EXAMEN EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE L'INFLUENCE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES PURIFIÉES SUR LES PAROIS CELLULAIRES DES PELLICULES DE RAISINS

ELECTRONIC MICROSCOPY EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF PURIFIED ENZYMATIC ACTIVITIES ON GRAPE SKIN CELL WALL

K. AMRANI JOUTEI[1], F. OUAZZANI CHAHDI[2], D. BOUYA[3], C. SAUCIER[4] et Y. GLORIES[4]

1 : Laboratoire de biotechnologie végétale, Faculté des Sciences et techniques Saïss, B.P. 2202 route d'Imouzzer,
2 : Faculté des sciences et techniques Saïss Fès, Maroc
3 : Faculté des sciences Dhar El Mehraz, Fès, Maroc
4 : Faculté d'œnologie, 351 cours de la Libération 33 405 Talence, France

Résumé : Les observations en microscopie électroniques montrent que les enzymes pectolytiques agissent différemment sur la dégradation des parois cellulaires de la pellicule des raisins et sur la libération des tanins. PG et PL dégradent les pectines de la lamelle moyenne et de la paroi primaire et favorisent la libération principalement des tanins qui se trouvent sous forme granulaire à l'intérieur de la vacuole. La cellulase dégrade les fibres de cellulose et permet la libération des tanins liés à la paroi cellulaire, ce qui laisse supposer que ces derniers sont liés dans la paroi cellulaire à des molécules cellulosiques. La dégradation de la pellicule se fait préférentiellement en partant des cellules de la pulpe vers l'épiderme en raison de la présence d'une cuticule à la surface de la pellicule. En outre, la diffusion des tanisn reste aléatoire puisque ces observations montrent que malgré la destruction de la paroi, la cellule garde son intégrité grâce à la présence des membranes cellulaire et vacuolaire qui s'opposent à la diffusion des solutés de la vacuole vers le milieu extérieur.

Abstract: Pectolytic enzymes act differently on the degradation of the cell wall of grape skin and on the liberation of tannins. PG and PL degrade the pectin from the middle lamella and the primary wall which favours the liberation of granulate tannins present inside the vacuole only ones. Cellulase degrade the cellulose fibbers and allows the liberation of tannins bound to the cellular wall. These last ones being bound to cellulosic molecules.

Mots clés : polygalacturonase, pectinestérase, cellulase, pectine lyase, tanin, paroi cellulaire

Key words: polygalacturonase, pectinesterase, cellulase, pectin lyase, tannin, cell wall

INTRODUCTION

En œnologie, l'application des enzymes pectolytiques à la dégradation des parois cellulaires a particulièrement retenu l'attention des chercheurs et des techniciens essentiellement pour la libération de la matière colorante. Des études récentes ont montré que les enzymes dites extractrices de couleur étaient peu actives vis à vis des anthocyanes (AMRANI JOUTEI, 1995). Par contre, les enzymes pectolytiques sont susceptibles de faciliter l'extraction des tanins en raison de leur localisation dans les cellules de la pellicule. Les tanins liés aux parois cellulaires sont les plus touchés par cette libération. En outre, ces enzymes sont souvent sujettes à des inhibitions de la part de substances déjà présentes dans le raisin en particulier les procyanidines qui passent dans le milieu (AMRANI JOUTEI, 1993).

A partir de ces résultats, nous avons tenté de déterminer l'influence des différentes préparations commerciales sur la dégradation de la paroi cellulaire de la pellicule et son incidence sur la libération des composés phénoliques lors de la vinification. Les différentes activités étudiées sont la polygalacturonase (PG), la pectine-lyase (PL) et la cellulase (Cx).

