



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES



Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

«Biotechnologie et Valorisation des PhytoRessources»

**Influence de quelques phytohormones sur les teneurs
en pectines totales et en H₂O₂ des olives au cours
de la maturation**

Présenté par : ALEM Fatima Zahra

Encadré par : Pr. AMRANI JOUTEI Khalid

Mr. MOUSTAKIME Youssef

Soutenu le : 15/06/2015

Devant le jury composé de :

- Mr AMRANI JOUTEI Khalid
- Mr BOUKIR Abdellatif
- Mr TAHRI JOUTI Mohammed Ali

Année universitaire

2014/2015

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents

Aucune dédicace, aucun mot ne saurait exprimer tout le respect, toute l'affection et tout l'amour que je vous porte. Merci de m'avoir soutenue et aidée à surmonter tous les imprévus de la vie.

Que ce travail, qui représente le couronnement de vos sacrifices généreusement consentis, de vos encouragements incessants et de votre patience, soit de mon immense gratitude et de mon éternelle reconnaissance qui si grande qu'elle puisse être ne sera à la hauteur de vos sacrifices et vos prières pour moi.

Je prie Dieu, le tout puissant, de vous protéger et de vous procurer santé, bonheur et longue vie...

A ma très chère sœur Ghita

Pour son amour son incontestable appui ainsi pour sa douceur

A mes chéries Laila et Salma et Fatima Zahra

Pour tous les instants inoubliables que j'ai passés avec vous, je vous aime beaucoup.

A tous mes chers amis, Fatima zahra, Chaimae, Et la liste est bien longue.

A toute ma famille.

Je dédie ce travail à toutes les personnes chères à mon cœur. Qu'elles trouvent ici l'expression de toute ma gratitude et mon amour.

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps, toute l'équipe pédagogique de la faculté des sciences et techniques de Fès et les intervenants professionnels responsables de la formation LST Biotechnologie et valorisation des phytoressources pour avoir assuré la partie théorique de celle-ci, et je remercie particulièrement l'équipe du laboratoire molécules bioactives : structures et fonctions pour l'accueil qu'elle m'a accordée sous la direction de Mr BENCHERKHI Rachid qui a mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Mon encadrant Professeur AMRANI JOUËI Khalid

C'est un grand honneur de m'avoir confié la responsabilité de ce travail. Vous m'avez toujours réservé le meilleur accueil malgré vos obligations professionnelles. Je vous remercie pour vos encouragements infatigables, votre amabilité et votre gentillesse qui méritent toute admiration. Veuillez trouver ici, professeur, le témoignage de ma vive gratitude et de mes sentiments les plus respectueux.

C'est ainsi que je remercie également Mr MOUSTAKIME Youssef, pour ses orientations, son encadrement et ses conseils judicieux lors de mon intégration au projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux membres du jury ; MR BOUKIR Abdellatif et MR TAHRI JOUËI Mohammed Ali pour leur présence et leur temps qu'ils m'ont consacré pour examiner mon rapport ainsi que pour leurs efforts.

Que tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail trouvent l'expression de mes remerciements les plus chaleureux particulièrement Mr HAZZOUMI Zakaria.

Liste des figures

		Page
Figure 1	Fruit de l'olivier.....	4
Figure 2	Schéma d'une cellule végétale.....	10
Figure 3	Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique.....	10
Figure 4	Action des pectinestérases sur la pectine.....	10
Figure 5	Evolution des activités enzymatiques endogènes, les activités polygalacturonases (PG) et les activités pectinestérases (PE) au cours de la maturation des olives.....	16

Liste des tableaux

Page

Tableau 1	Dates correspondantes des prélèvements effectués pour chaque traitement d'olivier.	18
Tableau 2	Influence de l'application des phytohormones exogènes sur l'évolution des différentes fractions en pectines au cours de la maturation.....	
Tableau 3	influence des phytohormones sur la synthèse de [H ₂ O ₂] au cours de la maturation.....	19

Sommaire

Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I. L'olivier	2
1. Description botanique	2
2. Physiologie de l'olivier	2
3. Cycle végétatif et productif de l'olivier	3
4. le fruit d'olivier :	4
II. L'huile d'olive vierge	4
III. La maturation.....	5
IV. Les phytohormones exogènes : effets sur les fruits et les cellules.	6
1. L'éthylène.....	6
2. L'acide abscissique	7
3. L'auxine	8
V. Les pectines constitutives de la paroi cellulaire	10
VI. Mode d'action des PE et PG sur la dégradation des pectines.....	10
1. PG : Polygalacturonases.....	10
2. PE ou PME : Pectinestérases ou pectines méthyl-estérases.....	11
VII. Le peroxyde d'hydrogène.....	11
Partie II : Matériel & Méthodes	
I. Matériel végétal	13
1. Matériel Végétal.....	13
2. Traitement des olives	13
3. Isolement et dosage des pectines.....	14
II. Extraction et mesure des activités enzymatiques endogènes.....	14
III. Dosage de peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	15
Partie III : Résultats & Discussion	
I. Détermination de la fragilisation cellulaire des olives au cours de la maturation.....	16
1. Evolution des teneurs en pectines et en activités enzymatiques endogènes des olives au cours de la maturation.....	16
2. Influence des traitements par les phytohormones exogènes sur la fragilisation de la paroi cellulaire chez les olives au cours de la maturation	18
II. Influence des phytohormones exogènes sur l'évolution de la synthèse des molécules H ₂ O ₂ chez les olives au cours de la période de maturation	19
III. Discussion.....	19
Conclusion	22
Références bibliographiques	23

INTRODUCTION

Introduction

Les pectines sont des polymères naturels qui, grâce à des changements chimiques, causent des modifications dans la structure de la cellule et donc influencent l'extraction du contenu cellulaire des fruits au cours des transformations agro-technologiques

Les activités enzymatiques qui rentrent dans la composition pectique des fruits pendant la maturation sont les pectinestérase (PE) et les polygalacturonase (PG). Elles hydrolysent les substances pectiques de la paroi cellulaire du fruit qui deviennent hydrosolubles par perte de leurs acides uroniques et de leurs résidus arabinoses (Ahmed et Labavitch, 1980).

Les pectinesterases déméthylent la pectine en pectate. Elles ont une forte spécificité pour les esters méthyliques de l'acide polygalacturonique. De ce fait, elles attaquent progressivement la chaîne pectique depuis son extrémité réductrice jusqu'à un groupement carboxylique libre (SOLM et DEVEL 1955) autorisant ainsi l'action ultérieure des PG incapables d'agir sur un substrat méthylé.

Cependant, les PG hydrolysent les liaisons glycosidiques des chaînes polygalacturoniques. (Rombout et Pilnik, 1979).

