

# Activité polygalacturonase et maturation chez la poire (*Pyrus malus*, cv. Passe Crassane).

A. ATTIBAYEBA et C. HARTMANN\*

ACTIVITE POLYGALACTURONASE ET MATURATION CHEZ LA POIRE (*PYRUS MALUS*, cv. PASSE CRASSANE).

A. ATTIBAYEBA et C. HARTMANN.

*Fruits*, Oct. 1985, vol. 40, n° 10, p. 665-668

RESUME - Chez la poire Passe-Crassane l'activité polygalacturonase [poly (1-4  $\alpha$ -D galacturonide) glycanohydrolase ; EC : 3.2.1.15] augmente de façon importante un peu avant la crise respiratoire. Cette augmentation est liée à la maturation car elle n'existe pas quand le fruit, n'ayant pas satisfait son besoin de froid, est incapable de mûrir. Par contre un apport d'éthylène déclenche la maturation et provoque l'augmentation de l'activité galacturonase.

## INTRODUCTION

Proposée par BIALE, la classification des fruits charnus en deux catégories : fruits climactériques et fruits non climactériques, est commode et acceptée de façon générale. Elle met l'accent sur la présence ou l'absence d'une crise respiratoire de maturation (crise climactérique) liée à une synthèse accrue d'éthylène (BIALE, 1960 ; MARCELLIN, 1982). La poire Passe-Crassane est un fruit climactérique mais a la particularité d'exiger, du moins dans certaines régions, un séjour au froid pour présenter une maturation harmonieuse (ULRICH et PAULIN, 1954 a).

La sénescence du fruit est, très fréquemment, accompagnée par un changement de la texture de la chair (ramollissement) qui résulte de modifications intéressantes la composition de la paroi cellulaire où les enzymes pectolytiques jouent un rôle majeur (ULRICH et HARTMANN, 1957 ; HUBER, 1983). La poire est dans ce cas et l'intervention des polygalacturonases y a été démontrée (DILLEY, 1970 ; PRESSEY et AVANTS, 1976 ; AHMED et LABAVITCH, 1980). Nous avons suivi les variations de l'activité poly-

galacturonase [poly (1-4  $\alpha$ -D galacturonide) glycanohydrolase ; EC : 3.2.1.15] chez la poire Passe-Crassane au cours de la sénescence du fruit cueilli, à température constante (+ 15°C), avec ou sans séjour préalable au froid (0°C).

## MATERIEL ET METHODES

### Fruits.

Les poires (*Pyrus communis* L. cv. Passe-Crassane) sont toujours récoltées début octobre sur les mêmes arbres d'un même verger, situé à Olivet (Loiret). Les expériences portent sur plusieurs années. Chaque récolte est divisée en deux lots.

1er lot : fruits placés à 15°C dès la récolte (maturation dite anormale).

2ème lot : fruits placés à 0°C à la récolte, maintenus à cette température pendant 12 semaines puis transférés à 15°C (maturation normale).

Une partie des fruits du lot 1 a été soumise de façon continue à une atmosphère renouvelée (air enrichi en éthylène à une concentration égale à 500  $\mu$ l. l<sup>-1</sup>).

\* - Laboratoire de Physiologie de la Maturation et de la Sénescence. Université d'Orléans, 45046 ORLEANS Cédex.

### Mesure des échanges gazeux.

Le rejet de  $\text{CO}_2$  est mesuré en atmosphère renouvelée avec un analyseur à rayonnement infra-rouge tandis que l'éthylène émis en atmosphère confinée est dosé par chromatographie en phase gazeuse (HARTMANN et al., 1983).

### Préparation des échantillons.

Des tranches radiales sont découpées dans la pulpe du fruit, congelées dans l'azote liquide puis lyophilisées et conservées à température ambiante sous pression réduite. Une attention particulière a été portée sur l'échantillonnage pour diminuer les conséquences des variations individuelles et éviter l'influence des gradients de concentration. D'une part, à la récolte, les fruits sont choisis aussi semblables que possible (taille, position dans l'arbre). D'autre part, les tranches sont découpées dans quatre secteurs radiaux opposés sur des lots de cinq fruits ce qui donne par conséquent 4 x 5 tranches.

