UTILISATION DE L'ANALYSE D'IMAGE POUR L'ÉTUDE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE LA PELLICULE DE BAIE DE RAISIN (*VITIS VINIFERA* L., CV CABERNET FRANC)

USE OF IMAGE ANALYSIS FOR THE STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE GRAPE BERRY SKIN (*VITIS VINIFERA* L., CV CABERNET FRANC)

M. CHEVALIER[1], Émilie PERROCHON[2], A. CLEMENT[3], Anne-Laure DUBOT[2], Marie TELLIER[1], Y. CADOT[2] et G. BARBEAU[2]

1 : Institut National de la Recherche Agronomique,
Unité d'amélioration des espèces fruitières et ornementales, 49071 Beaucouzé cedex
2 : Institut National de la Recherche Agronomique, Unité expérimentale Vigne et Vin,
49071 Beaucouzé cedex
3 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Automatisés. Institut universitaire de Technologie,
dép. G.E.I.I. 4, bd Lavoisier B.P. 42018, 49016 Angers cedex France

Summary : The localization and quantitative determination of phenolics in grape berry skins, from the onset of veraison, constitute the first step to understand the evolution of these compounds throughout the maturation process. Histological techniques are appropriate to study the evolution of phenolics but manual countings are long and drudgery and do not allow for reliable quantitative results. The image analysis software "Scion Image" proved to be a good tool to improve the quantitative results. This method permitted also to measure the cells area and the area occupied by phenolic compounds inside the vacuoles. Image analysis could be helpful to the understanding of the evolution of phenolics during maturation and possibly contribute to explain their extraction during maceration.

Mots clés : raisin, analyse d'image, composés phénoliques, histologie, pellicule.

Keys words: grape berry, image analysis, phenolic compounds, histology, grape berry skin.

INTRODUCTION

Les composés phénoliques sont connus pour leur rôle dans l'élaboration de la qualité des vins rouges. Ils sont essentiellement localisés dans la pellicule de la baie de raisin au niveau des vacuoles et des parois (AMRANI JOUTEI, 1994) et dans les pépins (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Dans les vacuoles des cellules de la pellicule, ils peuvent prendre des aspects différents. (AMRANI-JOUTEI, 1993 ; FOUGÈRE-RIFOT *et al.*,1995).

L'observation de coupes histologiques effectuées dans la pellicule de baies de raisin, cv Cabernet franc, prélevées entre véraison et véraison + 20 jours et colorées au bleu de toluidine, permet de distinguer deux grands types de cellules : des cellules sans précipité vacuolaire et des cellules où la vacuole renferme des granulations correspondant aux composés phénoliques (OLLAT *et al.*, 2002). Les composés phénoliques précipitent sous différentes formes après fixation au glutaraldéhyde (RAJAEI, 1987 ; PARK 1995) et peuvent être classés sous quatre formes principales (AMRANI-JOUTEI, 1994) : dilués dans la vacuole, granuleux plus ou moins fins répartis uniformément dans la vacuole, petits amas sphériques accolés au tonoplaste et gros amas sphériques répartis librement dans la vacuole. Le comptage manuel de ces cellules permet de montrer que le nombre de cellules sans polyphénols ne varie pas au cours du temps; par contre, les polyphénols dilués se condensent progressivement pour donner des polyphénols finement granuleux, qui eux-mêmes se condenseront pour donner des polyphénols petits sphériques puis gros sphériques (BARBEAU *et al.*, 2001).

Les comptages manuels sont longs et fastidieux; il est difficile d'obtenir des résultats quantitatifs fiables. L'objet de la présente étude est de tester une nouvelle méthode utilisant le logiciel d'analyse d'image Scion Image . Cette méthode permet de suivre l'évolution du nombre et de la surface des cellules de la pellicule au

*Correspondance : cvlr@angers.inra.fr

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2003, **37**, n°1, 61-65

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

cours de la maturation , d'observer leur contenu en polyphénols et de mesurer la surface occupée par ceux-ci.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'étude de l'évolution des composés phénoliques au cours du temps est réalisée sur une parcelle de vigne située à Turquant près de Saumur (Anjou, France). Des baies de raisin, de variété Cabernet franc, ont été prélevées régulièrement (début véraison, mi-véraison, fin véraison et mi-véraison + 20 jours) au cours de l'été 1999.

Les fragments de pellicule ont été découpés dans la zone équatoriale de la baie de raisin. Ces fragments ont ensuite été fixés par une solution de glutaraldéhyde à 4 % dans du tampon phosphate 0.1 M, pH 7.4, durant deux heures sous vide à 4 °C. Les échantillons ont été déshydratés puis inclus dans la résine Technovit 7100 (KROES *et al.*,1998).