Le peroxyde d'hydrogène est un indicateur de stress ; il est synthétisé par la plante comme moyen de défense. Cependant, l'application de phytohormones représente un déséquilibre naturel qui influence la maturation de la plante.

Ce travail consiste à suivre l'évolution des teneurs en pectines au cours de la maturation des olives après un traitement des oliviers à la véraison avec l'AIA, l'ABA et l'éthylène. Les teneurs en H_2O_2 sont également déterminées.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'olivier

1. Description botanique

L'olivier fait partie de la famille des oléacées. Ayant un aspect très rameux avec un tronc noueux au bois dur et dense et à l'écorce brune crevassée, il peut atteindre quinze à vingt mètres de hauteur et vivre plusieurs siècles. Ses feuilles sont opposées, ovales et allongées. Elles sont portées par un court pétiole. Elles ont une couleur vert foncé sur la face supérieure qui persiste, c'est-à-dire qu'elles sont toujours vertes.

C'est grâce à ses feuilles que l'olivier peut vivre en milieu aride ; les cellules foliaires s'allongent quand il pleut pour emmagasiner l'eau. En cas de sécheresse, les feuilles se rétractent et bloquent l'activité de photosynthèse au détriment des fruits.

Les fleurs sont blanches avec un calice, deux étamines, une corolle à quatre pétales ovales, et un ovaire de forme arrondie qui porte un style assez épais et il se termine par un stigmate. Par ailleurs, la plupart des oliviers sont auto-fertiles, c'est-à-dire que leur propre pollen peut féconder leurs propres ovaires. La fécondation se fait principalement par l'action du vent et la période de fertilité ne dure qu'une petite semaine par année.

Ainsi, le fruit de cet arbre est l'olive. Ce fruit est une drupe avec une peau (épicarpe) recouverte d'une matière cireuse imperméable à l'eau. Sa pulpe charnue (mésocarpe) est riche en matière grasse stockée durant la lipogenèse. Son noyau est très dur et osseux et formé d'une enveloppe (endocarpe).

2. Physiologie de l'olivier

L'olivier appartient au genre *Olea*, qui est constitué de 30 espèces différentes comme le troène, le lilas, le frêne, le forsythia... Cette famille est celle des oléacées. L'olivier est sempervirent, c'est à dire qu'il est toujours vert : ses feuilles malgré l'apparence tombent avec un cycle de trois années. Comme elles ne tombent pas toutes en même temps, l'arbre donne l'impression d'être toujours vert. Il peut vivre plusieurs siècles : plusieurs pays sont fiers d'avoir des arbres millénaires. Il est avant tout méditerranéen et résiste à la sécheresse, au froid (jusqu'à moins 15 degrés) Il craint l'excès d'humidité surtout à son pied et une trop importante hygrométrie. Il pousse quand la température dépasse 10 à 12 degrés, soit environ sur 8 à 10 mois au cours d'une année. Il a 2 périodes de croissance (le

printemps et l'automne) et il a une période de dormance estivale. 7 Ses feuilles sont lancéolées, persistantes. Elles sont vert grisâtre, coriaces à bords révoluté. Ses fleurs s'épanouissent en petites grappes blanches. Chaque grappe donnera un seul fruit. Son fruit ovoïde, une drupe, l'olive, est vert puis noir à maturité complète. IL a un noyau fusiforme. Son bois très dur est imputrescible et est utilisé en ébénisterie.

3. Cycle végétatif et productif de l'olivier

L'olivier passe au cours de son cycle annuel de développement par les phases suivantes :

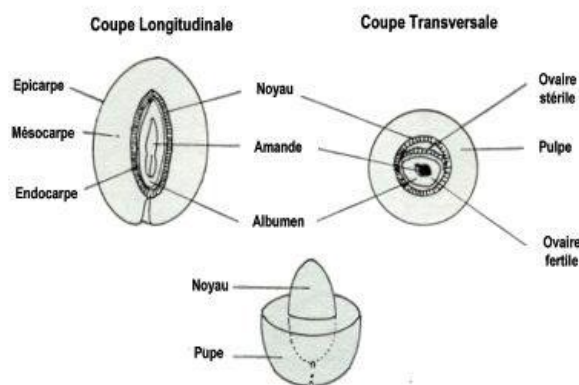
- Janvier, février : induction, initiation et différenciation florale ;
- Mars : croissance et développement des inflorescences à aisselle des feuilles que portent les rameaux de l'année précédente ;
- Avril : pleine floraison ;
- Fin Avril-début mai : fécondation et nouaison des fruits ;
- Juin : début de développement et grossissement des fruits ;
- Septembre : véraison ;
- Octobre : maturation du fruit et son enrichissement en huile ;
- Mi-novembre à janvier : récolte des fruits.

La période la plus intense du cycle annuel se déroule de mars à juin. Au cours de cette phase, les besoins en eau et en nutriments de l'arbre augmentent. Les rendements sont variables en fonction de l'âge des arbres, des densités de plantation et des soins culturaux.

4. le fruit d'olivier :

L'olive est une drupe dont le mésocarpe représente approximativement les 2/3 du fruit. Celui-ci est très riche en lipides.

Sa forme n'est pas constante et ils existent des plusieurs variétés, comme la mancenille, de fruit pratiquement sphérique et d'autres, comme le térébinthe, avec un fruit allongé et légèrement courbe.



Sa taille peut varier entre peu plus d'un centimètre (arbequine) et plus de 3 cm chez l'olive grosse sévillane.

Figure 1 : fruit de l'olivier

L'endocarpe est ligneux et sa morphologie est aussi un caractère variétal. L'épicarpe est intimement soldé au mésocarpe et il est de couleur vert, même s'il tourne violet avec sa maturité, brillant (dû à la présence de cire) et de doux toucher.

II. L'huile d'olive

L'huile d'olive vierge est un jus d'olive qui est récolté à maturité optimale et correctement traitée. C'est une huile de haute valeur qui est pratiquement la seule huile végétale qui peut être consommée directement en l'état, appréciée pour sa saveur et ses caractéristiques nutraceutiques (de santé).

L'huile d'olive vierge est obtenue directement des olives par des procédés mécaniques dans des conditions thermiques qui ne provoquent aucune altération de sa qualité. Les seuls traitements autorisés sont le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Cette façon d'extraction protège l'huile de toutes les dégradations et préserve ses composants mineurs qui contribuent significativement à sa qualité et à sa bonne conservation.

Les paramètres de qualité et d'authenticité de l'huile d'olive sont influençables par plusieurs facteurs, à savoir : la variété, l'environnement, les techniques culturales et la technologie d'extraction. Toutefois, l'influence du facteur variétal reste la plus importante sur la qualité et la composition chimique des huiles d'olive produites sous des conditions adéquates de production et de trituration.