### Extraction de l'enzyme.

Elle est réalisée selon une technique adaptée de celle de PRESSEY et AVANTS (1976). Un gramme de pulpe de poire lyophilisée est finement broyé au broyeur à billes Dangoumau pendant 30 secondes à la température du laboratoire. A la poudre ainsi obtenue, on ajoute 25 ml d'eau froide contenant 0,05 ml de mercaptoéthanol et 0,5 g de polyvinylpyrrolidone insoluble activé par ébullition en milieu chlorhydrique puis rincé. Le tout est agité doucement à  $+4^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes et centrifugé 10 minutes à 2400 g. Le culot est lavé deux fois à l'eau, les surnageants sont éliminés et l'extraction est ensuite effectuée à pH 6, sous agitation légère, toujours à  $+4^\circ\text{C}$  par une solution de NaCl 1 M pendant 3 heures. Le mélange est alors centrifugé, le culot lavé avec 10 ml de solution saline et les surnageants réunis.

### Mesure de l'activité enzymatique.

Elle est adaptée de celle décrite par TUCKER et al. (1980) et repose sur le dosage du pouvoir réducteur libéré à  $+37^\circ\text{C}$  et à pH 6 par la méthode de NELSON-SOMOGYI (NELSON, 1944). L'activité est exprimée en nanokatal et ramenée à 1 g de matière sèche.

### Validité des résultats.

Les extractions en l'absence de NaCl ont pour but d'éliminer les sucres solubles et ne contiennent pas d'activité détectable. Par contre, celle-ci est libérée en présence de chlorure de sodium. Un temps d'extraction supérieur à 3 heures n'apporte pas d'augmentation. Les différents paramètres de la mesure ont été vérifiés. Pour estimer la précision des résultats, 8 extractions indépendantes ont été effectuées sur 8 échantillons provenant respectivement de fruits en maturation normale après un séjour de 1 et de 13 jours à  $+15^\circ\text{C}$ . Le coefficient de variation obtenu est inférieur à 13 p. 100 pour une activité moyenne de 17,35 nanokatal et un gramme de matière sèche (1 jour à  $+15^\circ\text{C}$ ) et à 1,5 p. 100 pour une activité de 137,1 (13 jours).

## RESULTATS

### Maturation normale.

A  $+15^\circ\text{C}$ , après un séjour au froid de 12 semaines, les fruits présentent une crise respiratoire typique, accompagnée par une synthèse accrue d'éthylène (MORIN et al., 1985). La figure 1 montre que l'activité polygalacturonase augmente de façon importante pour atteindre un maximum qui se situe environ 7 jours avant le maximum respiratoire. Puis l'activité décroît, de façon plus ou moins marquée selon les années tandis que le fruit poursuit sa sénescence et qu'apparaissent les altérations (blettissement, brunissement) caractéristiques de la post-maturation.

