidon des baies vertes au cours de leur croissance. Par contre, AMERINE et ROOT (1960) avaient signalé la présence d'amidon dans les faisceaux libéro-ligneux des baies mûres de Sémillon.

Nous avons ainsi été amenés à déterminer les teneurs en amidon et aussi en glucides solubles des baies tout

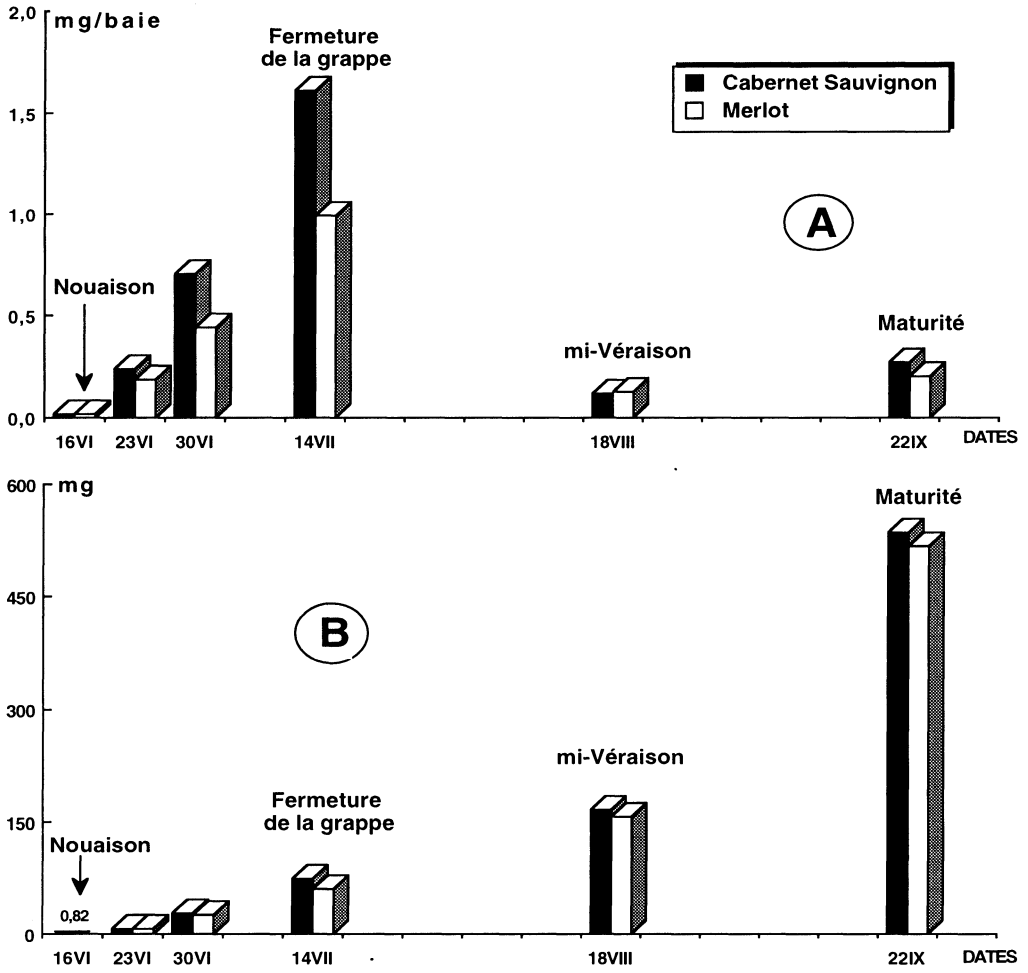


Fig. 12 — Teneur en amidon (A) et poids sec (B) d'une baie de Cabernet Sauvignon et de Merlot à différentes étapes de leur développement.

