HAL
open science

Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux

Capucine Massot

To cite this version:

Capucine Massot. Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0631 . tel-00585438

HAL Id: tel-00585438

https://theses.hal.science/tel-00585438v1

Submitted on 12 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THESE

présentée pour obtenir le grade de **Docteur en Sciences**
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Spécialité : Sciences Agronomiques

Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux

par Capucine MASSOT

Soutenue le 1er décembre 2010 devant le jury composé de

Laurent URBAN	Professeur à l'Université d'Avignon	Président
Pierre BALDET	Chargé de recherche INRA, Bordeaux	Rapporteur
Dominique RUMEAU	Chargée de recherche CNRS, Cadarache	Rapporteur
Christophe ROBIN	Directeur de recherche INRA, Nancy	Examinateur
Michel GENARD	Directeur de recherche INRA, Avignon	Directeur de thèse
Hélène GAUTIER	Chargée de recherche INRA, Avignon	Directrice de thèse

Ecole doctorale
Systèmes intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences, Environnement (SIBAGHE)
Montpellier

Laboratoire
INRA- UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles (PSH)
Avignon

Mange des tomates, mon amour
Mange des tomates, nuit et jour
Ça donne bonne mine
C'est plein de vitamines
Vitamines A, B, C
C'est bon pour la santé

Jack Ary

Remerciements

Que de personnes rencontrées pendant cette thèse, que de moments partagés dont je ne pourrais retranscrire ici toute l'intensité mais que je garde en moi, soyez en sûr, et dont je me souviendrais avec bonheur.

Je souhaite tout d'abord remercier de tout cœur Hélène Gautier pour son encadrement, sa réactivité, nos discussions autour des résultats et de leur variabilité, son enthousiasme et son dynamisme. Elle a toujours été là pour me relancer dans les périodes les plus difficiles. Sans oublier également toute sa famille (Rémy et les enfants) pour les quelques moments passés ensemble et surtout pour leur compréhension.
Je remercie également Michel Génard pour les discussions constructives autour des articles et de la modélisation, ses encouragements et son soutien pendant ces trois ans autour du vaste sujet qu'est la vitamine C.

Je remercie les membres du jury, Dominique Rumeau, Pierre Baldet, Christophe Robin et Laurent Urban qui ont accepté de juger mon travail.

Un énorme merci à la fine équipe vitamine C de l'unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes :

- Rébecca Stevens bien sûr, pour ses chaleureux encouragements et son aide dans la rédaction des articles
- Cécile Garchery pour m'avoir initiée au «concept » de QPCR
- Gisèle Riqueau pour son aide dans les prélèvements
- Noé Gest pour son effervescence du midi à 'la dinette'.

Je remercie Félicie Lopez-Lauri pour sa collaboration à ce travail par les discussions partagées et par son aide importante dans la méthodologie employée. Elle m'a également encouragée à réaliser un monitorat à l'Université d'Avignon. Cette expérience m'a permis de m'épanouir pendant ces trois années de thèse, j'ai pu m'investir dans la formation et l'enseignement universitaire et rencontrer des doctorants d'autres horizons.

Je remercie également Laure Valat avec qui j'ai partagé beaucoup d'heures de travaux pratiques et qui m'a beaucoup apporté sur le plan pédagogique.

Je remercie l'équipe EQF qui m'a accueillie, les chercheurs, Nadia et Philippe, pour leurs remarques constructives mais aussi Béatrice pour son aide en expérimentation.
J'adresse un grand merci à Valentina Baldazzi qui dès son arrivée s'est plongée avec moi dans la vitamine C, et à la petite Lara pour avoir été de mon côté jusqu'au bout même si elle a beaucoup occupé sa maman, sans oublier Mister motobécane…

Un énorme MERCI aux différentes équipes techniques sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible : Claude Courbet et Michel Pradier, grâce à qui mes tomates ont poussé et même bien poussé … Et les équipes techniques du GAFL et tout particulièrement Manu et Yollande, mais aussi l'équipe du laboratoire chapotée par Laurent : Doriane, Emilie, Patricia, Sylvie et

Guy, j'y est passé du temps mais en leur compagnie, bercée par la hotte, ce fut un véritable plaisir.

Un très grand merci à Alain Crovetti, pour sa patience, son calme quand on arrive au dernier moment pour imprimer et son travail d'une grande qualité !

Je remercie le congélateur Dometic de ne pas avoir lâché au mauvais moment et de m'avoir permis de venir pique-niquer le week-end devant les vergers et le Jouan pour sa fiabilité.

Je remercie mes acolytes de bureau Odile, ma maman INRA, Guigui (continues tu es sur la bonne voie) et Kiki (quoi ? comment ? Kiki n'a pas de bureau… pourtant elle a passé du temps dans ce bureau, faut dire qu'il y avait à faire surtout sur le mien…)

Merci aux doctorants et jeunes docteurs pour leur soutien moral, pour les locaux: Marion, Benoît, Safaa, Camille, Carole, Hazem, Rémy et les petits nouveaux qui sont nombreux en cette fin d'année 2010 et à qui je souhaite bon courage et bonne chance mais aussi Chloé, Rémy, Alban, Claire, Sanders, Louise et Mélissa (je suis encore là pour tes essuie-glaces), pour les autres unités INRA, et enfin Mélanie représentant les sciences « molles », notre rencontre *fortuite* fut vraiment une chance pour moi et un vrai bonheur.

Merci au LBM pour son accueil, je me souviendrais toujours de l'ambiance et des repas dans le couloir, merci à Sophie pour la bible de la QPCR (faut que je te la rende !) et Adrien Charles Aurélien (une seule et même personne… qui n'aime pas les remerciements tant pis tu y es quand même), je sais que je peux passer réparer la machine à café en cas de disette…

Merci à Romain pour m'avoir accompagnée et supportée pendant une partie de ce travail dans les bons et mauvais moments.

Enfin et surtout, un énorme merci à ma famille, mes parents, qui ont su m'accompagner et m'encourager dans ce challenge malgré l'éloignement, les sœurettes et leurs enfants qui m'ont bien occupée et changé les idées, les frangins rugbymen ou non pour les week-ends sportifs. Je suis fière et heureuse d'avoir pu vous présenter mon travail en Avignon et je profite de ce document pour vous dire aussi que je vous aime.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE *1*

Synthèse bibliographique *4*

1. La tomate **4**
1.1. Botanique 4
1.2. Importance économique 4
1.3. Structure et développement du fruit de tomate 5
1.3.a. La fleur 5
1.3.b. La structure du fruit de tomate 5
1.3.c. Le développement 6
1.3.d. La maturation 7

2. La vitamine C **8**
2.1. Structure de la vitamine C 8
2.2. Biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes 8
2.2.a. La voie majeure de biosynthèse chez les plantes 8
2.2.b. Les autres voies de biosynthèse 9
2.2.c. L'hypothèse d'un cycle VTC2 10
2.3. Recyclage de l'ascorbate et statut redox 12
2.4. Dégradation de la vitamine C 13
2.5. Variabilité des teneurs en vitamine C dans la plante 14
2.5.a. Facteur génétique 14
2.5.b. La variabilité spatiale 16
2.5.c. La variabilité temporelle 17

3. Les rôles de la vitamine C dans la plante **19**
3.1. Croissance et développement 19
3.1.a. Division cellulaire 19
3.1.b. Expansion cellulaire 20
3.2. Cofacteur 22
3.3. Antioxydant 22
3.4. Défense contre les pathogènes 24
3.5. Photosynthèse 24

4. La lumière : facteur majeur de régulation de la teneur en vitamine C dans les plantes **28**
4.1. Régulation directe de la teneur en vitamine C par la lumière 28
4.1.a. Impact de la lumière sur la voie de synthèse 28
4.1.b. Impact de la lumière sur le recyclage 30
4.1.c. Impact de la lumière sur la dégradation 31
4.2. Régulation indirecte de la teneur en vitamine C par la lumière 32
4.2.a. Rôle de la température 32
4.2.b. Rôle des sucres 32
4.2.c. Rôle du transport de vitamine C et de précurseurs dans la plante via le phloème 33
- Le transport inter- et intracellulaire 33
- Le transport entre organes 33

Présentation du travail de thèse *35*

MATERIEL ET METHODES *39*

Le matériel végétal *39*

Les méthodes *39*

1. Dispositif expérimental **39**

2. Prélèvement et échantillonnage 40

3. Mesures sur fruits et sur feuilles 40

4. Analyses biochimiques 40

4.1. Dosage colorimétrique de la vitamine C 40

4.2. Dosage des activités des enzymes du cycle ascorbate/glutathion 41

4.3. Dosage des sucres 41

4.4. Dosage du thréonate 41

5. Analyse du transcriptome 41

CHAPITRE I : La concentration en sucres solubles, facteur non déterminant pour la régulation de la vitamine C dans les fruits *46*

Résumé *47*

Abstract *48*

Introduction *49*

Material and Methods *50*

Field experiment during summer 50

Greenhouse experiment during autumn 51

Fruit analyses 52

Data analyses 53

Results *53*

Discussion *59*

CHAPITRE II : Etude indirecte du transport entre feuilles et fruits *62*

Résumé *63*

Abstract *64*

Introduction *65*

Materials and methods *66*

Experiment 1 66

Experiment 2 68

Fruit analyses 71

Statistical analysis 73

Results *74*

Impact of leaf and /or fruit shading on fruit composition at breaker stage 74

Impact of fruit shading on AsA and sugar content in tomato fruit during ripening 76

Comparison of leaf shading and whole plant shading during ripening on fruit AsA and sugar content 80

Discussion *83*

CHAPITRE III : Etude des différences de régulation de la voie de biosynthèse dans les feuilles et les fruits en réponse à la lumière *86*

Résumé *87*

Abstract *88*
Introduction *89*
Material and Methods *92*
Long term shading experiment 92
Diurnal experiment 92
Light intensity measurements 93
Fruit analyses 93
Results *94*
Vitamin C content and vitamin C related gene expression in leaves and red fruits respond differently to shading 94
Vitamin C shows daily fluctuations in leaves but not in fruits 96
Two additional genes *GalDH* and *GLDH* respond to daily light fluctuations in leaves 98
Discussion *100*
Light regulation of vitamin C synthesis in leaves 100
Transcripts in leaves and fruits 102
Light regulation of vitamin C synthesis in fruits 103
Supplemental data 106
CHAPITRE IV : Réponse de la vitamine C à la lumière en fonction de la température ... *110*
Introduction *111*
Material and Methods *113*
Results *118*
Impact of light at different temperature during fruit off-vine ripening on fruit external coloration (a/b) and fruit fresh weight 118
Fruit vitamin C content after 56h in growth cabinet depends on light and temperature 119
Regulation of vitamin C metabolism by light and temperature 120
Discussion *123*
Vitamin C regulation by light in fruits 123
Vitamin C and oxidative stress 127
Vitamin C regulation by temperature 127
Conclusion *128*
CHAPITRE V : Vers un modèle simplifié de la teneur en vitamine C totale dans les fruits de tomate *130*
Variations des teneurs en vitamine C totale pendant le développement du fruit de tomate131
1. Objectif et données expérimentales 131
2. Construction du modèle 132
2.1. Hypothèses simplificatrices 132
2.2. Estimation des paramètres *k* et *g* au cours du développement du fruit 133
2.3. Importance de la disponibilité en sucres sur la concentration en vitamine C totale 136

3. Conclusion et perspectives **139**

Impact de la température et du rayonnement sur la teneur en vitamine C du fruit de tomate ***140***

1. Objectif et données expérimentales **140**

2. Construction du modèle **140**

2.1. Hypothèses simplificatrices 140

2.2. Impact du rayonnement et de la température sur les taux de synthèse et de dégradation de la vitamine C 141

3. Conclusion et perspectives **144**

DISCUSSION GENERALE ***145***

Y a-t-il un transport de vitamine C ou de précurseurs des feuilles vers les fruits ? ***146***

Quel est le rôle des sucres dans la synthèse de la vitamine C ? ***147***

Comment la lumière modifie-t-elle la voie de synthèse de la vitamine C ? ***149***

1. Impact de la lumière sur la voie de synthèse de la vitamine C dans les feuilles **149**

2. Impact de la lumière sur la voie de synthèse de la vitamine C dans les fruits **151**

2.1. Fruits in situ 151

2.2. Fruits détachés 152

Comment la lumière influence-t-elle le recyclage et la dégradation de la vitamine C dans les fruits? ***153***

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ***155***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ***159***

ANNEXES ***172***

Annexe I ***172***

Annexe II ***182***

Annexe III ***187***

Annexe IV ***191***

NOTES ***192***

Abréviations

Enzymes

AO	Ascorbate oxydase
APX	Ascorbate peroxydase
DHAR	Déhydroascorbate
GalDH	L-Galactose déshydrogénase
GGP	GDP-L-galactose phosphorylase (codée par 2 gènes :*VCT2* et *VTC5*)
GLDH	L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase
GME	GDP-D-mannose-3',5'-épimérase
GMP	GDP-D-mannose pyrophosphorylase
GPP	L-Galactose-1-phosphate phosphatase
GR	Glutathion réductase
MDHAR	Monodéhydroascorbate
MIOX4	Myo-inositol oxygénase
PMI	Phosphomannose isomérase
CAT	Catalase
SOD	Superoxyde dismutase

Acides nucléiques

ADN_c	Acide désoxyribonucléique complémentaire (=cDNA)
ARN	Acide ribonucléique (=RNA)
ATP	Adénosine triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide 5' triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
GDP	Guanosine diphosphate
Oligo dT_{21}	oligonucléotide constitué d'une succession de 21 désoxythymidines

Unités

μL	Microlitre
Ct	Threshold cycle (= cycle seuil)
g	Force relative de centrifugation
JAA	Jour après anthèse
MF	Matière fraîche
mg	Milligramme
sec , min, h, j, m	Seconde, minute, heure, jour, mois
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
MS	Matière sèche
nm	Nanomètre

Méthodes

GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
QPCR	PCR quantitative en temps réel
RT	Transcription inverse

Divers

ANOVA	Analyse de variance
AsA	Acide ascorbique ou vitamine C
AMR1	régulateur de la voie de synthèse de l'ascorbate
CO_2	dioxygène
DCMU	3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl urée
DHA	Déhydroascorbate
DTT	Dithiothréitol
FAO	Forme active de l'oxygène

FD	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine NADH reductase
GSH	Glutathion réduite
GSSG	Glutathion oxydée
L-AA	Ascorbate
L-Gal	L-Galactose
MDHA	Monodéhydroascorbate
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
PR	liée à la pathogénie
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
PQ	Plastoquinone
PC	Plastocyanine
O_2^- (ou $O_2^{\cdot -}$)	Anion superoxyde
$^1O_2$	Oxygène singulet
^3Chl	Chlorophylle triplet
HO^-	Radical hydroxyle

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité Plantes et Systèmes de culture Horticoles en collaboration avec l'unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes et le laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
Une partie de ce travail a déjà fait l'objet d'une valorisation sous forme d'article ou de communication orale.

Articles publiés

Gautier H, **Massot C**, Stevens R, Sérino S, Génard M (2009). Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany,* **103**: 495-504

Garcia V, Stevens R, Gil L, Gilbert L, Gest N, Petit J, Faurobert M, Maucourt M, Deborde C, Moing A, Poëssel JL, Jacob D, Bouchet JP, Giraudel JL, Gouble B, Page D, Alhagdow M, **Massot C**, Gautier H, Lemaire-Chamley M, de Daruvar A, Rolin D, Usadel B, Lahaye M, Causse, M, Baldet, P, Rothan C (2009). An integrative genomics approach for deciphering the complex interactions between ascorbate metabolism and fruit growth and composition in tomato. *Comptes Rendus Biologies*, **332** (11): 1007-1021

Gautier H, Lopez-Lauri F, **Massot C**, Murshed R, Marty I, Graselly D, Keller C, Sallanon H, Génard M (2010). Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling, Special issue Antioxidant properties of crops. *Functional Plant Science and Biotechnology,* **4** (SI1)**:** 66-75

Massot C, Génard M, Stevens R, Gautier H (2010). Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 751-757

Génard M, Robin C, Gautier H, **Massot C**, Bénard C, Larbat R, Bertin N, Le Bot J, Adamowicz S, Bourgaud F (2010). Elaboration de la qualité du fruit: composition en métabolites primaires et secondaires. *Innovations Agronomiques*, **9** : 47-57

Article soumis

Massot C, Stevens R, Génard M, Longuenesse J.J, Gautier H
Light affects ascorbate content and ascorbate related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta*

Posters

Massot C, Génard M, Sanders J, Garcia G, Gautier, H. How do temperature and irradiance affect tomato fruit content in vitamin C? *International Symposium on Human Health Effects of Fruit and Vegetables* (2009)

Massot C, Stevens R, Génard M, Longuenesse JJ, Gautier H[1]. Light regulates ascorbic acid genes in red fruits of tomato. *5th European Plant Science Organisation conference (EPSO) Finland* (2010)

Massot C, Gautier H, Longuenesse J.J, Grasselly D, Génard M. Impact de la charge en fruit sur le contenu en sucres et en vitamine C des tomates. 5èmes rencontres du végétal. Angers, France (2009)

[1] Personne ayant présentée le poster

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Dans un contexte de préoccupation croissante des consommateurs pour la qualité des produits, et de promotion par l'Etat d'une alimentation saine favorisant notamment la consommation des fruits et légumes, l'amélioration de la qualité des fruits et légumes, en répondant à l'attente des consommateurs, est un enjeu stratégique de l'INRA et de la profession. Cette amélioration de la qualité peut être obtenue par sélection variétale ou en optimisant les conditions de cultures. Mais pour cela, il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'élaboration de cette qualité. Le programme de recherche de l'équipe écophysiologie de la qualité des fruits (EQF, unité Plantes et Systèmes de culture Horticoles, INRA d'Avignon) porte sur la compréhension de l'élaboration de la qualité des fruits charnus (dont le modèle d'étude est la tomate) sous contrôle du génome, de l'environnement climatique et des pratiques culturales. Cette qualité inclut de nombreuses composantes physico-chimiques, comme le calibre (taille et poids frais) du fruit, la composition en sucres, en acides et en composés antioxydants, ainsi que la texture, qui sont appréhendées à l'échelle de l'organe ou du tissu. Les mécanismes de variation des teneurs en sucres et en acides, composés majoritaires du fruit, ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années. En revanche, les composés antioxydants, présents en faibles quantités dans la plante, ont, jusqu'à présent, été peu étudiés par la communauté scientifique malgré leur rôle dans le fonctionnement de la plante et leurs effets bénéfiques connus ou supposés sur la santé humaine (Koo, 1996, Li and Schellhorn, 2007b, Li and Schellhorn, 2007a).

La tomate a une place importante dans l'alimentation humaine puisqu'elle est consommée toute l'année, dans le monde entier. Elle se positionne au premier rang mondial des fruits cultivés avec une production d'environ 127 millions de tonnes en 2007 (Food and Agriculture Organisation, 2007). La tomate est considérée comme un aliment santé car elle est faiblement calorique, riche en minéraux et qu'elle contient de nombreux antioxydants (vitamine C, polyphénols, caroténoïdes, Figure 1).

La vitamine C, puissant antioxydant, est essentielle à l'homme. Comme celui-ci a perdu la capacité de la synthétiser, il doit se la procurer via son alimentation. Ainsi, les fruits et les légumes constituent la principale source de vitamine C dans l'alimentation humaine. La vitamine C joue, par ailleurs, de nombreux rôles dans la plante notamment lors de la croissance, du développement, de la photosynthèse et de la protection contre les stress

oxydatifs. Son importance pour l'alimentation humaine et la plante fait de la vitamine C un objet d'étude important pour l'amélioration de la qualité nutritionnelle des fruits et légumes.

Des variations importantes de teneur en vitamine C dans les fruits et légumes ont été décrites et observées en fonction de la saison et des conditions de culture. Chez la tomate, par exemple, les teneurs en vitamine C pour une même variété peuvent varier de 84 à 590 mg kg^{-1} MF[2] (Dumas et al., 2003). Dès 1945, Hamner et al. ont suggéré que la lumière était le principal facteur de variation des teneurs en vitamine C dans les fruits. Cependant, si des études montrent que la teneur en vitamine C augmente avec le rayonnement reçu par le fruit (El-Gizawi et al., 1993, Li et al., 2009), l'impact de la lumière sur le métabolisme de la vitamine C dans les fruits reste peu étudié. En effet, la régulation par lumière a été essentiellement étudiée chez les feuilles où une stimulation des voies de biosynthèse et de recyclage (réduction de la forme oxydée) a pu être mise en évidence lors du passage de l'obscurité à la lumière (Dowdle et al., 2007, Yabuta et al., 2007). La lumière pourrait modifier i) de manière directe la teneur en vitamine C des feuilles en modifiant sa synthèse, son recyclage et sa dégradation mais également ii) de manière indirecte en modifiant la température de la feuille qui elle-même a une influence sur la teneur en vitamine C ou iii) en jouant sur la teneur en sucres via une augmentation de la photosynthèse (substrat pour la synthèse de vitamine C). Chez les fruits, la régulation de la vitamine C est plus complexe encore car il pourrait s'ajouter à ces différents mécanismes, le transport de sucres, d'autres précurseurs de la vitamine C ou de vitamine C en provenance des feuilles. **L'objectif de mon travail de thèse était de comprendre l'impact de la lumière sur les variations de teneurs en vitamine C du fruit de tomate en** abordant successivement différentes hypothèses : la modification de la teneur en vitamine C dans le fruit par les sucres (Chapitre I), par les transports de vitamine C ou de précurseurs des feuilles vers les fruits (Chapitre II), par une stimulation de la voie de synthèse de la vitamine C par la lumière (Chapitre III), par une modification de la synthèse, du recyclage et de la dégradation en fonction du microclimat du fruit (Chapitre IV) et de synthétiser ces résultats en proposant un modèle décrivant l'accumulation de vitamine C dans le fruit de tomate en fonction du microclimat du fruit et du stade de développement (Chapitre V).

[2] MF : matière fraîche

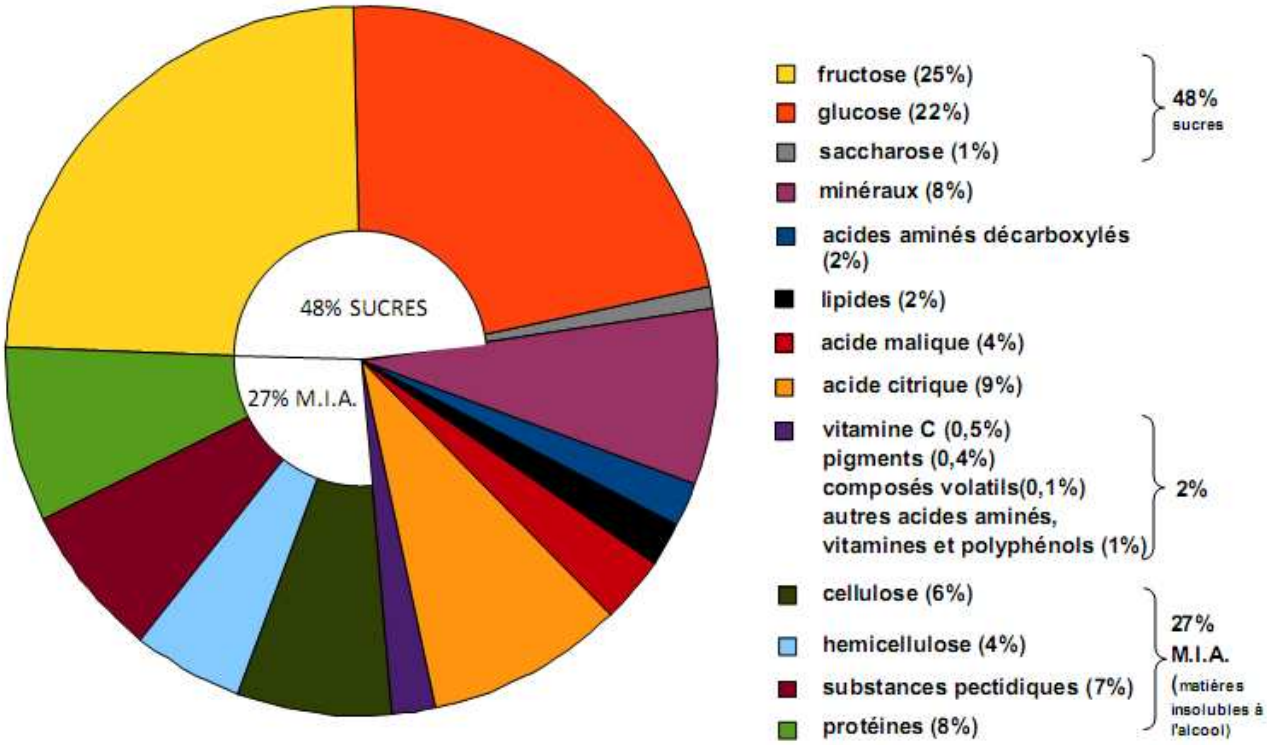


Figure 1: Composition de la matière sèche chez la tomate mûre d'après Davies et Hobson (1981). Les pourcentages sont calculés en masse. La tomate est majoritairement constituée d'eau (de 90 à 95%), les 5 à 10% restant correspondent à la matière sèche qui est déterminante dans l'élaboration de la qualité organoleptique et nutritionnelle du fruit. Ainsi, chez la tomate, la matière sèche est constituée pour moitié de sucres, de 13% d'acides et d'environ 20% de composés pariétaux (pectine, hémicellulose) déterminant le goût et la texture du fruit. Parmi les composés d'intérêt nutritionnel, les minéraux représentent 8% de la matière sèche et les vitamines, pigments et polyphénols environ 2%.

Synthèse bibliographique

Ce chapitre présente la tomate, objet de cette étude et une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur la vitamine C, son métabolisme, les facteurs de variabilité génétique, temporelle et spatiale dans les plantes et son rôle dans la plante. Puis, il introduit la lumière comme facteur majeur de régulation des teneurs en vitamine C dans la plante.

La tomate, *Solanum lycopersicum* L., appartient à la famille des solanacées. Elle est originaire d'Amérique du Sud et fut introduite, en France, au XVIe siècle comme plante ornementale, puis cultivée à partir du XVIIIe siècle pour son fruit consommé comme un légume.

1. La tomate

1.1.Botanique

La tomate est une plante vivace herbacée mais qui est cultivée, sous nos climats tempérés, comme une annuelle. Les variétés utilisées pour la consommation en frais sont à port indéterminé, c'est-à-dire que la tige peut se développer indéfiniment par empilement de sympodes (constitués de 3 feuilles et d'un bourgeon floral) se développant à partir de bourgeons axillaires après floraison du bourgeon terminal. Ces variétés nécessitent une culture tuteurée, majoritairement conduite sous abri. A l'inverse, les variétés destinées à l'industrie sont à port déterminé entraîné par la floraison du bouquet axillaire après la production de quelques sympodes. La maturation des fruits est alors plus groupée permettant une récolte mécanique en plein champ. La température optimale de croissance de la tomate se situe entre 21° et 24°C le jour et entre 15° et 17°C la nuit.

1.2.Importance économique

Malgré ces exigences et grâce au progrès des techniques culturales, la tomate est produite presque partout dans le monde et à n'importe quelle saison. Ses fruits se retrouvent aujourd'hui consommés toute l'année, dans le monde entier. Elle joue, par conséquent, un rôle important dans l'alimentation humaine. La tomate se positionne au premier rang mondial des fruits cultivés avec une production d'environ 127 millions de tonnes en 2007 (Food and Agriculture Organisation, 2007), dont une partie importante est destinée à la transformation.

La France a produit, quant à elle, 850 000 tonnes en 2007 dont la majorité s'est écoulée sur le marché du frais (végétable n°33, avril 2008).

1.3.Structure et développement du fruit de tomate

1.3.a. La fleur

Les fleurs de tomate sont regroupées en inflorescence formant des grappes. Elles sont hermaphrodites et autofécondes, c'est-à-dire que le pollen d'une fleur peut féconder la même fleur. À l'anthèse, la fleur est pleinement épanouie et peut alors être fécondée, cette période ne dure que quelques jours (Figure 2).

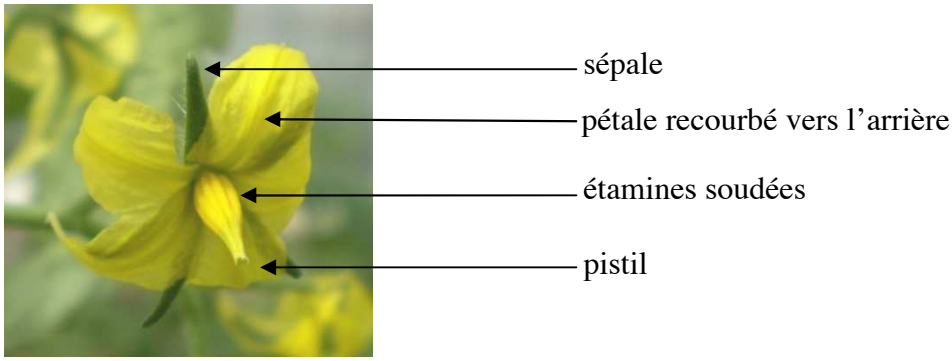


Figure 2 : Fleur de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) à l'anthèse

1.3.b. La structure du fruit de tomate

La tomate est une baie qui peut être de forme, de couleur et de taille très différentes suivant les variétés. Elle est constituée de plusieurs loges contenant les graines rattachées au placenta. La partie charnue, appelée péricarpe, provient de la différenciation des parois de l'ovaire de la fleur. Elle est divisée en trois parties : le péricarpe externe, le péricarpe radial et le péricarpe interne appelé columelle. Dans le péricarpe externe, on distingue l'exocarpe membrane externe de la tomate ou peau, l'endocarpe membrane interne qui délimite les loges et le mésocarpe charnu constitué de plusieurs couches de cellules (Figure 3). Le placenta s'étend dans les locules et entoure les graines, celui-ci est ferme et compact dans les fruits immatures. À maturité, ses tissus se séparent formant le tissu loculaire gélatineux et homogène plus communément connu sous le nom de gel. Ce gel finit par remplir toute la cavité loculaire.

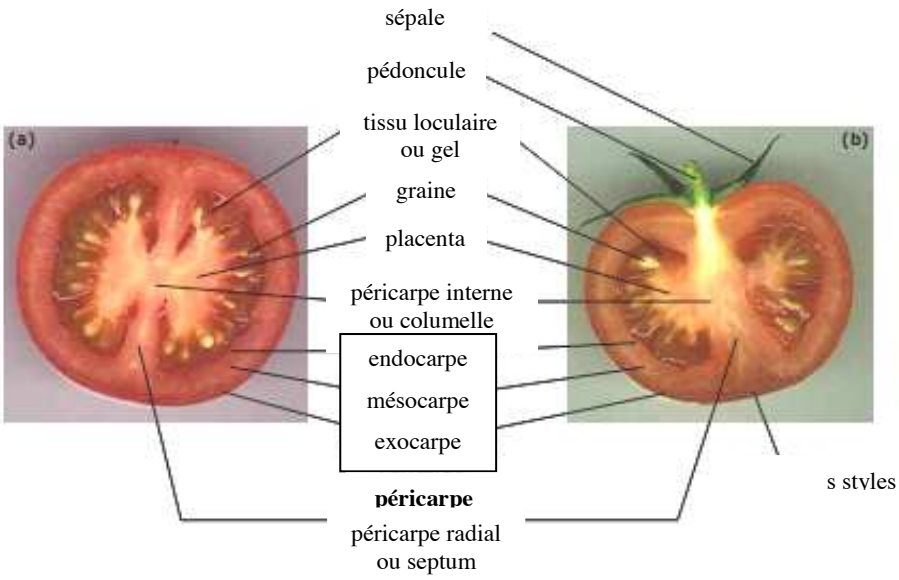


Figure 3 : Structure du fruit de tomate à maturité (Chaïb, 2007) : (a) coupe transversale et (b) coupe longitudinale.

1.3.c. Le développement

Le développement du fruit de tomate peut être divisé en trois phases : la division, l'expansion et la maturation (Gillaspy et al., 1993). Au cours du développement de la fleur, une première période de divisions cellulaires a lieu dans l'ovaire, puis la croissance de l'ovaire cesse et ne reprendra qu'après la fécondation, si elle a lieu. La première phase de développement du fruit (ou mise à fruit), après la fécondation, amorce le processus de formation du fruit. Si la fécondation n'a pas lieu, le fruit est dit parthénocarpique, c'est-à-dire qu'il ne contient pas de graine et se développe peu. Dans cette première phase, la croissance du fruit est principalement due à des divisions cellulaires intenses. Puis, pendant la deuxième phase, la croissance du fruit continue principalement par expansion cellulaire jusqu'à ce que le fruit atteigne sa taille finale au stade vert mature (Figure 4). Cette phase est très importante car les cellules en expansion exercent alors une grande force de puits pour le transport des assimilats (sucres, acides aminés, Gillaspy et al., 1993). La durée de chacune de ces phases affecte de la taille finale de fruit.

1.3.d. La maturation

Au stade vert mature, le fruit a atteint sa taille finale. C'est le début de la troisième phase : la maturation. Cette phase permet d'aboutir à un fruit 'rouge mûr' (Figure 4). La tomate est un fruit climactérique, c'est-à-dire qu'au début de la maturation, la respiration augmente et de l'éthylène est synthétisé en grande quantité, de façon transitoire, lors de la crise ou pic climactérique (Giovannoni, 2001). Cette maturation s'accompagne de nombreux changements physiologiques et biochimiques conférant au fruit ses propriétés organoleptiques (couleur, texture, goût…). Parmi ces changements, les plus importants sont :

Couleur : les chloroplastes sont transformés en chromoplastes, avec dégradation simultanée de la chlorophylle et synthèse de caroténoïdes, en particulier de lycopène.