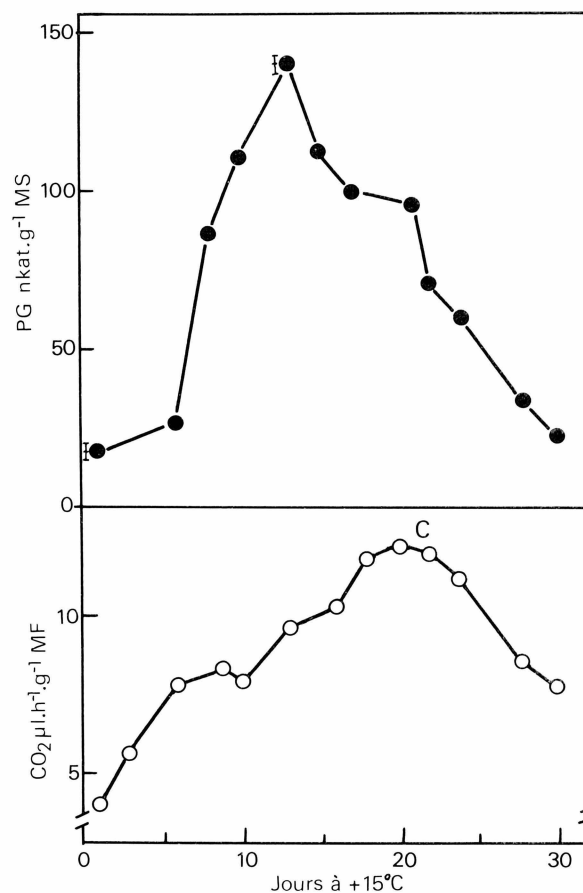


Fig. 1 \* Maturation normale à  $+15^\circ\text{C}$  après un séjour de 12 semaines à  $0^\circ\text{C}$ . En bas : Intensité respiratoire exprimée en microlitres de  $\text{CO}_2$  dégagés par 1 g de matière fraîche en 1 heure (C = maximum climactérique). En haut : Activité polygalacturonase exprimée en nanokatal pour 1 g de matière sèche (les barres placées à côté des activités relatives à un séjour de 1 ou 13 jours à  $+15^\circ\text{C}$  correspondent à l'intervalle de confiance de la moyenne calculée pour un seuil de 95%).

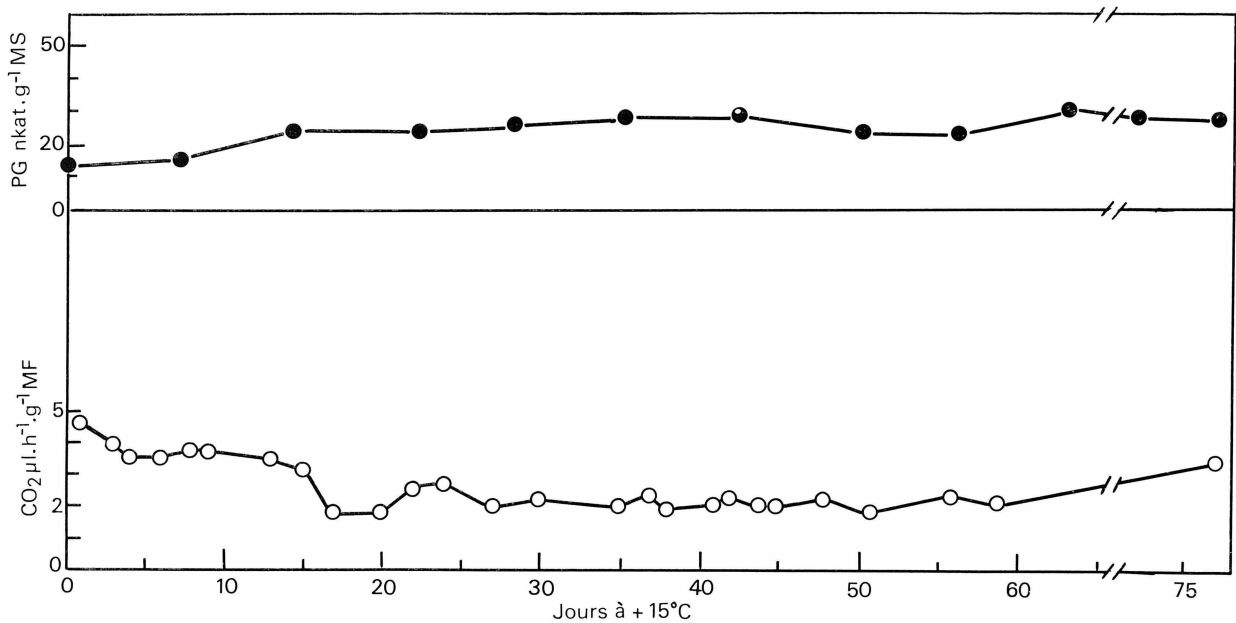


Fig. 2 \* Maturation anormale des fruits placés à +15°C, immédiatement après la récolte. En haut : Activité polygalacturonase. En bas : Intensité respiratoire.