*Correspondance : khalidamrani@yahoo.fr

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2003, **37**, n°1, 23-30
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

Inclusion des échantillons : Des fragments de pellicules du cépage Merlot qui ont macéré pendant 2 jours dans des solutions contenant différentes préparations (activités) enzymatiques sont prélevés puis fixés pendant 2 heures à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans une solution tampon de Sorensen 0,1 M à pH 7,2 (phosphate monopotassique et disodique) ; les échantillons sont ensuite rincés plusieurs



Fig. 1 - Microscopie électronique à transmission de pellicules : répartition des tanins dans les différentes parties et gradient de condensation le long de la pellicule
Cu : cuticule, Ta : tanins sous forme d'amas, Tg : tanins granuleux, pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of grape berry skin : distribution of tannins in the various parts and gradient of condensation along the skin
Cu : cuticle, Ta : tannins under heap shape, Tg : granulate tannins, pc : cell wall, lm : middle lamella

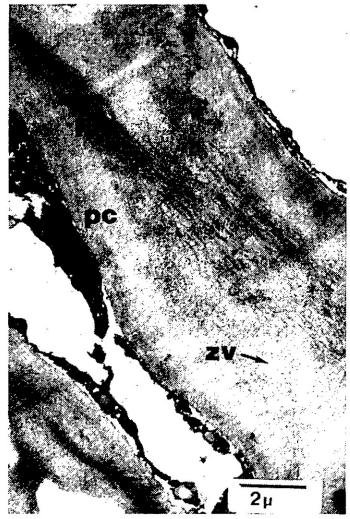


Fig. 3 - Microscopie électronique à transmission de pellicules de raisins mûrs ; formation de zones vides entre les cellules
pc : cell wall, lm : lamelle moyenne, zv : zone vide

Transmission electronic microscopy of mature grapes skin : forming of empty zones between cells
pc : cell wall, lm : middle lamella, zv : empty zone

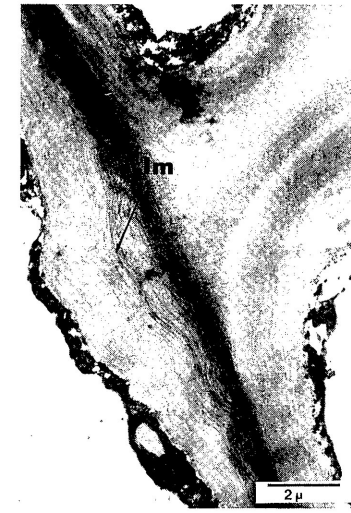


Fig. 2 - Microscopie électronique à transmission de pellicules ; présence de lamelle moyenne sous forme de fibrilles
lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of berry skin : presence of middle lamella under fibrillare shape
lm : middle lamella

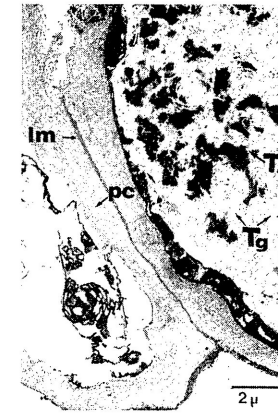


Fig. 4 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la polygalacturonaseDégradation de la paroi primaire et subsistance de la lamelle moyenne. Présence de tanins à l'intérieur de la vacuole
Ta : tanins sous forme d'amas, Tg : tanins granuleux, pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with the polygalacturonase. Degradation of the primary wall and subsistence of middle lamella. Presence of tannins inside the vacuole
Ta : tannins under heap shape, Tg : granulate tannins, pc : cell wall, lm : middle lamella

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

fois dans le même tampon, post-fixés 2 h à 4 °C dans une solution de tétroxyde d'osmium à 0,1% et rincés à nouveau plusieurs fois dans le tampon. Ils sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol présentant des concentrations croissantes de 40 à 95 % vol jusqu'à trois bains d'éthanol absolu. Après passage intermédiaire par l'oxyde de propylène, ils sont enfin inclus dans une résine époxyde (épon 812).Des coupes ultrafines contrastées par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb sont recueillies et observées avec un microscope électronique à transmission JEOL 1200EX.