Goût : l'acidité du fruit diminue suite à la dégradation de l'acide malique et de l'acide citrique. Les teneurs en sucres (hexoses) augmentent du fait du stockage vacuolaire des sucres importés et de la dégradation des réserves d'amidon.

Arômes : de nombreux composés aromatiques (esters, aldéhydes) sont synthétisés.

Texture : le fruit perd de sa fermeté suite à la dégradation de certains constituants des parois cellulaires (hémicellulose, cellulose, pectines).

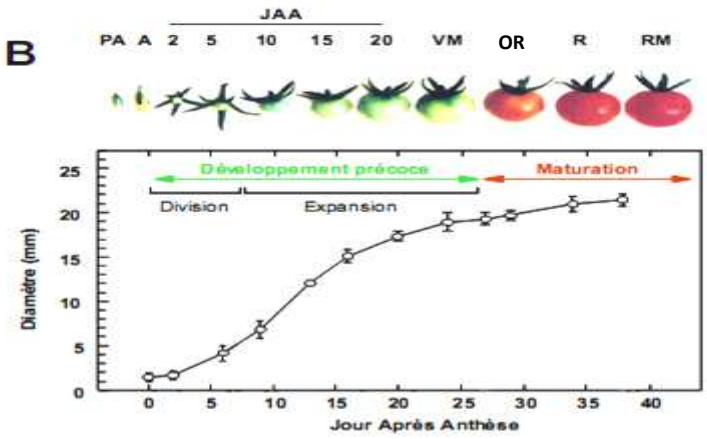


Figure 4 : Développement du fruit de tomate de type cerise (*Solanum lycopersicum* L.). Les différents stades de développement du fruit de tomate : PA, pré-anthèse ; A, anthèse ; JAA, jour après anthèse ; VM, vert mature, OR, orange ; R, rouge, RM, rouge mûr. Suivi du diamètre du fruit pendant le développement (Alhagdow, 2006).

2. La vitamine C

2.1.Structure de la vitamine C

La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone (formule chimique $C_6H_8O_6$). Dans la plante, l'acide ascorbique est principalement présent sous sa base conjuguée : L-Ascorbate (L-AA, Figure 5). L'ascorbate ou l'acide ascorbique constitue la forme réduite de la vitamine C. Par ailleurs, l'ascorbate peut être oxydé en monodéhydroascorbate (MDHA) qui se dissocie rapidement de nouveau en ascorbate et en déhydroascorbate (DHA) ; le DHA est ensuite dégradé ou de nouveau réduit (cf parties 2.3 et 2.4, Davey et al., 2000, Horemans et al., 2000b).

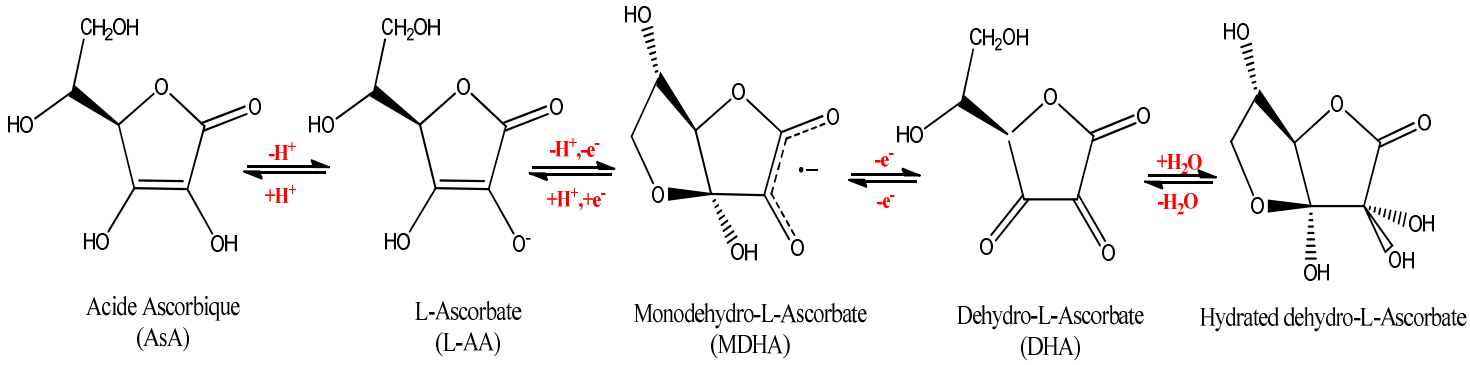


Figure 5 : Structure chimique de l'Acide Ascorbique, du L-Ascorbate, du monodéshydro-L-Ascorbate, du déhydro-L-Ascorbate et du déhydro-L-ascorbate hydraté. Représentation de Cram : liaison dans le plan ——— , liaison vers l'arrière ⋯⋯⋯ et liaison vers l'avant ◣ d'après Potters et al. (2002).

2.2.Biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes

Plusieurs voies de biosynthèse ont été décrites chez les plantes depuis 1998.

2.2.a. La voie majeure de biosynthèse chez les plantes

La voie majeure de biosynthèse de l'ascorbate dans les plantes (voie L-galactose (L-Gal, Figure 6) a été découverte tardivement, en 1998, par Wheeler et al. (1998). Son établissement découle d'une série de résultats obtenus à partir de mutants d'*Arabidopsis* déficients en ascorbate (les mutants *vtc*) au cours des 40 dernières années. Récemment, Dowdle et al. (2007) ont montré que les doubles mutants d'*Arabidopsis vtc2/vtc5* (gènes codants pour l'enzyme GDP-L-galactose phosphorylase) étaient incapables de croître sans ajout d'ascorbate ou de L-Gal (Dowdle et al., 2007). Ces résultats confirment l'importance de cette

voie dans la synthèse de l'ascorbate chez *Arabidopsis*. La voie L-Gal est constituée de 10 étapes enzymatiques du D-Glucose au L-ascorbate avec la formation intermédiaire du GDP-D-Mannose et du L-Galactose (Linster and Clarke, 2008) (Figure 6). Les six premières étapes permettent de synthétiser des nucléotide-oses activés qui sont aussi des précurseurs de composés pariétaux. À partir de l'étape 7, la voie est spécifique de la synthèse de l'ascorbate. Le GDP-L-galactose est transformé en L-Galactose-1-phosphate+GDP par la GDP-L-galactose phosphorylase (GGP, étape 7). Puis, il est hydrolysé par la L-Galactose-1-phosphate phosphatase (GPP) en L-galactose (étape 8). Enfin, ce dernier est oxydé en 2 étapes (étapes 9 et 10) par la L-Galactose déshydrogénase située dans le cytosol (GalDH) pour former du L-galactono-1,4-lactone puis par la L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GLDH) pour finalement synthétiser de l'ascorbate. Cette dernière étape se produit au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Ainsi, l'ascorbate est synthétisé au niveau de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et peut donc facilement être transporté à travers la membrane externe et ainsi être distribué à tous les compartiments intracellulaires. Par ailleurs, plusieurs voies alternes de biosynthèse de la vitamine C ont également été décrites.

2.2.b. Les autres voies de biosynthèse

Après 1998, d'autres voies de synthèse ont également été décrites (voir Smirnoff, 2001, Ishikawa et al. 2006 et 2008). Ainsi, Wolucka et al.(2003) démontrent que l'enzyme GME (GDP-mannose-3',5'-épimérase) peut changer de forme moléculaire par interaction avec d'autres protéines (étape 6 de la voie L-Gal) et catalyser également la conversion vers le GDP-L-Gulose chez *Arabidopsis*. Ils proposent alors une autre voie à partir de l'étape 6 de la voie L-Gal (voie L-Gulose, Figure 6*)*. Néanmoins, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer l'importance de cette voie par rapport à la voie L-Gal. Deux autres voies ont été décrites à partir d'intermédiaire de l'acide uronique. Chez la fraise, où la vitamine C s'accumule principalement pendant la maturation, l'ascorbate est synthétisé à partir des composés issus de la dégradation des parois cellulaires (acide galacturonique, voie de récupération, Figure 6, Agius et al., 2003). Les auteurs suggèrent qu'il pourrait en être de même dans d'autres fruits.

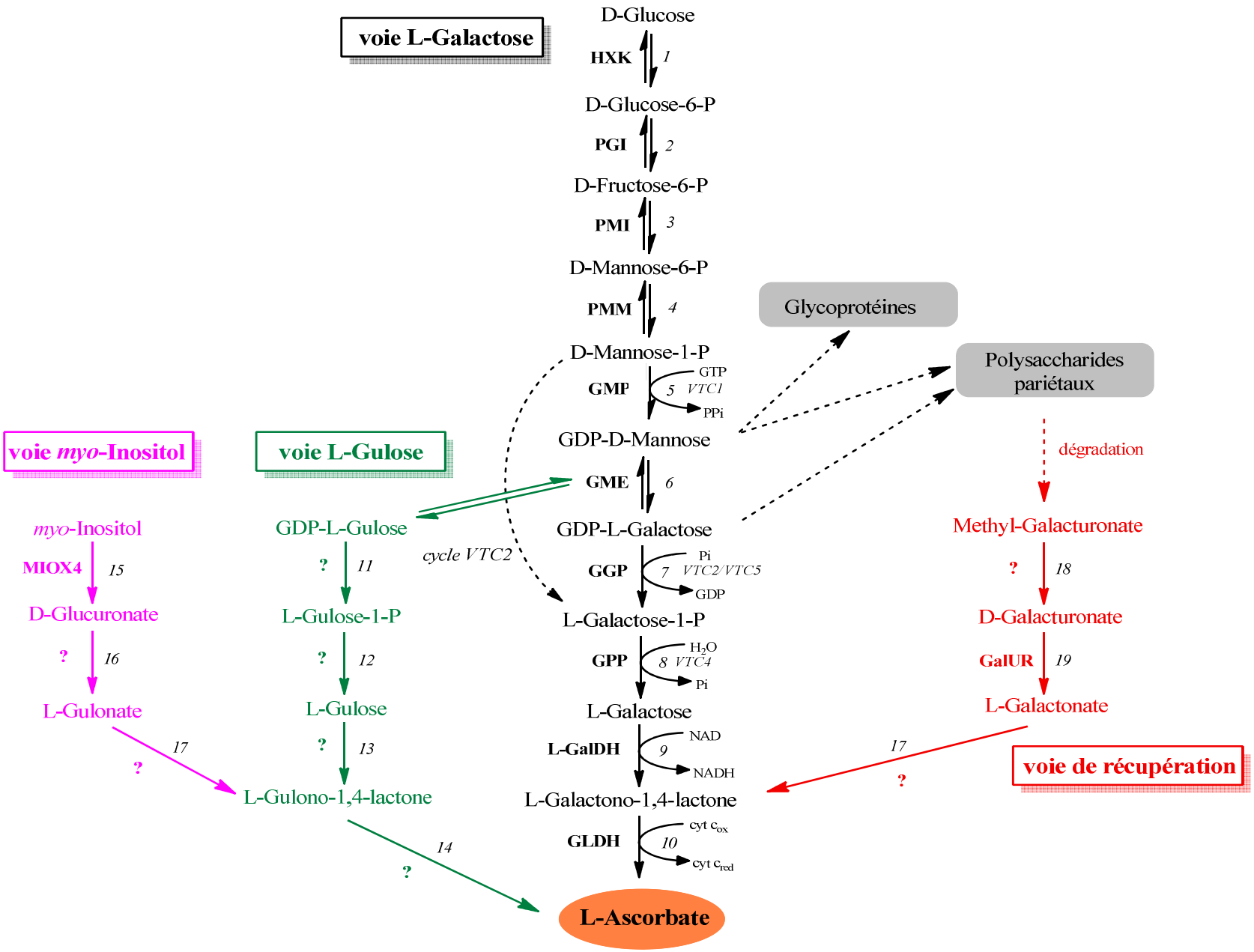


Figure 6 : Voies de synthèse du L-ascorbate chez les plantes. Voie principale L-Galactose (Wheeler et al., 1998), voie *myo*-Inositol (Agius et al. 2003), voie L-Gulose (Wolucka Van Montagu, 2003) et voie de récupération des polysaccharides pariétaux (Lorence et al., 2004). Les enzymes qui catalysent les réactions sont: 1, hexokinase (HXK); 2, phosphogulose isomérase (PGI); 3, phosphomannose isomérase (PMI); 4, phosphomannose mutase (PMM); 5, GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP); 6, GDP-mannose-3',5'-épimérase (GME); 7, GDP-L-Galactose phosphorylase (GGP); 8, L-Galactose-1-P-phosphatase (GPP); 9, L-Galactose-déshydrogénase (L-GalDH); 10, L-Galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GLDH) ; 11, nucléotide pyrophosphatase ou sucre-1-P guanylyltransférase; 12, phosphatase; 13, déshydrogénase; 14, L-gulono-1,4-lactone déshydrogénase/oxidase; 15, myo-inositol oxygénase (MIOX4); 16, uronate réductase; 17, aldonolactonase; 18, methylesterase; 19, D-galacturonate reductase. En italique les gènes identifiés chez *Arabidopsis*
Le point d'interrogation indique que l'enzyme de cette réaction n'est pas encore connue (d'après Alhagdow 2006) .

Cependant le profil métabolique effectué par Carrari et al. (2006) ne soutient pas cette idée chez la tomate puisque l'acide galacturonique s'accumule fortement pendant la maturation (Carrari et al., 2006). Enfin, Lorence et al.(2004) proposent une voie de synthèse à partir du *myo*-Inositol toujours chez *Arabidopsis*. Celui-ci serait oxydé par la *myo*-inositol oxygénase (MIOX4) en D-glucuronate. Puis, comme pour la voie du L-Gulose, une L-Gulono-1,4-lactone déshydrogénase/oxydase permettrait de former de l'ascorbate (voie *myo*-Inositol, Figure 6). Cependant, des travaux récents ont montré que cette dernière voie joue une rôle négligeable dans la synthèse de l'ascorbate chez *Arabidopsis* (Endres and Tenhaken, 2009).

2.2.c. L'hypothèse d'un cycle VTC2

En 2007, Laing et al. (2007) mesurent une autre activité que l'activité GDP-L-galactose phosphorylase pour l'enzyme GGP codée par deux gènes (*VTC2/VTC5) :* une activité D-mannose-1-P guanylyltransférase. Ces derniers proposent alors l'existence d'un cycle appelé « cycle VTC2 » entre les étapes 5 et 7 (Figure 6) dans lequel la biosynthèse du L-Galactose-1-P se ferait à partir du D-mannose-1-P par l'action combinée de l'enzyme GPP (avec l'activité guanylyltransférase) et GME (Figure 7a). GMP servant alors uniquement à réapprovisionner le cycle en GDP-D-mannose consommée pour la synthèse des polysaccharides et la formation des glycoprotéines. Peu après, Wolucka et Van Montagu (2007) approfondissent ce cycle en proposant un cycle étendu directement branché sur la photosynthèse sans nécessité d'activité PMI (Phosphomannose isomérase, Figure 7b). Ce cycle nécessite alors la présence d'une enzyme GDP-D-mannose-2'-épimérase convertissant le GDP-D-glucose en GDP-D-mannose. Cependant, l'incapacité à confirmer l'activité guanylyltransférase de l'enzyme GPP (Linster et al., 2008), la récente mise en évidence de l'activité PMI chez *Arabidopsis* comme principale voie de synthèse du GDP-D-mannose (Sharples and Fry, 2007) et l'absence d'identification d'une enzyme GDP-D-mannose-2'- épimérase représentent à ce jour des obstacles à l'existence et au fonctionnement de ce cycle. Un travail plus approfondi est nécessaire pour déterminer si ces cycles sont physiologiquement pertinents.

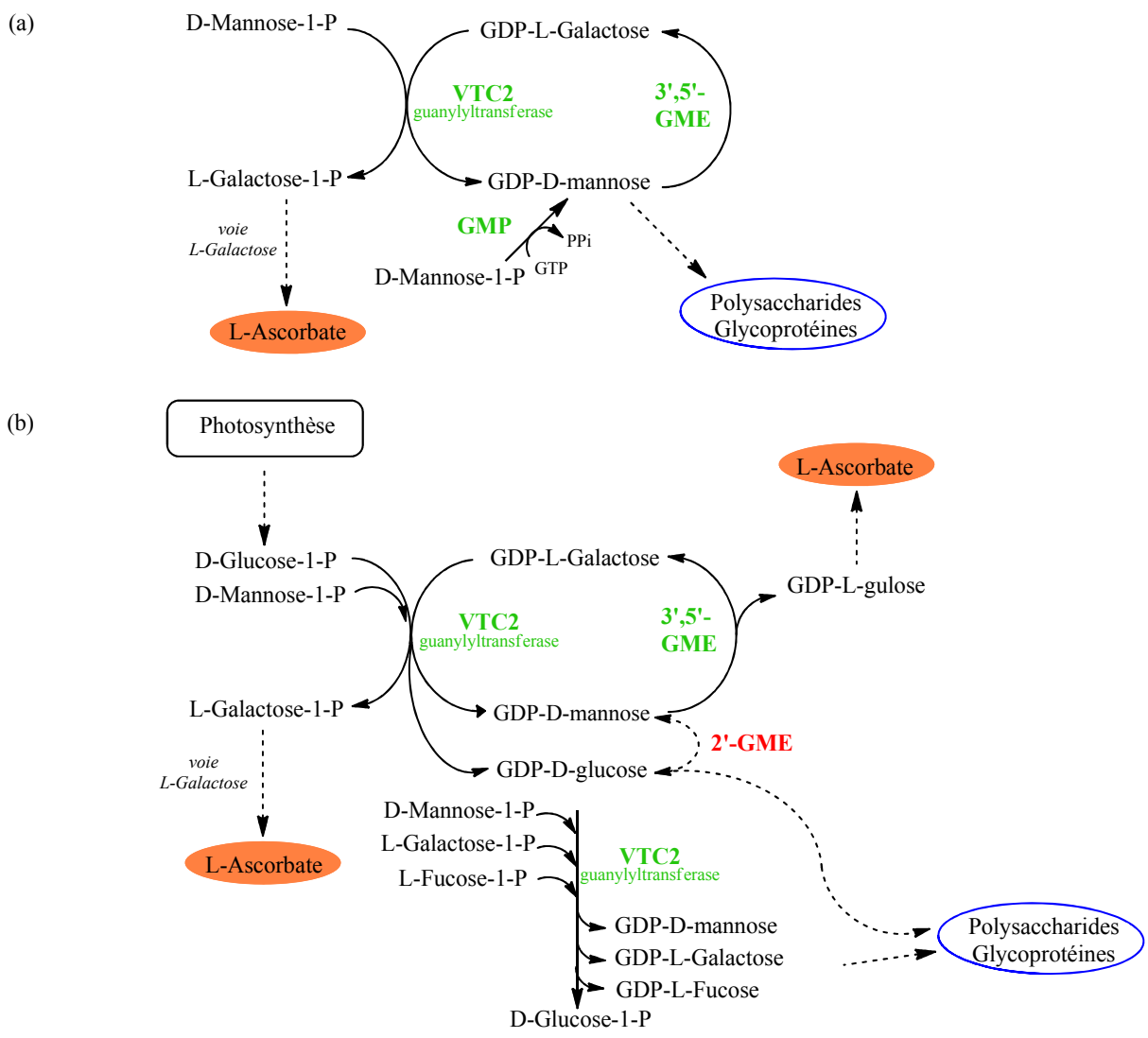


Figure 7 : Cycles VTC2. (a) Cycle proposé par Laing et al. (2007), la synthèse de L-Galactose-1-P à partir du D-mannose-1-P ne requiert que 2 enzymes : VTC2 guanylyltransférase et GDP-D-mannose 3'5'-épimérase (3'5'-GME). L'activité GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) est indispensable pour la formation de GDP-D-mannose utilisé d'autre part pour la synthèse des polysaccharides pariétaux et des glycopotéines. (b) Cycle étendu proposé par Wolucka et Van Montagu (2007). Il fait intervenir une enzyme supplémentaire encore inconnue (en rouge) qui permettrait la conversion de GDP-D-glucose en GDP-D-mannose (2'-GME). Dans ce second cycle, le D-Glucose-1-P provient directement de la photosynthèse est converti en GDP-D-glucose par l'enzyme VTC2 guanylyltransférase libérant du L-Galactose-1-P qui entre dans la voie de synthèse de l'ascorbate. Le GDP-D-glucose peut être recyclé en GDP-L-galactose par l'intervention successive des enzymes 2'-GME et 3',5'-GME. La réaction initiant ce deuxième cycle pourrait faire intervenir une GDP-D-glucose pyrophosphorylase et une GDP-D-mannose-2'-épimerase pour convertir le D-glucose-1-phosphate en GDP-D-glucose et finalement, en GDP-D-mannose ou comme proposé par Laing et al. (2007), une GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) d'après Linster and Clarke, 2008.

2.3.Recyclage de l'ascorbate et statut redox

La vitamine C existe sous plusieurs formes dans la plante (partie 2.1). Les formes oxydées DHA et MDHA sont obtenues par oxydation non enzymatique ou enzymatique de l'ascorbate grâce à l'ascorbate oxydase (AO) ou à l'ascorbate peroxydase (APX) (Smirnoff, 2000b). Elles peuvent être soit dégradées (partie 2.4), soit réduites par deux réductases (la mono-déhydroascorbate réductase : MDHAR et la déhydroascorbate réductase : DHAR) pour former de nouveau de l'ascorbate (Figure 8). Ce recyclage de l'ascorbate par les réductases est au fondement même de son rôle d'antioxydant puisqu'il permet de régénérer la forme active (forme réduite) de la vitamine C après son utilisation pour réduire les espèces réactives de l'oxygène (cf partie 3.3, Chen et al., 2003, Ishikawa et al., 2006) et de maintenir un état redox de la vitamine C dans la plante (rapport entre la forme réduite et la forme totale). Comme la vitamine C est présente en grande quantité dans la plante, elle représente une contribution importante dans l'équilibre redox total de la plante avec les couples NAD(P)/NAD(P)H et glutathion réduit/oxydé (Chen and Gallie, 2004). L'équilibre redox intègre les informations en provenance du métabolisme et de l'environnement contrôlant la croissance et la réponse de la plante pour une adaptation à des changements d'environnement ou à des stress biotiques et abiotiques (cf partie 3).

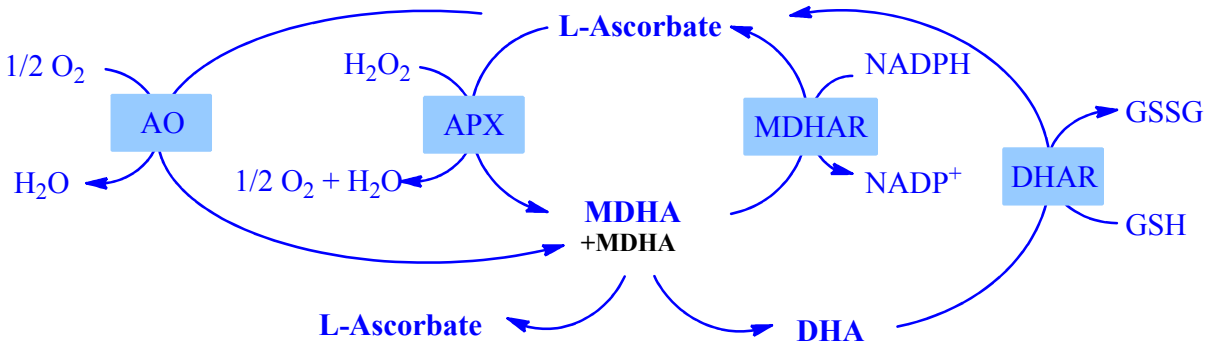


Figure 8 : Recyclage de l'ascorbate. Enzymes de recyclage en bleu : AO (ascorbate oxydase) ; APX (ascorbate peroxydase) ; DHAR (déhydroascorbate réductase) et MDHAR (monodéhydroascorbate réductase) ; DHA : déhydroascorbate, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, MDHA : monodéhydroascorbate, $NADP^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée), NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite).

2.4.Dégradation de la vitamine C

La ou les voies de dégradation de l'ascorbate chez les plantes ne sont pas très bien connues. En effet, même si plusieurs travaux ont mis en évidence, dès les années 1970, le catabolisme de l'ascorbate en oxalate, acide thréonique ou acide tartrique (Saito and Kasai, 1969, Yang and Loewus, 1975, Nuss and Loewus, 1978, Williams and Loewus, 1978), les composés de dégradation peuvent être différents suivant les plantes étudiées. Ainsi, chez certaines plantes de la famille des Vitaceae (vigne), l'ascorbate est dégradé en tartrate (Saito and Kasai, 1969, Saito and Kasai, 1984), chez d'autres plantes, comme l'épinard et le trèfle, c'est l'oxalate qui s'accumule (Yang and Loewus, 1975) ou le thréonate comme chez le géranium citron ou l'oseille (Helsper and Loewus, 1982). Chez la tomate, on ne sait pas exactement quel composé est issu de la dégradation de l'AsA, même si Alhagdow et al. (2007) suggèrent que cela pourrait être le thréonate dans le fruit de tomate. Les étapes conduisant à ces composés restent encore obscures (Green and Fry, 2005). Dans la voie proposée par Green et Fry (Figure 9, 2005), à partir du DHA, la dégradation peut se faire en partie de façon non-enzymatique mais également enzymatique même si certaines enzymes sont, à ce jour, encore inconnues. Cette voie a été mise en évidence dans l'apoplasme de cellules de rosier mais est également suggérée possible, par les auteurs, dans les autres compartiments cellulaires. L'ascorbate est un métabolite peu stable qui s'oxyde très rapidement. Ainsi, 24h suffisent pour perdre 40% du pool de vitamine C dans des feuilles d'Arabidopsis détachées et gardées à l'obscurité (Conklin et al., 1997). Pallanca et Smirnoff (2000) observent que cette dégradation est directement proportionnelle à la taille du pool de vitamine C (Pallanca and Smirnoff, 2000). De plus, il semble qu'elle soit également plus importante dans les organes en forte croissance (13%/h dans les axes embryonnaires de pois contre 2,5%/h dans les feuilles d'*Arabidopsis*, Pallanca and Smirnoff, 2000). Du fait du manque de connaissance des voies de dégradation, le renouvellement de la vitamine C dans la plante reste peu connu.

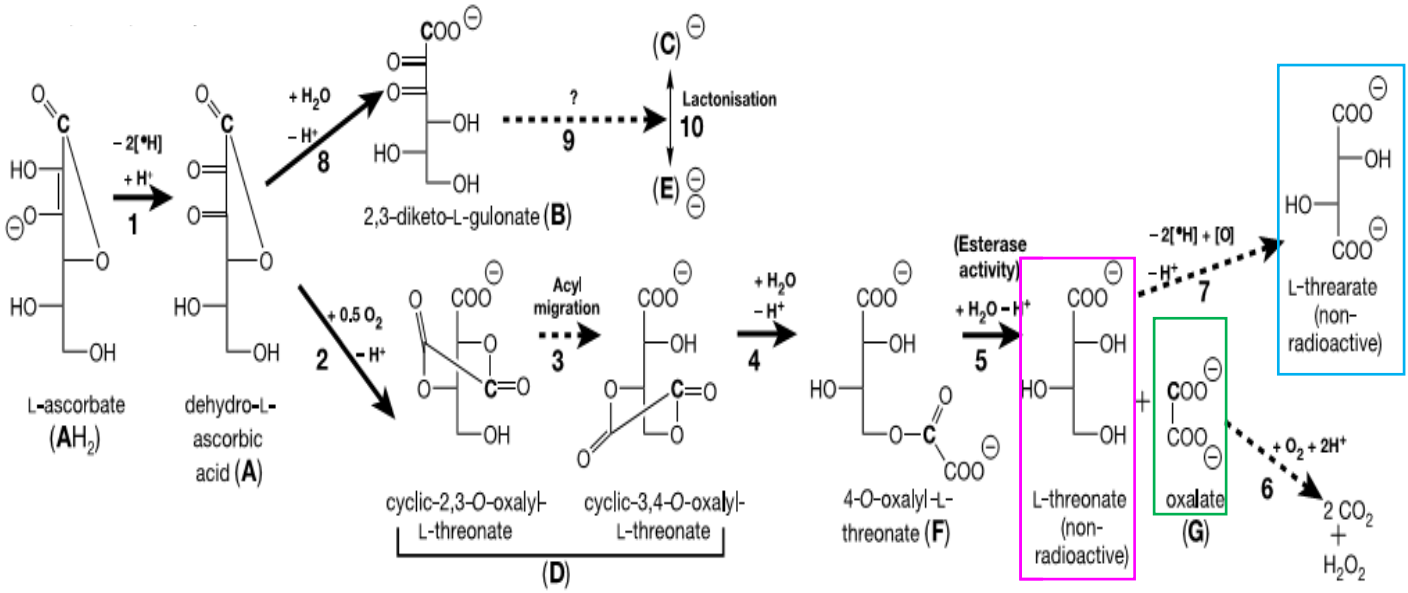


Figure 9 : Voie de dégradation extracellulaire de la vitamine C proposée par Green and Fry (2005). Les composés radioactifs sont représentés par une lettre majuscule en gras. Les flèches en pointillées montrent des réactions qui n'ont pas pu être détectées pour les cultures de cellules de *Rosa*. Toutes les étapes, exceptées les étapes 6 et 7, se réalisent à des taux détectables de façon non-enzymatique (figure issue de Green and Fry (2005)).

2.5.Variabilité des teneurs en vitamine C dans la plante

2.5.a. Facteur génétique

La teneur en vitamine C des fruits et des légumes est très variable selon les genres ou les espèces (Tableau 1). Ainsi le camu-camu (*Mirciaria dubia*, baie d'Amazonie), un des fruits les plus riches en vitamine C connus aujourd'hui, contient en moyenne 20 à 30 g de vitamine C kg^{-1} MF. À l'opposé, la poire est plutôt pauvre en vitamine C avec 20 à 30 mg kg^{-1} MF seulement. Au sein d'un même genre, les teneurs en vitamine C peuvent également varier de manière importante en fonction de l'espèce ou de la variété. Chez le fruit de tomate, la teneur en vitamine C peut varier de 13 à 570 mg kg^{-1} MF pour une population de *Solanum pimpinellifolium*, tomate sauvage (Galiana-Balaguer et al., 2006) et de 8 à 310 mg kg^{-1} MF pour une population de *Solanum lycopersicum*, tomate cultivée (Fernandez-Ruiz et al., 2004). En général, chez la tomate, les variétés sauvages contiennent plus de vitamine C (Galiana-Balaguer et al., 2006). De même, les tomates de petite taille sont plus riches en vitamine C que les tomates de taille plus importante (Wokes and Organ, 1943, Causse et al., 2003). Cette variabilité génétique permet d'envisager des possibilités d'amélioration de la teneur en vitamine C par croisement. Plusieurs études effectuées sur tomate montrent qu'il est possible d'augmenter la teneur en vitamine C des fruits de calibre moyen en introduisant des allèles sauvages par croisement (Stevens, 1986, Hagimori et al., 2005, Stevens et al., 2007).

Cependant cela se fait parfois au détriment du rendement (Stevens, 1986). Enfin, jusqu'à présent, très peu de gènes candidats ont été identifiés chez les fruits comme colocalisant avec des Quantitative Trait Loci (QTL)[3] de fortes teneurs en vitamine C (Davey et al., 2006, Stevens et al., 2007). Parmi ces gènes candidats, les auteurs retrouvent des gènes codants pour les enzymes de synthèse (GME) ou de recyclage de l'ascorbate (MDHAR) chez la tomate ou encore des gènes liés à la synthèse de l'éthylène chez la pomme (Davey et al., 2006, Stevens et al., 2007). À l'avenir, la détermination des gènes candidats pourrait offrir de nouvelles voies d'amélioration des teneurs en vitamine C dans le fruit.

Tableau 1 : Teneurs en vitamine C de certains fruits et légumes en mg/kg de matière fraîche (MF) d'après Davey et al. (2000) et Alves et al. (2002)

fruit/légume	teneur en vitamine C (mg/kg MF)
Acerola	13000
Abricot	70-100
Avocat	150-200
Brocoli	1130
Camu-camu	20000-30000
Carotte	60
Cassis	2000-2100
Cerise	50-80
Chou-fleur	640-780
Citron	500
Cynorhodon	10000
Epinard	510
Goyave	2300-3000
Kiwi	600
Laitue	150
Litchee	450
Melon	100-350
Orange	500
Pêche	70-310
Poire	30-40
Pomme	20-100
Pomme de terre	100-300
Tomate moyenne	200-250

[3] Un Quantitative Trait Loci est une région plus ou moins grande d'ADN qui est étroitement associée à un caractère quantitatif, c'est-à-dire une région chromosomique où est localisé un ou plusieurs gènes à l'origine du caractère en question.

2.5.b. La variabilité spatiale

Les teneurs en vitamine C sont variables en fonction de l'organe étudié, du tissu et au sein même de la cellule entre les différents compartiments (Foyer et al., 1983, Rautenkranz et al., 1994).

- Dans la cellule

Dans la cellule végétale, la vitamine C est présente dans tous les compartiments cellulaires (cytosol, chloroplastes, mitochondries, vacuole et apoplasme) (Horemans et al., 2000b) mais à différentes concentrations (Figure 10). La vitamine C s'accumule de manière importante dans les chloroplastes où elle peut atteindre 30-40% de la quantité totale de vitamine C de la feuille (Foyer et al., 1983). Des quantités considérables ont aussi été mesurées dans l'apoplasme (Vanacker et al., 1998), le cytosol et la vacuole (Rautenkranz et al., 1994). Ces fortes accumulations sont en relation avec le rôle de l'ascorbate dans la détoxication des espèces réactives de l'oxygène produites par la métabolisme cellulaire (cf partie 3.3, Potters et al., 2002). Dans le cytoplasme, la vitamine C est largement sous forme réduite sauf si les conditions entrainent un stress oxydatif.