Les effets bénéfiques pour la santé de l'huile d'olive sont dus à la fois à ses teneurs élevées en acides gras mono-insaturés et en substances anti oxydantes. Par conséquent, plusieurs propriétés pharmacologiques ont été attribuées à ce produit naturel :

Prévention des maladies cardiovasculaires : elle réduit la teneur en LDL dans le sang, elle réduit aussi la pression artérielle, elle semble de plus éviter la formation de caillots sanguins.

L'huile d'olive atténue la sécrétion gastrique : elle peut donc soulager les personnes souffrant d'hyperacidité gastrique et de reflux gastrooesophagien.

Elle a un très bon pouvoir antioxydant : par sa composition en composés phénoliques (essentiellement l'hydroxytyrosol) et sa teneur en vitamine A et D.

Elle a un pouvoir anti inflammatoire : Son action anti-inflammatoire est fondamentale sur la paroi des vaisseaux sanguins, car de plus en plus, il semble prouvé que c'est cet aspect inflammatoire de la paroi qui est responsable des accidents vasculaires plutôt que le seul taux de cholestérol. L'équilibre de l'huile au niveau du rapport oméga 6 oméga 3 est stratégique dans la lutte contre le phénomène inflammatoire qui a tendance à rigidité et à scléroser les parois artérielles.

III. La maturation

C'est un processus complexe qui dure plusieurs mois. Le fruit grossit et change de couleur. Il passe du vert foncé au vert clair sous l'effet de la dégradation de la chlorophylle, puis au rouge violacé, enfin au violet foncé puis au noir dès le départ de la synthèse des anthocyanes. Lorsque l'olive est noire, elle n'est pas forcément mure. Elle est mure lorsque sa chair est molle. Le fruit ne peut pas être consommé sur l'arbre car il est fortement amer. Pour être consommé il devra subir une désamérisation.

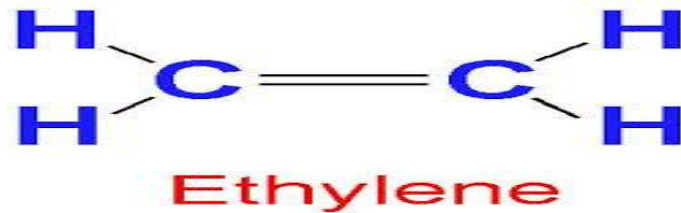
Tout au long de sa maturation ont lieu de nombreuses transformations chimiques à l'intérieur de sa chair. Sa teneur en acide linoléique augmente, celle en acide oléique reste stable. La maturité idéale pour la production d'huile serait atteinte lorsque le rapport entre l'acide oléique et l'acide linoléique serait de 10.

Ainsi la couleur du fruit change grâce à l'action de l'éthylène avec des conditions de luminosité déterminées c'est-à-dire :

- La biosynthèse de la chlorophylle est stimulée par l'éthylène dans l'obscurité
- La biosynthèse des anthocyanes est stimulée par l'éthylène lorsqu'il est exposé à la lumière.

IV. Les phytohormones exogènes : effets sur les fruits et les cellules.

1. L'éthylène



L'éthylène est une hormone mixte qui a des effets positifs tels que l'initiation de la floraison, abscission, sénescence ainsi que la germination et des effets négatifs sur le développement en inhibant la croissance des végétaux. Elle exerce une influence sur toutes les phases du développement de la germination à la sénescence souvent en interaction avec d'autres hormones.

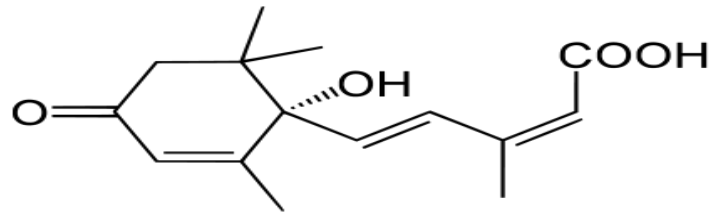
Elles sont précédées chez de nombreux fruits par un accroissement très net de l'intensité respiratoires que l'on appelle crise climactérique. La période antérieure ou phase préclimactérique étant une période d'activité métabolique ralentie.

La production d'éthylène est très sensible aux facteurs de l'environnement : lumière, température, différents types de stress (blessures, radiations, sécheresse, attaques par les microorganismes, etc...). Dans le cas de ces agressions cette synthèse accrue d'éthylène s'accompagne de la formation de composés phénoliques, les enzymes de synthèse PAL ou d'oxydation (peroxydase) de ces composés étant nettement activées. L'éthylène déclenche ainsi des réactions de la plante qui peuvent être assimilées à des sortes de réactions de défense (cicatrisation, protection...) d'où l'appellation d'Hormone de Stress.

La production d'éthylène est stimulée par les auxines (naturelles ou synthétiques). De nombreuses réponses obtenues chez les plantes lors de l'application d'auxine sont reproduites par l'exposition des plantes à l'éthylène. Ainsi de nombreuses réponses attribuées à l'auxine aux fortes concentrations se produisent par l'intermédiaire de l'éthylène (inhibition de l'élongation). Cette interaction fournit un contrôle naturel lors de la production excessive d'auxine.

2. L'acide abscissique

L'acide abscissique ou ABA (de l'angl. abscissic acid) est un sesquiterpénoïde composé de 15 carbones de formule $C_{15}H_{20}O_4$.



- *Action sur la fermeture des stomates* : Il s'agit d'un phénomène très important au plan physiologique puisqu'il permet de contrôler les pertes d'eau de la plante et de maintenir l'homéostasie hydrique. C'est un exemple de réponse rapide à une hormone de l'ordre de quelques minutes (lors de l'apport d'ABA exogène). HARRIS *et al.* (1990) en utilisant un radio immuno essai (extrêmement sensible) pour l'ABA ont été capables de quantifier l'ABA dans une seule cellule de garde. A la suite d'un stress hydrique on observe un accroissement du taux d'ABA par un facteur 20. La production d'ABA se ferait en 1^{er} au niveau des racines stressées qui perçoivent le stress et l'ABA serait transporté vers les apex.
- *Formation des graines et dormance* : L'ABA intervient comme nous le verrons ultérieurement dans le contrôle de l'expression de gènes qui correspondent à des protéines de réserve des graines et à des protéines permettant sans dommage la déshydratation des tissus (les déhydrines). L'ABA est, par ailleurs, nécessaire à l'entrée en dormance des graines et des bourgeons. L'ABA est d'une manière générale un antagoniste des gibbérellines dans des phénomènes comme la dormance ou la production d' α -amylase par les cellules d'aleurone.
- *L'Abscission* : Bien que l'hormone ait été initialement caractérisée en relation avec l'abscission. Ce sont des doses supra physiologiques qui sont actives et on pense que ces doses entraîneraient la surproduction d'éthylène véritable hormone responsable de l'abscission.

