

# Le fruit après récolte : enzymes, maturation et sénescence.

C. HARTMANN\*

LE FRUIT APRES RECOLTE : ENZYMES, MATURATION ET SENESCENCE.

C. HARTMANN.

*Fruits*, juin 1983, vol. 38, n° 6, p. 499-504.

RESUME - Comme tous les êtres vivants, les végétaux sont soumis au vieillissement et à la mort. Le fruit cueilli (nous nous limiterons au fruit charnu) est un exemple d'organe végétal en voie de sénescence. La physiologie du fruit après récolte (post harvest physiology) a fait l'objet de nombreux travaux dus certainement pour une grande part à son intérêt économique. Mais, il est d'autre part essentiel de comprendre le déterminisme des transformations caractéristiques de la sénescence. Ces transformations font intervenir des enzymes et l'on peut mettre en évidence dans le fruit mûrissant, de nombreuses variations d'activités enzymatiques. L'interprétation de ces variations pose un certain nombre de problèmes. Les recherches actuelles, portant sur le fruit entier et sur des «modèles» expérimentaux, tentent de les résoudre en s'intégrant dans le cadre des théories de la sénescence.

Plusieurs théories ont été émises. Celle dite de la «mort programmée» fait intervenir un programme intégré, inscrit dans le patrimoine génétique. Il semble actuellement que ces théories ne s'excluent pas totalement entre elles.

## INTRODUCTION

L'étude physiologique de la maturation du fruit après cueillette a débuté depuis longtemps déjà, très probablement à cause de son intérêt pratique et des problèmes économiques dont elle peut aider la solution. Elle constitue un cas particulier et original du vieillissement ou plus exactement de la sénescence des organes végétaux. On connaît la définition de SACHER (1973) : «Dernière phase de la vie, au cours de laquelle s'initie une série d'événements normalement irréversibles, qui conduit à la désorganisation

cellulaire et à la mort». L'une des manifestations les plus importantes de la sénescence est la perte de la faculté de division cellulaire. Le fruit mûrissant, ne présentant plus de cellules en division, est un organe sénescé. Il faut cependant remarquer que chez certains fruits mûrissant sur l'arbre, la maturation commence bien avant l'arrêt de la croissance mais celle-ci se fait alors par grandissement cellulaire. La cerise en est un exemple significatif et le poids moyen du fruit est multiplié par un facteur de l'ordre de 3 pendant la maturation. La sénescence n'est donc pas ici incompatible avec une croissance active.

La maturation fait partie de la sénescence mais celle-ci se poursuit lors de la post-maturation ou sénescence avancée qui fait suite à l'état de maturité. Courte chez la poire

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

où elle se manifeste par des troubles physiologiques se traduisant notamment par le bléttissement et le brunissement des tissus, elle peut s'étaler sur plusieurs mois chez la pomme par exemple. D'autre part une prématuration est parfois la condition d'une maturation harmonieuse. La poire Passe-Crassane de l'Orléanais, de la région parisienne ou du sud-ouest de la France est dans ce cas (figure 1). A plus 15° la maturation n'est correcte qu'après un séjour au froid de 8 à 14 semaines (ULRICH et PAULIN, 1954 ; LEBLOND et ULRICH, 1973).

Les recherches ont d'abord porté sur les modifications visibles caractérisant la maturation, échanges gazeux, concentration de divers constituants. Dans un deuxième temps elles ont cherché à expliquer ces modifications par une modulation de l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme. Sous réserve d'une étude critique souvent délicate, la mesure de l'activité d'une enzyme *in vitro* peut en effet nous renseigner sur la concentration des formes actives *in vivo* autrement dit sur son activité potentielle et sur ses variations en fonction du temps et de divers paramètres expérimentaux. Sans chercher à dresser un tableau complet, voir notamment à ce sujet la revue d'ULRICH et HARTMANN (1967), l'ouvrage de HULME (1970 et 1971) et les revues récentes de RHODES (1980 a et b), et de HARTMANN (1983), je me propose de donner dans un premier temps quelques exemples significatifs de ces variations puis de faire le lien entre activités enzymatiques et synthèses protéiques. Après avoir évoqué l'intérêt de certaines approches expérimentales j'essaierai de situer l'évolution du fruit dans le cadre plus général de la sénescence de la cellule végétale.