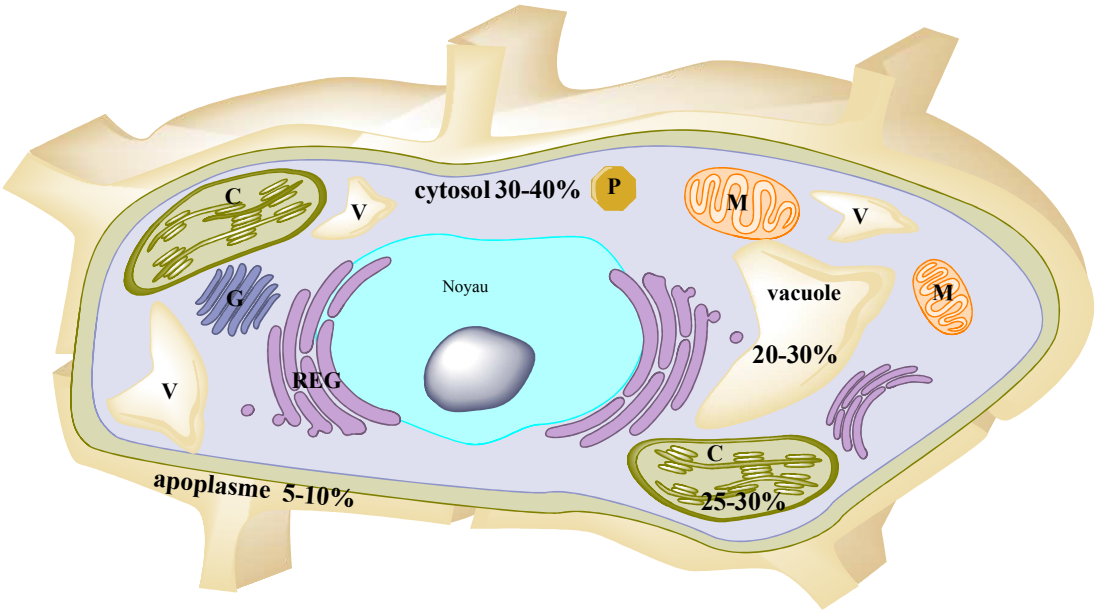


Figure 10 : Cellule végétale avec ces différents compartiments et organites (V, vacuole; M, mitochondrie; C, chloroplaste; P, peroxysome; REG, réticulum endoplasmique granuleux; G, appareil de Golgi). Les teneurs en ascorbate dans les différents compartiments sont exprimés en pourcentage. Comme il n'existe pas d'étude sur la teneur en ascorbate dans les peroxysomes et la mitochondrie, leurs concentrations sont incluses dans celle du cytosol (d'après Horemans et al. 2000).

- Dans la plante

Chez certains organes comme les fruits, la teneur en vitamine C varie en fonction du tissu étudié. Ainsi, généralement la peau contient plus de vitamine C comme chez la pomme ou la tomate (Mc Collum, 1946). De plus, il existe un gradient décroissant de teneur en vitamine C entre les tissus extérieurs de la tomate (péricarpe) et ceux plus à l'intérieur (placenta et gel) (Wokes and Organ, 1943, Mc Collum, 1946). A l'échelle de la plante, entre les organes, des différences de concentration existent également. Les organes photosynthétiques et les méristèmes ont généralement une concentration importante en vitamine C (Loewus et al., 1987). En revanche, les stolons, les racines, les fleurs et les graines sont souvent assez pauvres en vitamine C (Gara et al., 1997, Franceschi and Tarlyn, 2002, Córdoba-Pedregosa et al., 2003, Tedone et al., 2004). Le statut redox de la vitamine C dans la plante dépend également de l'organe étudié (Noctor, 2006). Ainsi, dans les parties aériennes le pool de vitamine C est principalement sous forme réduite (moins de 10% de DHA) alors que dans les racines, la vitamine C est plus oxydée (jusqu'à 30% de DHA, (Córdoba-Pedregosa et al., 2003)).

2.5.c. La variabilité temporelle

- Pendant le développement

Tout au long du développement de la plante, les teneurs en vitamine C varient dans les différents organes. Ainsi, la vitamine C s'accumule fortement dans l'axe embryonnaire pendant la germination (Pallanca and Smirnoff, 1999). Dans les feuilles, la teneur en vitamine C est élevée chez les feuilles jeunes encore en croissance et diminue dans les feuilles matures et pré-sénescentes (Chen et al., 2003, Bulley et al., 2009, Li et al., 2010). En revanche, les variations de teneurs en vitamine C pendant le développement du fruit sont différentes suivant le genre étudié et même l'espèce. La vitamine C peut s'accumuler très tôt chez certains fruits comme le poivron ou le kiwi (Yahia et al., 2001, Bulley et al., 2009) ou plus tardivement, pendant la maturation, comme chez la tomate, le melon ou la fraise (Madamba et al., 1974, Lopez-Andreu et al., 1986, Yahia et al., 2001, Agius et al., 2003, Pateraki et al., 2004, Ioannidi et al., 2009). Enfin, comme les feuilles sénescentes, les fruits sur-matures voient leur teneur en vitamine C diminuer (Yahia et al., 2001). Le statut redox de la vitamine C est également modifié pendant le développement. Ainsi, la vitamine C se trouve majoritairement sous forme réduite dans les feuilles jeunes et matures, et est majoritairement oxydée dans les

feuilles sénescentes (Li et al., 2010). Dans les fruits, ce statut redox est maintenu très haut pendant la maturation car celle-ci implique de nombreux processus oxydatifs comme la dégradation des parois cellulaires (Foyer and Noctor, 2009).

- À l'échelle de la journée

En plus des variations au cours du développement, se superposent des fluctuations des teneurs en vitamine C à l'échelle de la journée. Ces variations journalières ont été principalement décrites au niveau des feuilles chez différentes espèces (Tamaoki et al., 2003, Chen and Gallie, 2004, Tedone et al., 2004, Dowdle et al., 2007) en liaison avec les variations d'intensité lumineuse. Ainsi, le pool de vitamine C des feuilles augmente dans la matinée et diminue dans l'après-midi. Ces fluctuations dans les feuilles s'expliquent d'une part par l'impact de la lumière sur la régulation des gènes de la voie de biosynthèse et des activités enzymatiques (voir partie 2.1). D'autre part, certains gènes de la voie de biosynthèse semblent être contrôlés par des horloges circadiennes comme les gènes codants pour l'enzyme GGP, *VTC2/VTC5* (point clé de la régulation de la biosynthèse (Dowdle et al., 2007)). Les études actuelles sont contradictoires car parfois c'est la forme réduite qui augmente dans la journée, (Tamaoki et al., 2003) et parfois la forme oxydée (Chen and Gallie, 2004, Dowdle et al., 2007) entrainant des variations opposées du statut redox dans la journée. Chez les fruits, ces fluctuations journalières n'ont jamais été décrites.

3. Les rôles de la vitamine C dans la plante

La vitamine C est présente chez toutes les plantes et dans tous les compartiments cellulaires (apoplasme, cytosol, chloroplastes, vacuoles et mitochondries) car elle joue de nombreux rôles dans la plante.

3.1.Croissance et développement

La vitamine C est essentielle à la croissance et au développement des plantes. En effet, récemment, Dowdle et al. (2007) ont montré que le mutant *Arabidopsis vtc2/vtc5,* incapable de synthétiser de la vitamine C (blocage au niveau de l'enzyme clé de la voie de biosynthèse GGP, enzyme n°8 Figure 6), ne pouvait se développer au-delà de la germination (Dowdle et al., 2007). Un autre mutant d'*Arabidopsis, vct1* (blocage de l'enzyme GMP) dont la teneur en vitamine C est réduite (-70%), présente une diminution significative de croissance (Veljovic-Jovanovic et al., 2001). C'est l'association de deux processus, la division et l'expansion cellulaire qui permet à la plante de croître et il semble que la vitamine C joue un rôle dans ces deux processus (voir les synthèses de Smirnoff, 1996 et Davey et al., 2000).

3.1.a. Division cellulaire

De fortes concentrations en ascorbate ont été mises en évidence au niveau des méristèmes suggérant son implication dans la division cellulaire (Smirnoff, 1996). Ainsi, les travaux de Citterio et al. (1994) montrent que l'ascorbate est nécessaire à la progression du cycle cellulaire. En effet, il stimulerait le passage de la phase G1[4] (cellule compétente) à la phase active de synthèse de l'ADN appelée phase S. Ceci a été démontré dans les centres quiescents de racines de maïs et d'ail dans lesquels l'ajout d'ascorbate permet l'activation de la division cellulaire des cellules bloquées en phase G1 (Innocenti et al., 1990, Kerk and Feldman, 1995). De plus, ces mêmes centres quiescents montrent habituellement une faible teneur en ascorbate (Kerk and Feldman, 1995). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de l'ascorbate dans la division cellulaire. La première hypothèse serait qu'il interviendrait dans la synthèse de l'hydroxyproline (acide aminé) comme cofacteur des prolyl- et lysyl-hydroxylases, enzymes de synthèse d'hydroxyproline et d'hydroxylysine (Padh, 1990). L'

[4] Le cycle cellulaire est divisé en plusieurs phases : la phase G1, première phase de croissance (la plus longue), la phase S durant laquelle le matériel génétique est répliqué, la phase G2, qui est la seconde phase de croissance cellulaire et la phase M, celle de la mitose proprement dite.

hydroxyproline entre dans la composition de glycoprotéines qui semblent jouer un rôle dans la progression du cycle cellulaire (Ito et al., 1998, De Tullio et al., 1999). Une deuxième hypothèse serait que l'ascorbate augmente l'activité de la désoxyribonucléotide réductase (Smirnoff, 1996). Cette enzyme qui synthétise les désoxyribonucléotides nécessaires à la réplication de l'ADN n'est active que si son atome de fer est à l'état réduit. L'ascorbate pourrait alors être utilisé pour réduire le fer et maintenir ainsi son activité (Citterio et al., 1994).

3.1.b. Expansion cellulaire

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de l'ascorbate dans l'expansion cellulaire (Smirnoff, 1996). Au niveau de l'apoplasme, on retrouve de l'ascorbate, du MDHA, du DHA et de l'AO (Figure 11), or l'AO semble jouer un rôle important dans la régulation de la plasticité membranaire. En effet, des fortes activités de l'AO ont été décrites chez les cellules en expansion des graines de maïs en germination (Suzuki and Ogiso, 1973) et dans les jeunes feuilles et fruits de courgette en croissance (Lin and Varner, 1991). Smirnoff (1996) s'appuie sur le cycle de recyclage de l'ascorbate dans l'apoplasme pour élaborer une première hypothèse (Figure 11). L'ascorbate est transportée via un transporteur dans l'apoplasme. À cet endroit, l'ascorbate oxydase (AO) oxyde l'ascorbate en MDHA qui est réduit par le transfert d'électrons du cytoplasme vers l'apoplasme via le cytochrome b (Asard et al., 1995, Asard et al., 2001, Figure 11). Ce transport d'électrons stimule l'H^+-ATPase et donc le transport de protons vers l'apoplasme ce qui, selon la théorie de la croissance acide, pourrait stimuler l'expansion cellulaire (Rayle and Cleland, 1992). Dans une deuxième hypothèse, le DHA formé par la dismutation du MDHA pourrait réagir avec les chaînes latérales des résidus de lysine et d'arginine empêchant les liaisons des protéines structurales avec l'hémicellulose et le polygalacturonate (Lin and Varner, 1991). Cela aboutirait à une paroi plus extensible. Une troisième hypothèse est basée sur la dégradation totale de la vitamine C en oxalate via le DHA. L'oxalate permettrait de réguler la teneur en ions calcium par piégeage au niveau de la paroi (formation de cristaux d'oxalate de calcium). Or, une diminution du calcium augmente l'extensibilité de la paroi en diminuant les liaisons croisées entre les chaînes de polygalacturonate (Lin and Varner, 1991). Enfin, dans la quatrième hypothèse, l'ascorbate modifierait l'expansion cellulaire en influençant directement la lignification. En effet, l'ascorbate peut piéger les radicaux monolignols impliqués dans la synthèse de la lignine et inhiber l'activité des peroxydases responsables de la formation de ces radicaux diminuant

ainsi la lignification de la paroi (Takahama, 1993, Otter and Polle, 1994). Toutes ces hypothèses montrent que l'ascorbate peut jouer de nombreux rôles dans la modification de la plasticité pariétale et réguler ainsi l'expansion cellulaire.

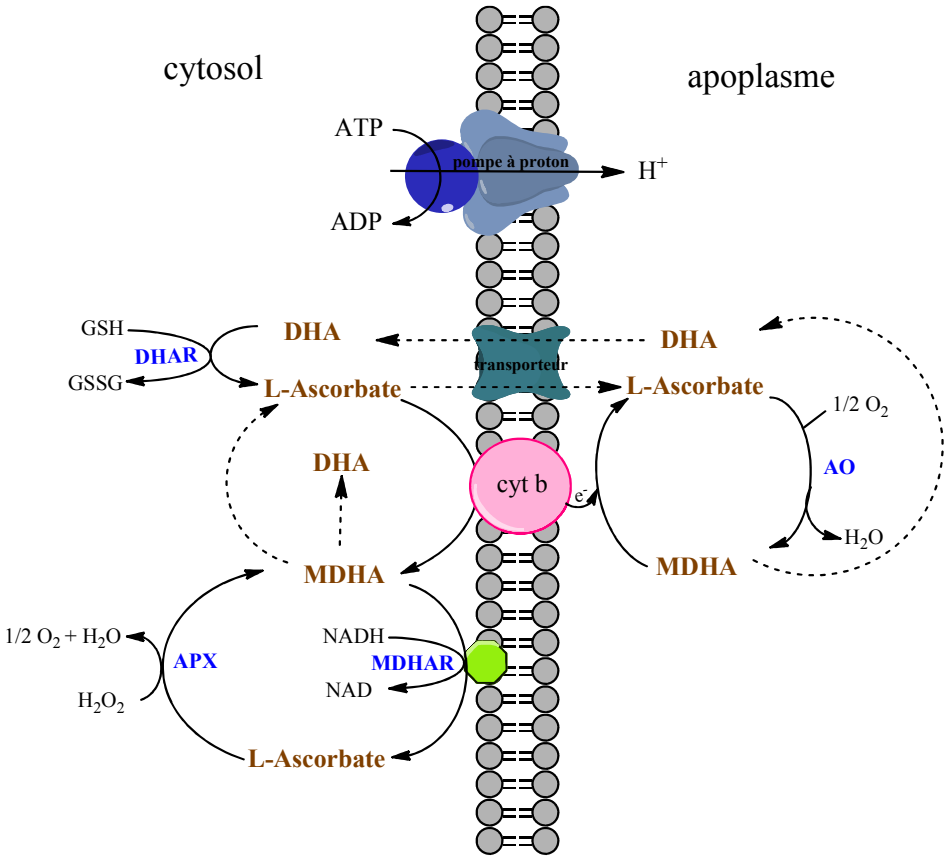


Figure 11 : Recyclage de l'ascorbate dans l'expansion cellulaire. Enzymes de recyclage en bleu : AO (ascorbate oxydase) ; APX (ascorbate peroxydase) ; DHAR (déhydroascorbate réductase) et MDHAR (monodéhydroascorbate réductase). Cyt b : cytochrome b, DHA : déhydroascorbate, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, MDHA : monodéhydroascorbate (d'après Conklin et al. 2004).

3.2.Cofacteur

L'ascorbate est également un cofacteur pour de nombreuses enzymes (De Tullio et al., 1999, Arrigoni and De Tullio, 2000, Davey et al., 2000). La plupart de ces enzymes sont des mono ou dioxygénases qui contiennent du fer ou du cuivre dans leur site actif. Le rôle de l'ascorbate est alors de conserver l'ion métallique de ce site actif sous sa forme réduite et d'augmenter ainsi l'activité de ces enzymes (Davey et al., 2000). Ces enzymes catalysent l'insertion d'oxygène (mono ou dioxygène) dans un substrat organique (Arrigoni and De Tullio, 2002). Ainsi, l'AsA est nécessaire aux enzymes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase (ACC-oxidase) et à la gibbérelline 3-dioxygénase pour la synthèse de deux phytohormones l'éthylène et l'acide gibbérellique respectivement (Davey et al., 2000).

3.3.Antioxydant

L'ascorbate est un antioxydant majeur pour la plante, capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène (FAO). En effet, bien que l'oxygène soit indispensable à la plante pour synthétiser des substrats carbonés, son utilisation s'accompagne de la formation d'intermédiaires radicalaires très réactifs. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxication de ses intermédiaires très réactifs. Ces FAO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-), l'oxygène singulet ($^1O_2$) et le radical hydroxyle (HO^-) sont nocifs pour la plante. Ils sont générés par le métabolisme aérobie dans les chloroplastes (Asada, 1999), les mitochondries ou les peroxysomes même en conditions optimales de développement et de façon plus importante pendant l'exposition à des stress (sécheresse, blessure, carence nutritive, forte salinité, forte luminosité, polluants…). Des quantités excessives de FAO conduisent à un état toxique appelé stress oxydatif. En effet, les FAO peuvent infliger de sérieux dommages à la cellule. Ils sont capables de détruire les protéines, dénaturer l'ADN, peroxyder les lipides et entraîner la mort cellulaire (Noctor and Foyer, 1998, Davey et al., 2000, Potters et al., 2002). L'anion superoxyde est faiblement réactif, il est généré à partir d'O_2 au niveau des chaînes photosynthétiques de transport d'électrons (Foyer and Noctor, 2009). Sa dismutation à l'aide de l'enzyme SOD (superoxyde dismutase) aboutit à la formation d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène (Foyer et al., 1994a) (Figure 12). Le peroxyde d'hydrogène est plus réactif et a une durée de vie plus longue. Il peut à son tour être soit sectionné au niveau de la liaison O-O et donner OH^- soit détoxiqué par la catalase (CAT) dans les peroxysomes (Arrigoni and De Tullio, 2002). L'oxygène

singulet, quant à lui, est généré au niveau des photosystèmes par transfert d'électrons provenant des chlorophylles excitées. Ce dernier est très réactif. En plus des deux enzymes SOD et CAT, les FAO peuvent être neutralisées de façon non enzymatique par des molécules antioxydantes. Parmi les molécules antioxydantes permettant de réguler directement la concentration intracellulaire de FAO, l'ascorbate joue un rôle prédominant car c'est le plus abondant dans la cellule végétale (Smirnoff, 2000b, Conklin, 2001). Il réagit directement avec plusieurs FAO tels que OH^-, H_2O_2 et $O_2^{\cdot}$ (Padh, 1990, Shao et al., 2008). Enfin, l'ascorbate participe également de façon indirecte aux mécanismes de détoxication enzymatique de la plante grâce à des enzymes antioxydantes comme l'ascorbate peroxydase (APX). Le peroxyde d'hydrogène peut être détoxiqué grâce à cette enzyme via le cycle Ascorbate/Glutathion Asada-Halliwell (Figure 12, Davey et al., 2000, Conklin, 2001). Ce cycle décrit pour la première fois en 1976 (Foyer and Halliwell, 1976) détaille la relation entre le glutathion, l'ascorbate et l'H_2O_2. L'APX utilise l'ascorbate comme donneur d'électrons pour réduire l'H_2O_2 en eau et produit du MDHA. Le MDHA est soit dissocié en ascorbate et DHA, soit réduit en ascorbate par la MDHAR. Le DHA peut être lui aussi réduit en ascorbate par la DHAR, une enzyme dépendante de l'oxydation du glutathion. Enfin, le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est de nouveau réduit en glutathion (GSH) par la glutathion réductase (GR). Ces réactions enzymatiques et non-enzymatiques forment le système de défense antioxydant de la plante dans lequel l'AsA joue un rôle déterminant (Foyer et al., 1994a).

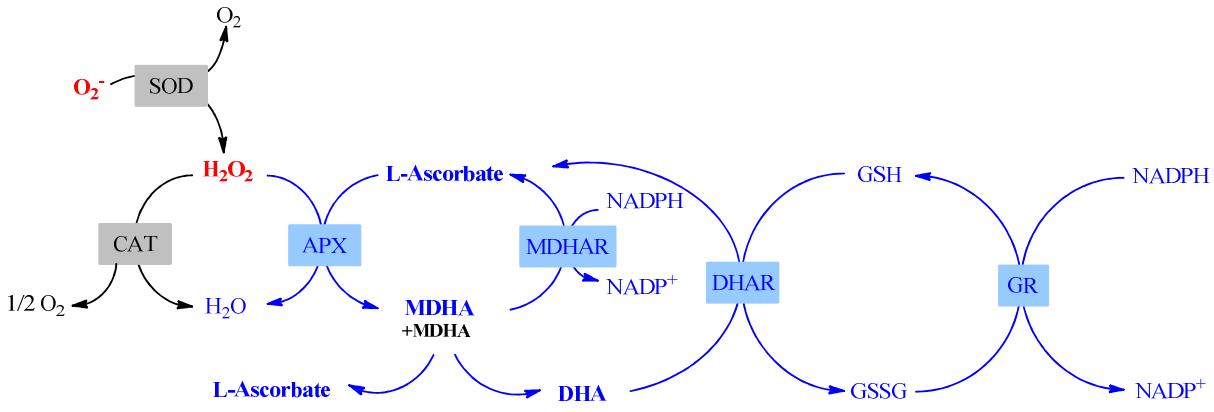


Figure 12 : Détoxication des formes actives de l'oxygène par le cycle ascorbate/glutathion (en bleu) et l'action des enzymes SOD et CAT (en noir). Les enzymes impliquées sont : SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; APX, ascorbate peroxydase ; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase ; DHAR, déhydroascorbate réductase ; GR glutathion réductase (Foyer and Noctor, 2009).

3.4.Défense contre les pathogènes

Lorsque la plante est attaquée par un pathogène qu'elle reconnait, elle met en place une réponse hypersensible. Cette réponse se traduit par la synthèse massive et rapide de phytoalexines (composés antibiotiques), de FAO, de protéines de défense (appelées PR pour pathogenesis-related) et par la mort cellulaire programmée (Lamb and Dixon, 1997). Cette dernière résulte de l'épaississement des parois déclenché par la synthèse des FAO et en particulier d'H_2O_2. En effet, l'augmentation du pH cellulaire (autour de 7), provoquée par l'intrusion du pathogène, induit un changement de conformation qui rend les peroxydases NAD(P)H-dépendantes aptes à produire de l'H_2O_2 au niveau de la paroi. Son accumulation modifie les liens entre les protéines pariétales entrainant la formation d'une barrière (Barth et al., 2004, Colville and Smirnoff, 2008). Il en résulte des nécroses cellulaires qui doivent permettre de stopper le pathogène. L'étude de plantes mutées déficientes en vitamine C (mutants *vtc*) a permis de mettre en évidence le rôle de la vitamine C comme régulateur de cette réponse aux pathogènes. Ainsi, les mutants *vct1* et *vtc2* d'*Arabidopsis,* qui ont des teneurs en vitamine C de 25 à 30% inférieures au type sauvage, sont plus résistants aux pathogènes. En effet, la diminution des teneurs en vitamine C entraine une forte induction des gènes codant pour des protéines PR, de certaines enzymes lytiques et l'accumulation importante de phytoalexines (Pastori et al., 2003, Barth et al., 2004, Colville and Smirnoff, 2008) mais les mécanismes de régulation par la vitamine C restent inconnus.

3.5.Photosynthèse

La plante utilise l'énergie lumineuse pour synthétiser des composés organiques. En condition normale de lumière (Figure 13), un photon est capté par une chlorophylle du photosystème II (PSII), un électron de cette dernière passe alors à l'état excité. Cet électron est ensuite transmis jusqu'à la plastoquinone (PQ) qui pour rester stable récupère un proton du stroma. L'électron perdu par la chlorophylle est quant à lui remplacé par un électron provenant de la protolyse de l'eau. La plastoquinone transmet les électrons au cytochrome b, qui libère des protons dans le lumen. Les protons ainsi accumulés dans le lumen par protolyse de l'eau et par transfert depuis le du stroma alimentent le canal de l'ATP synthétase et permettent la production d'ATP. Les électrons du cytochrome b sont transmis à la plastocyanine (PC) qui les transfère au photosystème I (PSI). L'énergie lumineuse captée par le PSI permet la transmission d'un électron à la ferrédoxine (FD) et enfin à la ferrédoxine NADP réductase (FNR). L'électron perdu par le PSI est remplacé par l'électron venant de la PC. La FNR fixera 2 protons provenant du stroma sur une molécule de NADP à l'aide de l'électron qu'elle vient

de recevoir. Dans un deuxième temps, le NADH et l'ATP servent à la fixation du carbone provenant du CO_2. Cette étape porte aussi le nom de phase chimique, ou "phase sombre", bien que pouvant se réaliser à la lumière : cette appellation reflète seulement le fait que la lumière n'est pas directement nécessaire à cette étape, contrairement à la phase photochimique (ou "phase claire"), précédemment décrite qui est photo-dépendante. Cependant, les plantes peuvent également être soumises à des excès de lumière c'est-à-dire des conditions d'éclairement très intense, supérieur à l'éclairement nécessaire pour la photosynthèse maximale, particulièrement en été. L'activité photosynthétique étant limitée par la vitesse des réactions d'assimilation du CO_2, il en résulte une saturation de la chaîne de transfert d'électrons. Les photosystèmes ne peuvent alors plus évacuer les charges électroniques provenant de l'excès de photons absorbés, entrainant la formation de FAO par transfert de ces électrons vers les molécules d'oxygènes moléculaires (Figure 14). En effet, au niveau du photosystème I, les électrons provenant de l'oxydation de l'eau tendent alors à réagir avec l'oxygène moléculaire environnant pour aboutir à la formation d'anions superoxydes (O_2^-, réaction de Mehler). Simultanément, au niveau du PSII, les molécules de chlorophylles excitées des centres réactionnels ne peuvent plus se désactiver par photochimie. Les chlorophylles à l'état triplet (^{3}Chl) fortement instables réagissent alors avec l'oxygène pour former de l'oxygène singulet ($^1O_2$). L'ascorbate joue alors un rôle primordial de protection au niveau des deux photosystèmes (Figure 10). Au niveau du PSI, les anions superoxydes sont en partie transformés en H_2O_2 grâce à l'intervention de la SOD. Puis l'APX chloroplastique permet de former de nouveau de l'H_2O à partir d'H_2O_2, en oxydant l'ascorbate. Ce cycle eau-eau joue un rôle important dans la photo-protection du chloroplaste (Figure 14, (1)). Il nécessite aussi la régénération de l'ascorbate partiellement oxydé en MDHA grâce aux électrons provenant de la ferrédoxine ou grâce à la MDHAR. L'énergie lumineuse en excès au niveau du photosystème II peut être éliminée par augmentation de la dissipation thermique grâce à la formation de xanthophylles (anthéraxanthine et zéaxanthine, Figure 14 (2)) (Demmig-Adams et al., 1990, Demmig-Adams and Adams, 1996). Cette dissipation thermique est appelée quenching non photochimique.

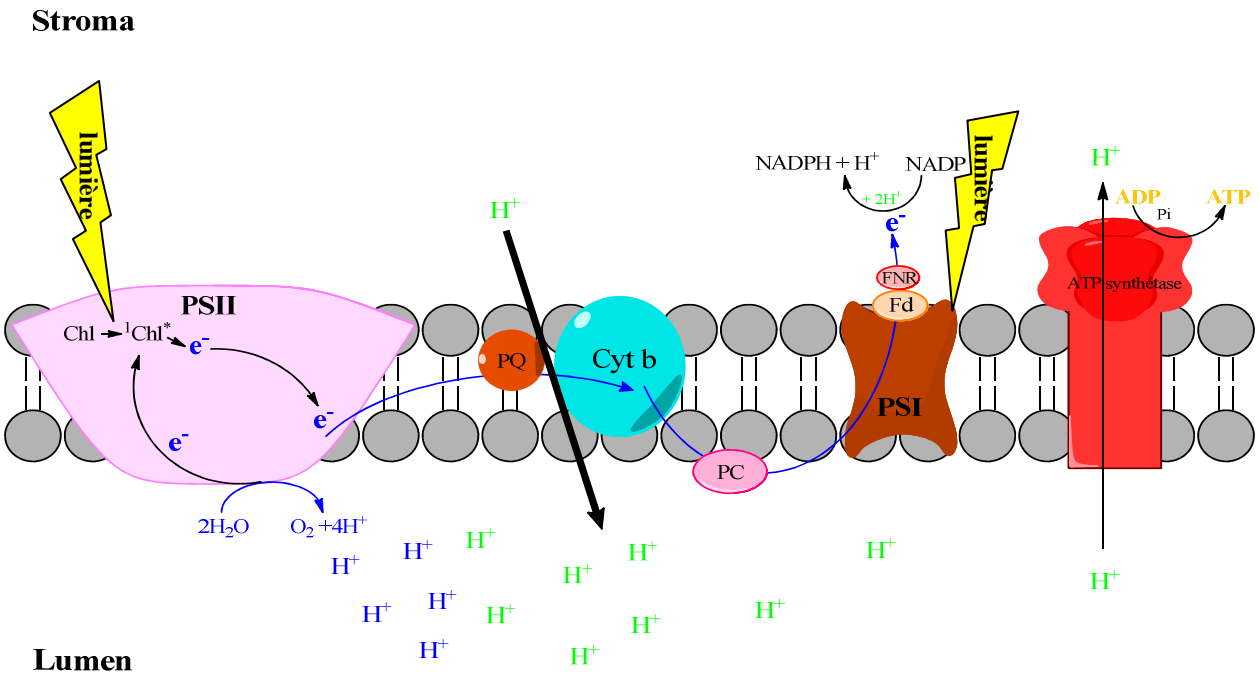


Figure 13 : Réactions de photosynthèse au niveau de la membrane des thylakoides. Chl, chlorophylle ; ^{1}Chl*, chlorophylle excitée ; Cyt b, cytochrome b ; e^{-}, électron ; Fd, ferrédoxine ; FNR, ferrédoxine NADP rectuctase ; PC, plastocyanine ; PQ, plastoquinone ; PSI, photosystème I ; PSII, photosystème II.

Le pigment violaxanthine présent dans le photosystème II change de structure sous l'action de l'enzyme violaxanthine dé-époxydase pour donner la zéaxanthine qui est capable de recevoir l'énergie de la chlorophylle excitée et de la dissiper sous forme de chaleur. Ce passage des formes violaxanthine à zéaxanthine utilise le pouvoir réducteur de l'ascorbate (Eskling et al., 1997, Eskling and Akerlund, 1998, Conklin, 2001). Cette réaction est activée suite à une diminution du pH du lumen, ce qui constitue un mode de régulation très efficace ; l'excès de lumière conduisant à la saturation de la chaîne de transfert des électrons et à l'établissement d'un ΔpH transmembranaire élevé. Par la suite, le DHA diffuse à travers la membrane dans le stroma où il est recyclé par réduction grâce au système enzymatique DHAR/GR. Cette diffusion permettrait le transport d'ascorbate dans le lumen. En favorisant la dissipation de l'énergie lumineuse reçue en excès, la formation de la zéaxanthine limite la formation des FAO. De plus, elle permettrait en association avec le tocophérol de limiter la peroxydation des lipides (Eskling et al., 1997, Figure 14, (3)). Enfin, l'ascorbate joue un rôle important de protection en piégeant ces FAO formées en conditions d'excès de lumière. Ainsi, l'ascorbate participe par ces trois processus au maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurale de la cellule photosynthétique.