II - INFLUENCE DES ENZYMES DE MACÉRATION SUR LA LIBÉRATION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les baies de Cabernet-Sauvignon sont prélevées au cours de la maturation en 1999 dans la région de Meknès puis éclatées manuellement afin de séparer les pellicules du reste de la baie. 20 g de poids frais de ces pellicules intactes sont ensuite lavés à l'eau distillée et mis à macérer pendant 6 jours (144 heures) dans 80 ml d'une solution aqueuse à 5 g/l d'acide tartrique neutralisée à pH 3,4 avec du NaOH (1N) et contenant les différentes activités enzymatiques (cellulase (Cx), endo-polygalacturonase (PG) et pectine lyase (PL) (respectivement SIGMA ref C1184, P3429 et P7052). La pectine methyl estérase PME est ajoutée avec la PG pour permettre une déméthylation des acides polygalacturoniques. Les différentes combinaisons et les concentrations des activités enzymatiques utilisées sont :

(I)- Témoin
(II) - Cx 5 g/hl
(III) -PG + PME : 1 g/hl + 3 g/hl
(IV) -PG + PME + Cx : 1 g/hl + 3 g/hl + 5 g/hl
(V) -PL : 1 g/hl (VI) - PL + Cx : 1 g/hl + 5 g/hl

Au cours de la macération, des prélèvements sont effectués régulièrement, la teneur en tanins est déterminée par le dosage selon la méthode de RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966 et celle des anthocyanes est déterminée par la méthode RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1965). L'indice de gélatine qui représente l'affinité des tanins vis à vis des protéines est déterminé selon la méthode de GLORIES (1978). Les résultats exprimés représentent la moyenne de 3 expérimentations.

RÉSULTATS

I - OBSERVATION DES COUPES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION

Dans un précédent article (AMRANI JOUTEI *et al.*, 1994), nous avons montré l'existence de 4 types de tanins dans la pellicule de raisin : tanins granulaires, tanins sous forme de gros amas, tanins liés à la paroi cellulaire et tanins liés à la membrane vacuolaire. La figure 1 montre la répartition des tanins dans les différentes parties de la pellicule avec un gradient de densité de ces molécules allant de la base jusqu'à la surface pour former dans la couche épidermique des amas de grandes tailles. La paroi cellulaire est épaisse et présente la structure typique des parois végétales à savoir une lamelle moyenne souvent épaisse séparant deux cellules contiguës et des microfibrilles de cellulose parallèles les unes aux autres. Des fibrilles de pectines peuvent également être observées dans la lamelle moyenne (fig. 2). En outre, à maturité, la paroi des pellicules de raisins présente souvent une certaine fragilisation marquée par le début de dissolution de la lamelle moyenne ce qui entraîne la formation de zones vides entre les cellules (fig. 3).

Par contre, les coupes de pellicules macérées en présence des enzymes permettent les observations suivantes : en présence de polygalacturonase PG seule, on constate que la dégradation de la paroi se réalise en délitant les structures pariétales en lamelles parallèles les unes aux autres (fig. 4). Ces fibres sont probablement de nature cellulosique si on considère que PG agit principalement sur les zones homogalacturonanes de la paroi cellulaire. Dans ces conditions, la zone de jonction entre deux cellules constituée par la lamelle moyenne est rarement affectée en dépit d'une dégradation très importante de la paroi cellulaire primaire (fig. 4) ce qui laisse supposer que les pectines de la lamelle moyenne ont une nature différente de celle de la paroi primaire. En outre, la présence conjointe de PG et de PME entraîne également la dégradation de la lamelle moyenne avec souvent disparition de cette celle ci (fig. 5). Les mêmes résultats sont obtenus en utilisant la pectine-lyase (PL) (fig. 6). Mais il arrive par-

Tableau I - Détermination de l'indice de gélatine des extraits de pellicules après 144 heures de traitement avec PG, PL et Cx

Determination of gelatine index on grape berry skin extract after treatment with PG, PL and Cx

Témoin	PG + PME	PG + PME + Cx 1g/hl	PG + PME + Cx 5 g/hl	PL	PL + Cx 1 g/hl	PL + Cx 5 g/hl
51	50	41	35	50	48	40