Les coupes de 1.5 µm d'épaisseur ont été obtenues avec un microtome LEICA RM 2165. puis colorées au bleu de toluidine à 0.5 % durant 90 secondes, rincées à l'eau distillée et montées dans l'histolaque. Les

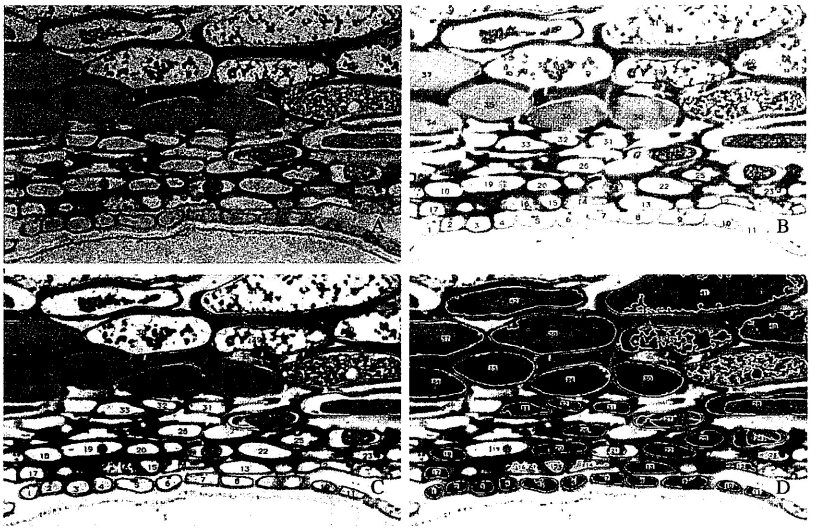


Fig. 1 - Mesure de la surface des cellules et des polyphénols vacuolaires

A : Image initiale en couleur ; B : Image en niveaux de gris : les cellules sont numérotées pour faciliter les mesures ; C : On redessine manuellement le contour de chaque cellule, en respectant l'ordre de numérotation des cellules ; D : Les couleurs permettent de classer les cellules en fonction de leur contenu

Area measurement of cells and vacuolar polyphenolic compounds

A : Initial colour image ; B : Black and White image; cells are numbered to facilitate the measurements ; C : Every cell outlines are manually drawn, following their cell numbering order ; D : Colours allow to class the cells according to their content

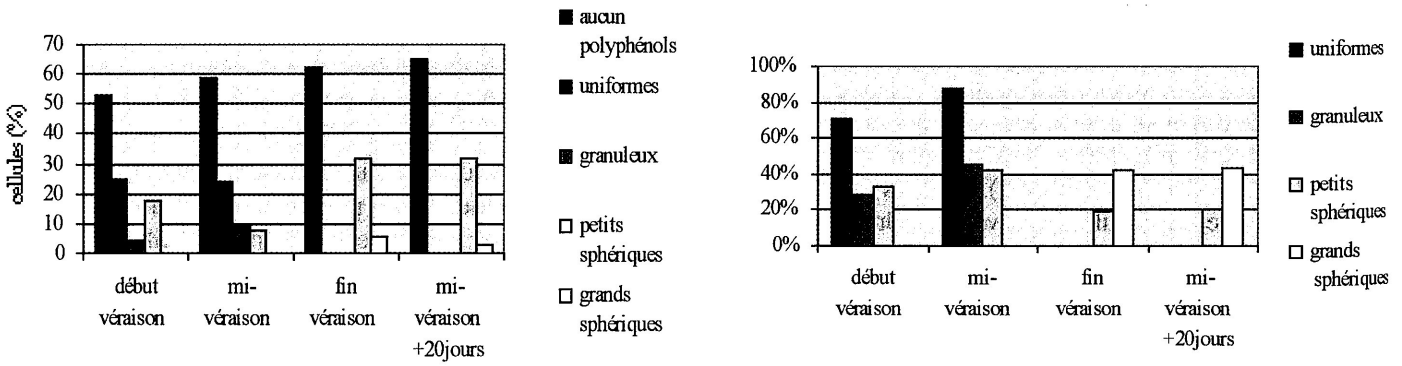


Fig. 2a - Evolution du nombre de cellules en fonction de leur contenu en polyphénols

(comptage réalisé sur 100 cellules de pellicule de baie de raisin)

Évolution de la surface des composés phénoliques par type

(mesures réalisées sur 100 cellules de pellicule de baie de raisin)

Fig. 2a - Cell number evolution according to their phenolic content

(counting are realised on 100 cells of grape berry skin)

Évolution of the area of phenolic compounds by type

(measurement are realised on 100 cells of grape berry skin)

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

observations sont réalisées sur un microscope Olympus BH2/RFCA. Les images sont acquises par une caméra tri-CCD (SONY, modèle DXC-390 PAL) et enregistrées dans la mémoire de l'ordinateur. Les photos sont ensuite étudiées via le logiciel d'analyse d'image NIH image – Scion Image (Scion corporation).