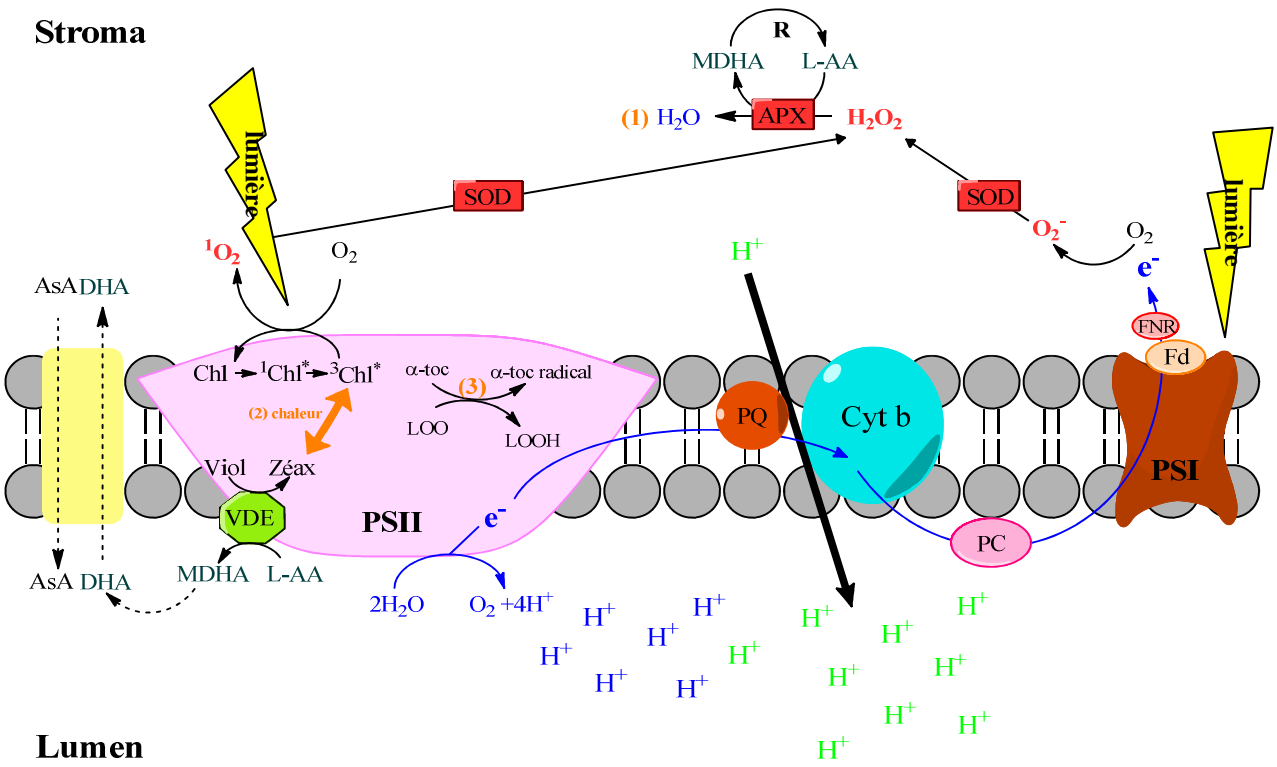


Figure 14 : Rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse en situation d'excès de lumière (d'après Smirnoff (2000a). R : la régénération de MDHA est assurée soit par le transfert d'électrons venant de la ferrédoxine directement, soit par MDHAR (monodéhydroascorbate réductase) soit si le MDHA est dismuté en DHA par la DHAR (déhydroascorbate réductase) en utilisant la glutathion. (1) Cycle eau-eau. (2) dissipation thermique par formation de zéaxanthine. (3) réduction des lipides par l'α-tocophérol. APX, ascorbate peroxydase ; Chl, chlorophylle ; ^{1}Chl*, chlorophylle excitée ; ^{3}Chl*, chlorophylle triplet ; Cyt b, cytochrome b ; DHA, déhydroascorbate ; Fd, ferrédoxine ; FNR, ferrédoxine NAPD reductase ; H_2O_2, peroxyde d'hydrogène ; L-AA, ascorbate ; LOO, radical lipide peroxyl ; LOOH, lipide hydroperoxyde ; MDHA, monodéhydroascorbate, O_2^-, anion superoxyde ; $^1O_2$, oxygène singulet; PQ, plastoquinone ; PSI, photosystème I ; PSII, photosystème II ; SOD, superoxyde dismutase ; α-toc, α-tocophérol ; Viol, violaxanthine ; VDE, violaxanthine de-époxydase ; Zéax, zéaxanthine.

4. La lumière : facteur majeur de régulation de la teneur en vitamine C dans les plantes

La lumière est considérée comme un facteur majeur de variation des teneurs en vitamine C dans la plante. Ainsi, l'augmentation de la lumière entraîne une élévation des teneurs en vitamine C (Grace and Logan, 1996, Gatzek et al., 2002, Tamaoki et al., 2003, Li et al., 2008c). Inversement, le pool de vitamine C diminue quand les feuilles ou les fruits sont placés à l'obscurité (El-Gizawi et al., 1993, Conklin et al., 1997, Yabuta et al., 2007) ou ombrés (Venter, 1977, El-Gizawi et al., 1993, Garcia-Plazaola et al., 1999, Li et al., 2009). Cependant, les mécanismes de régulation par la lumière restent peu connus notamment dans les fruits. La lumière peut agir de manière directe sur la teneur en vitamine C en modifiant son métabolisme (synthèse, recyclage et dégradation, 2.1). Mais elle peut également modifier de manière indirecte la teneur vitamine C dans les fruits en modifiant la température du fruit qui elle-même a une influence sur le métabolisme de la vitamine C (cf 2.2.a). De plus, la lumière pourrait contrôler la synthèse d'ascorbate via la photosynthèse et la teneur en sucre, substrat de synthèse de l'ascorbate (2.2.b) et pourrait influencer les transports de sucres, d'autres précurseurs ou de vitamine C en provenance des feuilles (2.2.c).

4.1. Régulation directe de la teneur en vitamine C par la lumière

4.1.a. Impact de la lumière sur la voie de synthèse

La lumière peut affecter la synthèse de l'ascorbate en stimulant l'expression des gènes, ou plus en aval, en augmentant la quantité ou l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. L'influence de la lumière sur la synthèse d'ascorbate a principalement été étudiée chez les feuilles. Quelques études ont montré une corrélation positive entre l'augmentation du pool de vitamine C à la lumière et l'augmentation de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse (Tabata et al., 2002, Tamaoki et al., 2003, Dowdle et al., 2007, Tableau 2). Ainsi, l'expression des gènes codant pour les enzymes GMP, GGP et GPP (étapes 5, 7, 8 de la voie de synthèse) augmente dans les feuilles d'*Arabidopsis* à la lumière et diminue quand les plantes sont placées à l'obscurité (Yabuta et al., 2007). Les résultats concernant *GME*, *GalDH* et *GLDH* sont contradictoires. L'expression du gène *GLDH* diminue quand les feuilles sont ombrées ou mises à l'obscurité (Tabata et al., 2002, Tamaoki et al., 2003, Yabuta et al., 2007, Li et al., 2008c, Li et al., 2009) mais n'augmente pas obligatoirement à la lumière. De même, *GalDH* et *GME* ne répondent pas toujours de la même manière à la lumière suivant les espèces

étudiées ou les traitements appliqués (Mieda et al., 2004, Yabuta et al., 2007, Li et al., 2009). Récemment, une protéine régulatrice appelée AMR1 pour « Ascorbic acid Mannose pathway Regulator 1 » a été identifiée dans les feuilles d'*Arabidopsis* (Zhang et al., 2009). La protéine AMR1 régule négativement l'expression des gènes *GMP, GME, VTC2, GPP, GalDH* et *GLDH*. Par ailleurs, la transcription d'*AMR1* varie au cours du développement de la feuille mais aussi en fonction de la lumière : lorsque la lumière augmente, la quantité de transcrits d'*AMR1* diminue et l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate augmente. Ainsi, plusieurs étapes de la voie de synthèse de l'ascorbate pourraient être régulées par la lumière et sous contrôle de facteurs de transcription qui n'ont pas encore été trouvés chez la tomate. Cependant, une modification de l'expression des gènes ne signifie pas obligatoirement une modification simultanée de la quantité ou de l'activité de l'enzyme. En effet, les transcrits obtenus ne sont pas obligatoirement traduits en protéines. Ainsi, Dowdle et al. (2007) montrent que sur toutes les enzymes de la voie de biosynthèse, seules GGP et GLDH voient leurs activités augmenter avec l'augmentation du rayonnement (Dowdle et al., 2007) (Tableau 3). Ces résultats sur GLDH ont été confirmés dans deux autres études sur feuilles d'*Arabidopsis* et de pommier (Tamaoki et al., 2003, Li et al., 2009). Enfin des résultats contradictoires sur l'impact de la lumière ont également été trouvés sur l'activité de l'enzyme GalDH qui ne varie pas avec la lumière selon Dowdle et al. (2007) et Mieda et al. (2004) et diminue chez le pommier lorsque les feuilles sont ombrées (Li et al., 2009). Les variations de transcrits n'induisent pas toujours des variations de teneur en ascorbate. Ainsi, comme l'observe Dowdle et al. (2007) sur feuille de tabac, la quantité de transcrits de *VTC2* et *VTC5* est maximale à 12h alors que la teneur en ascorbate est maximale à 18h (délai de 6h). Ce délai pourrait être expliqué par le temps nécessaire, à partir du gène transcrit, à la synthèse de la protéine et à son activation ou à des régulations post-transcriptionnelles.

Dans les feuilles, cette régulation de la teneur en ascorbate par la lumière semble être liée au rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse (cf partie 3.5). Ainsi, Yabuta et al. (2007) montrent que l'inhibition de la photosynthèse par ajout de DCMU[5] ou d'atrazine[6] stoppe l'induction des gènes de la voie de biosynthèse à la lumière et supprime l'augmentation de vitamine C. Par ailleurs, la synthèse de l'ascorbate est étroitement liée à la respiration (Bartoli et al., 2005).

[5] 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée désherbant chimique qui bloque le transfert d'électron vers la plastoquinone dans la photosynthèse

[6] 2-chloro-4-(éthylamine)-6-(isopropylamine)-s-triazine, désherbant chimique se lie à la protéine D1 du photosystème II et de ce fait, inhibe le transport des électrons nécessaire à la photosynthèse

plante	culture	Conditions initiales de lumière	traitement lumineux	gène	réponse			corrélation avec vit c	auteurs
Tabac	serre	N0	L0		*3h*				Tabata et al., 2002
				GMP	+			oui	
				GLDH	+				
Arabidopsis	chambre climatique	N1	L1	GLDH	*6h*	*9h*	*12h*	oui	Tamaoki et al., 2003
					1	**1,5**	**2**		
Arabidopsis	chambre climatique				*24h*	*48h*	*72h*		Yabuta et al., 2007
		N2	L2	GMP	1	2,2	**3**	oui	
		N2	N5	GMP	**0,5**	**0,5**	**0,5**	oui	
		N2	L2	GME	1	1	1	non	
		N2	N5	GME	**0,7**	**0,7**	**0,7**	oui	
		N2	L2	VTC2	1,5	**2,2**	**3,5**	oui	
		N2	N5	VTC2	**0,2**	**0,3**	**0,4**	oui	
		N2	L2	GPP	1	**2**	**2,1**	oui	
		N2	N5	GPP	**0**	**0**	**0**	oui	
		N2	L2	GalDH	**0,5**	**0,5**	**0,5**	non	
		N2	N5	GalDH	**0,5**	**0,5**	**0,5**	oui	
		N2	L2	GLDH	1	1	1	non	
		N2	N5	GLDH	**0,1**	**0,1**	**0,1**	oui	
Pommier	verger				*20j*				Li et al., 2009
		L3	N3	GalDH	**-**			oui	
				GLDH	-			oui	
Arabidopsis	chambre climatique				*24h*				Dowdle et al., 2007
		L4	L5	GME	**1,7***			oui	
				VTC2	**5***			oui	
				VTC5	3*			non	
					3h	*6h*	*+2h*		
		N4	L4	VTC2	1	5	2	délai	
		N4	L4	VCT5	1	3,7	1,1	délai	
		N4	N5	VTC2	1	0,4	0,1	?	
		N4	N5	VCT5	1	0,4	0,2	?	
Tabac	chambre climatique				*16h*				Pignocchi et al., 2003
		L6	N6	GLDH	0,7			?	
					1h	*6h*	*24h*		
		N6	L7	GLDH	1	1,1	1	?	
Epinard	?				*24h*	*48h*	*72h*		Mieda et al., 2004
		N5	L8	GalDH	1,4	1,4	1,4	non	
		N5	N5	GalDH	1,4	1,4	1,4	non	

Tableau 2: Impact de la lumière (intensité et durée) sur les niveaux de transcrit des gènes codant pour la voie de synthèse de la vitamine C et corrélation avec les variations de vitamine C dans les feuilles.
Les niveaux de transcrits sont exprimés en relatif par rapport aux conditions initiales, *données calculées par rapport au traitement faible lumière (25μmol/m²/s). Les conditions lumineuses sont indiquées par N pour nuit ou ombrage et L pour lumière, chaque chiffre correspondant à des intensités lumineuses différentes.
N0: 5 jours de nuit, L0: lumière (lumière naturelle); L1,N1: cycles jour/nuit (14/10h), 100μmol/m²/s; N2: nuit (8h); L2: lumière continue, 100μmol/m²/s; L3 lumière naturelle; N3: ombrage de 50%; L4,N4: cycles jour/nuit (12/12h, 150μmol/m²/s; L5: lumière continue, 320μmol/m²/s; N5: nuit continue; L6: 16h de lumière (250μmol/m²/s); N6 : 16h de nuit; L7: lumière continue (250μmol/m²/s); L8: lumière (50μmol/m²/s).

plante	culture	conditions initiales	environnement lumineux	enzyme	réponse			corrélation avec vit c	corrélation avec gène	auteurs
					6h	*9h*	*12h*			
Arabidopsis	chambre climatique	N1	L1	GLDH	1,1	**1,2**	**1,6**	oui	oui	Tamaoki et al., 2003
					20j					
Pommier	verger	L3	N3	GalDH	**0,7**			oui	oui	Li et al., 2009
				GLDH	**0,56**			oui	oui	
					24h					
Arabidopsis	chambre climatique	L4	L5	PMI	0,9			non	?	Dowdle et al., 2007
				PPM	**1,3**			oui	?	
				GMP	1,1			non	?	
				GME	*1,2*			non	non	
				GGP	**80**			oui	oui	
				GPP	1			non	?	
				GalDH	1,1			non	?	
				GLDH	**1,9**			oui	?	
					72h					
Epinard	?	N5	L8	GalDH	1,1			non	--	Mieda et al., 2004
		N5	N5	GalDH	1,1			non	--	

Tableau 3: Impact de la lumière (intensité et durée) sur les activités des enzymes de la voie de synthèse de la vitamine C et corrélation avec les variations de vitamine C et les variations des transcris des gènes correspondants dans les feuilles.

Les données sont exprimées en relatif par rapport aux conditions initiales. Les conditions lumineuses sont indiquées par N pour nuit ou ombrage et L pour lumière, chaque chiffre correspondant à des intensités lumineuses différentes.

L1, N1: cycles jour/nuit (14/10h), 100μmol/m^2/s; L3: lumière naturelle; N3: ombrage de 50%; L4, N4: cycles jour/nuit (12/12h, 150μmol/m^2/s; L5: lumière continue, 320μmol/m^2/s; N5: nuit continue; L8: lumière (50μmol/m^2/s).

En effet, la dernière enzyme de la voie de biosynthèse GLDH est enchâssée dans la membrane interne de la mitochondrie au niveau de la chaîne de transport d'électrons et participe au transfert d'électrons vers le cytochrome c en oxydant le L-Galactono-1,4-lactone en ascorbate entre les complexes III et IV. Ce rôle de l'ascorbate dans la respiration pourrait également expliquer l'augmentation de la teneur en ascorbate à la lumière comme la respiration augmente avec l'intensité lumineuse (Bartoli et al., 2006). Ainsi, la lumière joue un rôle direct dans la régulation de la synthèse de la vitamine C dans les feuilles probablement en liaison avec son rôle dans le fonctionnement mais des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation.

Chez les organes puits, même s'il a été démontré que ceux-ci étaient capables de synthétiser leur propre ascorbate (comme chez la pomme de terre (Viola et al., 1998), le cassis (Hancock et al., 2007), la courgette (Hancock et al., 2003) et la pomme (Razavi et al., 2005)), la régulation de la voie de biosynthèse par la lumière reste peu étudiée. Récemment, Li et al. (2009) ont démontré que l'activité GLDH diminuait dans la peau des pommes lorsqu'elles sont ombrées et que cette diminution était d'autant plus importante que l'ombrage était augmenté (Li et al., 2009). Dès 1945, Hamner avait observé que les fruits ombrés contiennent moins de vitamine C que les fruits à la lumière (Hamner et al., 1945). Venter (1977) décrit même une relation linéaire entre l'intensité de rayonnement cumulée durant le développement des fruits et les teneurs en vitamine C dans le fruit, en ombrant les plantes sur différentes durées (Venter, 1977). Ces résultats sont confirmés en 1993 par El-Gizawi (El-Gizawi et al., 1993), qui montre une diminution de la vitamine C par des ombrages croissants (0%, 35%, 51% ou 63% d'ombrage) soulignant que l'accumulation de vitamine C est influencée par l'intensité lumineuse plutôt que la photopériode. La lumière est donc un facteur important de régulation de l'AsA dans les fruits mais les mécanismes de régulation au niveau génétique et enzymatique n'ont pratiquement pas été étudiés dans les fruits.

4.1.b. Impact de la lumière sur le recyclage

Une fois oxydée, de façon enzymatique ou non-enzymatique, la vitamine C peut être dégradée ou régénérée par l'activité des réductases (MDHAR et DHAR, partie 1.3). Le recyclage de l'ascorbate par les réductases est important pour réguler le pool de vitamine C car il permet de régénérer la forme active de la vitamine C et empêche sa dégradation. L'expression des transcrits des gènes liés à l'oxydation et la réduction de la vitamine C est modifiée par la

lumière (Tableau 4). Quand l'intensité lumineuse augmente, l'expression des gènes codant pour l'AO et l'APX cytosolique augmente dans les feuilles chez le tabac (Tabata et al., 2002, Dutilleul et al., 2003), l'épinard (Yoshimura et al., 2000) et le pois (Hernandez et al., 2006). En revanche, l'expression de l'*APX* chloroplastique n'est pas modifiée par la lumière (Tabata et al., 2002, Dutilleul et al., 2003, Hernandez et al., 2006). Une seule étude sur le gène codant pour MDHAR reporte, quant à elle, une augmentation de l'expression à la lumière chez le pois (dans les chloroplastes, Hernandez et al., 2006). La régulation par la lumière des gènes codant pour les enzymes de recyclage reste donc peu étudiée. En revanche, de nombreuses études se sont intéressées à la modification par la lumière de l'activité des enzymes liées à l'oxydation et la réduction de la vitamine C (Tableau 5). Parmi ces études, certaines montrent que l'activité d'APX, de MDHAR et de DHAR est augmentée à la lumière (Mishra et al., 1995, Bartoli et al., 2006, Zhou et al., 2009) indiquant une oxydation de l'ascorbate plus importante à la lumière mais également une réduction et donc une régénération de l'ascorbate plus importante. Cependant, dans d'autres études, toutes les activités des enzymes de détoxication ne sont pas modifiées par la lumière (Gechev et al., 2003, Chen and Gallie, 2004). Ainsi, la réponse à la lumière des activités des enzymes de recyclage de l'ascorbate est très variable. Dans les fruits, les quelques résultats décrits dans la littérature démontrent que les activités des enzymes d'oxydation et de réduction sont augmentées à la lumière permettant l'utilisation et la régénération rapide de l'ascorbate (Torres and Andrews, 2006, Li et al., 2008a, Li et al., 2008b). Lorsque les fruits sont ombrés, les activités des enzymes MDHAR, DHAR et APX diminuent (Li et al., 2008a, Li et al., 2009).

4.1.c. Impact de la lumière sur la dégradation

Il existe peu d'études sur l'impact du rayonnement sur la dégradation de la vitamine C. Le taux relatif de dégradation obtenu par suivi de vitamine C marquée augmente avec la quantité de vitamine C (Pallanca and Smirnoff, 2000). Ainsi, comme le pool de vitamine C augmente à la lumière, certains auteurs ont supposé que la dégradation augmentait également (Bartoli et al., 2006). Cependant, la dégradation de la vitamine C à l'obscurité est également importante puisque 40% du pool de vitamine C est perdu dans des feuilles d'Arabidopsis détachées et gardées à l'obscurité (Conklin et al., 1997).

plante	culture	conditions initiales	environnement lumineux	gène	réponse		auteurs
					3h		
Tabac	serre	N0	L0	AO	+		Tabata et al., 2002
				cyto APX	+		
				stromal APX	0		
					5h		
				cyto APX	**2,5**		
Epinard	chambre climatique	N1L1	L2	stromal APX	1		Yoshimura et al., 2000
				putative cyto APX	1		
				microbody APX	1		
					5h	*11h*	
Tabac	serre	N3	L3	stromal APX	0,6	0,6	Dutilleul et al., 2003
				cyto APX	1,3	1,3	
					1h		
Pois	chambre climatique	N4L4	L5	chlMDHAR	2,04		Hernandez et al., 2006
				cyto APX	4,16		
				stromal APX	1,4		

Tableau 4: Impact de la lumière (intensité et durée) sur l'expression des transcrits des gènes codants pour les enzymes de recyclage de la vitamine C.
Les données sont exprimées en relatif par rapport aux conditions initiales, les valeurs en gras sont significativement différentes du niveau initial. N0: 120h de nuit, L0: lumière (lumière naturelle); L1/N1: cycles jour/nuit (8/16h, 300 μmol/m²/s) , L2: lumière continue (1600 μmol/m²/s), L3/N3 cycles jour/nuit (16/8h, lumière naturelle); L4/N4: cycles jour/nuit (18/6h, 200 μmol/m²/s); L5: lumière continue (4000 μmol/m²/s).

plante	culture	conditions initiales	environnement lumineux	enzyme	réponse			auteurs
					4h	*6h*	*10h*	
Tabac	serre	N10	L1	APX	1	1	1	Chen et al,. 2004
				MDHAR	**1,2**	**1,3**	**1,4**	
				DHAR	**1,2**	**1,2**	**1,3**	
					20j			
Pommier	verger	L2	N2	APX	**0,86**			Li et al., 2009
				MDHAR	**0,67**			
				DHAR	**0,64**			
					24h			
Tomate	chambre climatique	N3	N3'	APX	1,27			Kuzniak et al., 2004
		N3'	L3	APX	**1,74**			
		N3	N3'	MDHAR	**2**			
		N3'	L3	MDHAR	**2,6**			
		N3	N3'	DHAR	1			
		N3'	L3	DHAR	1			
					12h	24h	48h	
Courgette	chambre verre	N4	L4	AO	**2,3**	**2,3**	**2,3**	De Tullio et al., 2007
		L5	N5	AO	**0,5**	**0,25**	**0,08**	
					7h30			
Chêne liège	extérieur	N6	L6	APX	1			Faria et al., 1996
				MDHAR	**2**			
				DHAR	**4**			
					24h	*48h*	*72h*	
Tabac	serre	L7	L8	APX	1,2	1,1	**1,7**	Gechev et al., 2003
				MDHAR	1	1	1	
				DHAR	1,1	1,1	1,1	
					24h	*4j*	*7j*	
Arabidopsis	chambre climatique	L9/N9	L10/N10	APX	1	1	1	Kubo et al., 1999
				MDHAR	1	1	1	
				DHAR	1	**1,7**	**1,6**	

Tableau 5: Impact de la lumière (intensité et durée) sur les activités des enzymes de recyclage de la vitamine C(1). Les données sont exprimées en relatif par rapport aux conditions initiales, les valeurs en gras sont significativement différentes du niveau initial. L1/N1: cycles jour/nuit (10/14h, lumière naturelle); L2: lumière naturelle; N2: ombrage de 50%; N3: fin du cycle jour/nuit (16/8h, 350μmol/m^2/s), N3': nuit continue, L3: lumière continue; N4: 24h de nuit; L4: lumière continue (140 μmol/m^2/s); L5: 24h de lumière (140 μmol/m^2/s); N5: nuit continue; N6/L6: cycles jour/nuit conditions naturelles; L7: cycles jour/nuit (14/10h, 100 μmol/m^2/s); L8: cycles jour/nuit (16/8h, 360 μmol/m^2/s); L9/N9: cycles jour/nuit (14/10h, 100 μmol/m^2/s); N10/L10: cycles jour/nuit (14/10h, 200 μmol/m^2/s).

plante	culture	conditions initiales	lumière	enzyme	réponse		auteurs
					12h	*24h*	
Blé	chambre climatique	L15/N15	L16/N16	APX	**1,8**	**4,9**	*Mishra et al., 1995*
				MDHAR	**3,2**	**4**	
				DHAR	**1,7**	**2,6**	
					15j		
Arabidopsis	chambre climatique	L17	L17	MDHAR	1,2*		Bartoli et al., 2006
				DHAR	**1,4***		
		L17	L18	MDHAR	**1,4***		
				DHAR	**1,9***		
					18j		
Laitue	serre	L21	L22	APX	**1,2**		Zhou et al., 2009
				MDHAR	**1,8**		
				DHAR	**1,3**		
		L21	L23	APX	**1,7**		
				MDHAR	**2,4**		
				DHAR	**1,9**		
					4m		
Pervenche	chambre climatique	L24	L25	APX	**1,4**		Grace and Logan, 1996
				MDHAR	**2**		
		L24	L26	APX	**2**		
				MDHAR	**0,4**		

Tableau 5 (suite): Impact du traitement lumineux et de sa durée sur les activités des enzymes de recyclage de la vitamine C (2).

Les données sont exprimées en relatif par rapport aux conditions initiales, les valeurs en gras sont significativement différentes du niveau initial, *données recalculées en relatif par rapport à la faible intensité lumineuse (voir conditions initiales). L15/N15: cycles jour/nuit (16/8h, 40W/m²); L16/N16: cycles jour/nuit (16/8h, 430W/m²); L17: lumière faible, 50 μmol/m²/s; L18: lumière moyenne, 100 μmol/m²/s, L20: forte lumière, 250 μmol/m²/s; L21, lumière faible (à midi 200-350 μmol/m²/s); L22 lumière moyenne, (à midi, 700-900 μmol/m²/s); L23 forte lumière, (à midi 1000-1200 μmol/m²/s); L24, lumière faible (12h photopériode, 20 μmol/m²/s); L25, lumière moyenne (12h photopériode, 200 μmol/m²/s); L26 forte lumière (12h photopériode, 1200 μmol/m² /s).

4.2.Régulation indirecte de la teneur en vitamine C par la lumière

4.2.a. Rôle de la température

De grosses hétérogénéités de température peuvent exister entre les fruits d'une même plante principalement causées par des différences d'exposition des fruits au rayonnement. Comme la température a une influence directe sur l'ensemble du métabolisme primaire et secondaire de la plante, elle peut affecter sa composition en micronutriment (Dorais and Ehret, 2008). La tomate voit ses teneurs en vitamine C augmenter à faible température (Walker and McKersie, 1993). A l'opposé, les températures relativement élevées (>31°C) semblent entraîner une diminution des teneurs en vitamine C dans les fruits, que les fruits soient sur la plante ou détachés (Lester, 2004, Richardson et al., 2004, Gautier et al., 2008). Cette diminution serait liée à une augmentation de la dégradation de la vitamine C par oxydation (Torres et al., 2006). Cependant, comme la température modifie également la vitesse de développement du fruit, et donc le stade du fruit, qui influence de manière importante la teneur en vitamine C, les effets observés sont difficiles à interpréter.

4.2.b. Rôle des sucres

La lumière peut aussi réguler de manière indirecte la teneur en vitamine C des fruits ou des feuilles en modifiant la teneur en sucres. En effet, comme les sucres (et en particulier le glucose, sucre réducteur) sont les précurseurs de l'ascorbate, on peut supposer que l'augmentation de la disponibilité en sucres à forte intensité lumineuse au niveau des feuilles ou après transport au niveau des fruits puisse contrôler le pool de vitamine C. Les sucres peuvent également agir comme des molécules 'signal' (notamment le saccharose) et promouvoir l'expression de gènes (voir les synthèses bibliographiques de Smeekens, 2000 et Hanson and Smeekens, 2009). Ainsi, Nishikawa et al. (2005) montrent que le fait d'alimenter le brocoli en saccharose augmente l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate. De plus, l'alimentation en saccharose ou glucose permet également d'augmenter les teneurs en vitamine C dans les feuilles d'orge à la lumière et de diminuer les pertes de vitamine C à l'obscurité (Smirnoff and Pallanca, 1996).

De fortes relations entre teneurs en sucres et en vitamine C ont ainsi été décrites dans les feuilles et les fruits (Mc Collum, 1946, Smirnoff and Pallanca, 1996, Stevens et al., 2007). Dans les feuilles d'orge, Smirnoff et Pallanca (1996) reportent même une relation linéaire

positive entre la quantité de vitamine C et la quantité de sucres. Chez les organes photosynthétiques, la lumière, les teneurs en sucres et en vitamine C semblent être positivement corrélés, en relation avec le rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse (voir 3.5). En revanche, chez les organes non-photosynthétiques, la relation sucre/vitamine C semble être moins claire. En effet, l'ajout de glucose à des pois en germination ne permet pas d'augmenter la teneur en vitamine C (Pallanca and Smirnoff, 1999a). De plus, chez les fruits, le génotype influence fortement cette relation sucre/vitamine C. Ainsi Stevens et al. (2007) montrent que la corrélation sucre/ vitamine C est faible voire inexistante pour 2 populations de tomate sur 3.

4.2.c. Rôle du transport de vitamine C et de précurseurs dans la plante via le phloème

- *Le transport inter- et intracellulaire*

De nombreuses études ont montré que l'ascorbate et le DHA pouvaient être transportés à travers la membrane des différents compartiments cellulaires (chloroplastes, vacuoles, peroxysomes) et des cellules (Horemans et al., 1998, Horemans et al., 2000a, Horemans et al., 2000b). Le transport de l'apoplasme vers le cytosol semble se faire préférentiellement sous forme oxydée (DHA) chez de nombreux végétaux (Rautenkranz et al., 1994, Horemans et al., 1998, Horemans et al., 2000a, Kollist et al., 2001). Quelques études ont également mis en évidence le transport d'ascorbate (Anderson et al., 1983, Beck et al., 1983, Foyer and Lelandais, 1996). Toutefois, le ou les mécanisme(s) de transport des deux formes à travers la membrane plasmique et dans les différents compartiments restent encore à élucider.

- *Le transport entre organes*

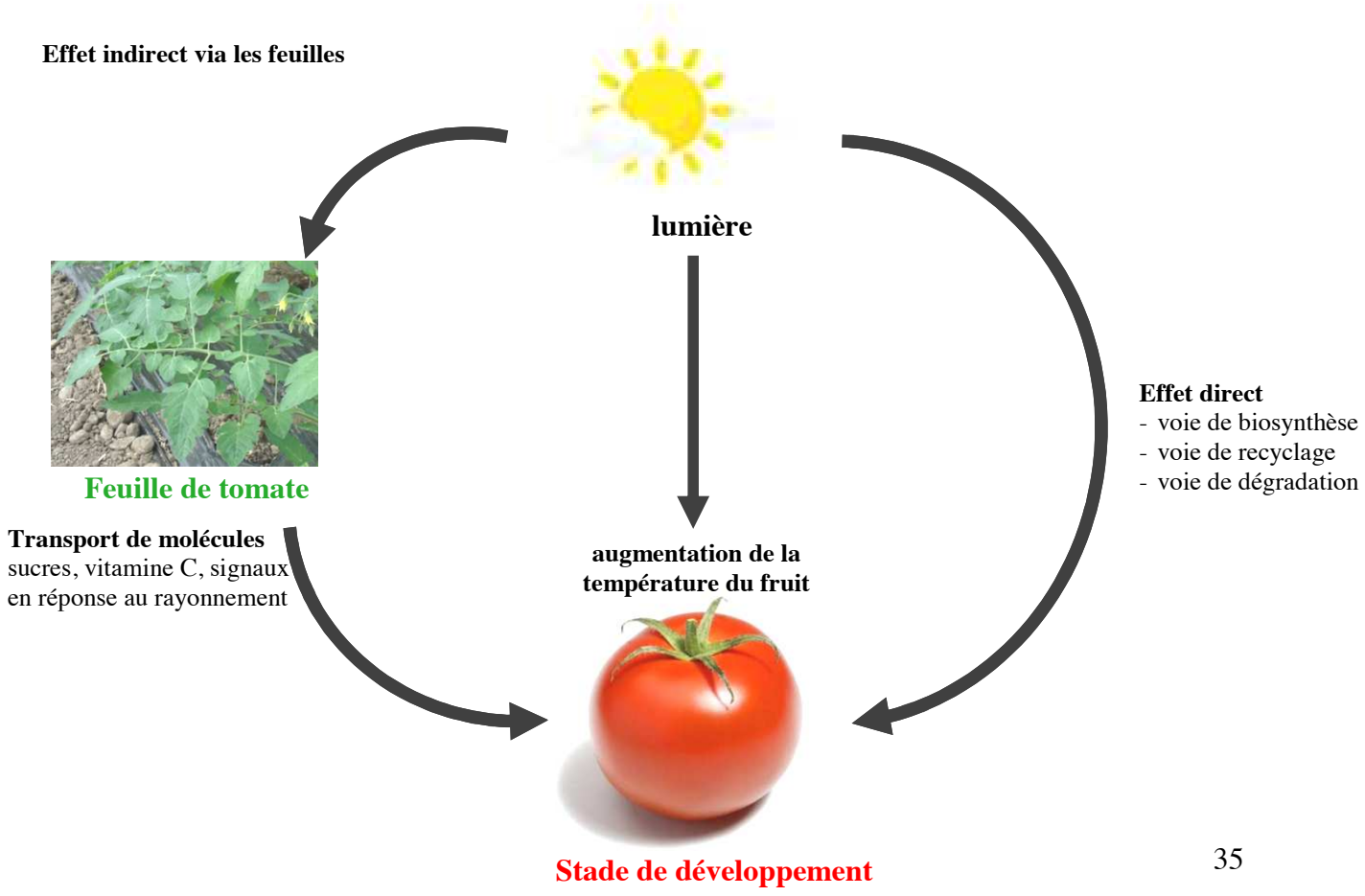
La vitamine C est présente dans tous les organes de la plante (voir partie 1.5.b.) et peut être transportée à travers la membrane plasmique mais également sur de plus longues distances via le phloème. Les feuilles, de part leur activité photosynthétique, sont considérées comme une 'source' en assimilats alors que les racines, fleurs et fruits, organes non photosynthétiques, dépendent pour leur fourniture en assimilats des feuilles et sont donc des 'organes puits'. Ainsi, le glucose, précurseur de l'ascorbate, synthétisé dans les feuilles est transféré sous forme de saccharose (glucose+fructose) dans le phloème où il transite vers les organes "puits" de la plante. De la même manière, le transport longue distance de la vitamine C entre organes

source et puits via le phloème a été décrit et mis en évidence récemment (Franceschi and Tarlyn, 2002). Ainsi, la présence de vitamine C ou de conjugués dans les exsudats de phloème a pu être mise en évidence récemment grâce à des techniques d'exsudation ou de recueil de stylets de puceron chez la pomme de terre, certaines cucurbitacées et chez l'arabette (Franceschi and Tarlyn, 2002, Hancock et al., 2003, Tedone et al., 2004, Hancock et al., 2008). Chez les cucurbitacées, grâce à une exsudation importante, la concentration des exsudats en vitamine C a pu être estimée. La vitamine C est présente à des concentrations comprises entre 0,5 et 1,4 mg g^{-1} MF (soit 2,8 à 8,2 mM) pour des concentrations en sucres solubles totaux dans le phloème variant de 10 à 23 mg g^{-1} MF (Hancock et al., 2003). En revanche, pour les autres espèces, la faible quantité recueillie dans les stylets de puceron n'a pas rendu la quantification possible. De plus, la totalité des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate a également été retrouvée dans les exsudats de phloème de courgette indiquant la capacité de biosynthèse au niveau des cellules du phloème (Hancock et al., 2003). Cependant, la contribution quantitative de ce transport dans la teneur totale en AsA des organes puits, reste à déterminer. En effet, Hancock et al. (2007) ont récemment démontré que cette contribution était faible pour le cassis. Le transport de vitamine C vers les organes puits pourrait expliquer les fortes teneurs en vitamine C de certains fruits, mais il reste très peu étudié et l'on ne sait pas s'il peut être modifié par des facteurs environnementaux ou génétiques.