#### VARIATIONS D'ACTIVITES ENZYMATIQUES

Décrivons à titre d'exemple, quelques-unes des variations mises en évidence au cours de la maturation de la poire Passe-Crassane. Un phénomène caractéristique est la disparition de l'amidon. Les travaux menés à Toulouse par l'équipe de J. FALLOT ont montré que les activités enzymatiques  $\alpha$  et  $\beta$ , rapportées à un fruit, augmentaient au début de la crise respiratoire pour diminuer par la suite. L'observation des zymogrammes obtenus après électrophorèse en gel de polyacrylamide met en évidence l'apparition puis l'augmentation d'une  $\alpha$  amylase (PECH, 1977). Il faut noter qu'à ce moment l'amidon a disparu depuis longtemps, ce qui pose le problème de l'«utilité» de ces variations.

Les enzymes intervenant dans le catabolisme des glucides présentent une évolution intéressante. La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-P Dh) ouvre la voie des phosphopentoses ou voie des hexoses monophosphates (HMP). Son activité diminue fortement dès le début de la maturation et cette décroissance se poursuit au cours de la sénescence avancée. Rapprochée avec le résultat d'autres expériences, cette observation fait penser à une activité décroissante du cycle des HMP au cours de la sénescence

(HARTMANN, 1966 et 1968). La poire, fruit «climactérique», voit son intensité respiratoire s'intensifier jusqu'à un maximum. Cette intensification va de pair avec une activation de la glycolyse qui est notamment caractérisée par une augmentation de l'activité aldolasique (HARTMANN, 1963). On a donc l'impression d'une réorientation du métabolisme pendant la maturation et d'un «glissement» de la voie des HMP vers la glycolyse (TAGER, 1956).

Evoquons maintenant une enzyme intervenant dans le métabolisme de l'acide organique de loin le plus abondant chez la poire Passe-Crassane : l'acide malique. L'enzyme malique à NADP fait passer du malate au pyruvate avec production de gaz carbonique et de NADP réduit. C'est une enzyme du compartiment cytoplasmique de la cellule. Nous avons étudié certaines de ses caractéristiques dans notre laboratoire (DROUET et HARTMANN, 1977 ; HARTMANN et DROUET, 1979). Son activité atteint un maximum au moment de la maturité et diminue ensuite (HARTMANN et al., 1968 ; HARTMANN et DROUET, 1973).

Le rôle joué par cette enzyme dans le métabolisme de la sénescence est encore mal connu. On peut noter qu'elle constitue une source possible de NADP réduit en l'absence de réactions photosynthétiques (le fruit mûrit à l'obscurité et la concentration en chlorophylles diminue rapidement) au moment où l'activité du cycle des HMP se réduit de façon importante. D'autre part, intervenant dans le fonctionnement du cycle de Krebs, elle permet de «shunter» l'acide oxaloacétique, de réguler la concentration en acide malique et de contribuer au maintien du pH intracellulaire.

#### ACTIVITES ENZYMATIQUES ET SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Il existe essentiellement deux manières d'expliquer les variations d'activités enzymatiques. La première fait appel à l'activation d'une protéine enzymatique préexistante et ne nécessite pas par conséquent une synthèse de  *novo*. Cette activation peut être, notamment, la conséquence de modifications intervenant dans la compartimentation cellulaire de l'enzyme ou dans celles de ses effecteurs ou encore résulter de l'intervention d'inhibiteurs ou d'activateurs naturels. Ces mécanismes sont liés aux caractéristiques de la perméabilité des membranes et ont été invoqués très tôt par certains chercheurs (BLACKMAN et PARIJA, 1928 ; BAIN et MERCER, 1964). Il semble bien que de tels mécanismes interviennent dans la régulation des enzymes de la glycolyse qui s'intensifie remarquablement au cours de la crise respiratoire présentée par les fruits climactériques. Une des enzymes clés de la glycolyse est la phospho-fructo kinase (PFK). Les propriétés allostériques de cette enzyme sont en relation avec l'intensité du métabolisme respiratoire (SALMINEN et YOUNG, 1975). De même les activités oxydatives de la mitochondrie seraient contrôlées par des modifications des membranes. Les problèmes expérimentaux très délicats posés par l'étude de ces