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2003, **37**, n°1, 23-30
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

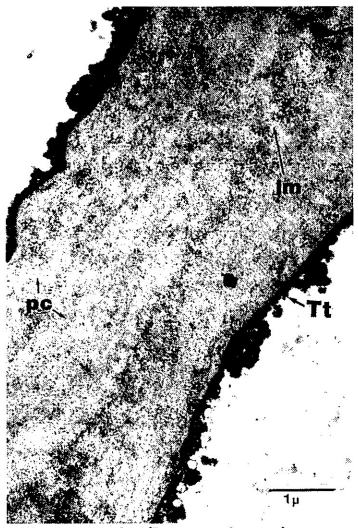


Fig. 5 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la polygalacturonase et la pectin methyl estérase. Dégradation de la paroi primaire et de la lamelle moyenne

pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne, Tt : tanins liés au tonoplaste

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with the polygalacturonase and pectin methyl esterase. Degradation of the primary wall and the middle lamella.

pc : cell wall, lm : middle lamella, Tt : tannins bound to tonoplaste

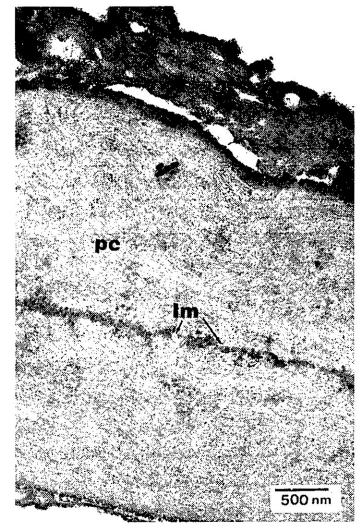


Fig. 6 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la pectine lyase. Dégradation de la paroi primaire et de la lamelle moyenne

pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with the pectine lyase. Degradation of the primary wall and the middle lamella

pc : cell wall, lm : middle lamella



Fig. 7 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la polygalacturonase et la pectine methyl estérase. Dégradation de la lamelle moyenne et formation d'une zone vide

pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne, zv : zone vide

Ttransmission electronic microscopy of berry skin treated with polygalacturonase and pectin methyl esterase. Degradation of the middle lamella and forming of empty zones

pc : cell wall, lm : middle lamella, zv : empty zone

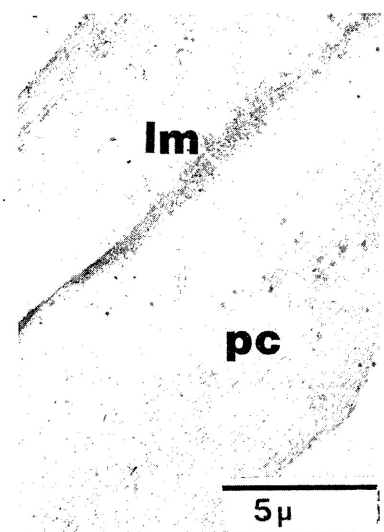


Fig. 8 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la cellulase. Dégradation de la paroi primaire et persistance de la lamelle moyenne

pc : paroi cellulaire, lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with cellulase. Degradation of the primary wall and subsistence of the middle lamella

pc : cell wall, lm : middle lamella

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

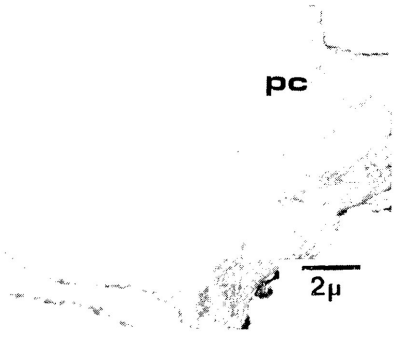


Fig. 9 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la polygalacturonase, la pectine methyl estérase et la cellulase. Dégradation de la paroi primaire et de la lamelle moyenne
Pc : paroi cellulaire