TABLEAU

Teneurs en amidon (en mg/g MS) des baies de Cabernet Sauvignon et de Merlot prélevées à différents stades en 1993 et en 1994

Stades phénologiques		J	J+8	K	L	m-8	m	N
Cabernet Sauvignon	1993	28,5	38,6	—	19,8	—	1,7	0,8
	1994	16,3	33,3	24,9	22,1	4,9	0,7	0,5
Merlot	1993	24,9	21,9	—	17,3	—	1,6	2,1
	1994	23,1	27,7	17,5	16,3	6,1	0,8	0,4

au long du développement de la grappe, et les résultats obtenus peuvent être décrits de la façon suivante :

1) La teneur en amidon pendant la période de croissance de la baie (tableau)

Au stade nouaison (stade J de BAGGIOLINI, 1952), les teneurs en amidon des jeunes baies sont de l'ordre de 25 mg/g MS. Elles sont donc moins fortes qu'aux stades boutons floraux et fleurs (CHERRAD et PARK, 1996). Quant à la teneur en glucides solubles, elle diminue de moitié du stade bouton floral au stade nouaison et cette diminution est due à la fois au glucose, au fructose et au saccharose (CHERRAD et PARK, 1996).

Au stade J +8 (nouaison plus 8 jours), la phase de diminution de la teneur en amidon signalée précédemment est suivie par une phase d'augmentation qui est plus accentuée pour le Cabernet Sauvignon que pour le Merlot. On remarque en outre que les teneurs en amidon sont plus élevées dans les jeunes baies du Cabernet Sauvignon que dans celles du Merlot.

Du stade (J+8) au stade fermeture de la grappe (L) en passant par le stade K (baies de la taille d'un petit pois), il se produit une diminution lente de la teneur en amidon, mais les valeurs atteintes restent néanmoins encore assez élevées (16 à 22 mg/g MS). La teneur en glucides solubles, à l'inverse de celle de l'amidon, augmente progressivement et le glucose est le seul sucre impliqué dans cette évolution.

A partir de la fermeture de la grappe (stade L), la teneur en amidon des baies diminue rapidement jusqu'à la mi-véraison. Au contraire, la teneur en glucides solubles (glucose et fructose essentiellement) augmente beaucoup pendant cette période (elle est multipliée par 10 de J+8 à la mi-véraison), alors que la teneur en amidon diminue continuellement et régulièrement.

2) La teneur en amidon pendant la période de maturation de la baie (tableau)

Au stade mi-véraison (appelé ici stade m, ou stade 36 de EICHHORN et LORENZ, 1977), qui correspond au début de la phase de maturation de la baie, la teneur en amidon est très faible puisqu'elle ne dépasse pas 1,7 mg/g MS, alors que huit jours plus tôt (m-8) elle était encore relativement importante, de l'ordre de 5,5 mg/g MS. Elle n'a cependant pas encore atteint sa valeur minimale.

A maturité (stade N), la teneur en amidon des baies est encore un peu plus basse, mais elle n'est pas nulle, ce qui est en accord avec les observations microscopiques. A l'inverse, les glucides solubles (glucose et fructose) continuent d'augmenter dans les baies de la véraison à la maturité. Cette augmentation est considérable et les sucres qui s'accumulent pendant cette période proviennent essentiellement de la photosynthèse réalisée par les feuilles.

Si l'on exprime maintenant les teneurs en amidon par rapport à une baie, on constate que de la nouaison à la fermeture de la grappe, le contenu en amidon de cette baie évolue dans le même sens que son poids sec, comme le montre la comparaison des figures 12A et 12B. Autrement dit, la baie s'enrichit en amidon. En revanche, à partir de la véraison, la baie, malgré son augmentation de poids sec, s'appauvrit en amidon.

En définitive, la capacité des grains de raisin à synthétiser de l'amidon diminue constamment pendant toute la durée de leur croissance. Jusqu'à la fermeture de la grappe, cette capacité de synthèse reste assez élevée, ce qui indique, semble-t-il, que l'activité photosynthétique de la baie n'est pas négligeable. Par la suite, les teneurs en amidon des baies diminuent rapidement pour atteindre des valeurs très basses. Cette diminution, qui implique l'hydrolyse des granules d'amidon formés, s'explique sans doute par une baisse - ou la disparition - de l'activité photosynthétique et l'on peut alors se demander s'il existe une relation entre ce phénomène et la teneur en chlorophylle des baies.