3. L'auxine

C'est une hormone végétale stimulatrice (qui induit ou stimule un phénomène physiologique). Au sens strict, l'auxine est de l'*acide indole-acétique* (AIA). Le terme d'auxines a ensuite été élargi à un ensemble de substances possédant des propriétés physiologiques voisines et une conformation chimique apparentée (Acide Indole

Butyrique, Acide Naphtalène Acétique et l'Acide Phényl Acétique). L'AIA et les autres auxines semblent présentes chez toutes les plantes vasculaires.



L'auxine et l'élongation cellulaire :

L'auxine est la principale hormone agissant sur l'augmentation de la taille des cellules. Cet effet, qui dépend des concentrations intracellulaires d'auxine et de la nature des organes, s'exerce sur des cellules jeunes en cours d'élongation, au moment où la paroi est extensible.

On sait que l'élongation cellulaire est un processus complexe qui fait intervenir une absorption d'eau, l'extension de la paroi sous l'effet de la turgescence, et l'incorporation de nouveaux composés entre les mailles de fibrilles de cellulose ainsi distendues.

L'auxine agit en fait sur l'élongation cellulaire à deux niveaux :

- d'une part au niveau de la paroi, dont elle provoque le relâchement. Dans le détail, l'auxine stimule au niveau de la membrane plasmique une pompe à protons, entraînant ainsi une acidification du milieu : le pH au voisinage de la paroi tombe de 6.5 à 4.5. L'efflux de protons a plusieurs conséquences, toutes favorables au relâchement de la paroi : rupture de liaisons acidolabiles entre l'extensine, les hémicelluloses et composés pectiques, et la cellulose ; déplacement du calcium qui soudait entre elles les chaînes uroniques des composés pectiques ; entrée d'ions K^+ provoquant conjointement une entrée d'eau d'où une augmentation de la turgescence cellulaire ; activation de certaines enzymes, de type cellulases et protéases, susceptibles d'hydrolyser les composés de la paroi.
- d'autre part sur les synthèses protéiques, en modifiant l'expression génique. Il est établi que l'auxine agit sur l'activité génique en régulant la synthèse d'ARN codant pour des

protéines nécessaires à l'élongation. Ces protéines spécifiques de l'élongation cellulaire n'ont pas été clairement identifiées à ce jour. Il reste également à préciser leur rôle et le lien qu'elles peuvent avoir avec la stimulation de l'efflux de protons.

L'auxine et la division cellulaire :

L'auxine stimule les mitoses (division cellulaire), mais cette action ne s'exerce pas indistinctement sur tous les méristèmes : l'auxine n'agit pas (ou peu) sur la prolifération au niveau des méristèmes primaires. En revanche, elle a une action très marquée sur la prolifération des cambiums

V. Les pectines constitutives de la paroi cellulaire

A l'inverse des cellules animales, les cellules végétales sont des cellules « revêtues ». La membrane est doublée par une enveloppe continue et solide : la paroi. La figure ci-dessous représente le schéma d'une cellule végétale :

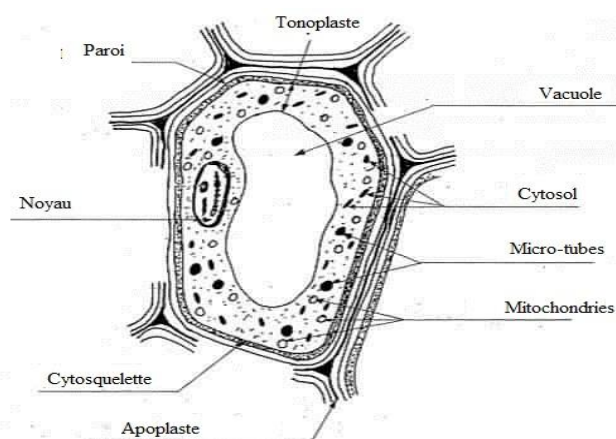


Figure 2 : Schéma d'une cellule végétale

La paroi cellulaire du fruit d'olivier est essentiellement pecto-cellulosique, elle est composée par des polysaccharides pectiques et des polysaccharides hémi-cellulosique (xyloglucanne et xylane).

Les pectines sont constituées d'une zone lisse formée d'homogalacturonanes (HG) et d'une zone hérissée composée de rhamnogalacturonanes (RG) et de chaînes latérales. Ce sont des complexes de polysaccharides à forte teneur en acide galacturonique (AG) et une faible quantité de rhamnose et d'oses neutres (VORAGEN *et al.*, 1995 ; BONNIN *et al.*, 1997).

VI. Mode d'action des PE et PG sur la dégradation des pectines

1. PG : Polygalacturonases

Les polygalacturonases (PG) Les PG coupent la liaison glycosidique α 1-4 reliant deux résidus d'acide galacturonique de la chaîne polygalacturonique. Elles ont pour substrat préférentiel les polygalacturonates. Mais, en fonction de leur sensibilité à la présence de groupement méthoxyl (Me), ces enzymes peuvent réagir différemment. Généralement l'augmentation du degré de méthylation ralentit l'activité enzymatique et le pourcentage final de liaisons hydrolysées (BENEN et al. 1999). Cependant, certaines enzymes PG sont très actives sur un substrat pas ou peu méthoxylés. Alors que, d'autre ont une activité optimale sur pectine fortement méthoxylé (PARENICOVA *et al.*, 2000). La présence de groupement acétyles influence également la dégradation des pectines par les PG.

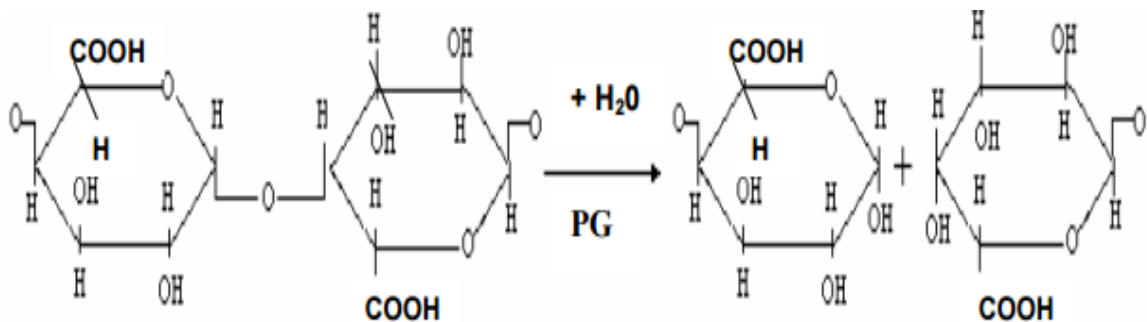


Figure 3 : Action des polygalacturonases sur l'acide polygalacturonique.