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with polygalacturonase, pectin methyl esterase and cellulase. Degradation of the primary wall and the middle lamella
Pc : cell wall

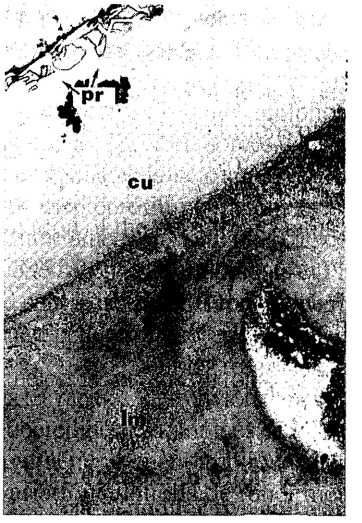


Fig. 10 - Microscopie électronique à transmission de pellicules traitées avec la pectine lyase. Dégradation de la lamelle moyenne et persistance de la couche cuticulaire
Cu : cuticule, pr : pruine, lm : lamelle moyenne

Transmission electronic microscopy of berry skin treated with pectine lyase. Degradation of middle lamella and subsistence of cuticulare layer
Cu : cuticle, pr : bloom, lm : middle lamella

fois qu'une petite zone de la lamelle moyenne (fig. 7) soit encore visible, cette dernière subit une dégradation avec formation d'une zone vide entre deux cellules rappelant les zones vides observées dans la paroi cellulaire des raisins à maturité (fig. 3)

Les résultats concernant la cellulase (Cx) différent de l'action des PG et PL. On constate dans ces conditions une diminution de la cohésion entre les fibres de cellulose au voisinage de la lamelle moyenne et une diminution de la densité des structures dans cette région. (fig. 8). Cependant, dans les parties internes (voisinage de la cellule), la densité importante de la paroi et la cohésion élevée entre les fibrilles de cellulose laissent supposer une dégradation faible voire inexistante de la paroi primaire. Des observations identiques ont été faites chez la pomme et la poire par BEN-ARIE et KISLEV (1979)

En outre, lorsque les deux enzymes sont ajoutées en même temps (Cx et PG ou Cx et PL), on a dégradation de la lamelle moyenne mais également de la paroi cellulaire. En plus, la paroi perd de son intensité et des microfibrilles apparaissent (fig. 9).

Il faut noter que ces activités se manifestent principalement dans les régions profondes de la pellicule et que les parois cellulaires de l'épiderme ne sont souvent pas affectées. Mais lorsque les teneurs en enzymes augmentent (20 g/hl de PG), même les régions épi-

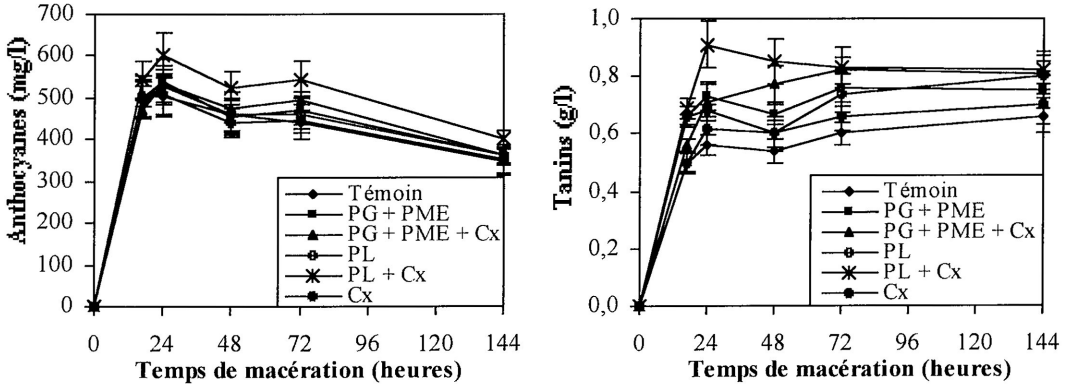


Fig. 11 - Influence des PG, PL et Cx sur l'extraction des tanins et des anthocyanes de pellicules de raisins
PG : Plygalacturonase, PL : Pectine lyase, Cx : Cellulase, PME, Pectine methylestérase

Influence of the PG, PL and Cx on the extraction of tannins and anthocyanins of grape berry skin
PG : Plygalacturonase, PL : Pectine lyase, Cx : Cellulase, PME, Pectine methylestérase

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2003, **37**, n°1, 23-30
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

dermiques sont touchées avec les mêmes caractéristiques de dégradation observées précédemment.