**Maturation anormale.**

Si le fruit est placé à +15°C immédiatement après la récolte, il reste ferme, ne présente pas de crise respiratoire et l'émission d'éthylène est très réduite (LEBLOND, 1975). La figure 2 montre que, même après un séjour prolongé à +15°C, l'activité polygalacturonase demeure à un niveau très bas. Il est à remarquer que la chair des fruits reste ferme.

**Maturation en présence d'éthylène.**

La présence d'éthylène exogène peut suppléer le besoin de froid (ULRICH et PAULIN, 1954b ; LEBLOND, 1975). La figure 3 montre qu'en présence d'éthylène exogène, l'intensité respiratoire augmente et que, parallèlement, l'activité polygalacturonique s'accroît de façon importante.

**CONCLUSION**

Chez la poire Passe-Crassane une augmentation importante de l'activité polygalacturonase apparaît être liée à la maturation et précède la crise climactérique. Si celle-ci n'existe pas, l'activité reste faible. Cette observation a été faite sur des fruits de différentes années. Une augmentation du même type a été décrite chez la tomate (POOVAIAH et NUKAYA, 1979) où elle résulte d'une synthèse *de novo* (TUCKER et GRIERSON, 1982). La tomate présente la particularité d'offrir des mutants dont la maturation est profondément perturbée et qui n'ont pas de polygalacturonase active. La poire Passe-Crassane elle, exige un séjour au froid. S'il fait défaut il n'y a pas de maturation ni d'activité polygalacturonase importante. Un apport d'éthylène exogène peut remplacer le froid. Il est

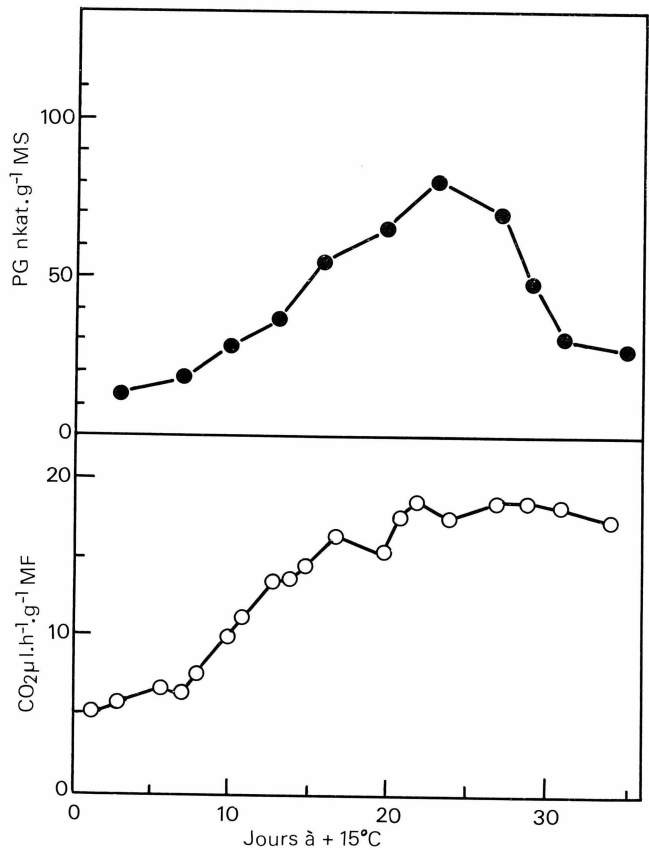


Fig. 3 \* Fruits placés immédiatement après la récolte à +15°C en atmosphère renouvelée contenant 500 μl.l<sup>-1</sup> d'éthylène. En haut : Activité polygalacturonase. En bas : Intensité respiratoire.

certain qu'il faut relier l'augmentation de l'activité polygalacturonase avec la production d'éthylène par le fruit. Chez la tomate GRIERSON et TUCKER (1983) ont montré que la synthèse d'éthylène commençait avant celle de la polygalacturonase et que l'éthylène jouait donc le rôle de gachette déclenchant cette synthèse. A cause de son

besoin de froid, la poire Passe-Crassane constitue un matériel intéressant pour l'étude des mécanismes qui régulent la production d'éthylène par le fruit mûrissant (MORIN et al., 1985). Il faut maintenant rechercher comment celle-ci intervient dans l'augmentation de l'activité polygalacturonase.