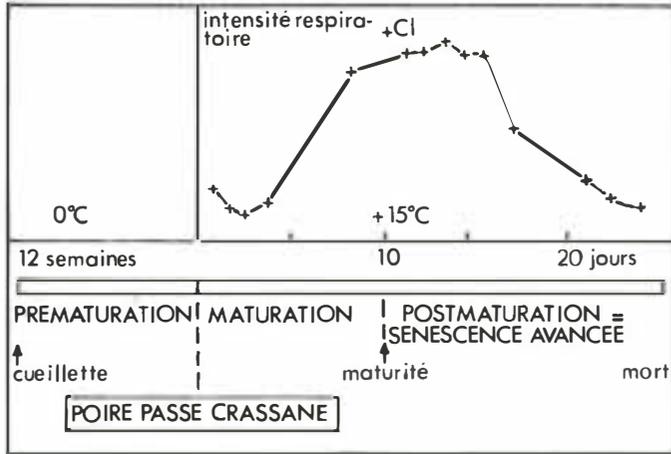


Figure 1 - Un exemple de la sénescence du fruit cueilli : la poire Passe-Crassane. Cl : maximum climactérique.

Figure 2 - Absorption d'oxygène (en haut) et activité de l'enzyme malique (en bas) de cylindres découpés dans des poires Passe-Crassane ayant (B) ou n'ayant pas (A) satisfait leur besoin de froid.

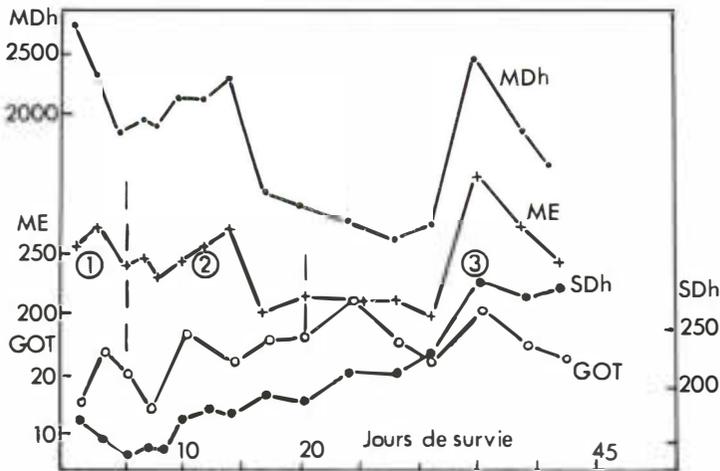
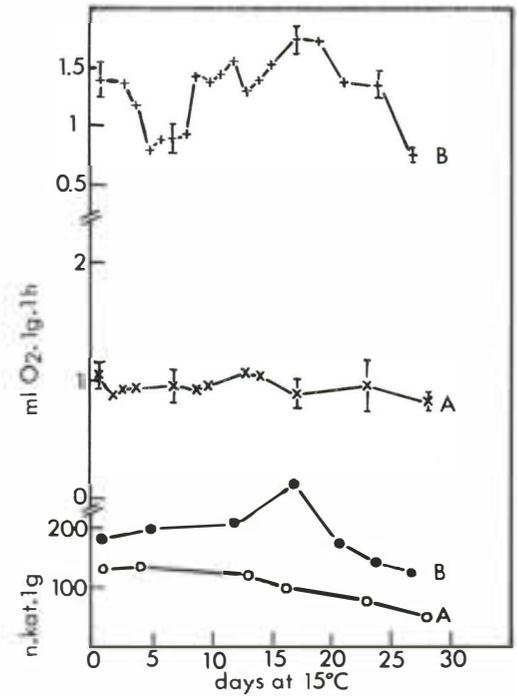