En plus, la cuticule qui couvre la totalité de la couche épidermique est formée conformément aux observations de RAJAEI (1987) de deux régions de densité différentes et surmontée d'une cire cuticulaire et d'une pruine (fig. 10). Cette couche cuticulaire n'est jamais touchée par les enzymes pectolytiques et garde son aspect naturel malgré la dégradation totale de la paroi cellulaire sous jacente (fig. 10) ce qui explique le fait que lors de la macération elle constitue une barrière au passage des solutés des régions profondes vers l'extérieur et à l'entrée des enzymes du milieu extérieur vers l'intérieur de la pellicule. Il faut ajouter à cela que les cellules dont les parois cellulaires sont dégradées par les enzymes gardent souvent une membrane cellulaire intacte avec présence de tanins à l'intérieur des vacuoles (fig. 4, 5, 7 et 10) et de tanins liés à la membrane vacuolaire.

II - INFLUENCE DES DIFFÉRENTES ACTIVITÉS (PG, PL ET CX) SUR LA LIBÉRATION DE LA MATIÈRE COLORANTE

La figure 11 montre que l'extraction des anthocyanes n'est pas améliorée lorsqu'on utilise la PG, la PL ou la Cx. En outre, comme il a déjà été démontré précédemment (Amrani Joutei et Glories 1994), on observe une diminution de la cinétique de diffusion des anthocyanes au cours du temps probablement due aux phénomènes d'adsorption de ces molécules sur les parties solides du milieu. Par contre, pour les tanins, ces activités entraînent une extraction plus importante par rapport au témoin et cette extraction diffère selon l'activité considérée ; en effet, contrairement à la Cx qui n'améliore que faiblement la diffusion, la PL et la PG + PME permettent une plus grande extraction, certainement en raison d'une plus importante dégradation de la paroi. Les tanins extraits dans ce cas sont principalement sous forme granulaire situés à l'intérieur des vacuoles, alors que les tanins-polysaccharides sont extraits d'une façon moins importante puisque l'indice de gélatine demeure important (tableau I). En effet, plus les tanins sont liés et plus l'indice de gélatine est faible.

Lorsqu'on ajoute à ces activités la cellulase Cx, on constate une augmentation de l'extraction des tanins et un peu celle des anthocyanes. Là aussi, on constate que la différence entre la PG et la PL, additionnées avec les cellulases, est faible. Cependant on ne remarque pas de différences significatives entre les courbes d'extraction des tanins lorsque Cx est utilisée à des doses de 5 g/hl ou à 1 g/hl (résultats non présentés pour des raisons de clarté des figures). Néanmoins, l'indice de gélatine déterminé après 144h de macération (tableau I) montre que la Cx à 5 g/hl entraîne une diminution de l'indice de gélatine d'une façon très importante alors qu'à 1 g/hl la diminution est faible. Sans la Cx, les valeurs de l'indice de gélatine sont pratiquement identiques que pour le témoin. Si on considère que la cellulase dégrade la cellulose favorisant ainsi la libération des complexes T-P et par la suite entraînant la diminution de l'indice de gélatine, on peut supposer que les tanins se trouvent liés dans les parois cellulaires avec les structures cellulosiques.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Lors de la vinification en rouge, nous avons montré dans un précédent article (AMRANI JOUTEI et GLORIES, 1995) que l'utilisation des enzymes pectolytiques pour la libération des composés phénoliques se heurte à un certain nombre de problèmes : en effet, si ces enzymes n'ont aucune influence sur l'extraction des anthocyanes, elles restent néanmoins importantes pour la diffusion des tanins aussi bien des pellicules que des pépins, ces derniers sont en effet capables de libérer leurs tanins en présence de tout facteur susceptible de dégrader la paroi cellulaire. En outre on sait que la paroi cellulaire primaire est constituée de fibrilles de cellulose (ALBERSHEIM *et al.*, 1973) et de substances pectiques (ALBERSHEIM *et al.*, 1960) qui sont les principaux constituants de la lamelle moyenne où ils peuvent se présenter sous forme fibrillaire (COLVIN et LEPPARD, 1973; HANKE et NORTHCOTE, 1975).