## BIBLIOGRAPHIE

- AHMED (A.E.) et LABAVITCH (J.M.). 1980.  
Cell wall metabolism in ripening fruit.  
II.- Changes in carbohydrate - degrading enzymes in ripening «Bartlett» pears.  
*Plant Physiol.*, 65, 1014-1016.
- BIALE (J.B.). 1960.  
Respiration of fruits.  
in : RUHLAND W., *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, 12, 2, p. 536-586. Springer Berlin.
- DILLEY (D.R.) 1970.  
Enzymes.  
in : HULME A.C. *The Biochemistry of fruits and their products*, I, p. 179-208. Academic Press, London and New-York 1970.
- GRIERSON (D.) et TUCKER (G.A.). 1983.  
Timing of ethylene and polygalacturonase synthesis in relation to the control of tomato fruit ripening.  
*Planta*, 157, 174-179.
- HARTMANN (C.), DROUET (A.) et RIGAULT (C.). 1983.  
Changes in enzymes and polysomes during aging of cylinders excised from pulp tissues of Passe-Crassane pears.  
*Physiol. Vég.*, 21, 59-66.
- HUBER (D.J.). 1983.  
The role of cell wall hydrolases in fruit softening.  
*Hort. Rev.*, 5, 169-219.
- LEBLOND (C.). 1975.  
Influence de divers traitements thermiques sur l'évolution de l'intensité respiratoire de la synthèse éthylénique et de quelques caractères organoleptiques de la poire Passe-Crassane.  
*Physiol. Vég.*, 13, 651-665.
- MARCELLIN (P.). 1982.  
La respiration des fruits après récolte : la crise climactérique.  
*Bull. Soc. Bot. Fr.* 129 *Actual bot.* 107-121.
- MORIN (F.), RIGAULT (C.) et HARTMANN (C.). 1985.  
Conséquences d'un séjour au froid sur le métabolisme de l'éthylène au cours de la maturation de la poire Passe-Crassane après récolte.  
*Physiol. Vég.*, 23 (sous presse).
- NELSON (N.). 1944.  
A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.  
*J. Biol. Chem.*, 133, 375-380.
- POOVAIAH (B.W.) et NUKAYA (A.). 1979.  
Polygalacturonase and cellulase enzymes in the normal Rutgers and mutant rin tomato fruits and their relationship to the respiratory climacteric.  
*Plant Physiol.*, 64, 534-537.
- PRESSEY (R.) et AVANTS (J.K.). 1976.  
Pear polygalacturonases.  
*Phytochem.*, 15, 1349-1352.
- TUCKER (G.A.) et GRIERSON (D.). 1982.  
Synthesis of polygalacturonase during tomato fruit ripening.  
*Planta*, 155, 64-67.
- TUCKER (G.A.), ROBERTSON (N.G.) et GRIERSON (D.). 1980.  
Changes in polygalacturonase isoenzymes during the «ripening» of normal and mutant tomato fruit.  
*Eur. J. Biochem.*, 112, 119-124.
- ULRICH (R.) et HARTMANN (C.). 1957.  
Enzymes et maturation des fruits.  
*Ann. Nutr. et Alimentation*, 21, B, 161-193.
- ULRICH (R.) et PAULIN (A.). 1954a .  
Sur la complexité des conditions thermiques de la maturation des poires Passe-Crassane.  
*C.R. Acad. Agric.*, 40, 280-282.
- ULRICH (R.) et PAULIN (A.). 1954b.  
Sur la maturation des poires Passe-Crassane (conditions thermiques et influence de l'éthylène).  
*C.R. Acad. Agric. Paris*, 40, 603-604.