Figure 3 - Evolution de l'activité de la déshydrogénase malique à NAD (MDh), de l'enzyme malique à NADP (ME), de la succinodéshydrogénase (SDh) et de L-aspartate 2-oxoglutarate aminotransférase (GOT) au cours de la survie de cylindres de parenchyme de pomme Golden Delicious.

En abscisses : jours de survie à plus 15°C.  
En ordonnées : activités exprimées en nanokatal par gramme de matière sèche.

mécanismes font que les travaux portant sur ce sujet sont encore peu nombreux dans le cas des fruits bien que le problème ait été posé depuis un certain temps déjà.

Une autre explication fait appel à une synthèse active *de novo* de certaines enzymes et fait donc intervenir directement le métabolisme protéique. FRENKEL et al., (1968) ont montré que, chez la poire Bartlett, existe une active incorporation de C<sup>14</sup>phénylalanine dans la bande électrophorétique correspondant à l'enzyme malique ce qui suggère une synthèse active de cette enzyme. Ce type d'expérience est critiquable, la réalité de la synthèse nette n'étant pas prouvée, mais un résultat concordant a été trouvé chez la poire Passe-Crassane (BOULAY, 1975 ; HARTMANN et al., 1975), à l'aide de méthodes immunochimiques. L'utilisation de sérums anti-enzyme permet en effet de mesurer, non plus l'activité mais la quantité de protéines enzymatiques extraites du tissu. La démonstration complète, mettant en oeuvre la purification de l'enzyme, son dosage par immunochimie, la mise en évidence de la synthèse en présence d'eau deutérée a été faite récemment au Royaume Uni (GRIERSON et al., 1981) pour la polygalacturonase de tomate dont l'activité, nulle à la fin de la croissance du fruit, augmente très fortement au cours de la sénescence.

Pour l'étude des mécanismes mis en jeu lors de la sénescence du fruit, l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques ou de composés marqués est évidemment très utile. Cela pose le problème de l'utilisation de «modèles» où d'une part les corrélations existant entre les cellules sont a priori moins complexes que celles existant dans le fruit entier et avec lesquels d'autre part certaines interventions expérimentales sont moins ardues. L'intérêt des cultures de cellules *in vitro* a été démontré (PECH et al., 1981). Je voudrais ici évoquer brièvement les recherches faites à Orléans.

#### LA SURVIE DE CYLINDRES DECOUPES DANS LE PARENCHYME DE POMME ET DE POIRE

De très nombreux auteurs ont travaillé sur des disques ou des tranches, en général d'épaisseur égale ou inférieure à un centimètre comme «modèles» de maturation et de sénescence des fruits. Les cellules qui les composent sont maintenues en survie, dans des conditions déterminées, pendant une période plus ou moins longue (cf PECH, 1977). Les tissus peuvent être ou non infiltrés avec des solutions. Nous avons utilisé des cylindres de parenchyme de pomme et de poire, découpés aseptiquement et déposés sur un milieu stérile (gel d'agar) contenu dans des bocaux d'environ 200 ml. Le couvercle métallique, vissé sans joint, permet les échanges gazeux tout en protégeant le contenu contre les infections fongiques ou bactériennes. Les bocaux sont alors placés à l'obscurité à plus 15°C. Dans ces conditions les cellules se maintiennent sans altérations notables jusqu'à 60 jours. La présence de manitol (61,9 g/l) est nécessaire pour éviter un déséquilibre osmotique entraînant l'éclate-

ment des tissus et la mort des cellules et le milieu contient une faible quantité de saccharose (PECH, 1977). Les cellules ne se divisent pas, sont dites *en survie*, coupées de certaines des corrélations qui existaient dans le fruit entier. L'objectif est alors de mettre en évidence les caractères métaboliques de cette survie et de suivre les manifestations de la sénescence des cellules. La figure 2 est relative à la poire Passe Crassane (HARTMANN et al., 1983).