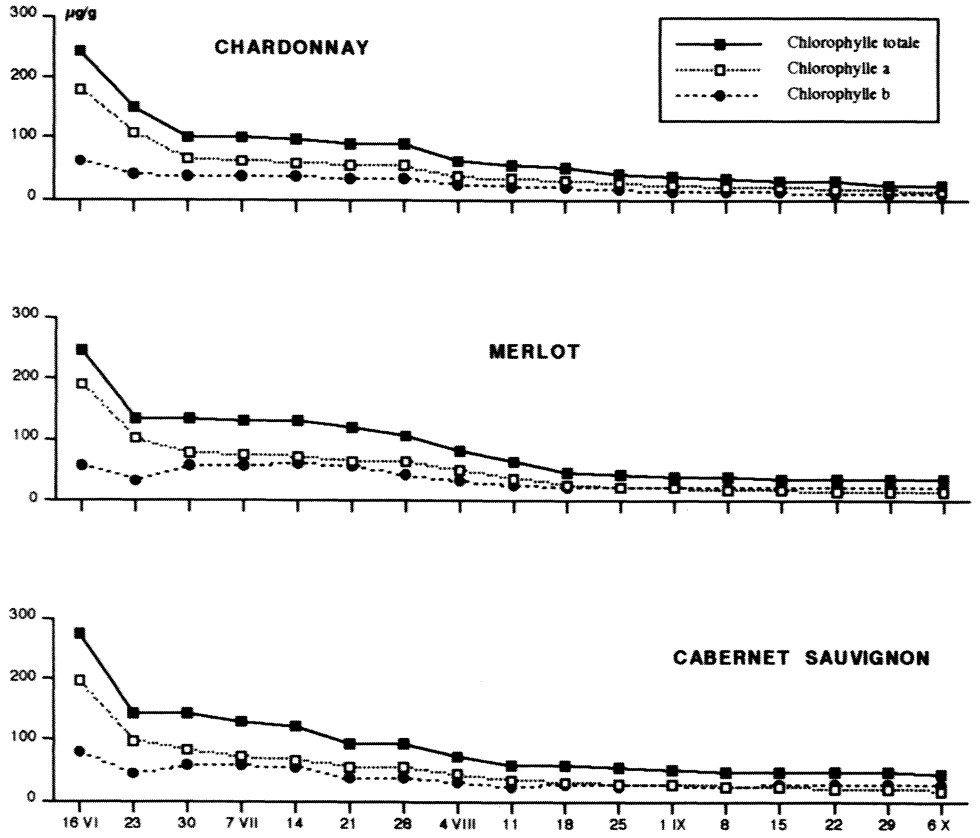


Fig. 13 — Evolution des teneurs en chlorophylle a, en chlorophylle b et en chlorophylle totale (en µg/g de matière fraîche) des pellicules des baies de Chardonnay, de Merlot et de Cabernet Sauvignon de la nouaison à la maturité.

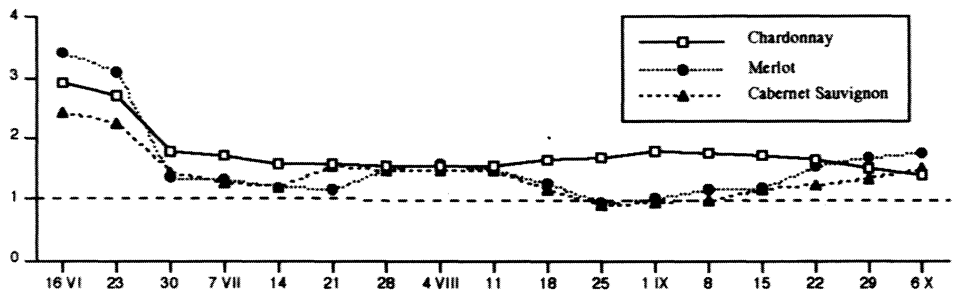


Fig. 14 — Variations du rapport chlorophylle a / chlorophylle b dans les pellicules des baies de Chardonnay, de Merlot et de Cabernet Sauvignon entre la nouaison et la maturité.