2. PE ou PME : Pectinestérases ou pectines méthyl-estérases

Elles catalysent l'élimination des groupements méthoxyles fixés sur la pectine pour former de l'acide pectique et du méthanol par hydrolyse des liaisons esters méthyliques sur le C-6 de l'acide galacturonique (Fig.). Ce mode d'action conduit à une distribution en bloc des groupements carboxyliques libérés et à une grande sensibilité des acides pectiques produits au Ca^{2+} (KHAN *et al.*, 1990).

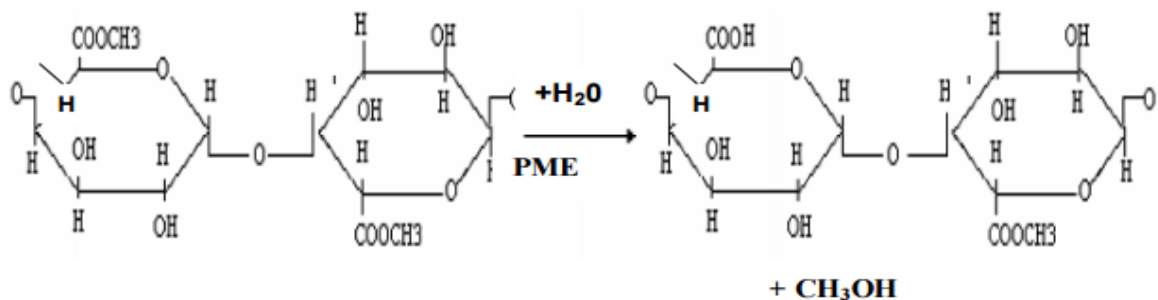


Figure 4 : Action des pectinestérases sur la pectine.

VII. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène, communément appelé eau oxygénée, est un composé chimique de formule H_2O_2 . Il existe naturellement chez les êtres vivants comme sous-produit de la respiration cellulaire. Tous les organismes aérobies possèdent des enzymes, appelées peroxydases, qui catalysent la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 .

Dans le système de défense de la plante, la production des formes actives d'oxygène (FAO) est l'un des événements les plus rapidement observables lors de stress biotiques ou abiotiques (BOLWELL, 1999 ; DAT *et al.*, 2000). Ces formes sont constituées essentiellement du radical superoxyde (O_2^-), du radical hydroxyl (OH), et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

D'après plusieurs études, le peroxyde d'hydrogène s'accumule lors de divers stress abiotiques comme le stress hydrique, salin, températures extrêmes, haute intensité lumineuse ... etc. Dans ce cas, H_2O_2 joue le rôle de molécule signal de la réponse et son application induit une tolérance au stress chez les plantes. Il est aussi décrit comme étant un messenger secondaire dans des mécanismes tels que la signalisation par les facteurs de croissance.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétal

1. Matériel Végétal

Règne	: <i>Plantae</i>
Sous-règne	: <i>Tracheobionta</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Classe	: <i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	: <i>Asteridae</i>
Ordre	: <i>Lamiales</i>
Famille	: <i>Oleaceae</i>
Genre	: <i>Olea</i>
Espèce	: <i>Olea europaea L.</i>
Variété	: <i>Picholine Marocaine</i>



2. Traitement des olives

Les olives, variété Picholine Marocaine non irriguée du jardin botanique de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès -Maroc-, ont été traitées par pulvérisation à la véraison par des phytohormones exogènes commerciales (Ethylène, ABA et IAA). Trois oliviers ont été traités par chaque phytohormone et trois oliviers sans traitement ont été réservés comme témoins.

Les olives ont été récoltées manuellement sur tout le pourtour des oliviers traités et témoins le long de la période de maturation des olives Le tableau ci-dessous montre les dates de prélèvements des olives :

Tableau 1 : dates correspondantes des prélèvements effectués pour chaque traitement d'olivier.

Traitement	Témoin	ABA	IAA	Ethylène
Date de prélèvement	P ₀ (21/09/2014)	P ₀ (21/09/2014)	P ₀ (21/09/2014)	P ₀ (21/09/2014)
	P ₁ (03/10/2014)	P ₁ (03/10/2014)	P ₁ (03/10/2014)	P ₁ (03/10/2014)
	P ₂ (07/11/2014)	P ₂ (25/10/2014)	P ₂ (14/10/2014)	P ₂ (14/10/2014)

	P ₃ (05/12/2014)	P ₃ (22/11/2014)	P ₃ (07/11/2014)	P ₃ (25/10/2014)
--	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Avec P₀ : prélèvement avant le traitement ; P₁ : 1^{er} prélèvement après le traitement ;
P₂ : prélèvement à mi- maturité ; P₃ : prélèvement à maturité complète.

3. Isolement et dosage des pectines

L'isolement des pectines est réalisé à partir de 50g d'olives dénoyautées selon le mode opératoire de Saulnier et Thibault (1987) qui met en œuvre la précipitation du matériel insoluble à l'alcool (MIA) par différents lavages à l'éthanol 95°. A partir de ce MIA, des extractions successives à l'eau, à l'oxalate de Na, à l'acide chlorhydrique et à la soude sont réalisées.

Le principe de dosage des substances pectiques est basé sur la détermination colorimétrique des teneurs en acides galacturoniques des chaînes pectiques hydrolysées en milieu acide à chaud des différentes fractions isolées en présence du 3-hydroxydiphényl (Robertson G. L., 1979).

II. Extraction et mesure des activités enzymatiques endogènes

✓ Préparation de l'extrait enzymatique brute

1g de pulpe d'olives homogénéisées pendant 30 secondes dans 25 ml du tampon phosphate de potassium (0,05 M, pH 6,6) avec 0,2 g de Triton X-100 en utilisant un homogénéisateur Polytron. 25 mg du Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) sont ajoutés et la suspension est centrifugée à 4 ° C pendant 15 min à 13000 rpm. Le surnageant est filtré à travers de la laine de verre et utilisé comme source d'enzyme brute (JESUS TOVAR M. *et al.*, 2002).