Les cylindres provenant de fruits ayant satisfait leur besoin de froid présentent, comme les fruits entiers, une crise respiratoire et un maximum d'activité de l'enzyme malique à NADP. Au contraire les cylindres découpés dès la récolte (A) ne présentent pas cette évolution.

Dans des cylindres de pulpe de pomme Golden Delicious, maintenus en survie, il est possible, comme pour le fruit entier, de mettre en évidence :

- une crise respiratoire,
- des variations des activités Enzyme malique à NADP et Déshydrogénase malique à NAD présentant deux maxima, l'un pouvant être relié à la «maturation», l'autre à la sénescence proprement dite,
- l'augmentation de l'activité L-aspartate oxaloacétate aminotransférase (GOT) jusqu'à un maximum et une augmentation progressive de l'activité succinodéshydrogénase (figure 3).

Dans les deux cas on met en évidence dans les tissus en survie des phénomènes rappelant ceux qui se déroulent dans le fruit entier. De plus il est aisé d'ajouter dans le milieu des inhibiteurs métaboliques ou des éléments marqués qui seront absorbés par les cellules. L'évolution des tissus en survie peut par conséquent, servir de «modèle» pour l'étude de la maturation et de la sénescence au niveau cellulaire en se souvenant néanmoins qu'un cylindre de parenchyme n'est pas un fruit entier et que les généralisations doivent être faites avec prudence.

#### CONCLUSION

Les explications de la sénescence, actuellement proposées, peuvent se grouper autour de trois théories.

Pour la première, la transmission de l'information génétique : transcription de l'ADN à l'ARN puis synthèse de protéines serait de plus en plus sujette à l'erreur. Les erreurs, de plus en plus nombreuses, se produisant au hasard, la théorie est dite *stochastique*. Dans le cas particulier des enzymes cela se traduit par l'apparition d'enzymes défectueuses, de moins en moins efficaces et, par suite, de désordres métaboliques. Ainsi chez la cerise, on assiste après la maturité à une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme malique, donc à une perte d'efficacité de celle-ci (HARTMANN, 1975).

Il existe cependant des mécanismes de compensation de

ces erreurs. Selon la seconde théorie, les systèmes de réparation diminueraient d'efficacité. Cela est illustré par exemple par une diminution spectaculaire de la capacité de récupération des mitochondries de poire après un stress consécutif à une exposition à des radiations ionisantes (ROMANI, 1975).

Pour la troisième enfin, la sénescence découle d'un mécanisme actif, gouverné par un programme conduisant à la mort (réorientation des synthèses protéiques, modifications actives des propriétés de perméabilité des membranes ...). C'est pour employer une expression imagée la théorie de la mort programmée. La synthèse d'enzyme malique démontrée au cours de la maturation de la poire et de la cerise entre dans ce cadre. L'exemple de la polygalacturonase de la tomate, dont l'activité est nulle dans le fruit en croissance mais qui est synthétisée *de novo* au cours de la maturation et de la sénescence avancée (GRIERSON et al., 1981) est peut-être plus démonstratif encore.

Nous voyons que les théories en présence ne s'excluent pas. Deux questions fondamentales attendent une réponse. En premier lieu quel est le mécanisme qui déclenche la mise en route du programme ? La privation d'auxine entraîne la sénescence des cellules isolées (CODRON et al., 1979) mais il est certain que les interactions entre les différentes substances de croissance ont un rôle important. On ne peut d'autre part exclure l'intervention d'autres facteurs.

Par ailleurs, dans quelle mesure, ce programme une fois mis en route est-il inéluctable, les transformations qu'il entraîne au cours de sa réalisation étant irréversibles ?