Présentation du travail de thèse

La synthèse bibliographique a montré que le pool de vitamine C dans la plante est le résultat des différents processus de synthèse, recyclage et dégradation. Ce pool varie en fonction du génotype, de l'organe étudié et du stade de développement de la plante. De plus, la lumière est un facteur majeur de fluctuations des teneurs en vitamine C dans la plante. De nombreux travaux s'intéressent à la régulation de la vitamine C dans les feuilles mais peu de données existent sur les fruits, systèmes plus complexes car dépendant des feuilles pour leur alimentation carbonée et pouvant recevoir de la vitamine C via le phloème. Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre l'impact de la lumière sur les variations de teneur en vitamine C dans les fruits par l'environnement lumineux. Deux hypothèses de travail ont été privilégiées :

- un effet direct de la lumière sur le métabolisme de la vitamine C dans le fruit (synthèse, recyclage entre les deux formes (oxydée et réduite) ou dégradation).
- un effet indirect de la lumière sur l'accumulation de vitamine C dans les fruits lié à une modification de la température (échauffement lié au rayonnement) ou au transport de molécules (dérivées du métabolisme des sucres, précurseurs de la vitamine C ou vitamine C) synthétisées dans les feuilles.



Les objectifs scientifiques de cette thèse étaient :

- d'élucider la relation entre sucres et vitamine C afin de déterminer si les sucres pouvaient réguler la teneur en vitamine C dans les fruits
- d'appréhender l'impact des transports entre feuilles et fruits sur la régulation par la lumière de la vitamine C dans les fruits
- d'analyser l'impact de la lumière sur le métabolisme de la vitamine C
- de dissocier l'impact de la lumière et celui de la température sur les variations de teneur en vitamine C dans le fruit

Dans ces deux dernières parties, pour élucider l'action de la lumière, nous avons étudié son impact sur la synthèse de la vitamine C par l'intermédiaire de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse et le recyclage en nous intéressant aux activités des enzymes de recyclage. Enfin, la dégradation qui n'avait pas été étudiée jusqu'à présent sur la tomate, a fait l'objet de dosages d'un produit de dégradation potentiel : le thréonate. En effet, une étude sur tomate a montré que la teneur en thréonate était diminuée dans les fruits de plantes mutées au niveau de la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'ascorbate (GLDH) impliquant un lien entre AsA et thréonate (Alhagdow et al., 2007).

Plusieurs axes de recherche sont développés dans les différents chapitres de cette thèse.

La première partie de ce travail (chapitre I) aborde la relation entre les sucres et la vitamine C. La synthèse de la vitamine C se fait à partir de glucose-6-phosphate. Or, souvent les variations de vitamine C dans le fruit sont mises en relation avec des variations de teneurs en sucres (Mc Collum, 1946, Murneek et al., 1954, Dumas et al., 2003). Ainsi, de fortes hétérogénéités saisonnières ont été mises en évidence concernant les teneurs en vitamine C et en sucres dans le fruit avec des variations de vitamine C pouvant atteindre +50% entre le printemps et l'été (Murneek et al., 1954). De plus, une forte variabilité génétique existe en ce qui concerne la teneur en vitamine C chez la tomate toujours en liaison avec la concentration en sucres (Causse et al., 2003, Navez et al., 2004). Il apparait donc important de clarifier cette relation sucres/vitamine C. Pour réaliser cette étude, deux génotypes aux teneurs en sucres et vitamine C contrastées ont été utilisés en culture d'automne sous serre et d'été en plein champ. Le premier génotype 'Cervil' est une tomate cerise, contenant beaucoup de sucres et

de vitamine C à maturité. A l'opposé, le deuxième génotype, 'Levovil', tomate de taille moyenne est pauvre en sucres et vitamine C à maturité. En automne, c'est-à-dire en situation potentielle de limitation en sucres, un traitement faible charge a permis d'augmenter les teneurs en sucres chez ces deux génotypes. Dans cette étude, l'évolution des sucres et de la vitamine C pendant le développement des fruits des deux génotypes a été caractérisée, soulignant l'impact important du stade de développement et du génotype sur les teneurs en sucres et en vitamine C. Cette étude a montré que les concentrations en sucres n'étaient pas déterminantes dans les variations de teneurs en vitamine C.

Dans une deuxième partie (chapitre II), nous abordons les transports entre feuille et fruit par des ombrages localisés. Cette étude avait pour objectif d'étudier les variations de teneurs en vitamine C et en sucres dans les fruits en fonction de l'environnement lumineux en s'appuyant sur des ombrages spécifiques des feuilles, des fruits ou de la plante entière. Cette étude indirecte ne permet pas d'exclure des transports entre feuilles et fruits même si l'impact direct de la lumière sur la teneur en vitamine C des fruits semble être prédominant.

Nous nous sommes donc ensuite intéressés, plus particulièrement, à l'impact des variations journalières du rayonnement incident sur l'accumulation de la vitamine C dans les feuilles et les fruits (Chapitre III). Nous avons étudié la régulation de la voie de synthèse en réponse aux changements d'intensité lumineuse dans les feuilles et les fruits à court (24h) et long terme (7 jours). Ces deux organes, feuilles et fruits sont très différents et ont des teneurs en vitamine C éloignées (deux fois moins de vitamine C exprimée en matière sèche dans les fruits par rapport aux feuilles) et l'on peut supposer que la régulation par la lumière y soit différente. Dans cette partie, mon travail a consisté à étudier les variations d'abondance des transcrits de la voie de synthèse de vitamine C en réponse à un ombrage long et au cours de la journée. Cette étude a permis de mettre en évidence des différences de régulation de la voie de synthèse de la vitamine C entre les feuilles et des fruits.

Dans une quatrième partie (Chapitre IV), nous avons étudié l'impact de la lumière en interaction avec la température sur la teneur en vitamine. Pour cela, nous avons récoltés des fruits en fin de croissance et début de maturation (stade tournant) que nous avons placés en chambre de culture permettant de contrôler les facteurs environnementaux et notamment la lumière et la température. Nous avons étudié les modifications du métabolisme de la vitamine C à l'échelle du fruit en mesurant les niveaux de transcrits des gènes de la voie de biosynthèse, l'activité des enzymes de recyclage et la teneur en thréonate, un des produits de dégradation possible de la vitamine C dans le fruit de tomate, indépendamment d'éventuels transports entre feuilles et fruits.

Enfin dans une cinquième partie, (Chapitre V), nous avons proposé un modèle simplifié d'accumulation de la vitamine C totale au cours du développement du fruit. Ce modèle considère un pool de vitamine C totale (forme réduite et oxydée) dans le fruit sans distinguer la synthèse in situ du fruit d'un éventuel transport des feuilles vers les fruits. Il sera ensuite complexifié afin de prendre en compte les réponses aux facteurs lumière et température.

Matériels et méthodes

MATERIEL ET METHODES

Le matériel végétal

La tomate est un fruit d'une grande importance économique dont le génome a été récemment séquencé. Elle est utilisée comme modèle pour l'étude de la qualité des fruits charnus c'est pourquoi elle est employée dans ce travail. Plusieurs génotypes ont été étudiés présentant des teneurs en sucres et vitamine C très différentes :

- deux tomates de type cerise *Solanum lycopersicum* 'Cervil' et *Solanum lycopersicum* 'West Virginia 106' (WVa 106) possédant des fortes teneurs en sucres solubles et en vitamine C à maturité (la seconde étant utilisée par ailleurs en génétique pour la génération de plantes transgéniques).
- une tomate de type intermédiaire *Solanum lycopersicum* 'Levovil' possédant des faibles teneurs en sucres et en vitamine C à maturité

L'utilisation de ces trois génotypes nous a permis d'illustrer la variabilité génétique existante lors de nos études. Ainsi, les génotypes 'Cervil' et 'Levovil' ont été utilisés pour déterminer l'impact des sucres sur la teneur en vitamine C (chapitre I). 'WVa 106' a été employé pour les études portant sur le transport et l'impact de la température et la lumière comme modèle représentatif des fruits de type tomate cerise (Chapitre II, III, IV).

Les méthodes

1. Dispositif expérimental

Ces génotypes ont été cultivés à différentes saisons, suivant différents systèmes de culture dans le but de faire varier les conditions environnementales. Les trois génotypes ont ainsi été cultivés en été, en plein champs où le rayonnement est maximal et sous serre à différentes saisons (printemps et automne).

De plus, pour mieux contrôler les facteurs environnementaux, dans le chapitre IV, nous avons privilégié l'étude de fruits détachés (système d'étude simplifié) en chambre climatique. Ce système d'étude permet de maîtriser les conditions environnementales et de faire varier séparément la température et le rayonnement, afin de mieux étudier leur impact respectif sur la vitamine C. Cette étude sur fruits détachés est possible chez la tomate car le fruit peut continuer de murir quand il est récolté après le stade vert-mature (Gautier et al., 2008). Ainsi,

on retrouve sur fruit détaché des modifications du métabolisme liées à la maturation comparables à celles observées sur le fruit resté sur la plante (synthèse des caroténoïdes, dégradation de l'amidon, accumulation des sucres solubles, catabolisme des acides et accumulation de vitamine C).

2. Prélèvement et échantillonnage

Les anthèses des fleurs de tomate ont été notées tous les 2-3 jours afin de constituer des pools de fruits de même âge physiologique (noté en jours après anthèse), c'est-à-dire un ensemble de fruits ayant le même nombre de jours après anthèse à plus ou moins un jour. Les modalités d'échantillonnage sont détaillées pour chaque expérimentation dans chacun des chapitres. La vitamine C s'oxydant facilement, les échantillons ont été rapidement plongés dans l'azote liquide directement ou après dissection pour ne garder que le péricarpe puis broyés dans l'azote liquide et conservés à -80°C en vue d'analyses ultérieures.

3. Mesures sur fruits et sur feuilles

La coloration des fruits a été mesurée dans le but de suivre la maturation des fruits car celle-ci influence de manière importante la teneur en vitamine C. Par ailleurs, comme la vitamine C joue de nombreux rôles dans le fonctionnement de la plante, nous avons effectué des mesures de photosynthèse, respiration, conductance stomatique et fluorescence de la chlorophylle (voir chapitre III) au niveau des feuilles afin de relier ces mesures aux variations de teneur en vitamine C.

4. Analyses biochimiques

4.1.Dosage colorimétrique de la vitamine C

L'extraction et le dosage ont été effectués suivant la méthode décrite par Stevens et al. 2006 sur microplaque et par spectrophotométrie (Annexe I). Ce dosage permet d'obtenir la teneur en vitamine C totale et réduite. La teneur en vitamine C oxydée est calculée par différence.

4.2.Dosage des activités des enzymes du cycle ascorbate/glutathion

Les protéines sont extraites à partir de 125mg de poudre de fruit congelée dans 1mL de tampon MES/KOH (pH 6.0, 50mM), contenant 40mM KCl, 2 mM de $CaCl_2$ et 1mM d'ascorbate de sodium. Le mélange est homogénéisé pendant 3 à 4 min sur un vortex à plateau à température ambiante et centrifugé pendant 15 min à 4°C. Puis les mesures des activités des enzymes du cycle ascorbate/glutathion ont été effectuées sur le surnageant suivant la méthode de Murshed et al. (2008) avec quelques modifications décrites dans le chapitre IV.

4.3.Dosage des sucres

- sucres solubles (HPLC)

Les sucres solubles ont été extraits, purifiés et dosés en chromatographie en phase liquide à haute performance suivant la méthode décrite par Gomez et al. (2002) (Annexe II).

- amidon (dosage colorimétrique)

Le dosage de l'amidon est réalisé après hydrolyse et dispersion de l'amidon par ajout d'amyloglucosidase. Le glucose ainsi libéré est mesuré suivant la méthode de Gomez et al. (2007), sur microplaque et par spectrophotométrie (Annexe III).

4.4.Dosage du thréonate

Le thréonate a été extrait et dosé en GC-MS suivant la méthode présentée dans le chapitre IV.

5. Analyse du transcriptome

Extraction d'ARN.

L'extraction de l'ARN a été effectuée à partir de 100mg de poudre fraîche pour les feuilles et 200mg pour les fruits auquel on a rajouté 1mL de Tri-Reagent (Sigma). Le mélange obtenu est homogénéisé au vortex et laissé à température ambiante 10 min. 500μL de chloroforme sont ajoutés et le tout est agité au vortex et laissé à nouveau 5 min à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 min à 12000g et à 4°C et le surnageant est récupéré (650μL). Après ajout de 455μL d'isopropanol, les tubes sont inversés plusieurs fois, incubés 10 min à température ambiante et centrifugés 10 min à 12000g et à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et lavé à l'éthanol 75% puis le culot est séché à l'air et repris dans 50μL d'eau RNAse free. La concentration en ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm avec un Nanodrop®. Pour prévenir d'éventuelles contaminations des ARN par de l'ADN génomique,

15μg d'ARN total de chaque échantillon sont traités avec de la RQ1 RNase free DNAse (Promega) suivant les instructions du fournisseur.

Réaction de transcription inverse (RT).

La synthèse des ADN complémentaires (ADN_c) est réalisée à partir de 5μg d'ARN (préalablement traités avec la DNAse). Cette synthèse se fait avec la reverse transcriptase SuperScript® II (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur en ajoutant 1μL RNAsin et 2μL oligo DT_{21} (10μM). Le mélange est dénaturé pendant 5 min à 65°C dans un thermocycleur puis rapidement mis sur la glace. 6μL de tampon 5X, 1μL de dNTP et 1μL de DTT (0.1M) sont ajoutés aux échantillons. Après homogénéisation, la stabilisation des hybrides amorce/matrice est effectuée durant 2 min à 42°C et 1μL de reverse transcriptase Superscript® II est ajouté (volume final de 32μL). La synthèse des ADN_c est réalisée pendant 60 min à 42°C et stoppée ensuite à 70°C pendant 10 min. Puis les ADN_c ainsi obtenus sont dilués au cinquième et stockés à -20C sous forme d'aliquotes de 2μL.

PCR quantitative en temps réel.

La PCR quantitative en temps réel (Q-PCR) est une méthode de biologie moléculaire qui permet de suivre au cours du temps, grâce à un rapporteur fluorescent, l'amplification spécifique d'un gène dans le but de le quantifier de manière absolue ou relative.

L'amplification est réalisée en présence de SYBR® Green, une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléiques double brins, devenant alors un très bon fluorophore et utilisée comme marqueur pour l'accumulation des acides nucléiques double brins formés dans le milieu réactionnel à chaque cycle de PCR (longueur d'onde d'émission maximum à 520nm).

L'enregistrement en temps réel de la fluorescence permet de visualiser l'amplification du gène d'intérêt (figure 8). Les amplifications suivent une courbe sigmoïdale. On distingue une première phase où la fluorescence ne se différencie pas du bruit de fond. Puis, l'augmentation de la fluorescence passe par une phase exponentielle durant laquelle l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité de matrice, et ralentie pour atteindre un plateau. Le cycle seuil où Ct (threshold cycle) correspond au cycle au cours duquel la fluorescence d'un échantillon devient significativement différente du bruit de fond.

Les analyses de PCR quantitative sont réalisées avec un thermocycleur Stratagene Mx3005P® (Stratagene, Cedar Creek, TX) en utilisant le Gotaq® qPCR Master Mix (Promega) selon les instructions du fournisseur dans un volume final de 24.5μL.

Le profil thermique pour les PCR était le suivant :

Un cycle de 2 min à 95°C suivi de 40 cycles à 95°C pour 20 sec, 55°C pour 35 sec et 72°C pour 35 sec. Enfin le dernier cycle d'1 min à 95°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 95°C permet de vérifier la spécificité de l'amplification sur les courbes de fusion obtenues (présence d'un seul pic, Figure 9). Pour chaque réaction, deux réplicats techniques ont été déposés et quatre répétitions biologiques ont été analysées pour chaque condition étudiée.

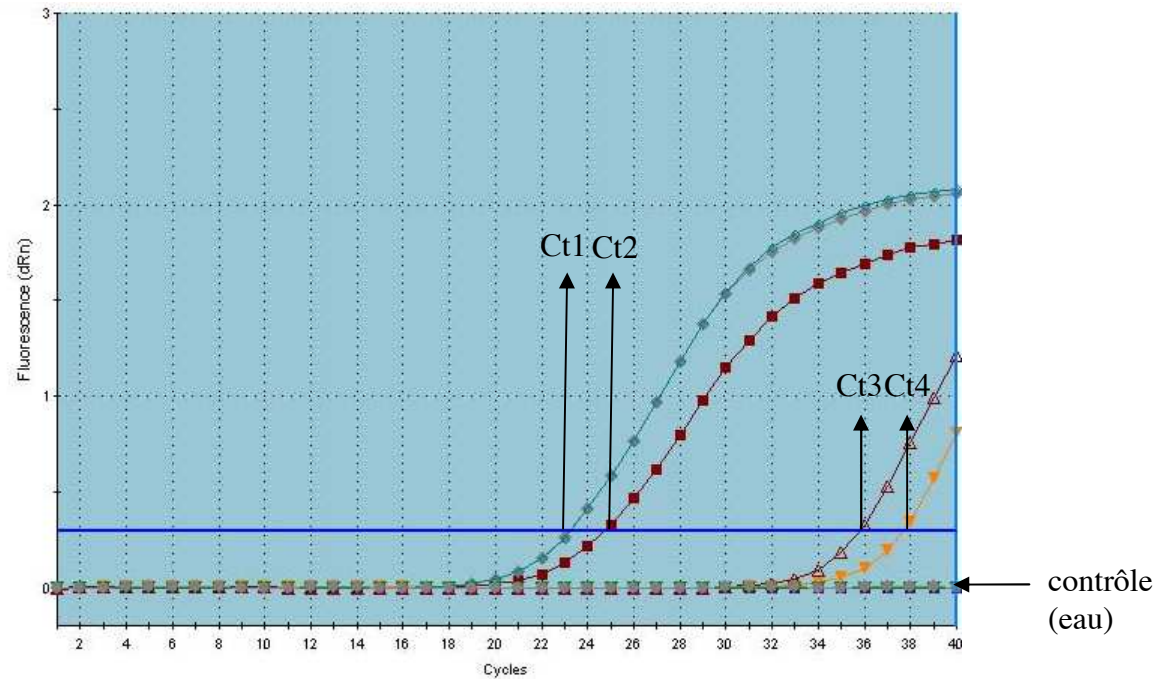


Figure 8 : Courbes d'amplification d'un gène d'intérêt à partir d'échantillons d'ADN_c différents. La fluorescence des puits au cours de la PCR est représentée en fonction du nombre de cycles. La ligne de base (ligne bleue horizontale) permet de définir le cycle seuil de chaque échantillon (ou Ct pour threshold cycle) correspondant au nombre de cycles nécessaire pour que la fluorescence de cet échantillon soit significativement supérieure au bruit de fond. La fluorescence du contrôle sans ADNc reste inférieure à la ligne de base.

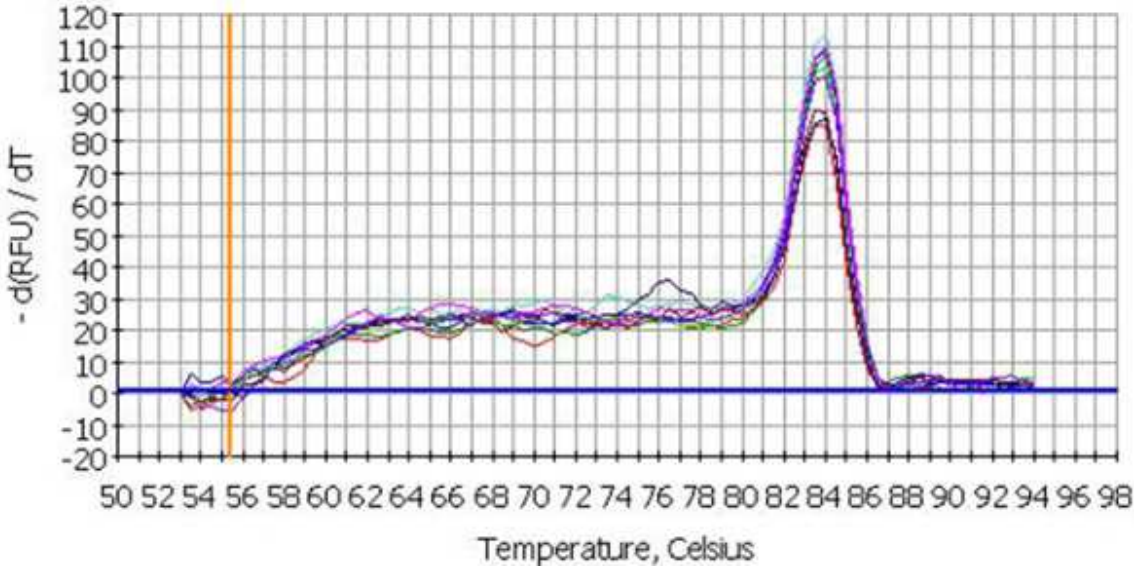


Figure 9 : Courbe de fusion (dérivée de la fluorescence du SYBR® green en fonction de la température). L'obtention d'un seul pic témoigne de l'amplification d'un seul et unique fragment d'ADN_c.

La quantification relative. La quantification relative des transcrits a été réalisée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001) grâce à la formule suivante prenant en compte l'efficacité du gène étudié et celle du gène de référence :

$$R=\frac{Eff\ gène\ étudié^{-(Ct\ échantillon-Ct\ contrôle)}}{Eff\ référence^{-(Ct\ échantillon-Ct\ contrôle)}}$$ → pour le gène étudié / → pour le gène de référence

R : quantité relative de transcrit

Eff : efficacité d'amplification traduisant le pourcentage de brins matrices dupliqués. Elle est obtenue par suivi en RT QPCR d'une gamme de dilution d'un pool des extraits dosés. Les Ct obtenus pour chaque dilution sont reportés sur un graphique avec en abscisse les logarithmes des concentrations Qo. Le coefficient directeur de la droite Ct en fonction du logarithme de la concentration Ct=f(log(Qo)) donne l'efficacité.

Ct : Cycle au cours duquel la fluorescence de l'échantillon est significativement supérieure au bruit de fond.

Un Ct contrôle a été déterminé afin d'exprimer les résultats par rapport à une condition 'témoin' lorsque cela était pertinent permettant d'exprimer les résultats par rapport à cette condition ou par rapport à la valeur de Ct la plus basse des échantillons dans les conditions expérimentales.

Les gènes de référence utilisés pour normaliser les expressions des transcrits est l'*Actin1* (SGN-U314757) et *EIF-4A-2* (U213502).

Les amorces pour les Q-PCR et leur séquence sont reportées dans l'Annexe IV.

Chapitre 1

La concentration en sucres solubles, facteur non déterminant pour la régulation de la vitamine C dans les fruits

CHAPITRE I : La concentration en sucres solubles, facteur non déterminant pour la régulation de la vitamine C dans les fruits

Ce premier chapitre correspond à un article publié dans le journal *Plant Physiology and Biochemistry* (Massot et al., 2010)[‡‡]. Ce travail porte sur la relation sucres/vitamine C souvent évoquée dans les articles mais peu étudiée. L'objectif de ce travail est de déterminer si la teneur en vitamine C du fruit est contrôlée par la teneur en sucres dans le fruit. Pour cela, nous sommes partis du constat que les teneurs en vitamine C et en sucre des fruits sont généralement corrélées au cours de la saison et au cours du développement. Nous avons comparé les cinétiques d'accumulation des sucres et de la vitamine C au cours du développement du fruit pour deux génotypes contrastés, un génotype à gros fruit 'Levovil' accumulant peu de sucres et de vitamine C et un génotype de type cerise 'Cervil' accumulant beaucoup de sucres et de vitamine C. Par une diminution de la charge en fruit, nous avons augmenté la teneur en sucres dans les fruits en automne, période où celle-ci pourrait être limitante pour la synthèse de la vitamine C dans les fruits, et présenté les conséquences sur la teneur en vitamine C. Cette partie nous permet de discuter le rôle des sucres sur les variations des teneurs en vitamine C dans les fruits.

[‡‡] **Massot C, Génard M, Stevens R, Gautier H. 2010**. Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry,* **48**: 751-757.

Résumé

Cette étude a pour but de clarifier la relation entre les sucres et la vitamine C dans les fruits. L'objectif est de déterminer si la teneur en vitamine C est contrôlée par les sucres de part leur rôle comme précurseur de la synthèse de vitamine C. Pendant l'été, la teneur en sucre et en vitamine C retrouvée chez les deux génotypes *Solanum lycopersicum* 'Cervil' et 'Levovil' est maximale. A l'automne, la réduction de la charge en fruit entraîne une augmentation de la taille et de la teneur en sucre des fruits sans que la teneur en vitamine C ne soit modifiée. Par conséquent, les sucres ne semblent pas limitant pour la synthèse de vitamine C à l'automne. Nous démontrons pour deux cultivars 'Cervil' et 'Levovil' ayant des profils d'accumulation différents de sucres et de vitamine C pendant la maturation, que les sucres ne sont pas d (féterminants dans la régulation de la vitamine C. La forte corrélation observée entre sucres et vitamine C pour le génotype 'Cervil' est due à une corrélation temporelle pendant la maturation sans lien causal.

Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit

Capucine Massot[1], Michel Génard[1], Rebecca Stevens[2], Hélène Gautier[1]

[1] INRA UR 1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France

[2] INRA UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine St Maurice, F-84143 Montfavet, France

Abstract

The present study aimed to clarify the relationship between sugars and vitamin C in fruit. The objective was to determine whether vitamin C content was regulated by sugar content due to the role of sugar as a precursor for vitamin C. During summer, maximal content in sugar and vitamin C were found in both genotypes tested *Solanum lycopersicum* 'Cervil' and 'Levovil'. During autumn, fruit pruning increased fruit size and hexose content but fruit vitamin C content did not increase. Therefore sugar substrate was not limiting for vitamin C synthesis during autumn. We demonstrated for two cultivars, 'Cervil' and 'Levovil', with different sugar accumulation profiles during ripening, that sugar content was not determinant in the regulation of vitamin C content. The strong correlation observed between sugars and vitamin C in 'Cervil' was due to their concomitant increase during fruit ripening.

Keywords: fruit load, fruit quality, *Solanum lycopersicum,* sugars, tomato, vitamin C

Abbreviations

D1: first period of fruit development from 0 to 29 Days after pollination for 'Cervil' and from 0 to 39 Days after pollination for 'Levovil'

D2: second period of fruit development from 30 to 60 Days after pollination for 'Cervil' and from 40 to 67 Days after pollination for 'Levovil'

DAP: days after pollination

FW: fresh weight

HL: high fruit load

LL: low fruit load

Introduction

Tomato fruit are produced year-round and their frequent and high levels of consumption mean they are an important source of antioxidant micronutrients and especially vitamin C for the human diet. Besides the well known role of vitamin C in preventing scurvy, recent studies have shown that vitamin C is involved in preventing various oxidative stress-related illnesses such as cancers, cardio-vascular diseases and aging (Koo, 1996, Li and Schellhorn, 2007a, Li and Schellhorn, 2007b). However, vitamin C content in tomato fruit varies all year round (Murneek et al., 1954) and depends on environmental factors, agricultural techniques and fruit ripening (Lopez-Andreu et al., 1986, Dumas et al., 2003). Seasonal variations in vitamin C levels have been described in relation to light intensity variations and sugar content (Mc Collum, 1946, Murneek et al., 1954, Dumas et al., 2003). Murneek et al. (Murneek et al., 1954) reported that fruit harvested during summer contained from 8 to 50% more vitamin C compared to fruit harvested during early spring. Moreover, Mc Collum et al. (1946) *s*howed that fruit exposed to light contained about 15% more reducing sugars and 35% more vitamin C compared to shaded fruit. Similarly, glasshouse-grown tomatoes are usually found to have lower levels of sugars and vitamin C than those grown outdoors, probably due to lower light intensities (Lopez-Andreu et al., 1986, Lester, 2004). Increased light can promote vitamin C content via increased sugar accumulation triggering increased vitamin C synthesis. Indeed, correlations between sugar and vitamin C content have been well described in fruit (Mc Collum, 1946, Causse et al., 2003, Stevens et al., 2007). This correlation between vitamin C and sugar contents could be linked to the role of sugars as a substrate for vitamin C biosynthesis (Wheeler et al., 1998), but also to the well known role of sugars acting as a signal that promotes gene expression (Smeekens, 2000, Hanson and Smeekens, 2009). In fact, increasing sucrose content has been shown to enhance expression of genes of the ascorbic acid biosynthesis pathway in broccoli (Nishikawa et al., 2005). Besides, Stevens et al. (2007) showed that this relationship, between sugar and vitamin C contents, can be influenced by genetic factors, as for two populations out of three, low or no significant correlation was found ($r<0.36$). Light can also have a direct effect on fruit vitamin C content by promoting vitamin C biosynthesis through increased gene expression. Such an activation by light was reported in leaves of *Arabidopsis* by Tamaoki et al. (2003) for the L-galactono-γ-lactone dehydrogenase gene which controls the final step of vitamin C biosynthesis from L-galactono-1.4-lactone. In the present work, we tested whether sugar content could regulate

vitamin C content by studying the impact of increased sugar content on vitamin C content. In a first experiment, plants were grown outdoors during summer time in order to maximize fruit vitamin C content during fruit ripening. Then, in another experiment, plants were grown during autumn in a greenhouse to obtain fruit with low sugar and vitamin C content, and fruits from half of the plants were pruned in order to increase sugar content and follow the impact on vitamin C.

Material and Methods

The study was performed using *Solanum lycopersicum* cv. 'Cervil' a cherry tomato with high sugar and vitamin C contents and *Solanum lycopersicum* cv. 'Levovil' an intermediate sized fruit tomato with low sugar and vitamin C contents (Causse et al., 2002, Causse et al., 2003).

Field experiment during summer

Plant growth. Plants were grown in a field in Avignon (Southern France, 44°N). On 21 March 2008, seeds were sown. On 22 April 2008 seedlings were planted in a field. Nutrient supply, chemical pest and disease control followed commercial practices. Plants were stopped above the second truss in 'Levovil' and the fourth truss in 'Cervil' to ensure good light interception for plant photosynthesis.

Load treatments. Trusses were not pruned leading to a high fruit load per plant.

Fruit sampling. Fruit were harvested in the morning between 9am and 11am on 26 June 2008 for 'Cervil' and 10 July 2008 for 'Levovil'. Three ripening stages were collected: mature green stage (corresponding to 34 days after pollination (DAP) for 'Cervil' and 40 DAP for 'Levovil'); orange stage (43 DAP for 'Cervil' and 42 DAP for 'Levovil') and red ripe stage (40 DAP for 'Cervil' and 51 DAP for 'Levovil') as it was reported that ripening stage greatly influence vitamin C and sugar content (Lester, 2004). Following harvest, equatorial fruit diameter, fruit fresh weight and external fruit color near the pistil scar were measured using an electronic digital caliper (Codiam Scientific), a balance and a Minolta chromameter (CR 300, Minolta, France SA) using the LAB color space (Hunter colour coordinates L, a and b; L=lightness ranging from 0 for dark to 100 for light, a ranging from green to red, b ranging from blue to yellow), respectively. Fruit were partitioned into five replicates per treatment each replicate corresponds to a sample of three tomatoes for 'Levovil' and five for 'Cervil'.

Fruits were then frozen in liquid nitrogen and store at -80°C before grinding to powder in liquid nitrogen.

Greenhouse experiment during autumn

Plant growth. Plants were grown in a glasshouse at Ctifl (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) Bellegarde (southern France, 43.75°N, 4.5°E). On 30 July 2007, seeds were sown. Seedlings were transplanted into rock wool cubes. On 30 August 2007, they were planted on coco slabs (Grodan Master (dimension 100x15x25cm) Grodan BV, Netherlands) at a density of 2.5 plants m^{-2} in two modules of $250m^2$ of a multispan Venlo-type glasshouse orientated north–south. Nutrient supply, chemical pest and disease control followed commercial practices. Water was supplied to the plants according to the potential evapotranspiration in order to maintain 20–30% drainage. Flowers were open-pollinated by bumble bees and all side shoots were removed as they appeared. Every fortnight, old leaves were removed up to the youngest turning truss.

Load treatments. In the first module, plants were conducted in low fruit load (LL). So, the inflorescences were pruned, after the anthesis of each flower, to five flowers per truss in 'Cervil' and to two flowers per truss in 'Levovil'. In the second module, plants were conducted in high fruit load (HL), twenty flowers per truss were kept for 'Cervil' and five for 'Levovil'.