La microscopie électronique à transmission montre que la dégradation des parois cellulaires des pellicules macérées en présence d'enzymes pectolytiques dépend des activités utilisées : La PG seule permet la solubilisation de la paroi primaire alors que son action est moins marquée sur la lamelle moyenne principalement dans les régions épidermiques. En association avec la PME ou en présence de PL, on assiste à la dégradation de la paroi primaire mais également de la lamelle moyenne. Ces deux activités entraînent dans ces conditions la dégradation des structures pectiques laissant en place les fibrilles de cellulose alignées tout au long de la paroi.

La Cx ne conduit pas aux mêmes résultats ; On observe la dégradation de la paroi cellulaire primaire dans les régions avoisinant la lamelle moyenne avec parfois une faible dégradation de cette dernière. L'activité b glucosidase qui en est responsable est inhibée par les tanins (AMRANI JOUTEI, 1993).

Dans les conditions naturelles, la microscopie électronique à transmission montre également une dégradation de la lamelle moyenne sans perturbation de la paroi cellulaire. Vu les résultats obtenus en présence des enzymes, on suppose que le début de fragilisa-

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

tion de la paroi cellulaire des raisins commence avec une dégradation d'abord de la lamelle moyenne réalisée par les activités pectolytiques endogènes secrétées par les raisins. Ces résultats confirment ceux obtenus par AMRANI JOUTEI et GLORIES 1994 qui ont observé une fragilisation de la paroi cellulaire des pellicules de raisins au cours de la maturation avec diminution des teneurs en protopectines et en pectines totales et augmentation des teneurs en activités PG, PME et protéase.

En outre, il apparaît clairement en accord avec d'autres résultats (AMRANI JOUTEI, 1993; DUCRUET, 2000) que les enzymes agissent préférentiellement en partant des cellules de la pulpe vers l'épiderme ; les pellicules possèdent une cuticule souvent épaisse sur leur face externe et cette cuticule qui est de nature lipidique, n'est pas affectée par les enzymes pectolytiques et demeure intacte en leur présence. La diffusion des solutés se fait donc préférentiellement par la face interne des pellicules et l'attaque enzymatique est facilitée également par cette même voie.

Les mêmes observations en microscopie électronique n'ont jamais permis de montrer la présence de pores visibles dus à l'action enzymatique (DUCRUET, 2000) malgré l'utilisation de concentrations élevées. Nos observations montrent que la désorganisation de la paroi ne se fait pas localement sous forme de pores, mais plutôt d'une façon uniforme et continue sur toute la longueur de la paroi comme le montre la figure 9.

D'un autre côté, même en présence d'enzymes, la libération des tanins reste aléatoire. En effet, les tanins qui se trouvent sous forme granulaire à l'intérieur des vacuoles diffusent à travers la paroi cellulaire fragilisée, et les tanins liés aux parois cellulaires sont également libérés en partie dans le milieu. Par contre, les observations en microscopie électronique montrent que malgré la destruction de la paroi cellulaire, la cellule garde une certaine intégrité grâce à la présence de la membrane cellulaire et cette dernière s'oppose à la diffusion des constituants situés à l'intérieur des vacuoles. C'est ainsi que les tanins liés aux membranes vacuolaires et les tanins qui se trouvent sous forme de gros amas dans la vacuole restent bloqués à l'intérieur de la cellule en l'absence d'une rupture mécanique ou enzymatique de la membrane cellulaire (fig. 4, 5 et 6) ; l'utilisation des phospholipases de Botrytis cinerea permettent une augmentation de l'extraction de la couleur en agissant sur la dégradation des structures phospholipidiques des membranes (MOREL, 1986).