Quoi qu'il en soit ces transformations ne peuvent être assimilées uniquement à un processus de dégénérescence et de désorganisation cellulaire même si l'on tient compte de la synthèse d'enzymes hydrolytiques. Il y a certainement quelque chose de plus. On sait que, pour qu'il y ait maturation, il faut une synthèse protéique active. Mais c'est le cas également pour la post-maturation ou sénescence avancée : l'étude des ribosomes de poire met en évidence plusieurs «vagues» successives, caractérisant soit la maturation et la synthèse d'éthylène soit la sénescence avancée. Chaque «vague» est marquée par la succession des mêmes événements : synthèse de ribosomes et de m ARN, apparition de polysomes, augmentation de la capacité de synthèse protéique (DROUET, 1981). Tout au long de la sénescence, on assiste au combat mené par la cellule pour défendre son intégrité et maintenir son homéostasie dans des conditions de plus en plus difficiles car les capacités de résistance diminuent. Ce combat ne fait pas intervenir constamment les mêmes mécanismes mais met en jeu ce que l'on peut appeler plusieurs lignes de défense successives. Lorsque ces lignes sont enfoncées on assiste à la phase finale et à des troubles métaboliques graves qui conduisent à une issue fatale.

Il faut maintenant chercher à mieux caractériser qualitativement ces étapes : nature des ARN messagers, nature des protéines synthétisées, éventuellement enzymes et protéines spécifiques. Il est très probable que l'analyse du mécanisme moléculaire de la sénescence (au même titre que celui des autres phases du développement végétal) ne se réalise pas dans un avenir immédiat étant donné la complexité des processus mis en jeu. Mais l'objectif est ambitieux et justifie sans doute les travaux entrepris.

## BIBLIOGRAPHIE

- BAIN (J.) et MERCER (F.). 1964.  
Organization resistance and the respiration climacteric.  
*Aust. J. Biol. Sc.*, 17, 78-85.
- BLACKMAN (F.F.) et PARIJA (P.). 1928.  
Analytic studies in plant respiration. I.- The respiration of a population of senescent ripening apples.  
*Proc. Roy. Soc.*, 103, 412-490.
- BOULAY (M.). 1975.  
Applications de quelques techniques immunochimiques à l'étude de la maturation de la poire (var. Passe-Crassane) et de la cerise (var. Bigarreau Napoléon).  
*Thèse Doctorat, 3ème cycle, Université d'Orléans*, 49 p.
- CODRON (H.), LATCHE (A.), PECH (J.C.), NEBIE (B.) et FALLOT (J.). 1979.  
Control of quiescence and viability in auxin-deprived pear cells in batch and continuous culture.  
*Plant Science Letters*, 17, 29-35.
- FRENKEL (C.), KLEIN (L.) et DILLEY (D.R.). 1968.  
Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits.  
*Plant Physiol*, 7, 1146-1153.
- DROUET (A.). 1981.  
La maturation et la sénescence de la poire Passe-Crassane. Quelques aspects du métabolisme protéique.  
*Thèse Doctorat d'Etat. Université d'Orléans*, 155 p.
- DROUET (A.) et HARTMANN (C.). 1977.  
Activity of pear fruit malic enzyme. Its regulation by métabolites.  
*Phytochem.*, 16, 505-508.
- GRIERSON (D.), TUCKER (G.A.) et ROBERTSON (N.G.). 1981.  
The molecular biology of ripening.  
in : Recent advances in the biochemistry of fruit and vegetables.  
*J. Friend et M.J. Rhodes ed. Academic Press*, p. 147-158.
- HARTMANN (C.). 1963.  
L'activité aldolasique des tissus de pomme et de poire pendant la maturation et la sénescence des fruits.  
*Phytochem.*, 2, 407-411.
- HARTMANN (C.). 1966.  
Contribution à l'étude de la crise climactérique des fruits. Recherches sur quelques aspects du métabolisme respiratoire.  
*Thèse Paris*, 83 p.
- HARTMANN (C.). 1968.  
Activité des déshydrogénases du cycle des pentoses phosphates au cours de la maturation de la poire.  
*Physiol. Vég.*, 6, 289-297.
- HARTMANN (C.). 1975  
Enzymes, maturation et comportement respiratoire d'un fruit (la cerise) cueilli à intervalles réguliers après la floraison et conservé à température constante.  
in : Facteurs et régulation de la maturation des fruits.  
*Colloques internationaux du CNRS n° 238*, 235-240.
- HARTMANN (C.). 1983.  
Quelques aspects de la sénescence du fruit.  
*Physiol. Veg.*, 21 137-150.