Fruit sampling. From 20 October to 19 December, once a week, fruits were harvested in the morning between 9am and 11am on truss n°7 for 'Cervil' and truss n°3 for 'Levovil' according to their stage of development expressed in days after pollination (DAP). Only the two first fruit of 'Levovil' were harvested (5 first fruit of 'Cervil') whatever the fruit load treatment. Consequently a total of 88 fruit for LL (130 for HL) were harvested and analysed in 'Levovil' (615 fruit for LL and 433 fruit for HL in 'Cervil'). Following harvest, the same fruit characterization was carried out as previously described for field experiment. Fruits were then frozen in liquid nitrogen for 'Cervil' or cut into quarters and the two opposite quarters frozen in liquid nitrogen for 'Levovil' and stored at -80°C before grinding to powder in liquid nitrogen (Retsch mixer mills, MM301, Eragny sur Oise, France).

Fruit analyses

Assays of total, reduced and oxidized vitamin C content were carried out as previously described by Stevens et al. (2006) on ground powder conserved at -80°C. Briefly, 0.5 to 1g of powder was homogenized with 600μL of ice cold 6% trichloroacetic acid (TCA). Samples were centrifuged for 15 min at 16,000g at 4°C. 20μL of supernatant were used in each assay. Two assays were carried out on each sample, one to measure the total vitamin C (including addition of 5mM dithiothreitol (DTT)) and one to quantify the reduced vitamin C content (omission of DTT from the assay). So, 20μL of each sample (or standard) were distributed into two wells for two repetitions) of a 96-well microplate and mixed with 20μL of 5 mM DTT (total ascorbic acid assay) or 0.4 M phosphate buffer (pH 7.4, reduced ascorbic acid assay). The plate was incubated at 37°C for 20 minutes. Then 10μL of N-ethyl maleimide (total ascorbic acid assay) or of 0.4 M phosphate buffer (pH 7.4, reduced ascorbic acid assay) were added and mixed followed by the addition of 80μL of color reagent (Stevens et al., 2006). After incubation at 37°C for 50 min, the absorbance was read at 550nm using the multiscan Ascent MP reader (Labsystems, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The standard curve obtained from the standard solution values allowed calculation of the vitamin C concentration of the samples after correction for the quantity of water introduced by the tomato sample.

Sugars were extracted as described in Gomez et al. (2002). Briefly, the soluble sugars were extracted at 4°C from 10 mg of freeze-dried fruit powder. Then 1mL of methanol/water solution (1:1, v/v) was added and 0.3mL of chloroform. Samples were shaken for 30 min at 4°C and centrifuged (5min at 16,000g at 4°C). A 0.8mL of methanol/water supernatant was recovered, evaporated under vacuum (Speed Vac). Then, for measurement of soluble sugars, samples were homogenized with 1.6mL of water at 4°C for 10 min before adding 10 mg of PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). After 30 min at 4°C, PVPP and phenolics were removed by centrifugation (10 min at 16,000g at 4°C) and the supernatant was purified and filtered using a C18 cartridge and a 0.2 μm filter. Finally, the soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) were assayed by HPLC. For starch measurement, 1mL of methanol was added to the tube containing chloroform and fruit powder, and the tube was shaken for 20 min before centrifugation (5 min at 16,000g at 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was used for starch assay. Starch was dispersed by autoclaving for 1h (120°C) and then hydrolyzed for 1.5h at 56°C by addition of amydoglucosidase solution (concentration 1g/L). The glucose released by starch hydrolysis was measured as described previously by Gomez et

al. (2007) using 150μL of diluted extract, 100μL of a solution containing ATP, NAD and 20μL of solution containing glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase.

Data analyses

Fruit traits measured during the greenhouse experiment in autumn were expressed versus time (in day after pollination, DAP). As fruit development was quicker in the field experiment during summer, field data were positioned on the same graph according to their external fruit coloration (a/b) in order to compare fruit traits at similar ripening stage (similar a/b ratio). Indeed, this ratio was previously reported to be linearly related to fruit stage of development (Giovanelli et al., 1999). Analyses of variance considering two factors 'fruit load' and fruit age expressed in 'days after pollination' and their interaction were performed on data from autumn experiment. For data collected in summer, only the factor 'fruit age' has been considered. Significant differences among treatments were assessed using a Tukey test at 5 %. A linear model was fitted to data describing fruit content in vitamin C =Y and hexose=X with fruit load treatment as a dummy variable (D) in autumn ($Y = b0 + b1*X + b2D + b3*X*D + E$ where E is the error term) during ripening. The hypotheses of coincidence, parallelism and equality of intercepts for the linear regressions, obtained for the two load treatments, were tested using this model as described by Wonnacott and Wonnacott (Wonnacott and Wonnacott, 1991). The same test was used with the dummy variable season, to compare linear regression for fruit harvested in high fruit load in autumn and summer during ripening. All statistical analyses were performed using R software (R development Core team, http://www.R-project.org).

Results

In summer, under HL, 'Cervil' fruit weight was about 5g and 'Levovil' about 120g, similar to those obtained in autumn under HL. Reducing fruit load increased fruit weight for both genotypes (*figure 1*). This was likely to be due to a limiting carbon and water supply under HL compared to LL. Moreover, in 'Cervil' and 'Levovil', reducing fruit load increased dry matter (data not shown). Fruit dry matter under high fruit load were similar in summer and autumn but were lower to the one obtained in autumn under low fruit load, indicating the major role of fruit load to modulate fruit dry matter accumulation within the fruit.

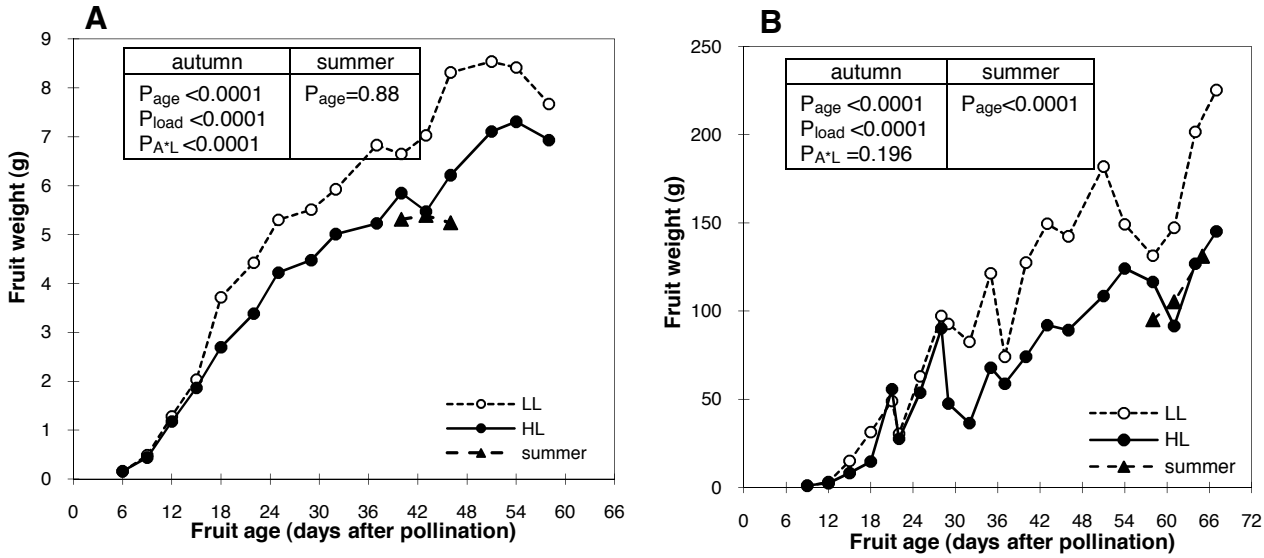


Figure 1: Mean fruit weight variations during fruit development in summer under high fruit load (--▲--) or in autumn under high fruit load (●–HL) and low fruit load (--○-- LL) for fruit of 'Cervil'(A) and 'Levovil'(B). Data are means of 2 or 3 samples, a sample corresponding to 2 fruit for 'Levovil' and 5 for 'Cervil'. P-values of the anova considering the factors fruit age (P_{age}), fruit load (P_{load}) and their interaction (P_{A*L}) were given in the tables.

In 'Cervil', starch was very high in young fruit and decreased during ripening (*figure 2A*). In contrast, sucrose and hexoses strongly accumulated during fruit development, especially hexoses from 30 to 60 DAP (*figure 2B and C*). In 'Levovil', starch also decreased during fruit development. Other sugars showed different pattern compared to 'Cervil': sucrose decreased during development and hexoses only slightly accumulated mostly from 6 to 18 DAP (*figure 3*). Moreover starch, sucrose and hexose contents were two to three times lower in 'Levovil' than in 'Cervil'.

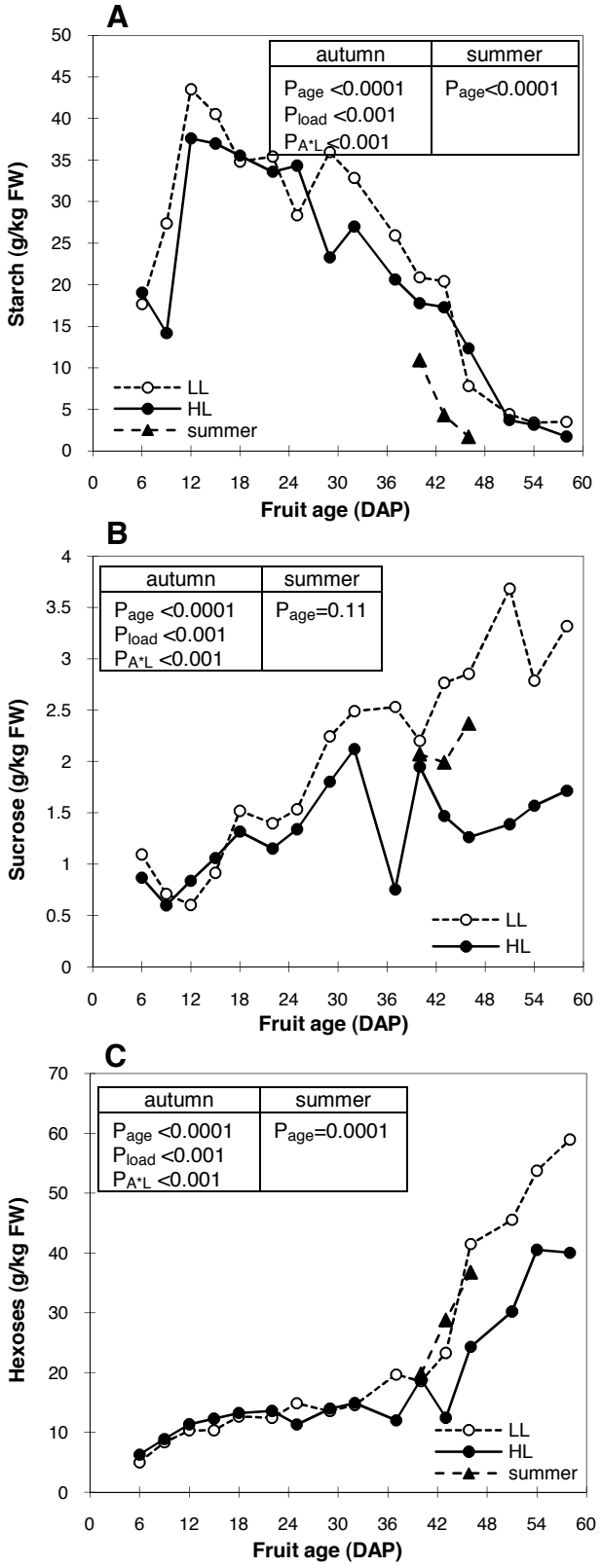


Figure 2: Sucrose (A), hexose (B) and starch (C) content during fruit development of 'Cervil' fruit in summer under high fruit load (--▲--) or in autumn under high fruit load (–●–HL) and low fruit load (--○-- LL). Legend similar to Figure 1.

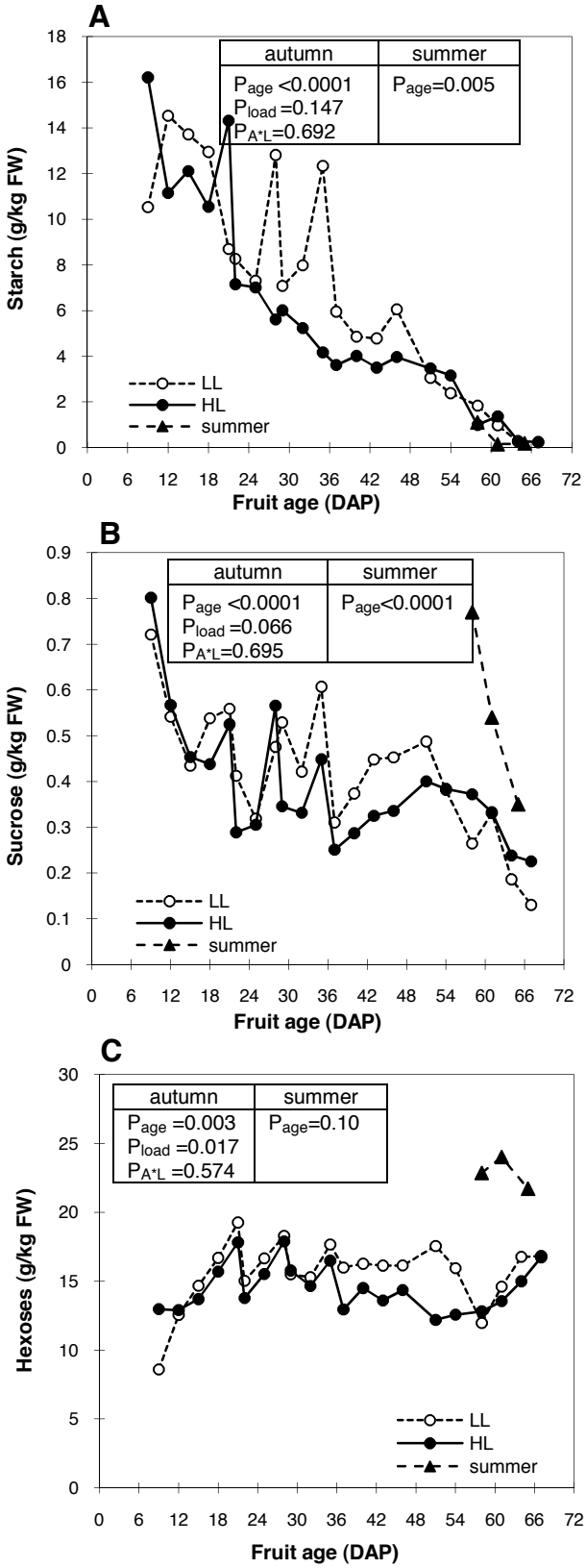


Figure 3: Sucrose (A), hexose (B) and starch (C) content during fruit development of 'Levovil' fruit in summer under high fruit load (--▲--) or in autumn under high fruit load (–●–HL) and low fruit load (--○--LL). Legend similar to Figure 1.

Reducing fruit load in autumn increased starch content and soluble sugars in 'Cervil' (+40% for sucrose and +30% for hexoses, *figure 2*). In 'Levovil', reducing fruit load did not significantly modify starch or sucrose content, but hexose content increased (*figure 3*). In summer, 'Cervil' had lower starch content and slightly higher soluble sugar content compared to autumn in high fruit load. Furthermore, sucrose and hexose contents were also higher during summer in 'Levovil' (+40%) although starch content was not greatly modified. We have therefore illustrated that 'Cervil' and 'Levovil' have different sugar variations during fruit ripening and in response to fruit load or season. Moreover, as expected, reducing fruit load led to increased hexose content for both genotypes and increased sucrose content in 'Cervil' only. In 'Cervil', reducing fruit load led to similar or even higher soluble sugar contents compared to those in summer. In contrast, in 'Levovil', soluble sugars under low fruit load did not reach levels observed in summer.

Vitamin C content varied during fruit development but was different between 'Levovil' and 'Cervil'. 'Cervil' fruit contained high vitamin C at the beginning of fruit development which slightly decreased first (from 6 to 40 DAP) and strongly increased during ripening to reach around 500 mg/kg FW at the end of maturation (from 42 to 60 DAP, *figure 4 A*). 'Levovil' fruit contained the highest vitamin C at the beginning of fruit development that decreased and stabilized during fruit ripening at around 200mg/kg FW (*figure 4 B*). Thus, despite the fact that 'Levovil' fruit had higher vitamin C content compared to 'Cervil' in younger fruit, at harvest, fruit vitamin C content in 'Cervil' was more than twice the one in 'Levovil'. Both genotypes showed no significant difference in vitamin C between HL and LL (*figure 4*). In summer, fruit vitamin C contents were about 20% higher than those in autumn for both genotypes whatever the fruit load applied.

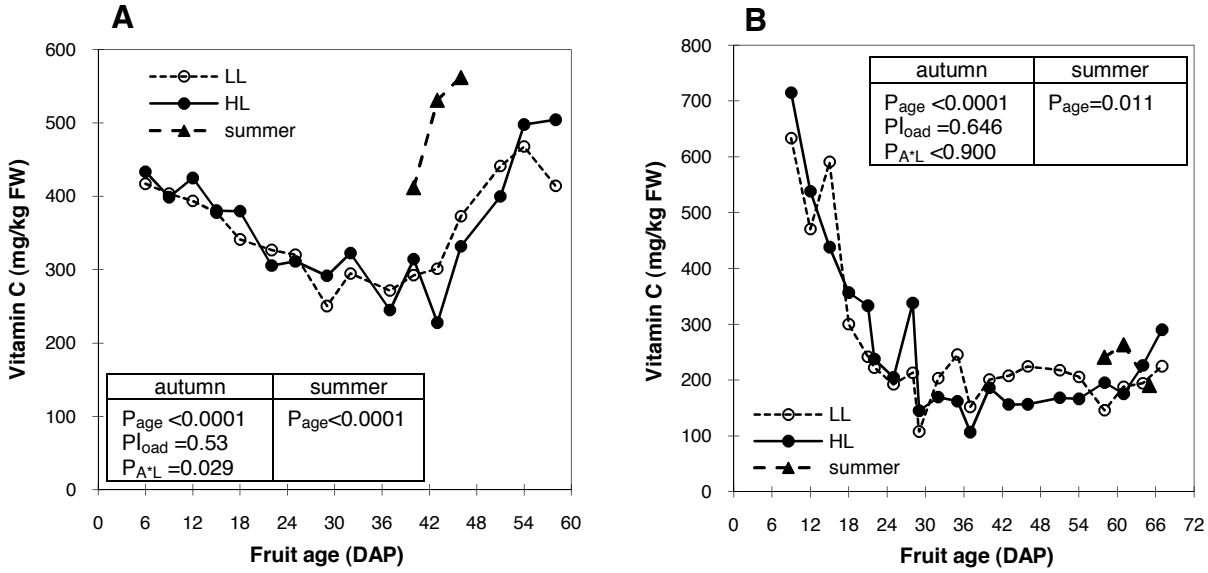


Figure 4: Total vitamin C in 'Cervil'(A) and 'Levovil' (B) content during fruit development in summer under high fruit load (--▲--) or in autumn under high fruit load (●–HL) and low fruit load (--○-- LL). Legend similar to Figure 1.

The relationship between vitamin C and the different sugars (sucrose, hexoses and starch) expressed per fresh weight in 'Cervil' and 'Levovil' during autumn and summer experiments are presented in table I. In 'Cervil', whatever the season and the fruit load, a similar trend was found: vitamin C content was always positively correlated to hexose and total soluble sugar content and negatively to starch content. No clear correlation was found between vitamin C and sucrose content. In 'Levovil', opposite correlations were found between vitamin C and hexoses or total soluble sugars depending on the season. Both starch and sucrose were positively correlated to vitamin C in autumn but no significant correlation could be found in summer.

Table I: Correlations between total vitamin C and sugars (sucrose, hexoses, starch or total soluble sugars), expressed per fresh weight during fruit development. Data are presented for autumn experiment in high and low fruit load in 'Cervil' and 'Levovil' and for summer experiment in high fruit load. Significant correlations are in bold.

			CERVIL				LEVOVIL			
			Sucrose	Hexoses	Starch	Total soluble sugars	Sucrose	Hexoses	Starch	Total soluble sugars
Autumn	High load	Vitamin C	0.09	**0.66**	**-0.41**	**0.67**	**0.76**	**-0.35**	**0.69**	**-0.30**
	Low load	Vitamin C	0.20	**0.66**	**-0.52**	**0.64**	**0.55**	**-0.50**	**0.50**	**-0.48**
Summer	High load	Vitamin C	0.33	**0.77**	**-0.91**	**0.76**	0.39	0.51	-0.01	**0.54**

The linear relationships between hexose and vitamin C contents in summer and in autumn was due to the concomitant increase in vitamin C and hexose contents during the second period of fruit development (D2 from 30 to 60 DAA), which corresponds to the end of fruit growth and fruit ripening (*figure 5 A*). That is the reason why we further considered the linear regression on data collected during the second period of fruit development (D2). As 'Levovil' did not accumulate vitamin C and hexoses during fruit ripening, no positive relation was found (*figure 5 B*). Despite close or even higher soluble sugar contents in autumn under low fruit load compared to summer, fruit vitamin C content remained lower during autumn in both genotypes. The regression slopes between sugars and vitamin C were equal,between seasons) but the intercept significantly increased during summer (p=0.002) due to higher vitamin C levels in summer for the same sugar content. Moreover the regression slopes were significantly different for the two fruit load treatments in autumn (P=0.003), indicating that this correlation between hexoses and vitamin C contents was fruit load dependent. So, the positive linear correlation between vitamin C and sugar contents, in 'Cervil', was due to their concomitant increase during fruit maturation rather than to substrate dependence.

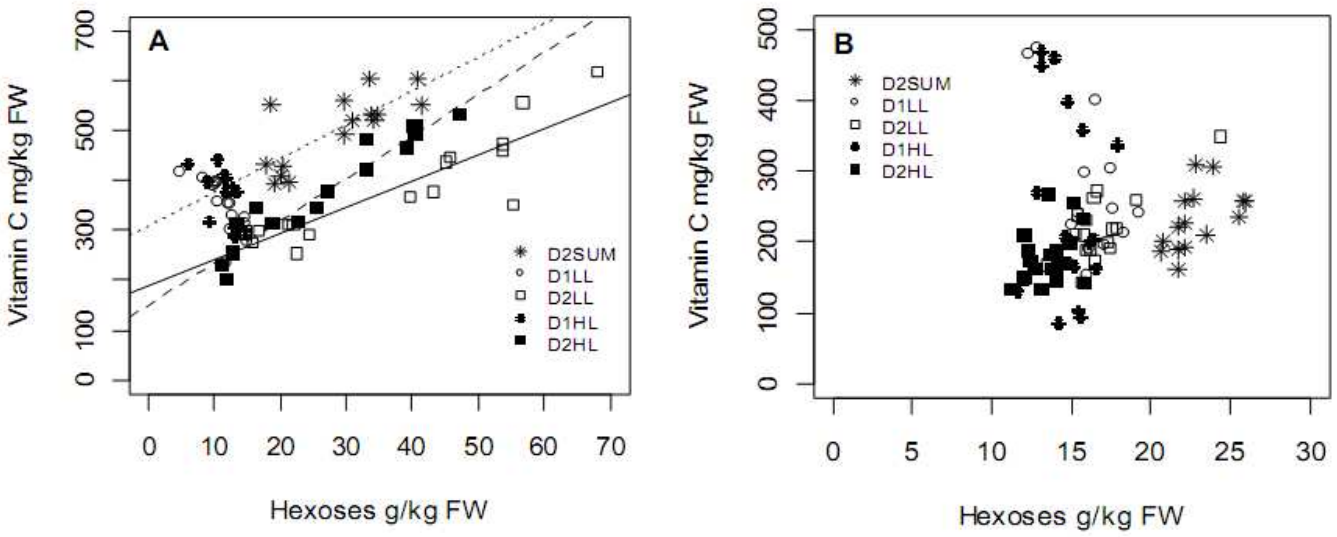


Figure 5: Relationship between vitamin C and hexose contents during fruit development in summer and autumn for 'Cervil' (A) or 'Levovil' (B). Fruit cultivated in autumn were separated in D1 LL (○): first period of fruit development (0 to 29 days after pollination for 'Cervil') under low fruit load; D2LL (□): second period of development (30 to 60 days after pollination for 'Cervil') under low fruit load; D1HL (●): first period of development under high fruit load; D2HL (■): second period of development under high fruit load. In summer fruit was harvested during the second period of development (D2SUM ✱). The linear regressions were calculated on data obtained during the second period of development (D2). The equation of linear regression for 'Cervil', in summer, is Y=6.8X+308 (R^2=0.59). In autumn, in high fruit load (D1HL+D2HL) the equation of the linear regression is Y=5.3X+187 (R^2=0.8) and in low fruit load (D1LL+D2LL), Y=8.5X+152 (R^2=0.93).

Discussion

We showed that 'Levovil' and 'Cervil' differ in vitamin C and hexose accumulation. Cervil's fruit accumulated vitamin C and hexoses mostly during their second period of development. In contrast Levovil's fruit contained high vitamin C at an early stage of fruit development which rapidly decreased during fruit growth and slightly increased during ripening. Moreover, hexoses mostly accumulated at the beginning of fruit development from 6 to 18 DAP in 'Levovil' and remained stable thereafter. This resulted in large differences in vitamin C and hexose contents in red-ripe fruit between 'Cervil' and 'Levovil'. Cherry tomato 'Cervil' contained more sugars and vitamin C expressed per fresh weight than the medium

sized fruit tomato 'Levovil'. When expressed by dry weight, the differences in sugar and vitamin C content between genotypes remained the same so that they were unlikely to be due to an increase in water influx during the second period of fruit development in the bigger fruit (data not shown). This negative relationship between fruit size and sugar and vitamin C content was previously reported by Navez et al. when comparing 16 cultivated genotypes harvested at red-ripe stage (Navez et al., 2004). Moreover, Zanor et al. (Zanor et al., 2009) also found that Levovil's fruit contained lower hexoses compared to Cervil's. These observations are in agreement with the fact that large-fruited lines are generally considered to have inferior taste due to their lower sugar content (Causse et al., 2002, Causse et al., 2003).

For both genotypes, increasing hexose content in autumn by reducing fruit load did not lead to increased vitamin C content. Vitamin C biosynthesis starts from hexoses, so we could have expected a substrate-dependent synthesis of vitamin C. Indeed, vitamin C and sugar contents in fruit or leaves often follow similar variations (Mc Collum, 1946, Smirnoff and Pallanca, 1996). Mc Collum (1946) showed that unshaded fruit had higher soluble sugars and ascorbic acid contents than shaded fruit. Positive correlations between these two components have previously been described in both organs (Smirnoff and Pallanca, 1996, Stevens et al., 2007). In addition to being a substrate for vitamin C synthesis, sugars, especially sucrose, can also play an important signaling role, regulating gene expression of enzymes related to vitamin C metabolism (Smeekens, 2000, Nishikawa et al., 2005). Indeed, Nishikawa et al. (2005) observed an up-regulation of genes related to vitamin C biosynthesis and metabolism in chloroplasts by sucrose feeding of broccoli plants. However, we know that sugar content is not the only factor that might regulate vitamin C in tomato fruit. A major factor influencing vitamin C content in fruit and leaves is light (Hamner et al., 1945, Murneek et al., 1954, Davey et al., 2000, Dumas et al., 2003). Many studies have reported a positive relationship between light, sugar and vitamin C contents (Mc Collum, 1946, Nishikawa et al., 2005). Gautier et al. (Gautier et al., 2009) supposed that light affects vitamin C content in fruit either indirectly via sugar synthesis or directly. Nevertheless, the role of light received directly by fruit seemed to be predominant in the absence of substrate limitation (Gautier et al., 2009). This was confirmed by the present experiment as the increase in hexose and sucrose contents did not trigger any increase in fruit vitamin C content in autumn. As previously shown in other non photosynthetic tissues, fruit vitamin C regulation did not seem to be tightly linked to primary metabolism and sugar content (Pallanca and Smirnoff, 1999, Richardson et al.,

2004, Hancock et al., 2007). Moreover, maximal vitamin C contents were obtained during summer in field experiments. We showed that, outdoors in summer, tomato fruit could contain about 20% more vitamin C than in autumn under glasshouses. However, such vitamin C contents were not reached in autumn even when sugar content was increased to the same level as the one in summer especially for 'Cervil'. These results underlined that substrate was not the limiting factor for vitamin C accumulation in fruit. The difference in light intensity between outside in summer and under glasshouses in autumn may explain differences in vitamin C content (Hamner et al., 1945, Mc Collum, 1946, Venter, 1977). Indeed, increasing light was reported to increase vitamin C biosynthesis in leaves and fruit via increased gene expression or enzyme activities of the vitamin C biosynthetic pathway (Tamaoki et al., 2003, Gautier et al., 2009, Li et al., 2009). We confirmed in this study that environmental conditions are important factors regulating fruit vitamin C content (Gautier et al., 2009).

Finally, the strong positive linear correlation described here for 'Cervil' between total hexoses and vitamin C was due to their concomitant increase during fruit maturation. Indeed, we found no positive relationship for the medium sized tomato 'Levovil' because contrary to 'Cervil', hexoses and vitamin C did not accumulate during maturation. Differences between genotypes for sugar and vitamin C correlations were also found by Stevens et al. (2007): only the population with high vitamin C content showed correlation with sugars.

In conclusion, we have showed that reducing fruit load in autumn increased fruit size and improved fruit quality due to increased dry matter and sugar contents in fruit. As fruit quality varies during the year, this cultural practice can help producers to improve it in winter when quality deteriorates because of a large accumulation of water in fruit and low assimilate supply in this period. However this improvement in gustative quality is not linked with an improvement of nutritional quality, as measured by ascorbic acid content, despite the decrease of crop yield. This might be explained by the important role of light on vitamin C regulation in the absence of substrate limitation.

Acknowledgements

We thank Dominique Grasselly, Laurent Rosso and Hélène Burk for plant management, Claude Courbet, Michel Pradier and Jean-Jacques Longuenesse for fruit harvesting, and Emilie Rubio, Patricia Robert, Sylvie Sérino, Doriane Bancel for starch and sugar assays.

Chapitre 2

Etude indirecte du transport entre feuilles et fruits

CHAPITRE II : Etude indirecte du transport entre feuilles et fruits

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié dans *Annals of Botany* (Gautier et al., 2009)[8]. Il a pour objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle par la lumière de la teneur en vitamine C dans les fruits en examinant deux hypothèses: un impact indirect via les feuilles et le transport de vitamine C ou de précurseurs de la vitamine C vers les fruits ou un impact direct de la lumière arrivant au fruit sur leur teneur en vitamine C. Pour cela, des ombrages sélectifs ont été mis en place soit sur les feuilles seules, soit sur les fruits seuls soit sur toute la plante. La comparaison de la teneur en vitamine C dans les fruits, après traitement, permet d'analyser l'importance relative de la lumière arrivant sur le fruit et celle arrivant sur les feuilles dans la régulation de la teneur en vitamine C dans le fruit. Par ailleurs, l'accumulation concomittante des sucres et de la vitamine C pendant la maturation et leur modification par les traitements d'ombrage sont discutés.

[8] **Gautier H, Massot C, Stevens R, Serino S, Génard M. 2009**. Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany* **103**: 495-504.

Résumé

Les mécanismes impliquant le contrôle par la lumière des teneurs en vitamine C dans les fruits ne sont pas encore entièrement connus. Cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact d'un ombrage des feuilles et/ou des fruits sur l'accumulation de vitamine C dans les fruits. Des tomates de type cerise (*Solanum lycopersicum* 'WVa 106') ont été cultivées sous serre. Les fruits au stade 'breaker' prélevés sur les plantes témoins non ombrées ont été comparés avec ceux prélevés sur des plantes entièrement ombrées, ou dont on avait ombré spécifiquement les feuilles ou les fruits. Dans une deuxième expérimentation, la corrélation sucres/ vitamine C a été étudiée pendant la maturation. Pour les fruits prélevés sur les plantes témoins, la vitamine C et les sucres sont corrélés et augmentent pendant la maturation. La réduction de la lumière arrivant aux fruits diminue fortement la teneur en vitamine C réduite, sans affecter les sucres, de sorte que les sucres et la vitamine C ne sont plus corrélés. Cette absence de corrélation entre sucres et vitamine C réduite indique que la teneur en vitamine C des fruits n'est pas limitée par la photosynthèse ou les sucres mais fortement dépendante de la lumière arrivant au fruit. L'ombrage des feuilles diminue la teneur en vitamine C réduite dans les fruits oranges (-19%) mais de manière moins importante, indiquant que le métabolisme de la vitamine C dans les fruits dépend aussi de la lumière parvenant aux feuilles et ne permettant pas d'exclure un transport de sucres et/ou de vitamine C vers les fruits par le phloème. Ainsi, le transport même s'il existe semble jouer un rôle moins important dans la régulation par la lumière que la synthèse de vitamine C du fruit. La régulation du métabolisme de la vitamine C par la lumière est complexe dépendant à la fois de la lumière arrivant aux feuilles et aux fruits et du stade de maturité.

Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance

Hélène Gautier[1], Capucine Massot[1], Rebecca Stevens[2], Sylvie Sérino[1], Michel Génard[1]

[1] INRA, UR1115 Plantes et systèmes de culture horticoles, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France;

[2] INRA, UR1052 Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint-Maurice, F-84143 Montfavet, France.