Ces résultats sont confirmés par l'influence de ces différentes activités sur la diffusion des tanins et des anthocyanes qui montre que les teneurs en anthocyanes ne sont pas influencées par ces différentes activités et que celles des tanins au contraire sont améliorées d'une manière différente selon l'activité et le mélange considérés ; en effet, la Cx seule a une influence négligeable alors que la PL ou la PG permettent une plus grande extraction. L'ajout de la Cx à l'une ou à l'autre de ces activités améliore généralement la diffusion. Dans ce cas, le processus mis en œuvre est relativement simple, la cellulase nécessite la présence dans le milieu d'autres activités enzymatiques pectolytiques qui fragilisent les structures pectiques de la paroi lui permettant ainsi d'accéder aux fibres de cellulose.

Il faut noter également que ces travaux montrent un intérêt œnologique important de l'activité PL. Cette dernière n'étant pas présente en quantités suffisantes dans les préparations industrielles il serait intéressant de revoir la composition de ces préparations vis à vis de cette activité.

Tous ces résultats nous amènent à conclure que les enzymes pectolytiques favorisent la libération des tanins qui se trouvent sous forme granulaire (de faible poids moléculaire) à l'intérieur de la vacuole puisque les indices de gélatines sont élevés dans ces cas, alors que les cellulases favorisent la libération des tanins liés aux parois cellulaires entraînant une baisse considérable de l'indice de gélatine même si les teneurs en tanins extraites ne diffèrent pas beaucoup des témoins non enzymés. Dans ces conditions, on peut supposer que les tanins liés à la paroi cellulaire font partie de la constitution de la paroi primaire en formant des liaisons avec les molécules cellulosiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBERSHEIM P., BAUER WD, TALMADGE KW, 1973. The structure of the wall of suspension cultured sycamore cells. *In F Loewus, ed. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides*. Academic Press, New York.

ALBERSHEIM P., MUHLETHALER K., A FREY-WYSSLING, 1960. Stained pectin as seen in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 501-506.

AMRANI JOUTEI K. ET GLORIES Y., 1994 . Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, n°4, 303-317.

AMRANI JOUTEI K. ET GLORIES Y., 1995. Tanins et anthocyanes : localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev. Fr Œnol.*, **153**, 28-31.

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

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

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

BEN-ARIE R. and KISLEV N., 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiol.*, **64**, 197-202.

COLVIN JR, LEPPARD GG, 1973. Fibrillar, modified polygalacturonic acid I, on and between plant cell walls. *In F Loewus*, ed. Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides. Academic Press, New York.

DUCRUET J., 2000. Étude des protéines du vin rouge. Mécanismes d'action d'enzymes de macération sur le raisin rouge. *Thèse de Doctorat*, Université de Bordeaux II.

GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse doctorat d'état*, Université de Bordeaux II .

HANKE DE, NORTHCOTE DH, 1975. Molecular visualization of pectin and DNA by ruthenium red. *Biopolymers*, **14**, 1-17.

MOREL Bruno, 1986. Étude d'une phospholipase se *Botrytis cinerea*. Mémoire de DEA. Institut d'œnologie. Université de Bordeaux II.

RAJAEI H., 1987. Changements cytochimiques et ultrastructuraux des parois cellulaires de la pellicule du raisin, *Vitis vinifera*, durant la croissance et la maturation de la baie. *Can. J. Bot.*, **65**, 1343-1355.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 2649-2652.

RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie analytique*, **48**, n° 4, 188.

Manuscrit reçu le 5 juillet 2002 ; accepté pour publication le 5 décembre 2002

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)