- HARTMANN (C.), LUGON (M.) et VALADE (D.). 1968.  
Etude des variations de l'activité de deux enzymes décarboxylantes au cours de la maturation de la poire.  
*Physiol. Vég.*, 6, 279-287.
- HARTMANN (C.) et DROUET (A.). 1973.  
Etude par électrophorèse en gel de polyacrylamide de l'évolution enzymatique des tissus de poire Passe-Crassane pendant la maturation du fruit cueilli.  
*Physiol. Plant.*, 28, 284-290.
- HARTMANN (C.), BOULAY (M.) et MOULET (A.M.). 1975.  
Enzyme malique, maturation et besoin de froid chez la poire Passe-Crassane.  
*C.R. Acad. Sc., Paris*, Série D. 281, 135-137.
- HARTMANN (C.) et DROUET (A.). 1979.  
Pear malic enzyme : some physical and immunological properties.  
*Rev. Can. Biol.*, 38, 101-104.
- 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.
- HULME (A.). 1970, 1971.  
The biochemistry of fruits and their products.  
Tome I, 1970, 620 p. ; Tome II, 1971, 788 p.  
*Academic Press London and New York*.
- LEBLOND (C.) et ULRICH (R.). 1973.  
Contrôle de l'évolution de la maturation par divers traitements thermiques et gazeux chez la poire «Passe-Crassane».  
*Bull. Inst. intern. Froid*, 3, 69-74.
- PECH (J.C.). 1977.  
Les protéines solubles et les amylases au cours de la maturation de la poire. Essai de contrôle de leur évolution dans des systèmes expérimentaux simplifiés.  
*Thèse Doctorat d'Etat, Toulouse*, 84 p.
- PECH (J.C.), LATCHE (A.) et FALLOT (J.). 1981.  
Maturation et sénescence des fruits. Rôle des auxines et intérêt des cultures *in vitro*.  
*1er Colloque sur les Recherches fruitières, Bordeaux*, 91-98.
- RHODES (M.J.C.). 1980.  
The maturation and ripening of fruits.  
in : Senescence in plants KV THIMANN ed., p. 158-205.  
*CRC Press. Boca Raton USA*.
- RHODES (M.J.C.). 1980.  
Respiration and Senescence of plant organs.  
in : The Biochemistry of Plants. D.D. DAVIES ed., vol. 2, p. 419-462.  
*Academic Press*.
- ROMANI (R.J.). 1975.  
Mitochondrial function and survival in relation to fruit ripening and the climacteric, in: Facteurs et régulation de la maturation des fruits.  
*Colloques internationaux du CNRS n° 238*, p. 229-233.
- SACHER (J.A.). 1973.  
Senescence and post-harvest physiology.  
*Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 24, 197-224.
- SALMINEN (S.O.) et YOUNG (R.E.). 1975.  
The control properties of phosphofructokinase in relation to the respiration climacteric in banana fruit.  
*Plant Physiol.*, 55, 45-50.
- TAGER (J.M.). 1956.  
The role of the pentose cycle in the ripening banana.  
*South Afric. Journ. Sci.*, 53, 167-170.
- ULRICH (R.) et HARTMANN (C.). 1967.  
Enzymes et maturation des fruits.  
*Ann. Nutr. et Alimentation*, 21, B, 161-193.
- ULRICH (R.) et PAULIN (A.). 1954.  
Sur la complexité des conditions thermiques de la maturation des poires Passe-Crassane.  
*C.R. Acad. Agric. Paris*, 40, 280-282.