Les images pouvant être calibrées, les mesures de surface des cellules sont exprimées en μm^2. Lors de la prise photo, le logiciel décompose l'image en deux : une image en noir et blanc (transformation du plan R, V, B, en une image de luminance) et un index couleur (fig. 1A). Toutes les mesures sont effectuées sur l'image en niveaux de gris (fig. 1B). Les contours des cellules sont redessinés manuellement, ce qui permet de mesurer leur surface, parois exclues (fig. 1C). Sur la photo en noir et blanc, les composés phénoliques sont noirs alors que le suc vacuolaire reste clair. L'opérateur attribue une couleur spécifique au suc vacuolaire selon la typologie des composés phénoliques (fig. 1D, rouge = cellules sans polyphénols, vert = polyphénols dilués, bleu foncé = polyphénols granuleux, jaune = polyphénols condensés en petits amas sphériques, bleu clair = polyphénols sous forme de grands amas sphériques). Il est ensuite possible de mesurer la surface occupée par les composés phénoliques par différence entre la surface totale de la cellule et la surface coloriée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La mesure de la surface des cellules, sur des coupes histologiques, a permis de suivre l'évolution de la taille de cellules de baies de raisin de variété Cabernet franc, au cours de l'été 1999. Celle-ci augmente au cours de la maturation, à la suite d'une arrivée massive de sucres dans les cellules. Ainsi que l'a montré OLLAT (2002), cette croissance est surtout tangentielle.

La répartition des composés phénoliques dans les cellules évolue au cours de la maturation de la baie de raisin (figure 2a). Le nombre de cellules sans polyphénols varie de façon peu significative au cours du temps. Jusqu'à la mi-véraison, les cellules à polyphénols dilués sont majoritaires et l'on observe quelques cellules à polyphénols granuleux. Les polyphénols petits sphériques sont surtout présents dans les cellules en fin de véraison ; à ce moment les polyphénols grands sphériques commencent seulement à apparaître.

L'évolution de la surface occupée par les composés phénoliques dans les cellules est suivie au cours de la maturation de la baie (figure 2b). Les polyphénols dilués occupent une grande majorité de la surface de la cellule (plus de 70 %). La surface occupée par les polyphénols granuleux reste à peu près constante entre début véraison et mi-véraison. La surface occupée par les polyphénols petits sphériques diminue légèrement entre mi-véraison et fin véraison alors que la surface des cellules augmente, les sphères de polyphénols n'augmenteraient donc pas en taille. Quand ils sont présents, les polyphénols grands sphériques occupent toujours une surface importante de la cellule (40 %).

L'analyse d'image permet de suivre aisément l'évolution des composés phénoliques de la pellicule de la baie au cours de la maturation du raisin, tant sur le plan de leur typologie que sur la surface qu'ils occupent dans les cellules. Cette méthode pourrait aider à mieux comprendre l'extractibilité des polyphénols durant la macération.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMRANI-JOUTEI K., 1993. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin. Étude de leurs extractibilité. *Thèse* de doctorat, Université de Bordeaux II, 125 p.

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

BARBEAU G., CHEVALIER M., DUBOT A-L, CHOLOUX S., TELLIER M. et CADOT Y., 2001. Mise au point d'un protocole d'étude histologique des polyphénols de la pellicule de la baie de raisin durant la maturation. *Congrès du GESCO*, Montpellier, 3-6 juillet 2001, 655-656.

CLEMENT A., 2002. Algorithmes et outils informatiques pour l'analyse d'images couleur – Application à l'étude de coupes histologiques de baies de raisin en microscopie optique. *Thèse* de Doctorat, Université, Angers, France.

FOUGERE-RIFOT M., PARK H.S. et BOUARD J., 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**, 1, 1-7.

HARBERTSON J.F., KENNEDY JA et ADAMS D.O., 2002. Tannins in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot noir berriesduring ripening. *Am. J. Œnol. Vitic.*, **53**, 1, 54-59.

KROES G.M.L., BAAYEN R.P. and LANGEN W., 1998. Histology for root of flax seedlings (*Linum usitatissimum*) infected by *Fusarium ascyoparum* f.s.p. lini. Eur. *J. Plant Pathol.*, **104**, 725-736

OLLAT N., DIAKOU-VERDIN P., CARDE J..P., BARRIEU F., GAUDILLERE J.P., MOING A., 2002. Grape berry development : a review. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, **36**, 3, 109-131

PARK H.S., 1995. Le péricarpe des baies de raisin et millerandées : ontogénèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment les tanins. *Thèse* Université, Bordeaux I, 209 p.

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**, 7, 1343-1345.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)