✓ Dosage des activités polygalacturonases (PG)

Les activités PG sont mesurées par augmentation du pouvoir réducteur d'une solution de polygalacturonate de sodium selon la méthode SOMOGYI-NELSON (1952). Cette méthode met en œuvre l'acide polygalacturonique dans un tampon acétate (0,1 M, pH 4,8) et fait intervenir des réactifs cuivriques et arséniomolybdique.

0,1 ml de la solution à analyser est ajouté à 0,9ml de la solution tampon contenant l'acide polygalacturonique à 0,5%. Cette solution constituera l'essai. Après 2 heures à 25°C, 1ml du réactif cuivrique est ajouté et maintenu au bain marie à 100°C pendant 20

minutes. Après refroidissement 1 ml du réactif arséniomolybdique est ajouté, ensuite la solution est complétée à 25 ml avec l'eau distillée. La densité optique est lue à 590 nm. Le témoin est effectué de la même façon en remplaçant la solution à analyser par une solution tampon acétate ne contenant pas l'acide polygalacturonique. Le pouvoir réducteur (G) de la solution, exprimé en µg/ml de glucose est défini à partir de la différence de la densité optique entre l'essai et le témoin, et la courbe étalon ($D.O_{590} = 0.015 \times [G]$). Une unité PG est la quantité d'enzymes entraînant un accroissement du pouvoir réducteur du milieu réactionnel équivalent à 1 µmole de glucose par minute.

$$\text{Activité PG (U l}^{-1}\text{)} = G \times 250/21,6$$

✓ Mesure des activités pectinestérases (PE)

Les enzymes PE sont dosées par acidimétrie selon la méthode de BARON (1984). Le milieu réactionnel contient 1 ml d'échantillon brut et 15 ml de pectine de pomme à 0,5 % dans NaCl 0,1 M pH 4,5. Le pH est mesuré au temps $t=0$ puis après 1 heure d'incubation à 37°C. Une unité PE provoque la diminution de 0,01 unité pH par ml d'échantillon et par heure dans les conditions décrites.

III. Dosage de peroxyde d'hydrogène H₂O₂

L'extraction est réalisée à partir 1 g de matière fraîche d'olive broyée dans 15 ml d'acide trichloracétique à 1 %. Le broyat est centrifugé pendant 15 min à 12000 rpm. Le dosage de peroxyde d'hydrogène est réalisé en ajoutant à 0,5 ml du surnageant et 0,5 ml du tampon phosphate 10 mM ; pH 7 et 1 ml d'iodure de potassium à 1 mM. La densité optique du tube est lue à 390 nm.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Détermination de la fragilisation cellulaire des olives au cours de la maturation

1. Evolution des teneurs en pectines et en activités enzymatiques endogènes des olives au cours de la maturation

A la véraison, les pectines constitutives des parois cellulaires des olives sont principalement constituées par des protopectines insolubles. Les pectines solubles extraites par l'eau et par l'oxalate de Na représentent une faible partie par rapport à la totalité des pectines (tableau 1). Au cours de la maturation de la drupe, Les teneurs en protopectines diminuent d'une façon très importante et peuvent perdre jusqu'à 60 % de leurs teneurs initiales. En même temps, on assiste à une augmentation régulière des teneurs en pectines solubles de telle sorte qu'à maturité, la différence entre ces deux types de pectine devient faible (tableau 1, figure 2).

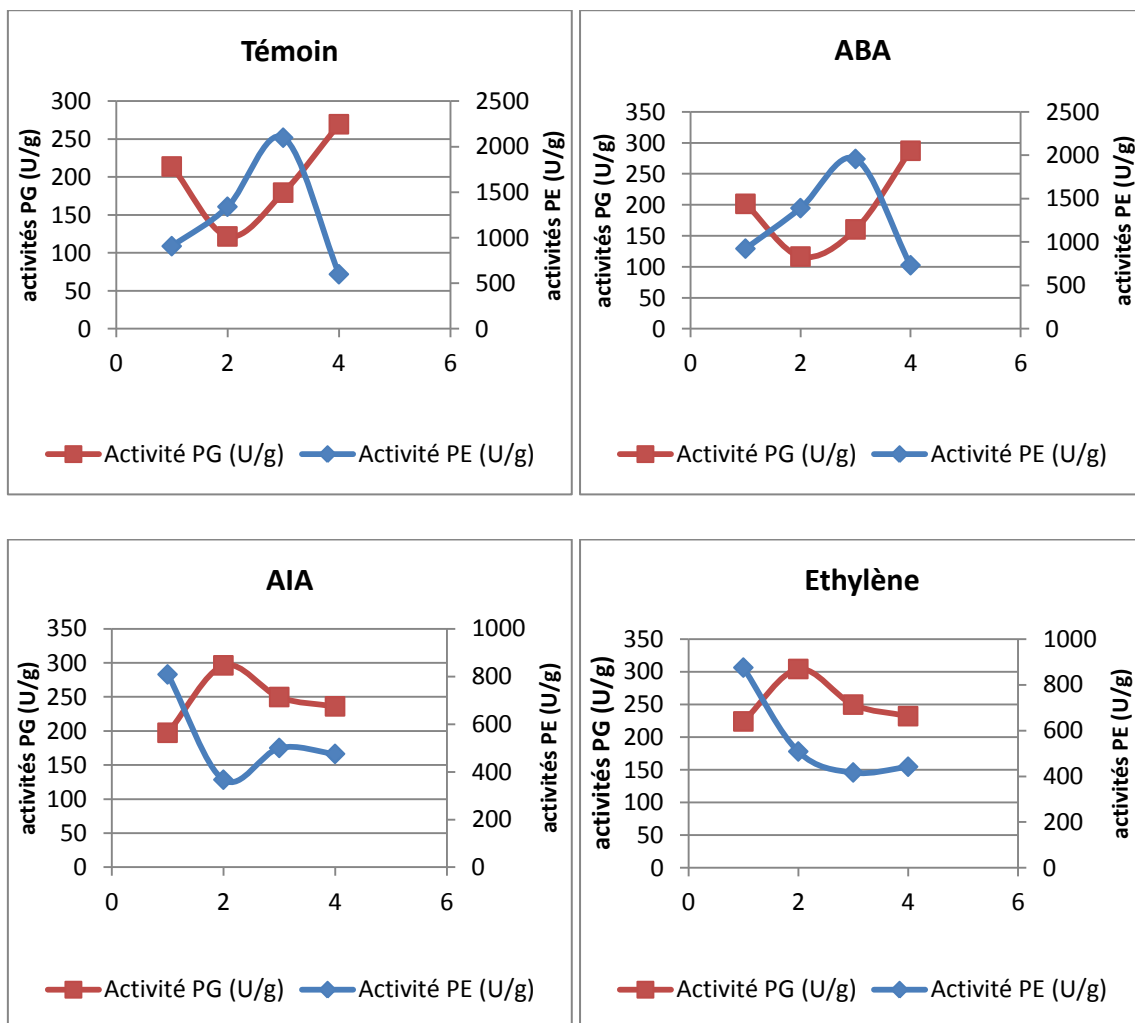


Figure 5 : Evolution des activités enzymatiques endogènes, les activités polygalacturonases (PG) et les activités pectinestérases (PE) au cours de la maturation des olives.