Abstract

Background and Aims. The mechanisms involving light control of vitamin C content in fruits are not yet fully understood. The present study aimed to evaluate the impact of fruit and leaf shading on ascorbate (AsA) accumulation in tomato fruit and to determine how fruit sugar content (as an AsA precursor) affected AsA content.

Methods. : Cherry tomato plants were grown in a glasshouse. The control treatment (normally irradiated fruits and irradiated leaves) was compared to the whole plant shading treatment and to leaf or fruit shading treatments in fruits harvested at breaker stage. In a second experiment, the correlation between sugars and AsA was studied during ripening.

Key Results. Fruit shading was the most effective treatment in reducing fruit AsA content. Under normal conditions, AsA and sugar content were correlated and increased with the ripening stage. Reducing fruit irradiance strongly decreased the reduced AsA content, without affecting sugars so that sugar and reduced AsA were no longer correlated. Leaf shading delayed fruit ripening: it increased the accumulation of oxidized AsA in green fruits (+98%), whereas it decreased the reduced AsA content in orange fruits (-19%), suggesting that fruit AsA metabolism also depends on leaf irradiance.

Conclusions. Under fruit shading only, the absence of a correlation between sugars and reduced AsA content indicated that fruit AsA content was not limited by leaf photosynthesis or sugar substrate, but strongly depended on fruit irradiance. Leaf shading most likely affected fruit AsA content by delaying fruit ripening and suggested a complex regulation of AsA metabolism which depends on both fruit and leaf irradiance and fruit ripening stage.

Keywords: Ascorbate, fruit quality, irradiance, **shading,** ***Solanum lycopersicum, sugars, tomato, vitamin C***

Introduction

The positive impact of irradiance on tomato fruit ascorbate (AsA) content has been known about for a long time (Hamner et al., 1945, Murneek et al., 1954, Venter, 1977, see reviews by Davey et al., 2000, Smirnoff and Wheeler, 2000, or Dumas et al., 2003a). Transferring plants from shade to sunshine increased fruit vitamin C content by up to 66% and the reverse effect was observed when transferring plants from sunshine to shade (Hamner et al., 1945). A linear relationship between tomato fruit AsA content and cumulated radiation during fruit development has been described in tomato fruit by shading plants for different lengths of time (Venter, 1977). These results were confirmed by shading plants with netting (0%, 35%, 51% or 63% shade), which decreased fruit AsA content (El-Gizawi et al., 1993), indicating that light intensity rather than light photoperiod duration influenced AsA accumulation. Later, (Davies and Hobson, 1981b) reported a strong impact of light and photosynthesis on AsA content in tomato fruits suggesting that photosynthesis and AsA biosynthesis might be linked. A correlation between sugars and AsA content has been well described in fruits since the first shading experiments by (Mc Collum, 1946) and could be linked to the AsA biosynthetic pathway and the role of sugars as substrates for AsA synthesis (Wheeler et al., 1998). (Smirnoff and Pallanca, 1996) also found a linear relationship between AsA and soluble carbohydrate content in barley leaves, which corroborates the hypothesis of a regulation of AsA biosynthesis by its sugars precursors. However, this relationship is not as clear in non photosynthetic organs (Pallanca and Smirnoff, 1999). Moreover, the use of tomato ripened off vine, has been helpful in confirming that there was also a local response to irradiance at the fruit level: AsA accumulation increased under increased fruit irradiance (Gautier et al., 2008). Nevertheless, Giovanelli et al., 1999 observed that tomato fruit AsA content was lower during postharvest ripening compared to fruits ripened on the vine. This indicated that AsA metabolism might be dependent on leaf to fruit transport. AsA is a small molecule and is likely to move from the leaves to the fruits with sucrose in the phloem, even though AsA transport in the phloem has not yet been shown in tomato and the contribution of AsA transport compared to AsA synthesis within the fruit can be negligible as was reported in blackcurrant (Hancock et al., 2007). Franceschi and Tarlyn, 2002 have shown that [^{14}C]AsA loaded into leaves was found in phloem and sink organs such as flowers, in *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa* and *Impatiens walleriana*. Similarly, Tedone et al., 2004 showed, using an EDTA exudation technique, that AsA was transported via the phloem from the leaves to potato tubers; they also found a correlation between AsA content in phloem

exudates and foliar AsA content. AsA precursors could also move from the leaves to the fruits via phloem flux as was found in the phloem of potato tuber (Hancock et al., 2003b): so that AsA synthesis in potato tubers might be boosted by the L-galactono-1,4-lactone concentration reaching the potato. AsA content in tomato fruit could thus be modulated according to *(a)* leaf irradiance triggering changes in phloem influx of AsA or precursors to the fruits; or *(b)* fruit irradiance, as several enzymes linked to AsA metabolism are upregulated by light. Several studies have confirmed light up-regulated expression of mRNAs such as GDP- D-mannose pyrophosphorylase (GMPase, Tabata et al. (2002) in tobacco leaves) and L-galactono-γ-lactone dehydrogenase, (GLDH, Tabata et al. (2002), and Tamaoki et al. (2003) in *Arabidopsis thaliana*), despite this not being found in tobacco leaves (Pignocchi et al., 2003).

The present work investigated interactions between fruit development stage and changes in light environment at the fruit or leaf level, or at both fruit and leaf levels, and their effects on fruit AsA content. The experiments explored the impact of leaf shading on fruit AsA content, to respond to the question of a hypothetical transport of vitamin C or precursors from leaves to fruits which could enhance AsA biosynthesis in the fruit. As strong changes in AsA occurred during ripening, this study mainly focuses on fruit at mature green, breaker and orange stages.

Materials and methods

Experiment 1

Plant Growth

Cherry tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv 'West Virginia 106') were grown in a greenhouse in Avignon (Southern France, 44°N). On the 10 Aug. 2006, seeds were sown in Petri dishes containing (Murashige and Skoog, 1962)) medium, and seedlings were transplanted on the 25 Aug. into 7-cm diameter pots containing potting soil (H21 Tref, **Tref EGO Substrates B.V.,** Moerdijk, Netherlands). Plants with five growing leaves were transplanted on the 13 Sept. into 5l pots containing potting soil (P3 Tref, **Tref EGO Substrates B.V.,** Moerdijk, Netherlands) in a (24.3 x 8.5 m= 206.55 m^2) compartment of a multispan Venlo-type greenhouse, N-S oriented. The plants were arranged in N-S-oriented double rows of 74 plants, which created a density of 1.8 plants m^{-2}. Plant nutrition and

chemical pest and disease control were in accordance with commercial practices. Water was supplied to the plants using a drip irrigation system to maintain 20 to 30% drainage. Flowers were mechanically pollinated three times a week. Inflorescences were each pruned to ten flowers after anthesis to obtain ten fruits per truss and limit fruit size heterogeneity among trusses. All plant side shoots were removed as they appeared.

Shading treatments

Four treatments were compared combining natural daylight and shading with a perforated silver screen which reflected 71% of incident radiation (Lee Filter: n°271; Andover, Hampshire, England, Fig. 1):

(A) IF-IL: control without any shading (irradiated fruits and irradiated leaves),

(B) SF-SL: total shading (whole plant, i.e. shaded fruits and shaded leaves under a perforated silver screen),

(C) SF-IL: shaded fruits and irradiated leaves (trusses were covered with a perforated silver screen),

(D) IF-SL: irradiated fruits and shaded leaves (leaves and stem were covered with a perforated silver screen).

These shading treatments mostly affected irradiance and had a low impact on fruit temperature due to the reflective properties and the perforations of the film. Moreover as 71% of the incident light was reflected, leaf shading was likely to affect plant photosynthesis and carbon flux to the fruits.

Three plants were randomly assigned to each of the four different light treatments. Shading treatments were initiated on 2 November, 20 d after the mean anthesis date of the first seven flowers of truss number 3.

Fruit sampling

From 14 November until 11 December, twice a week, cherry tomato fruits at breaker stages were harvested at midday on trusses 3-5 (greenish to yellow or pale orange pericarp with light orange locular tissue) and were partitioned into three replicates per treatment. Each replicate corresponds to a sample of at least four tomatoes. Following harvest, fruits were cut on ice, seeds and gel were discarded and pericarp tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before blending in liquid nitrogen.

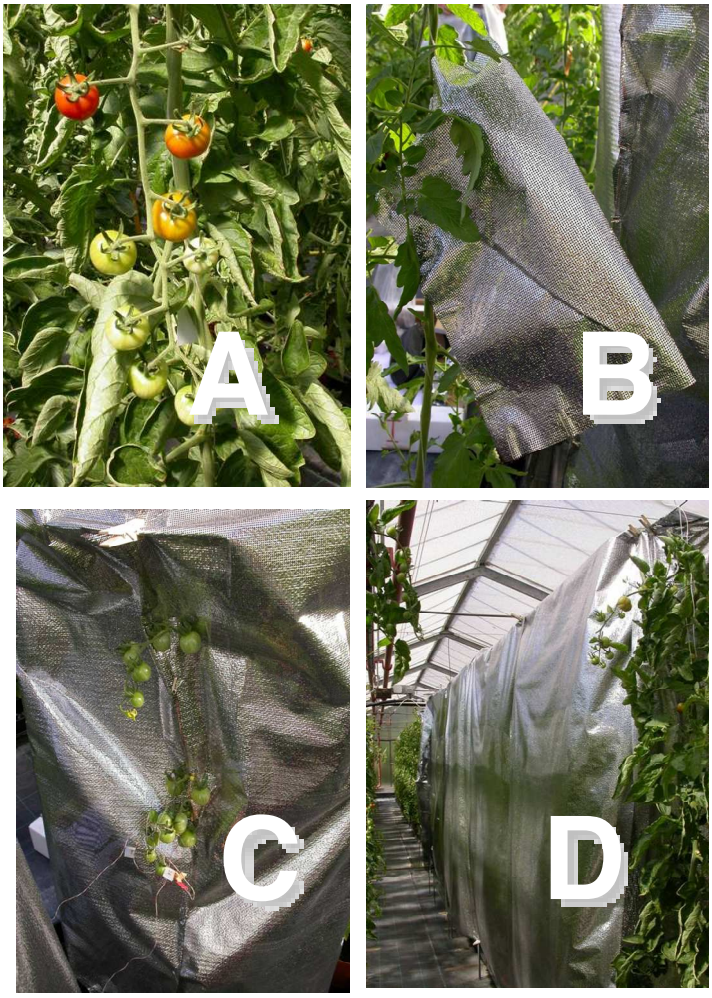


Figure 1: Photographs illustrating the four types of treatments. A: control (irradiated fruits and leaves: IF-IL); B: shaded fruits and irradiated leaves (SF-IL); C: Irradiated fruits and shaded leaves (IF-SL); D: total shading (fruits and leaves shaded: SF-SL).

Experiment 2

Plant growth

Experiment 2 took place in Spring 2007 using similar materials and methods as previously described for expt 1. Sowing took place on the 16 January, and plants with five growing leaves were transplanted on the 29 January and then placed in the greenhouse in 5 L pots on the 23 February, 32 plants were randomly assigned to the four shading treatments (eight plants per treatment).

Shading treatments

Interaction between fruit shading and fruit developmental stage

Fruit shading of trusses 6 started on 23 April for 21 d. On the 15 May, fruits from different plants and treatments were harvested at midday according to their developmental stage to obtain 4-5 replicates per treatment. Fruit developmental stage was expressed as days post anthesis (DPA): 28 DPA corresponded to mature green fruits (external fruit colour coordinate a = -11), 32 DPA to fruits at breaker stage (a = -5.8) and 36 DPA to fruits with orange external coloration (a = 28.7). Following harvest, fruit weight was determined, fruits were then cut on ice similarly to expt 1 and pericarps were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until blending in liquid nitrogen.

Interaction between leaf or whole plant shading and fruit developmental stage

Whole plant shading (SF-SL) and leaf shading only (IF-SL, fruits of truss 5 or 6 exposed to natural daylight and shaded leaves) were initiated on May 9th and lasted for 6 d to limit any developmental delay linked to leaf shading which could distort the treatment comparison as AsA and sugar content strongly depend on fruit developmental stage. After 6 d of shading, fruits were harvested at midday according to their stage of development from 28 to 36 DPA to obtain 4 replicates per treatment and per stage of development as was previously described for shaded fruits.

During expt 2, fruit temperature was measured every minute on 4-9 fruits per treatment with very fine thermocouples (0.2 mm copper/constantan). Thermocouples were inserted to a depth of 2 mm into the upper exposed side of fruits of the sixth truss in order to measure the impact of shading on fruit temperature. Temperature measurements were averaged and stored every 30 minutes on a delta logger (Delta-T DL2e, Delta-T Devices Ldt, Cambridge, UK). Evolution of fruit temperature during a sunny (12 April) or a cloudy day (14 April) is shown in Fig. 2. Fruit shading by itself had no impact on fruit temperature (comparison of SF–IL to IF–IL), but leaf shading (IF–SL) or whole plant shading (SF–SL) reduced fruit temperature during the diurnal period. Thus, in the leaf shading treatment, despite the reflective properties of the shading filter, shading leaves could have reduced light reaching the fruit. Due to a lower fruit temperature in the leaf shading treatment (SF-SL or IF-SL), these treatments were only applied for 6 d to limit the impact on fruit developmental stage. In contrast as the fruit shading treatment had no effect on fruit temperature, fruit shading lasted for 21 d.

Two complementary shading experiments were carried out. In expt 1, fruits at breaker stage were harvested to compare the respective impact of leaf, fruit or both leaf and fruit shading on

fruit composition and reveal the most effective shading treatment. In the second experiment the interaction between the shading treatment and fruit ripening was studied. The correlation between fruit soluble sugars and fruit AsA was studied during ripening under normal conditions (no shading) or fruit shading (which was the most effective shading treatment in reducing AsA). The second objective of expt 2 was to confirm that leaf shading also had a small impact on fruit AsA content by the comparison of fruit harvested from plants grown under normal conditions, leaf shading or whole plant shading.

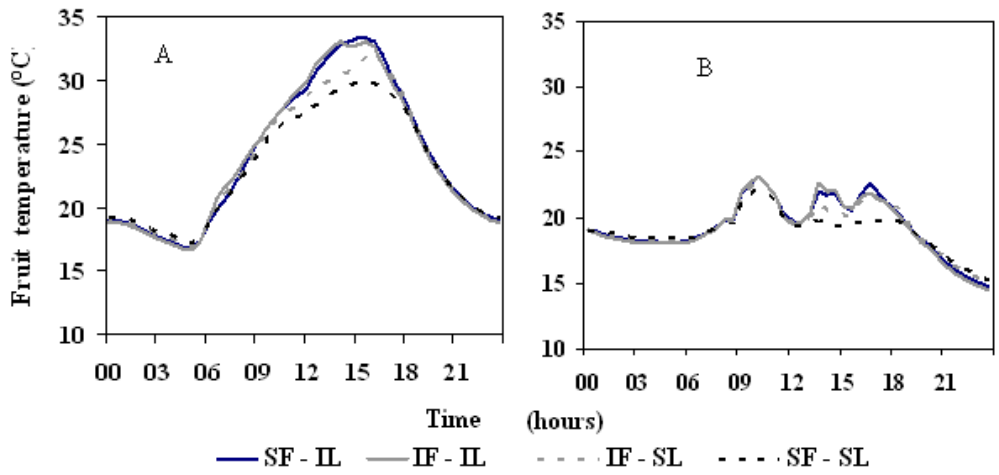


Figure 2: Impact of the different shading treatments on fruit temperature recorded on a sunny day (A) and a cloudy day (B). Data shown are means of temperature measurements made on 4 different plants per treatment during ripening of fruits of the 6th truss on 12 April (A) and 14 April (B) during experiment 2. Copper constantan thermocouples (0.2 mm) were inserted 2 mm into the upper exposed side of the fruits. Temperature measurements were made every minute and averaged every 30 minutes. SF-IL: shaded fruits and irradiated leaves; IF-IL: Control, irradiated fruit and leaves; IF-SL: irradiated fruits and shaded leaves; SF-SL: total shading (fruits and leaves shaded).

Fruit analyses

During expt 2, external fruit colour was characterized near the pistil scar by a Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta, France SA) using the LAB colour space (Hunter colour coordinates L, a and b; *L*: Lightness, *a* ranging from green to red, *b* ranging from blue to yellow. Fruit skin colour was expressed as *a*/*b* value, which better relates to colour variation during tomato ripening as previously used in Giovanelli et al.(1999). As fruit dry matter content decreased during ripening and with shading, the decision wa made to express fruit sugar and AsA content per unit dry weight.

Assays of total and reduced AsA content were carried out as previously described (Stevens *et al*., 2006) on material conserved at -80°C. Briefly, tomato tissue was ground in liquid nitrogen, and 1g of powder was homogenised with 600μl of ice cold 6% trichloroacetic acid (TCA). Samples were centrifuged for 15 minutes at 16000g at 4°C. A 20 μL aliquot of the supernatant were used in each assay. The AsA standards were prepared fresh: a solution of 1mg mL^{-1} sodium AsA was diluted in 6% TCA to give a concentration in 20 μL of 0, 5, 10, 15, 20 and 30 nmoles allowing a standard curve of absorption values of between 0 and 1 to be generated after addition of the appropriate reagents (below). Two assays were carried out on each sample, one to measure the total AsA (including addition of 5mM dithiothreitol (DTT)) and one to quantify the reduced AsA content (omission of DTT from the assay). A 20μL aliquot of each sample or standard were distributed into at least two wells (for two repetitions) of a 96-well microplate and mixed with 20 μL of 5mM DTT (total AsA assay) or 0.4M phosphate buffer pH 7.4 (reduced AsA assay). The plate was incubated at 37°C for 20 min. A 10 μL of N-ethyl maleimide (total AsA assay) or 0.4M phosphate buffer pH 7.4 (reduced AsA assay) were added and mixed followed by the addition of 80μl of colour reagent (see below). After incubation at 37°C for 50 min, the absorbance was read at 550nm using the multiskan Ascent MP reader (Labsystels, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The colour reagent was made up as follows: solution A: 31% orthophosphoric acid, 4.6% w/v TCA and 0.6% w/v iron chloride ($FeCl_3$); solution B: 4% 2,2-dipyridyl (w/v made up in 70% ethanol). Solutions A and B were mixed 2.75 parts (A) to 1 part (B). The standard curve obtained from the standard solution values allowed calculation of the AsA concentration of the samples after correction for the quantity of water introduced by the tomato fruit sample. Additional assays were carried out with ascorbate oxidase on samples (shaded and unshaded fruits from green immature to red ripe stages) to check the impact of other compounds such as phenolics on

Fe^{3+} reduction and therefore the specificity of the assay used. These assays confirmed that at least 95% of the absorbance in our samples is specific for ascorbate: after ascorbate oxidase addition a background absorbance of between 0 and 5% remained.

Sugars and acids were extracted as described in (Gomez et al., 2002). Briefly, the soluble sugars and acids were extracted at 4°C from 5 mg of freeze dried fruit powder. First, 1 mL of a methanol/water solution (1:1 v/v) was added, then 0.3 mL of chloroform. Samples were shaken for 30 min at 4°C and centrifuged (5 min at 16000g at 4°C). 0.8mL of the methanol/water supernatant was recovered, evaporated under vacuum (Speed-Vac) and stored at -20°C until measurement of soluble sugars or acids. For starch measurements, 1mL of methanol was added to the tube containing chloroform and fruit powder and the tube was shaken for 20 min before centrifugation (5 min at 16000g at 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was used for starch assay. Starch was dispersed by autoclaving for 2h (120°C) and then hydrolysed for 1.5h at 56°C by addition of amyloglucosidase solution. The glucose released by starch hydrolysis was measured as described previously (Gomez *et al.*, 2007) using 150 μL of diluted extract, 100 μL of a solution containing ATP, NAD and 20 μL of a solution containing glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase.

For measurement of sugars or acids, samples were homogenised with 800 μL of water at 4°C for 10 min before adding 5 mg PVPP (PolyVinylPolyPyrrolidone). 30 min later, PVPP and phenolics were removed by centrifugation (5 min at 16000g at 4°C) and sugars and acids were assayed from the supernatant. Sugars were estimated using the micro-method described in (Gomez et al., 2007). Glucose, fructose and sucrose concentrations were successively quantified by enzymatic assays measuring the production of NADH directly in each well at 340 nm using the multiskan Ascent MP reader. Samples were diluted to obtain a final concentration < 0.066 g L^{-1} for each sugar. A 150μlaliquot of extract and 100μL of a solution (buffer pH 7.6, containing ATP and NAD) were loaded into each well and the absorbance was measured before addition of 20 μL of a solution containing phosphate glucose dehydrogenase, hexokinase and ammonium sulfate solution. After 2 h, when the reaction was completed, a second absorbance measurement was performed. The increase in absorbance between the two readings was due to the formation of NADH and was proportional to the transformation of glucose in the extract. A 20μL aliquot of a solution containing phosphoglucoisomerase was then added. A third absorbance measurement was carried out 2 h later, when the reaction was completed: the increase in absorbance was proportional to the initial fructose content in the extract. The addition of 20 μL of a solution containing β-fructosidase produced fructose and glucose from the sucrose present in the extract, which was determined from the absorbance

measurement, performed 3h later, when the reaction was completed. Acids were determined from enzymatic assays adapted from a citric acid kit (Boehringer Mannheim, ref kit 0 139 076) and an L-malic acid kit (Boehringer Mannheim ref kit 0 139 068) by measuring the disappearance (for citrate) or the appearance of NADH (for malate). For the citrate assay, 100 μL of a reaction mixture was put into each well followed by 180 μL of sample. The reaction mixture was prepared from 12 mL of 0.6M glycilglycine buffer (pH 7.8, containing 0.1M L-glutamate) mixed with 23 μL L-malate dehydrogenase (5 g L^{-1}), 102 μL of lactate dehydrogenase (5 g L^{-1}) and 5 mg of NADH. The absorbance was measured at 340 nm before addition of 20 μL of a solution containing 48 mg of citrate lyase diluted in 3 mL water. The plate was incubated at room temperature and regularly shaken for 2 h, before absorbance reading. For the malate assay, the reaction mixture consisted of 100 μL of 0.6M glycylglycine buffer (pH 10), 20 μL of a 27.13mM NAD solution, 20μL of glutamate oxalate transaminase (66.7mg L^{-1}) and 100 μL of the sample. The absorbance was measured at 340 nm before the addition of 20 μL of L-malate dehydrogenase solution (33.3mg L^{-1}). After homogenization, the plate was incubated 1h30 at room temperature before reading at 340nm.

Statistical analysis

Analyses of variance considering the factor “shading treatments” (both experiments) and “fruit developmental stage” (second experiment) and their interactions (second experiment) were performed with the XLSTAT 2007 software (XLSTAT, Addinsoft FRANCE, Paris, France) and significant differences among treatments were assessed using a Tukey test at 5%. Pearson correlation coefficients were estimated using XLSTAT software and a significant correlation corresponded to a P value < 5%.

Results

Impact of leaf and /or fruit shading on fruit composition at breaker stage

Leaf shading (IF-SL) decreased fruit dry matter content (-18%) and modified dry matter composition in tomato harvested at breaker stage (Table 1). The concentration of different sugars was strongly reduced by leaf shading: glucose (-39%), fructose (-23%), sucrose (-33%) and starch (-37%) and in contrast malic and citric acids strongly increased (by 91% and by 49% respectively). Fruit shading only (SF-IL) had no effect on fruit dry matter content and composition in soluble sugars, starch, citric and malic acids. The combination of leaf and fruit shading (SF-SL) was not different from the leaf shading treatment in regard to sugars, malic or citric acid accumulation. Consequently fruit composition in soluble sugars, starch, malic and citric acids was strongly influenced by leaf irradiance but not by the fruit microclimate.

Total fruit AsA showed a totally different pattern to the major acids: it significantly decreased ($P<0.0001$) under whole plant shading (SF-SL, -21%) or fruit shading (SF-IL, -26%) but not under leaf shading (IF-SL, Fig. 3). Fruit shading had the strongest impact on the reduced AsA content (-52%), in comparison to whole plant shading (-25%) or leaf shading (-11%, not significant). The oxidised form, dehydroascorbic acid (DHA), was either not affected by fruit shading or the global shading treatment or slightly increased under the leaf shading treatment. We conclude that the reduced AsA content in fruit at breaker stage mostly depended on fruit microclimate rather than leaf microclimate.

Table 1: Impact of shading (leaves, fruits or both) during experiment 1 on mean fruit composition (± se) at breaker stage expressed per 100g dry weight. The objective of this experiment was to determine the most effective shading treatment that reduces fruit ascorbate content at breaker stage. Four treatments were compared: fruits grown under normal conditions (irradiated fruits and irradiated leaves IF-IL), fruits grown under shading (shaded fruits, irradiated leaves: SF-IL), fruits harvested on plants with shaded leaves (irradiated fruits shaded leaves: IF-SL), fruits harvested on plants receiving global shading (shaded fruits and shaded leaves: SF-SL). Results in the same line with the same superscript were not significantly different (P<0.05) according to the classification obtained by the Tukey-test.

	Control IF-IL Irradiated Fruit Irradiated Leaves	SF-IL Shaded Fruit Irradiated Leaves	IF-SL Irradiated Fruit Shaded Leaves	SF-SL Shaded Fruit Shaded Leaves	Shading impact Pr>F
Dry matter (g)	7.7 ± 0.3 [a]	7.8 ± 0.3 [a]	6.3 ± 0.3 [b]	6.6 ± 0.3 [b]	0.0001
Glucose (g / 100g DW)	17.1 ± 0.7 [a]	17.9 ± 1.2 [a]	10.4 ± 1.9 [b]	11.9 ± 0.6 [b]	0.0001
Fructose (g / 100g DW)	16.4 ± 0.9 [a]	18.6 ± 1.4 [a]	12.6 ± 1.7 [b]	12.6 ± 0.4 [b]	0.001
Sucrose (g / 100g DW)	9.6 ± 0.2 [a]	9.5 ± 0.6 [a]	6.4 ± 0.4 [b]	7.2 ± 0.2 [b]	<0.0001
Starch (g / 100g DW)	3.2 ± 0.7 [ab]	4.1 ± 0.9 [a]	2.0 ± 1.1 [b]	1.7 ± 0.3 [b]	0.02
Malic acid (g / 100g DW)	1.60 ± 0.03 [b]	1.78 ± 0.08 [b]	3.06 ± 0.60 [a]	2.41 ± 0.30 [ab]	0.003
Citric acid (g / 100g DW)	7.2 ± 0.1 [b]	8.1 ± 0.7 [b]	10.7 ± 0.7 [a]	10.5 ± 1.0 [a]	0.001

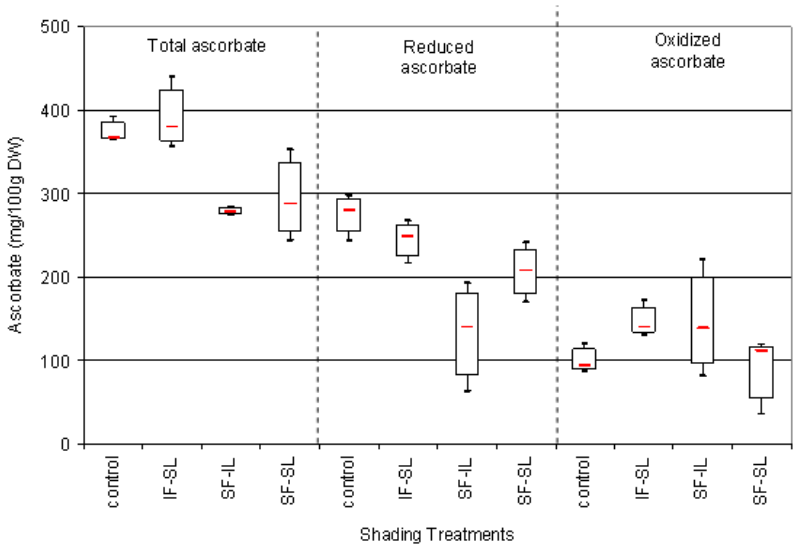


Figure 3: Impact of shading on fruit ascorbate content and its partitioning as reduced and oxidised form in fruits harvested at breaker stage on plants grown under normal conditions (control: irradiated fruits and leaves: IF-IL), with shaded fruits and irradiated leaves (SF-IL), with irradiated fruits and shaded leaves (IF-SL) or under total shading (fruits and leaves shaded: SF-SL). Boxplots showed the median, the lower and upper quartile and the lower and upper limits according to Tukey.

Impact of fruit shading on AsA and sugar content in tomato fruit during ripening

The impact of fruit shading (the most effective treatment in reducing AsA) on both soluble sugars and AsA during fruit ripening was studied. Fruit shading did not impact on fruit ripening rate as assessed by the change in external fruit coloration from green to red: the coordinate *a* increased from -11.2 in shaded fruit at 28 DPA (-11 for control fruit), to -5.5 at 32 DPA (-5.8 for control fruit) and 25.2 at 36 DPA (28.7 for control fruit).

During ripening, soluble sugars slightly increased in fruits grown under normal conditions as well as in shaded fruits mostly due to an increase in fructose (Table 2). Total AsA content also increased (+63% in control and +106% in shaded fruits, Fig. 4). This was mostly due to the increased content of the reduced AsA form (+78% in control and +145% in shaded fruits), whereas DHA content was not significantly modified.

Similarly to what was observed during expt 1, fruit shading did not affect fruit sugar content, but it lowered the reduced AsA (-45%) and DHA (-16%) content and consequently total vitamin C content (Fig. 4). For all fruit ripening stages (mature green, breaker and orange),

fruit shading decreased the reduced AsA content. In contrast, DHA content decreased with shading at mature green (-18%) and breaker stage (-34%) but not at orange stage (interaction between shading and developmental stage = 0.08).

During ripening, reduced AsA and soluble sugars (AsA precursors) were significantly correlated (r=0.74; P=0.006) in tomato fruits grown under normal conditions. In contrast, there was no correlation between DHA and soluble sugar contents (P=0.96). Since reduced AsA was the predominant form of AsA, a significant correlation was also found between total AsA and soluble sugars (r=0.69, P=0.01). For shaded fruits, there was no longer a significant correlation between reduced AsA and sugars (r=0.49, P=0.10), nor between DHA and sugars (p=0.46), or total AsA and sugars (P= 0.17).

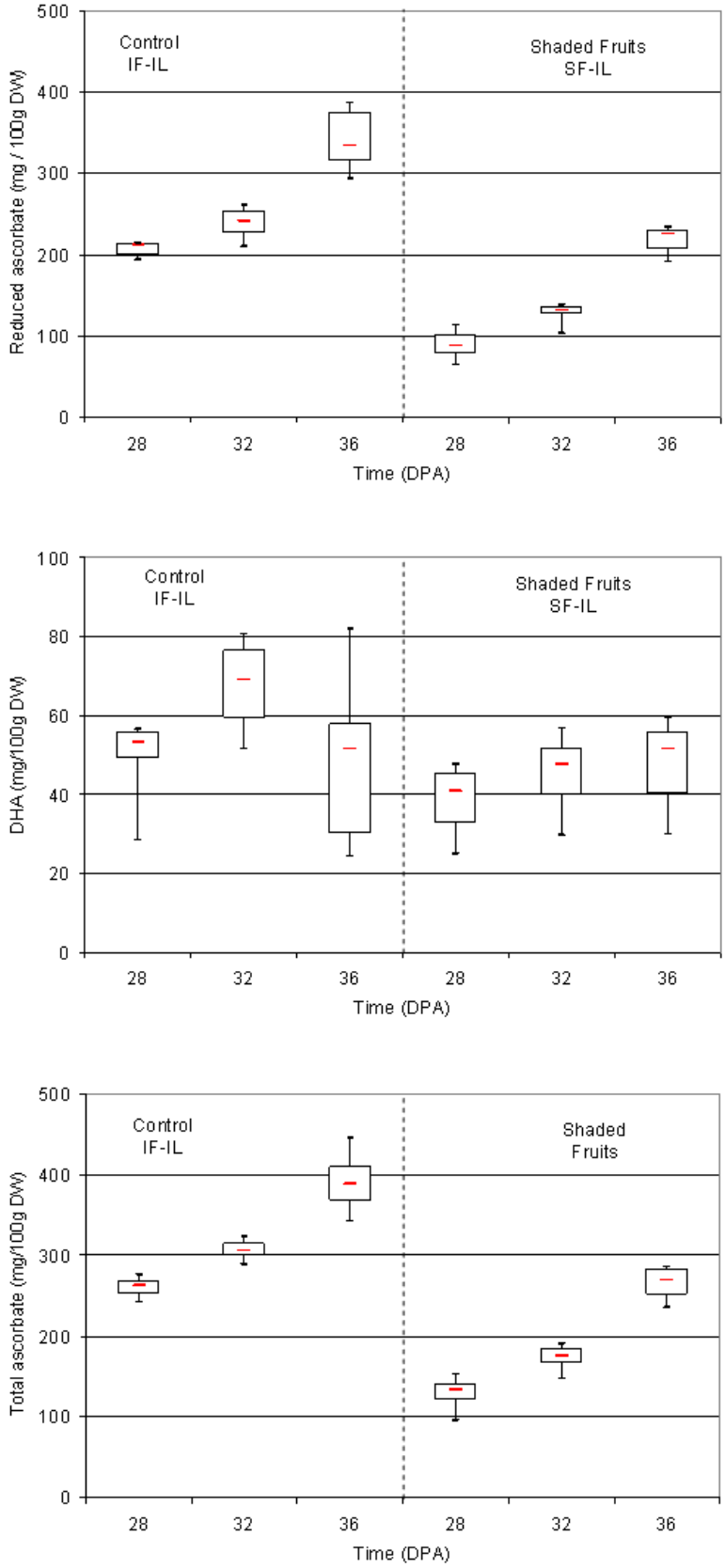


Figure 4: Impact of fruit shading (SF-IL) on fruit ascorbate content and its partitioning as reduced and oxidised forms in fruits harvested at mature green, breaker and red stage. Boxplots showed the median, the lower and upper quartile and the lower and upper limits according to Tukey.