III — ÉVOLUTION DE LA TENEUR EN CHLOROPHYLLE (figures 13, 14)

Grâce aux pigments chlorophylliens localisés dans les chloroplastes, une partie de l'énergie fournie par les rayons lumineux est captée au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse et, finalement, de l'amidon est synthétisé. On sait que la chlorophylle a est présente chez tous les végétaux et que la chlorophylle b, dans laquelle un $-CH_3$ est remplacé par un -CHO, ne se rencontre que chez les algues vertes (Chlorophycées) et les végétaux supérieurs (Cormophytes).

Chez la vigne, les études sur les chlorophylles sont peu nombreuses et concernent surtout les feuilles (STOEV et SLAVTCHEVA, 1982). Il est bien connu cependant que les baies vertes contiennent de la chlorophylle et que, selon PEYNAUD (1939), les baies mûres en contiendraient également, mais on ne sait rien sur l'évolution de la teneur en chlorophylle tout au long du développement de la baie.

Pour étudier cette question, nous avons choisi trois cépages : le Merlot, le Cabernet Sauvignon et le Chardonnay.

1) Chlorophylle totale

Quel que soit le cépage, la teneur en chlorophylle totale, exprimée en µg/g, diminue de la nouaison à la véraison. Cette diminution est importante pendant la première semaine qui suit la nouaison (Δ= -92 µg/g pour le Chardonnay, -113 µg/g pour le Merlot et -132 µg/g pour le Cabernet Sauvignon) ; elle se poursuit jusqu'à la véraison mais moins intensément: en huit semaines Δ= -99 µg/g pour le Chardonnay, -87 µg/g pour le Merlot et -85 µg/g pour le Cabernet Sauvignon. Ensuite, pendant la maturation des baies, la teneur en chlorophylle reste à peu près constante pour les deux cépages noirs alors qu'elle diminue régulièrement chez le cépage blanc. Il existe donc une différence entre les cépages noirs et le cépage blanc.

2) Chlorophylle a

L'évolution de la teneur en chlorophylle a est identique pour les trois cépages de la nouaison à la maturité. Après une diminution importante, pendant la première semaine après la nouaison (Δ= -71 µg/g pour le Chardonnay, -90 µg/g pour le Merlot et -96 µg/g pour le Cabernet Sauvignon), la teneur en chlorophylle continue à diminuer jusqu'à la véraison, puis jusqu'à la maturité mais avec une intensité moindre (Δ= -17 µg/g pour le Chardonnay, -13 µg/g pour le Merlot et le Cabernet Sauvignon).

3) Chlorophylle b

Comme pour la chlorophylle a, il se produit d'abord une diminution de la teneur en chlorophylle b pendant la semaine qui suit la nouaison, mais on observe ensuite une légère augmentation suivie d'un palier pour les deux cépages noirs et aucune variation pour le cépage blanc. A partir de fin juin, pendant quelques semaines, la teneur en chlorophylle b reste constante pour les trois cépages, puis elle diminue de nouveau pendant les deux ou trois dernières semaines de la croissance. A partir de la véraison, l'évolution de la teneur en chlorophylle b est différente de celle de la chlorophylle a. Pour le cépage blanc, elle diminue régulièrement pendant la maturation alors que pour les deux cépages noirs, elle reste pratiquement constante.

4) Rapport chlorophylle a / chlorophylle b

Au cours des deux premières semaines après la nouaison, le rapport chl a /chl b diminue beaucoup pour les trois cépages. A partir de la véraison (mi-août), nous avons observé une différence nette entre le cépage blanc et les cépages noirs : alors que pour le Merlot et le Cabernet Sauvignon, le rapport diminue régulièrement et de façon identique (les deux courbes sont confondues), chez le Chardonnay, il reste à peu près constant et voisin de celui noté le 30 juin.