Par ailleurs, la figure 1 montre l'évolution des activités enzymatiques PE et PG des olives témoins et traités pendant la période de maturation des olives. On constate que ces deux activités augmentent généralement au cours de la maturation chez les olives témoins : Les activités PE augmentent progressivement jusqu'à un maximum enregistré au quelques jours avant la maturité complète puis chutent à nouveau à la fin de la maturation. Les activités PG diminuent au cours de la véraison puis augmentent au début de la maturation puis d'une manière plus importante et plus rapide à la fin. L'augmentation de ces activités est accompagnée par une diminution des teneurs en protopectines et par l'augmentation des teneurs en pectines solubles (tableau 1).

De même pour les olives traités par ABA, les activités PE et PG suivent à peu près le même scénario que chez les olives témoins : Les activités PE augmentent progressivement jusqu'à un maximum qui dépasse celui enregistré chez les olives témoins puis chutent à un niveau moins important à maturité par rapport au témoin. Les activités PG pour ce traitement suivent une évolution similaire à celles du témoin.

Chez les olives traités par AIA et ceux traités par l'éthylène, on constate à la véraison une activité enzymatique endogène semblable aux olives témoins. Ensuite, on assiste à une augmentation rapide des activités PG et une diminution intense des activités PE estimée de 50 %. Par la suite, Ces deux activités se stabilisent à ces niveaux enregistrés tout au long de la période de maturation de la drupe.

2. Influence des traitements par les phytohormones exogènes à la véraison sur la fragilisation de la paroi cellulaire chez les olives au cours de la maturation

Quel que soit le traitement utilisé, on constate toujours une diminution des teneurs en protopectines et une augmentation des teneurs en pectines solubles au cours de la maturation avec diminution de l'écart entre ces deux types de pectines à maturité (tableau 1). Ceci se répercute sur les teneurs totales en pectines puisque les protopectines représentent la quasi-totalité des pectines à la véraison. En outre, l'application d'un traitement par l'éthylène assure une dégradation intense et rapide de la matière pectique puisque les olives traités par cette phytohormone atteignent leur maturité complète au bout d'un mois contrairement aux olives témoins qui ont pris deux mois et demi pour atteindre leur maturité complète.

Les mêmes remarques se reproduisent dans le cas des olives traité par l'AIA avec un retard pour atteindre une maturité complète de deux semaines par rapport aux olives traités

par l'éthylène et une précocité par rapport aux olives témoins estimée d'un mois. Alors que le traitement des olives par l'ABA n'agit pas d'une façon remarquable sur la dégradation de la matière pectique puisqu'ils ont besoin de deux mois pour atteindre une maturité complète.

Tableau 2 : influence de l'application des phytohormones exogènes à la véraison sur l'évolution des différentes fractions en pectines au cours de la maturation.

Traitement	Date de la récolte	Pectines solubles PSE+PSOX	Pectines insolubles PSH+PSOH	Pectines totales
Témoin	P0 (21/09/14)	1241	5074	6315
	P1 (03/10/14)	1292	3931	5223
	P2 (07/11/14)	1061	2897	3958
	P3 (05/12/14)	1443	2018	3461
(ABA)	P0 (21/09/14)	1075	5083	6158
	P1 (03/10/14)	1467	3887	5354
	P2 (25/10/14)	1207	2812	4019
	P3 (22/11/14)	1849	2044	3893
(AIA)	P0 (21/09/14)	1295	5132	6427
	P1 (03/10/14)	1369	3342	4711
	P2 (14/10/14)	1366	2133	3499
	P3 (07/11/14)	1715	1202	2917
(Ethylène)	P0 (21/09/14)	1150	4916	6066
	P1 (03/10/14)	1104	2295	3399
	P2 (14/10/14)	1230	1325	2555
	P3 (25/10/14)	1715	932	2647

II. Influence des phytohormones exogènes sur l'évolution de la synthèse des molécules H₂O₂ chez les olives au cours de la période de maturation

Le tableau 2 montre l'évolution de la synthèse des molécules de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ au cours de la maturation des olives. On constate que la synthèse de ces molécules augmente progressivement au cours de la maturation des olives témoins et atteignent leurs maximum à maturité, sauf que cette augmentation reste faible (50 %) ; la même constatation peut être faite sur les olives traitées par l'ABA. Par contre, les olives traitées par l'éthylène et par l'AIA montrent une très forte synthèse des molécules d' H₂O₂ surtout à maturité avec une évolution de 134 % et 271% respectivement pour les olives traités par l'éthylène et l'AIA.

Tableau 3 : influence de l'application des phytohormones exogènes sur la synthèse de [H₂O₂] au cours de la maturation des olives.

Traitement	Date de récolte	[H ₂ O ₂] µmol/g	% H ₂ O ₂
Témoin	P0 (21/09/14)	0,57	-
	P1 (03/10/14)	0,58	1,75
	P2 (07/11/14)	0,77	35
	P3 (05/12/14)	0,86	50,88
ABA	P0 (21/09/14)	0,68	-
	P1 (03/10/14)	0,68	0
	P2 (25/10/14)	0,81	19,11
	P3 (22/11/14)	1,15	69,11
AIA	P0 (21/09/14)	0,49	-
	P1 (03/10/14)	0,81	65,31
	P2 (14/10/14)	0,64	30,61
	P3 (07/11/14)	1,82	271,43
Ethylène	P0 (21/09/14)	0,84	-
	P1 (03/10/14)	1,03	22,62
	P2 (14/10/14)	1,04	23,81
	P3 (25/10/14)	1,97	134,52

III. Discussion

La diminution importante des teneurs en pectines totales au cours des 1ères phases de la maturation pourrait être liée à l'activité du PG détecté dans le fruit. La capacité du PG à dépolymériser la chaîne pectique d'un fruit au début de la maturation a été signalée par Brady et al. (1982) et Dellapenna et al. (1990) qui ont détecté trois isoformes de l'endo-PG au cours de la maturation de la tomate et ont constaté que la PG1 (endo-PG) est accumulée la première fois dans le fruit encore vert suivie par PG2 et (exo-PG) dans le fruit mûr.