En définitive, l'étude des variations de la teneur en chlorophylles des baies du Merlot, du Cabernet Sauvignon et du Chardonnay au cours de leur développement, en 1994, nous conduit à distinguer trois phases dans l'évolution de la chlorophylle totale (PARK, 1995 ; PARK et DARNÉ, 1996) :

- une phase de diminution rapide pendant la première semaine qui suit la nouaison.

- une phase de diminution plus lente pendant les huit semaines suivantes, jusqu'au stade de la véraison.

- une phase, de stabilité pour les cépages noirs ou de diminution légère pour le cépage blanc, entre la véraison et la maturité des raisins.

Par ailleurs, notre étude montre que si la diminution de la teneur en chlorophylles de la baie de raisin au cours de son développement est progressive, elle ne conduit pas à leur disparition totale à la maturité. En fait, la teneur en chlorophylle totale n'évolue plus que très faiblement à partir de la véraison. Il est alors remarquable de constater qu'à ce stade (18 août), cette teneur est pratiquement la même pour les trois cépages étudiés et, qu'ensuite, elle se stabilise à une valeur deux fois plus élevée pour les cépages noirs (40 à 50 µg/g) que pour le cépage blanc chez lequel elle a continué à diminuer de 50 µg/g à 25 µg/g pendant la maturation. A la maturité, les chlorophylles sont donc bien présentes dans les baies où elles se trouvent masquées par les autres pigments.

Nous avons pu montrer par ailleurs que la présence des anthocyanes chez les cépages rouges à partir de la véraison modifiait notablement l'absorption des chlorophylles (PARK, 1995). Les anthocyanes interfèrent de façon plus importante dans le domaine des longueurs d'onde voisines de 645 nm que dans celui des longueurs d'onde proches de 663 nm. De ce fait, les teneurs calculées à partir de densités optiques lues à ces deux longueurs d'onde manquent de précision et, en raison des plus forts coefficients utilisés pour son calcul, la teneur en chlorophylle b déterminée doit être plus forte que la teneur réelle. Il en est de même de la somme chl a + chl b. Dans ce dernier cas, l'écart entre cette somme et la détermination de la chlorophylle totale à 652 nm est toujours plus important, ce qui rend compte de l'imprécision des mesures.

CONCLUSION

L'étude des plastes en microscopie, les dosages d'amidon et de chlorophylle montrent que des chloroplastes, de l'amidon et de la chlorophylle sont présents dans les baies de raisin, de la nouaison à la maturité. De plus, en ce qui concerne la diminution de l'amidon et sa disparition quasi totale à maturité, il y a concordance entre les dosages et les observations structurales et ultrastructurales.

La forte teneur en amidon pendant la période herbacée du développement de la baie, à l'époque où les chloroplastes sont bien développés et la chlorophylle abondante, semble bien montrer que les baies, à ce moment là, participent activement à la synthèse de leurs glucides, alors que pendant la période de maturation où la teneur en chlorophylle a fortement baissé, les glucides solubles qui s'accumulent massivement dans la baie proviennent essentiellement des feuilles.

La diminution de la synthèse amylacée, au cours de la croissance de la baie, paraît finalement liée à la diminution progressive de la teneur en pigments chlorophylliens qui entraîne inévitablement une diminution de l'activité des chloroplastes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M.A et G.A. ROOT, 1960. Carbohydrate content of various parts of the grape cluster. *Americ. J. Enol. Vitic.*, **11**, 137-139.

BAGGIOLINI M.,1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Rev. rom. Agric. Vitic.*, **8**, 4-6.

BOUARD J., FOUGÈRE-RIFOT M., BENHARBIT EL ALAMI N. et H.S. PARK, 1994. Sur quelques anomalies de la structure des ovules et des ovaires des fleurs de vigne en relation avec la coulure et le millerandage. *VI^e Congrès latino-américain de Viticulture et Œnologie*. 20-25 novembre 1994, Santiago du Chili, 250-257.