La baisse modérée des teneurs en pectines totales enregistrée au milieu de la maturation, pourrait être liée directement à des valeurs élevées de l'activité de PE présente dans les fruits confirmant les observations de M.I. Mínguez-Mosquera (2002) qui a montré qu'à ce stade, l'action PE et des faibles activités de PG favorisent la formation de ponts calcium dans les chaînes pectiques, rendant la solubilisation de la protopectine moins importante.

Au dernier prélèvement, la dégradation de la matière pectique augmente à nouveau mais à un niveau moins important que celui enregistré dans la première étape de maturité. Ceci revient à l'activité PG qui atteint son activité maximal à ce stade de maturité et son rôle à transformer son substrat.

L'application d'un traitement par une phytohormone de type inhibiteur comme l'ABA sur les olives au cours de la maturation reste sans influence sur l'évolution des activités enzymatiques endogènes PG et PE et par conséquent sans effet sur la dégradation de la matière pectique. Par ailleurs, le traitement des olives par une phytohormone comme l'éthylène ou l'AIA influence l'évolution des activités enzymatiques endogènes en augmentant l'activité PG et diminuant l'activité PE puis les maintenir à des niveaux stables le long de la période de maturation. Ce qui explique la dégradation intense des pectines et la maturation précoce des olives.

La production des formes actives d'oxygène (FAO), notamment H₂O₂, est l'un des événements les plus rapidement observables lors de stress biotique ou abiotique (Bolwell, 1999 ; Dat *et al.*, 2000). Dans notre étude, cette production est remarquée en fin de maturation chez les olives traitées par l'AIA et par l'éthylène. L'augmentation de la synthèse H₂O₂ peut être donc être attribuée à la précocité de la maturité des olives, cette dernière étant largement influencée par l'application de l'AIA et de l'éthylène.

CONCLUSION

Conclusion

Au cours de la maturation les protopectines ont augmenté. Cette augmentation est négligeable devant la diminution des pectines insolubles.

La dégradation des pectines au cours de la maturation dépend de l'activité enzymatique : PE dégrade la fonction méthyle qui se localise dans la chaîne de l'acide polygalaturonique pour que PG coupe ces liaisons.

L'acide abscissique n'intervient dans aucune étape de la maturation contrairement à l'AIA et l'éthylène. Ces dernières jouent un rôle important dans l'accélération de la maturation.

Ainsi, le peroxyde d'hydrogène est synthétisé en fin de maturation chez les olives traitées par l'auxine et l'éthylène. Cela est dû à la précocité de maturation qu'à connu ces fruits.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Baron A. ; 1984 : Norme française homologuée de détermination des substances pectiques T₂. I/MGS/CSM,0314 et 0607700.

Benen. J.A.E , et al. 1999. Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C.Plant Cell 11: 1081-1092.

Bolwell, G.P., 1999. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. Current Opinion in Plant Biology 2, 287±294 .

Bonnin,C.P , Potter, I, Vanzin,G.F and Reiter W.D (1997).The MURI gene of *Arabidopsis thaliana* encodes an isoform of GDP-D-mannose-4,6-dehydratase,catalyzing the first step in the de novo synthesis of GDP-L-fructose Proc.Natl.Acad.sci-USA-94,2085-2090.

Brady, C.J., G. MacAlpine, W.B. McGlasson, and Y. Ueda (1982). Polygalacturonase in Tomato Fruits and the Induction of Ripening, Austral. J. Plant Physiol. 9:171–178.

DellaPenna, D., C.C. Lashbrook, K. Toenjes, J.J., Giovannoni, R.L. Fischer, and A.B. Bennett (1990). Polygalacturonase Isoenzymes and Pectin Depolymerization in Transgenic Rin TomatoFruit, Plant Physiol. 94:1882–1886.

Harris, Rothrock,D.W.,Fanning, A.,Inkeles,S.B.,Goodnight, Jr.,S-H,Illing-worth,D.R., and Connor, W.E. 1990. Fish oils in hypertriglyceridemia: A dose response study. Am.J.Clin.Nutr.51:399-406.

Dat J., Vandenabeele S., Vranova E. , Van Montagu M., Inze D * AND Van Breusegem F.,2000 , CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 779–795.

Jesús Tovar M., Paz Romero M., Joan Girona, and José Motilva M. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L. cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 82 : 892-898.

Khan, M. A. S. ; Bain, S. K. ; Akbar, M. A. ; Chowdhury, S. A., 1990. Studies on the effect of feeding urea treated rice straw supplemented with different levels of fishmeal in early lactating dairy cows.

M^R Isabel Minguez-Mosquera*, Lourdes Gallardo-Guerrero, and Maria Roca. JAOCS, Vol 79, no.1(2002).

Parenicova L., Benen J.A.E., Kesterh. , and Visserj .2000 'pga A and pga B encode two constitutively expressed endo polygalacturonases of *Aspergillus niger*'. biochem J. 345,637-644.

Robertson .G.L. ; 1979: The fractional extraction and quantitative determination of pectic substances in grapes and musts .Am .J.Enol.Vitic.,Vol3013,182-186.

Rombouts F.M. ET Pilnik W.; 1979: In Polysaccharides in Food. 7. Pectic Enzymes. New ed. J.M. Blanchard and J.R. Mitchell.Studies in the Agricultural and Food Science.

Saulnier et Thibault, J.-F. (1987). Enzymic degradation of pectic substances from the pulp of grape berries. Carbohydr. Polym., 7, 329-43.

Solm J and Devel H. ; 1955: Helv. Chim. Acta, 34, 2242.

Somogyi M. ; 1952: Notes on sugar determination. J. Biol.Chem.,195,19.

Voragen, A.G.J. ,Pilnik,W., Thibault, J.F., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C. (1995) Pectins in Food Polysaccharides, Stephen, A.M. (ed) , Marcel DEKKER Inc., NY,pp. 287-339.

RESUME

Résumé

Le présent travail consiste à étudier l'évolution des activités enzymatiques sur la dégradation des composés pectiques de différents oliviers cultivés dans le jardin botanique de la faculté des sciences et techniques de Fès. Ces derniers ont subi plusieurs traitements par trois phytohormones qui sont : éthylène, acide abscissique et auxine.

L'évolution de la synthèse de peroxyde d'hydrogène est également étudiée sur ces mêmes prélèvements.

Une partie du travail décrit les protocoles utilisés pour les extractions ainsi pour les dosages. Une autre partie est consacrée pour les résultats.

Ces résultats montrent que l'éthylène et l'auxine influencent sur le temps de la dégradation des pectines et donc sur le temps de maturation ce qui provoque une précocité de maturation.

Mots clés : phytohormones, acide abscissique, éthylène, auxine, pectines, peroxyde d'hydrogène, pectinesterase, polygalacturonases.