CARDE J.P., 1984. Leucoplasts : a distinct kind of organelles lacking typical 70S ribosomes and free thylakoids. *Europ. J. Cell Biol.*, **34**, 18-26.

CHARON J., 1983. Différenciation et fonctionnement des canaux sécréteurs dans les bourgeons du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) : étude structurale et ultrastructurale. *Thèse 3^e cycle*, Université P. et M. Curie, Paris VI, 107p.

CHENICLET C., 1984. Organisation ultrastructurale des cellules terpénogènes et composition des sécrétats terpéniques volatils : existe-t-il une relation fonctionnelle ? *Thèse 3^e cycle*, Université Bordeaux II, 131p.

CHENICLET C. et CARDE J.P., 1985. Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil : a correlative study. *Israel J. Botany*, **34**, 219-238.

CHERRAD M. et H.S. PARK, 1996. L'amidon des boutons floraux, des fleurs et des baies de Cabernet Sauvignon et de Merlot au cours du développement de la grappe, n° hors série du J. Intern. Sc. Vigne Vin, *La Viticulture à l'aube du III^e millénaire*, (à paraître).

DARNÉ G. et J. MADERO-TAMARGO, 1979. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés solubles phénoliques totaux des organes de la vigne. *Vitis*, **18**, 221-228.

EICHHORN K.W. et D. LORENZ, 1977. *Der deutsche Weinbau*, **1**.

FOUGÈRE-RIFOT M., PARK H.S. et J. BOUARD, 1995. Données nouvelles sur l'hypoderme et la pulpe des baies normales et des baies millerandées d'une variété de *Vitis vinifera* L., le Merlot noir. *Vitis*, **34**, n°1, 1-7.

HARBORNE J.B., 1973. *Phytochemical methods*. Chapman and Hall édit., London, 204-209.

HEINRICH G., 1970. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Drüsenzellen von *Poncirus trifoliata* ; zugleich ein Beitrag zur Wirkung ätherischer Öle auf Pflanzenzellen und eine Methode zur Unterscheidung flüchtiger von nichflüchtigen lipophilen Komponenten. *Protoplasma*, **69**, 15-36.

HOLDEN M., 1965. Chlorophylls. In : *Chemistry and biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin T. , Academic Press, London, 462-488.

KUNST A., DRAEGER B. et J. ZIEGENHORN, 1984. Carbohydrate, U.V. method with hexokinase and glucose-6-phosphate deshydrogenase.

in : BERGMEYER H.U., *Methods in Enzymatic Analysis, VI-metabolites 1*, Third edition, Verlag Chemie ed., Besel, 163-172.

LAVAL-MARTIN D. et P. MAZLIAK, 1979. *Physiologie végétale*. TP et TD. Collection Méthodes, Hermann édit., Paris , 20-21.

MAC KINNEY G., 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**, 315-322.

MOING A. et J.P. GAUDILLERE, 1992. Carbon and nitrogen rationing in peach/plum grafts. *Tree Physiol.*, **10**, 81-92.

PARK H. S., 1995. Le péricarpe des baies de raisin normales et millerandées : ontogenèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment des tanins. *Thèse d'université*, Université Bordeaux I, 208 p.

PARK H.S. et G. DARNÉ, 1996. Evolution des pigments chlorophylliens des baies de *Vitis vinifera* L. au cours de leur développement. n° hors série du J. Intern. Sc. Vigne Vin, *La Viticulture à l'aube du III^e millénaire*, (à paraître).

PEYNAUD E., 1939. Présence de chlorophylle dans la pellicule des raisins mûrs. *Rev. Vitic.*, **90**, 469-472.

STOEV K. et SLAVTCHEVA T., 1982. La photosynthèse nette chez la vigne (*Vitis vinifera* L.) et les facteurs écologiques. *Connaiss. Vigne Vin*, **16**, n°3, 171-185.

THIVEND P., MERCIER C. et A. GUILBOT, 1965. Dosage de l'amidon dans les milieux complexes. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, n°4, 513-526.

Manuscrit reçu le 27 septembre 1995 ;
accepté pour publication le 29 novembre 1995.