Table 2: Impact of fruit shading and ripening on fruit soluble sugars content. During experiment 2, fruits were harvested according to their developmental stage (expressed as days post anthesis), which correspond to fruits at mature green, breaker and orange stage to de-correlate ascorbate and sugar contents. Legend for shading treatment is similar to Table 1. Data are means ±se. Results in the same line with the same superscript were not significantly different (P<0.05) according to the classification obtained by the Tukey-test.

		Mature green (28 DPA)		Breaker (32 DPA)		Orange (36 DPA)				
		Control	SF-IL	Control	SF-IL	Control	SF-IL	Shading	Fruit stage	interaction
glucose	(g/100g DW)	16.9 ± 1.1 [a]	16.8 ± 1.8 [a]	17.0 ± 1.7 [a]	16.3 ± 0.8 [a]	17.3 ± 1.0 [a]	16.6 ± 1.6 [a]	0.41	0.9	0.92
fructose	(g/100g DW)	16.6 ± 1.1 [b]	17.2 ± 1.1 [ab]	18.1 ± 1.7 [ab]	17.3 ± 0.3 [ab]	19.9 ± 1.8 [ab]	20.2 ± 2.3 [a]	0.94	0.002	0.64
sucrose	(g/100g DW)	8.1 ± 0.5 [a]	8.4 ± 0.7 [a]	8.3 ± 0.9 [a]	8.3 ± 0.1 [a]	10.4 ± 2.7 [a]	8.8 ± 0.8 [a]	0.39	0.08	0.32

Comparison of leaf shading and whole plant shading during ripening on fruit AsA and sugar content

Leaf shading reduced fruit sugar content due to lower glucose, fructose and sucrose content (Table 3). The stronger effect of global shading (SF-SL) compared to leaf shading (IF-SL) on reduced AsA content confirmed that fruit irradiance was the most important regulating factor (Fig. 5). There was a strong interaction between fruit ripening stage and the shading treatment on reduced AsA and DHA content ($P<0.0001$). Leaf shading did not affect reduced AsA content but it increased DHA by 127% in mature green fruits (28 DPA, Fig. 5).

Leaf shading (IF-SL) for 6 days delayed the appearance of red fruit skin coloration (external fruit colour coordinate, a= 19.3 compared to 28.7 for the control 36 DPA). Thus despite the short term duration of the leaf shading treatment, the fruit ripening was delayed. This might be related to lower fruit temperature (Fig. 2), but also to reduced photosynthesis as a consequence of leaf shading. To better analyse the interactions between AsA metabolism and fruit ripening stage, fruit skin colour value was used instead of DPA (days post anthesis) to describe fruit ripening stage. This showed that the ripening delay triggered by total shading was responsible for the lower reduced AsA content (Fig. 6).

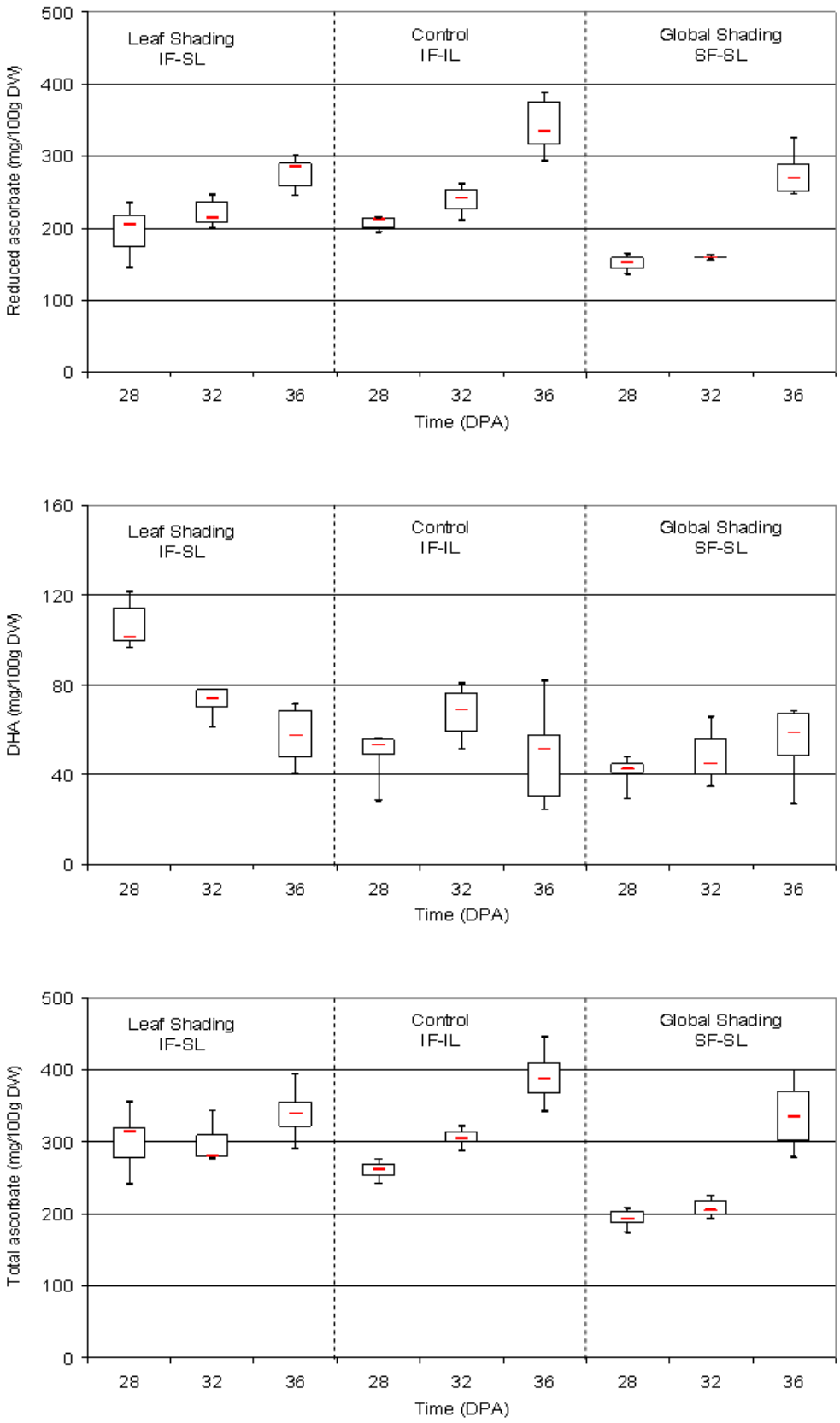


Figure 5: Impact of leaf (IF-SL) or whole plant shading (SF-SL) on fruit ascorbate content and its partitioning as reduced and oxidised forms in fruits harvested at mature green, breaker and red stage. Boxplots showed the median, the lower and upper quartile and the lower and upper limits according to Tukey.

Table 3: Interaction between fruit developmental stage and leaf shading (global plant shading (SF-SL) or leaf shading only (IF-SL) on fruit soluble sugar content (expressed in g/100g dry weight). Data are means ±se. Results in the same line with the same superscript were not significantly different (P<0.05) according to the classification obtained by the Tukey-test.

	Mature green (28 DPA)			Breaker (32 DPA)			Orange (36 DPA)					
	Control	SF-SL	IF-SL	Control	SF-SL	IF-SL	Control	SF-SL	IF-SL	Shading	Fruit stage	interaction
glucose	16.9 ± 1.1 [a]	13.9 ± 0.6 [bc]	12.8 ± 1.9 [c]	17.0 ± 1.7 [a]	13.4 ± 0.4 [bc]	14.4 ± 1.9[abc]	17.3 ± 1.0 [a]	15.7 ± 0.5 [abc]	16.0 ± 1.0 [ab]	<0.0001	0.006	0.16
fructose	16.6 ± 1.1 [ab]	13.7 ± 0.8 [b]	17.7 ± 2.4 [a]	18.1 ± 1.7 [a]	13.3 ± 0.6 [b]	18.0 ± 2.9 [a]	19.9 ± 1.8 [a]	17.9 ± 1.2 [a]	17.1 ± 1.1 [ab]	0.001	0.006	0.02
sucrose	8.1 ± 0.5 [ab]	6.8 ± 0.3 [b]	7.8 ± 0.8 [ab]	8.3± 0.9 [ab]	6.5 ± 0.3 [b]	8.4 ± 1.3 [ab]	10.4 ± 2.7 [a]	8.1 ± 0.5 [ab]	8.0 ± 0.6 [ab]	0.003	<0.04	0.23

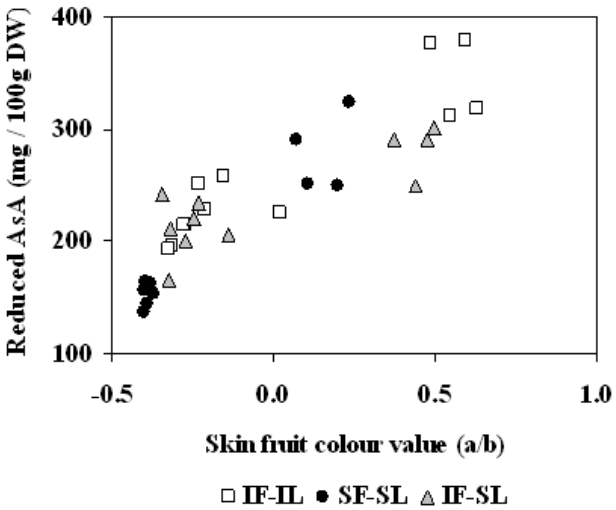


Figure 6: Relationship between reduced AsA content and fruit ripening stage, defined by the skin colour value a/b, in control fruits (IF-IL), fruits from plants with shaded leaves (IF-SL) or from totally shaded plants (SF-SL).

Discussion

The aim of the present study was to determine the respective impact of fruit and leaf irradiance on fruit AsA content. Light controlled regulation of fruit AsA content could be perceived at the fruit level by a modification of the synthesis, recycling or catabolism of AsA, but also at the leaf level triggering changes in AsA and sugar synthesis and then in their phloem transport to the fruits. Using shading treatments allowed discrimination between the impact of leaf and fruit shading on fruit AsA content. It was shown that light received by the fruit has more of an impact on the reduced AsA content in fruit than light received by the plant.

The fact that tomatoes harvested at a mature green stage and left to ripen maintain their reduced AsA content (Jimenez et al., 2002) indicated that tomato fruits possess the different enzymes related to AsA metabolism (synthesis, recycling, Ahn et al., 2002; Jimenez et al., 2002). The impact of irradiance on AsA related genes or enzymes has not been studied in fruit but several studies reported up-regulation by light of the expression of genes involved in AsA metabolism in leaves, even if some data are conflicting: only ascorbate oxidase and cytosolic ascorbate peroxidase mRNAs are light-regulated in tobacco leaves (Pignocchi et al., 2003) and mRNAs for GMPase (Tabata et al., 2002) and GLDH (Tabata et al., 2002, Tamaoki et al., 2003b) are light-regulated in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. Similarly, several enzymes involved in AsA metabolism showed increased activity when irradiance increased: the GDP-L-galactose phosphorylase appeared to be a key regulatory point of light regulation of the AsA pool in *Arabidopsis* leaves (Dowdle et al., 2007), in combination with enzymes involved in AsA recycling such as MDHAR (Mono DehydroAscorbate Reductase) and DHAR (Dehydroascorbate reductase; Chen, 2004). Consequently, shading fruits may trigger down regulation of gene expression or enzyme activities involved in AsA metabolism.

The total AsA and carbohydrate pools are strongly correlated in barley leaves exposed to light (Smirnoff and Pallanca, 1996). The transition from low light to high light and back to low light, suggested that increasing irradiance increased AsA synthesis and AsA turnover. In the present experiment, the link between AsA and sugar content during fruit ripening was less obvious for shaded fruits. A decrease in fruit AsA content under shading was unlikely to be due to a substrate limitation of AsA biosynthesis, as fruit shading did not impact on fruit

sugar content. Decreased fruit AsA content could also not be explained by a down-regulation of the expression of genes related to AsA biosynthesis and metabolism by sugars as was shown in broccoli florets (Nishikawa et al., 2005); sucrose feeding of broccoli plants without leaves and roots suppressed the loss of AsA, and genes related to AsA metabolism in chloroplasts were up-regulated by sucrose feeding. Thus sugar levels may act as a signal (reviewed by Smeekens, 2000) and may consequently affect AsA related gene expression. Another explanation for the correlation between sugars and leaf AsA was proposed by (Yabuta et al., 2007): recent studies in *A. thaliana* leaves suggested that the correlation could be related to the photosynthetic electron flux and independent of sugars. Consequently, the correlation between sugar and AsA content usually described in fruits might be linked to the existing correlation between fruit irradiance and leaf irradiance under natural conditions and not to the dependence of AsA biosynthesis on the availability of its substrate.

The impact of leaf shading clearly reduced fruit sugar content, but its effect on AsA content appears to be more complex as it interacted with fruit ripening stage. Leaf shading had no effect on reduced AsA content in fruits harvested 28 DPA, but it increased DHA and total AsA content. A different pattern was observed in fruits harvested at an orange stage: the reduced AsA content decreased and DHA content was not modified, so that total AsA was reduced. Higher DHA content in fruits harvested 28 DPA and lower reduced AsA content in fruit harvested 36 DPA could be linked to a delay in fruit ripening triggered by leaf shading; indeed a delay in the appearance of fruit external red coloration was observed with leaf shading and DHA has been shown to decrease during tomato ripening while reduced AsA increased (Gautier et al., 2008). This delay in fruit ripening could be linked to the lower fruit sugar content which may trigger down-regulation of genes related to AsA biosynthesis and metabolism (Nishikawa et al., 2005).

The present data underlined the complexity of AsA content regulation which depends on irradiance reaching both leaves and fruits and probably interacts with reactive oxygen species (ROS) production during ripening (Jimenez et al., 2002) and with changes in AsA related enzyme activities such as ascorbate oxidase (Yahia et al., 2001) and ascorbate peroxidase (Ahn et al., 2002) during ripening.

It is concluded that the correlation usually observed between sugars and AsA content, is the consequence of independent mechanisms: on one hand, leaf irradiance has an impact on

photosynthesis and sugar transport to the fruits and on the other hand fruit irradiance has an impact on AsA metabolism. The present data confirmed that both the leaf and fruit environment may have an impact on fruit AsA content. Fruit shading may directly reduce AsA synthesis and AsA metabolism globally so that the total AsA, reduced AsA and DHA contents decreased. The impact of leaf shading was not so obvious and not in contradiction with long distance transport by the phloem of sugars, or AsA or AsA precursors to the fruit. Leaf shading may trigger a delay in fruit ripening delaying DHA degradation and accumulation of reduced AsA. Both light reaching the fruits and the leaves and the ripening stage controlled AsA metabolism; consequently further analyses of the regulation of AsA related enzymes by fruit and leaf irradiance and fruit developmental stage will further the understanding of AsA metabolic regulation.

Acknowledgements:

We thank Emmanuel Botton and Claude Courbet for plant management and fruit harvesting and Emilie Rubio, Patricia Robert, Doriane Bancel and Hassana Bouhala for starch, sugar, acid and AsA assays.

Chapitre 3

Etude des différences de régulation de la voie de biosynthèse dans les feuilles et les fruits en réponse à la lumière

CHAPITRE III : Etude des différences de régulation de la voie de biosynthèse dans les feuilles et les fruits en réponse à la lumière

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis à *Planta*. Nous avons observé précédemment que la lumière modifiait directement et de manière importante les teneurs en vitamine C dans le fruit. Nous avons donc choisi de nous pencher sur les mécanismes qui contrôlent ces modifications par la lumière en mesurant le niveau des transcrits des gènes de la voie de biosynthèse après 7 jours d'ombrage. Ces mécanismes ont, par ailleurs, été beaucoup étudiés sur feuille mais très peu sur fruit. Cependant le fruit et la feuille sont très différents vis-à-vis de l'accumulation de nombreux métabolites, sucres solubles, acides, amidon y compris la vitamine C. Ainsi, chez la tomate, les feuilles contiennent environ cinq fois plus de vitamine C que les fruits et on peut supposer que la régulation des voies de synthèse par la lumière y est différente. Par conséquent, nous avons étudié des feuilles et des fruits de tomate afin de comparer les mécanismes de régulation de la teneur en vitamine C dans ces deux organes. La dynamique journalière de variation des teneurs en vitamine C a également été étudiée et comparée dans ces deux organes.

Résumé

La teneur en vitamine C dans les fruits de tomate varie selon l'éclairement des fruits mais les mécanismes n'ont jamais été étudiés dans les fruits de tomate. Des études précédentes sur feuille ont montré que les gènes *VTC2* et *VTC5* étaient fortement régulés par la lumière mais des résultats contradictoires ont été reportés concernant les autres gènes contrôlés par la lumière. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les étapes clés de la voie de synthèse de la vitmaine C régulées par la lumière dans deux organes très différents les feuilles et les fruits de tomate (*Solanum lycopersicum* 'WVa 106'). Sept jours d'ombrage réduisent fortement la teneur en vitamine C dans les feuilles (-50%) et dans une moindre mesure dans les fruits en maturation (-10%). Parmi les six dernières étapes de la voie de biosynthèse de la vitamine C, seuls un des deux gènes codant pour GGP (gène *VTC2)* et un des deux gènes codant pour GPP (*GPP2)* sont moins exprimés sous ombrage long dans les fruits comparé aux 7 gènes sous exprimés dans les feuilles (*GMP* (2 gènes sur 4), *GME* (les 2 gènes), *GGP* (1 gène sur 2) et *GPP* (les 2 gènes)). De plus, à court terme, deux gènes supplémentaires (*GalDH* and *GLDH*) sont régulés par la lumière dans les feuilles entre une journée couverte et une journée ensoleillée. A l'échelle journalière, dans les feuilles, les variations de teneur en vitamine C sont corrélées au niveau d'expression mesuré 8h avant de deux gènes de la voie de synthèse de la vitamine C: *VTC2* et *GME1*. En comparaison, les fruits à maturité sont plus tamponnés avec des variations de vitamine C plus faibles, un ombrage long ne modifiant l'expression que de deux gènes de la voie de synthèse.

Light affects ascorbate content and ascorbate related gene expression in tomato leaves more than in fruits

Capucine Massot[1], Rebecca Stevens[2], Michel Génard[1], Jean-Jacques Longuenesse[1], Hélène Gautier[1]

[1] INRA UR 1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Domaine St Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France

[2] INRA UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine St Maurice, F-84143 Montfavet, France

Abstract

Little is known about the light regulation of vitamin C (AsA) synthesis in fruits. In contrast, previous studies in leaves revealed that *VTC2* (coding for GDP-L-galactose phosphorylase) was one of the key genes up-regulated by light in leaves. However, contradictory results have been obtained regarding other light regulated genes. Our objective was to determine how the expression of AsA synthesis genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) was modified according to light irradiance in both leaves and fruits. Seven days of shading strongly reduced AsA content in leaves (50%) and to a lesser extent in fruits (10%). Among the last six steps of AsA biosynthesis, only two genes *VTC2* and *GPP1* (one of the two unigenes coding for L-Galactose-1-P phosphatase in tomato) were down-regulated by long-term shading in red-ripe fruits, compared to seven genes *GMP1*, *GMP3* (two of the four unigenes coding for GDP-D-mannose pyrophosphorylase), *GME1*,*GME2* (the two unigenes coding for GDP-D-mannose 3',5'-epimerase), *VTC2*, *GPP1* and *GPP2* (the two unigenes coding for GPP)) regulated in leaves. In addition, in leaves, two supplementary genes: *GalDH* (L-Galactose dehydrogenase) and *GLDH* (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) were also down-regulated by shading when a cloudy and a sunny day were compared. Moreover, in contrast to fruits, this study reveals strong daily changes in leaf AsA content (+50%) correlated to the transcript levels of *VTC2* and *GME* measured eight hours sooner and strong variations in the expression of the genes. We concluded that light affects AsA content and AsA related gene expression in leaves more than in fruits.

Keywords

Vitamin C; *Solanum lycopersicum*; Biosynthesis; Gene expression; Tomato; Light

Introduction

Plant vitamin C (AsA) content is highly dependent on environmental factors and especially the light environment (Tabata et al. 2002; Tamaoki et al. 2003; Chen and Gallie 2004). The major biosynthetic pathway of AsA in plants (L-galactose pathway, Wheeler et al., 1998) involves ten enzymatic steps (Fig. 1). The first six steps of the L-galactose pathway are used to synthesize activated nucleotide sugars that are also precursors of cell wall polysaccharides and glycoproteins. The committed pathway starts from step 7 with GDP-L-galactose phosphorylase coded by the two genes *VTC2* and *VTC5* which have been recently identified (Laing et al. 2007; Dowdle et al. 2007; Linster et al. 2008). This enzyme converts GDP-L-galactose to L-galactose-1-P. Finally, the next 3 steps: GPP (L-Galactose-1-P-phosphatase), L-GalDH (L-galactose dehydrogenase) and GLDH (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) convert L-galactose-1-P to L-ascorbate. Genes have been identified for all of the reactions involved in the L-galactose pathway, so that it is possible to study the mechanisms that regulate the expression of genes involved in AsA synthesis.

Light regulation of AsA related gene expression has been principally studied in leaves. Indeed, expression of *GMP* (coding for GDP-D-mannose pyrophosphorylase), *VTC2* (coding for GDP-L-galactose phosphorylase) and *GPP* (coding for L-Galactose-1-P phosphatase) genes increased in leaves of *Arabidopsis* under continuous light and decreased when plants were moved to the dark (Yabuta et al. 2007). *VTC2* seemed to be a key gene regulated by light as its expression and the activity of the corresponding enzyme GGP increase rapidly and strongly on transfer to high light (Dowdle et al. 2007). For *GME*, *GalDH* and *GLDH*, contradictory results have been reported in terms of their response to light. Gene expression coding for GLDH (step 10) and the corresponding enzymatic activity were found to decrease when leaves were shaded or moved to the dark in *Arabidopsis* (Tamaoki et al. 2003), tobacco (Tabata et al. 2002), Chinese (Li et al. 2008) or apple trees (Li et al. 2009) but did not systematically increase with increased light intensity (Yabuta et al. 2007; Pignocchi et al. 2003). The impact of light on *GME* gene expression has been little studied: Yabuta et al. (2007) reported that transcript level did not vary within the three days following plant transfer to light or dark, while Dowdle et al. (2007) showed a two fold increase in the number of transcripts after 24h of high light.

Less is known about light regulated AsA synthesis in fruits. In contrast to leaves, light regulation of AsA synthesis may be more complex: differences in fruit AsA content could be due to light regulation of AsA related gene expression or enzyme activities at the fruit level

but also to light regulation of AsA (or precursor) intake from leaves to the fruit. Indeed, it was previously shown that such transport exists in zucchini (Hancock et al. 2003) but can be negligible compared to fruit AsA synthesis in blackcurrant (Hancock et al. 2007). In tomato, the importance of fruit AsA synthesis over AsA transport from leaves has already been suggested by using shading experiments (Gautier et al. 2009). Moreover, sugar content seemed not to be limiting for AsA synthesis in tomato fruit as demonstrate recently by Massot et al. (2010). In fruits, only one study reported the role of light in the regulation of the AsA related gene expression (Li et al. 2009). Therefore regulation of fruit AsA biosynthesis by light is still unclear.

To get a better understanding of light regulation of AsA synthesis related gene expression in fruit, we compared the expression of the genes coding for the six last steps of the AsA pathway (Figure 1, steps 5 to 10) in tomato leaves and red-ripe fruits for shaded and control plants after seven days of shading or in plants submitted to diurnal variations of light. We investigated the difference of AsA content and AsA synthesis gene regulation depending on light environment in leaves and fruits.

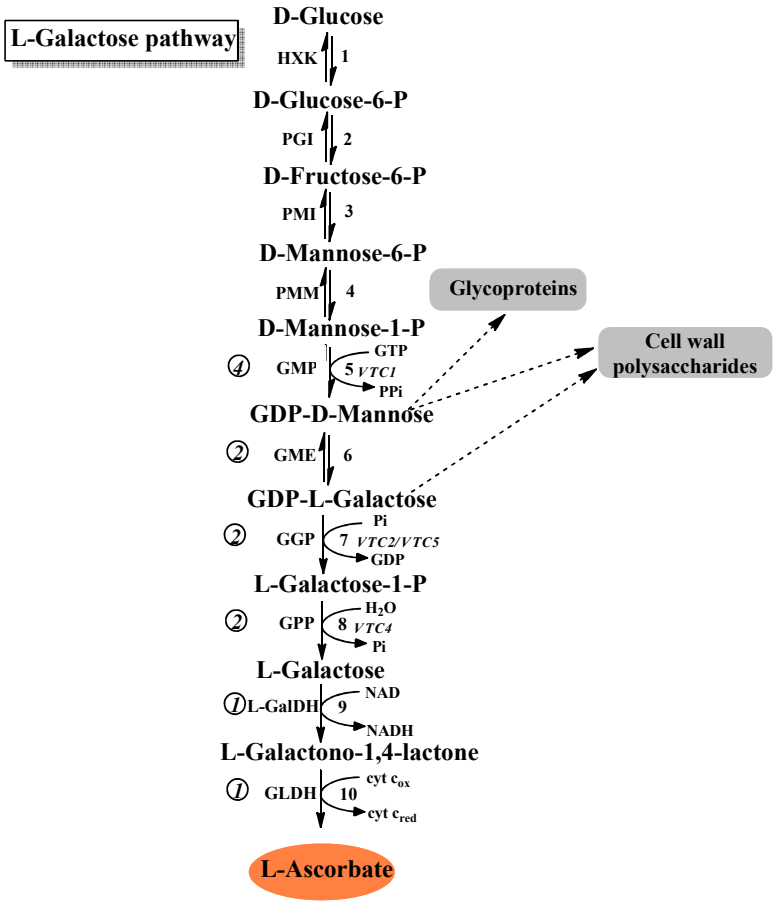


Fig. 1 Major L-ascorbic acid biosynthetic pathway in higher plants (L-Galactose pathway). Enzymes catalyzing the numbered reactions are in bold type for each step: 1, hexokinase (HXK); 2, phosphoglucose isomerase (PGI); 3, phosphomannose isomerase (PMI); 4, phosphomannomutase (PMM); 5, GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP); 6, GDP-D-mannose 3',5'-epimerase (GME); 7, GDP-L-galactose phosphorylase (GGP); 8, L-galactose-1-P phosphatase (GPP); 9, L-galactose dehydrogenase(L-GalDH); 10, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH). The first committed step for L-ascorbate synthesis GGP (step 7) is catalyzed by *VTC2* and *VTC5*. Numbers in circle indicate the copies of the genes found in *S. lycopersicum*

Material and Methods

The study was performed on a cherry tomato *Solanum lycopersicum* L. 'West Virginia 106' ('WVa106').

Long term shading experiment

Plant growth. Plants were grown in a glasshouse in Avignon (Southern France, 44°N). Plants with five growing leaves were transplanted on 23 March into 5 L pots containing potting soil in a multispan Venlo-type greenhouse, N–S oriented. Plant nutrition, chemical pest and disease control were in accordance with commercial practices. Water was supplied to the plants using a drip irrigation system to maintain 20–30 % drainage. Flowers were mechanically pollinated three times a week. All plant side shoots were removed as they appeared.

Shading treatment and sampling. On 11 June 2009, fruits at breaker stage (start of yellow coloration of the fruit at the locular position) on trusses n°5 and n°6 were tagged. The same day, young fully developed leaves that were sun exposed were marked. Half of the plants were then totally shaded at 12-13h universal time (UT) with a perforated silver net which reflected 71 % of incident radiation (Lee Filter: no.271; Andover, Hampshire, UK). These shading treatments mostly affected irradiance and had a low impact on temperature due to the reflective properties and the perforations of the film (supplemental Figure S1, Gautier et al., 2009). Seven days later, on 18 June 2009, previously tagged fruits and leaves were harvested at midday. Fruits had reached red ripe stage. Five replicates were collected; a replicate corresponds to a batch of three tomatoes for fruit samples or the five larger leaflets of a leaf for leaf samples. Pericarp tissue and leaflets were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before grinding to powder in liquid nitrogen.

Diurnal experiment

Plant growth. Plants with five growing leaves were transplanted on 4 March 2008 into soil, in a glasshouse, N-S oriented. Plant management was similar to the other experiment.

Sampling. Red ripe fruits (45 days after pollination) on truss 1 and young fully expanded leaves were harvested every 4 hours from dawn to 20h (UT) on a sunny day that started being cloudy in the afternoon (14 May) and at dawn and midday on a cloudy day (15 May). Five replicates were collected; a replicate corresponds to a batch of three tomatoes or the five

larger leaflets of a leaf. Following harvest, fruit pericarp and leaflets were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before grinding to powder in liquid nitrogen.

Photosynthesis, respiration and stomatal conductance measurements. Measurements were performed on five young fully expanded leaves, every four hour from dawn to 20h (UT) on the sunny day and at dawn and midday on the cloudy day. Net CO_2 assimilation rates, respiration and stomatal conductance of leaves were measured using PP System CIRAS-1 (Amesbury, USA) apparatus, with the following parameters 26°C, 600μmol m^{-2} s^{-1}, 370 ppm CO_2, 60% relative humidity and an air flow of 200ml s^{-1}.

Fluorescence measurements. Fluorescence measurements were performed using a portable Fluorescence Monitoring System (FMS 1, Hansatech®, Kings Lynn, Norfolk, UK), a leaf clip holder for adapting leaves to darkness conditions, and a PAR/temperature leaf-clip for ambient light environment. The variable to maximum fluorescence ratio (Fv/Fm) was calculated. This ratio, measured in the non-energized state after darkness adaptation for about 30 min, is a reliable measure of the maximal (potential) efficiency of excitation capture by open PSII in dark-adapted conditions. Fv/Fm is used as an estimate of the functional state of the photosynthetic apparatus at a given environmental situation (Krause and Weis, 1991). A decrease in Fv/Fm indicates photo-inhibition of PSII.

Light intensity measurements

Photosynthetically active radiation was measured above plants with a JYP 1000 sensor every min, averaged and stored every 15 min on a delta logger (Delta-T DL2e, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK). Light intensity measured during long shading and diurnal experiments are presented in Supplemental Fig. S1.

Fruit analyses

Assays of total AsA content were carried out as previously described by Stevens et al. (2006). Fruit dry matter content was determined on a sub sample after lyophilization. Total RNA was isolated from ground powder conserved at -80°C from leaves (200 mg) and fruits (250 mg) by phenol-chloroform extraction. Samples were homogenized with 1mL of TRI Reagent® Solution (Ambion). After 10 min at room temperature, 500μL of chloroform were added and samples were homogenized. They were incubated for 5 min at room temperature and then centrifuged for 15 min at 12,000g. The aqueous phase was collected and mixed with 0.7 volume of isopropanol. Samples were homogenized by inversion and after incubation at room

temperature for 10 min, they were centrifuged for 10 min at 12,000g and 4°C. The supernatants were discarded and pellets were washed with 70% ethanol. After centrifugation, ethanol was removed and pellets were dissolved in 50μL of RNAse free water and stocked at -20°C before reverse transcription. To eliminate DNA contamination, 15μg of total RNA was treated with RQ1 RNAse free DNAse (Promega). Then, reverse transcription was performed with 5μg of DNA free RNA, treated with Rnasin (Promega) to inhibit RNAse activity, using oligo $(dT)_{21}$ (10μM) and SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted 5 fold in water and 2μL aliquots were stored before use. Quantitative real-time PCR analyses were performed with the Stratagene Mx3005P® thermocycler (Stratagene, Cedar Creek, TX) using the Gotaq® qPCR Master Mix (Promega) according to manufacturer's instructions in a reaction volume of 24.5μL. Expression analyses of genes were performed for the six last step of AsA biosynthesis (Figure 1). We analyzed four GDP-D-mannose pyrophosphorylase genes [SlGMP1 (SGN-U315592), SlGMP2 (SGN-U313112), SlGMP3(SGN-U313111) and SlGMP4 (SGN-U329408)], two GDP-L-galactose phosphorylase genes [SlVTC2 (SGN-U312646), SlVTC5 (SGN-U316430)] , two L-galactose-1-phosphate phosphatase genes [SlGPP1 (SGN-U345930), SlGPP2(SGN-U317967)], an L-galactose dehydrogenase gene [SlGalDH (SGN-U319047)] and an L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase gene [SlGLDH (SGN-U317657)]. For each reaction, three technical replicates were run. Relative gene expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak and Schmittgen 2001) with *Actin1* [SlActin (SGN-U314757)] as an internal control. Primer sequences are detailed in Supplemental Table S1).

Results

We first analyzed the regulation by light of AsA synthesis related gene expression comparing the response of leaves and fruits to seven days of shading. Then, in order to study the short term regulation of AsA content in leaves and fruits, we further subjected plants to diurnal fluctuations.

Vitamin C content and vitamin C related gene expression in leaves and red fruits respond differently to shading

Plants were shaded for seven days to study the impact of a severe (-71% of incident radiation) and long term decrease of light irradiance, on fruit and leaf AsA content. Shading reduced

levels of AsA in leaves and fruits (Fig. 2). However, it affected leaves (50% reduction) more than fruits (only a 10% reduction in AsA levels).

In order to determine the impact of shading treatment on AsA synthesis related gene expression, we compared the relative abundance of transcripts of biosynthetic pathway genes in non-shaded and shaded leaves and fruits. In tomato, we found for *GMP, GME* and *GPP* more than one unigene corresponding to the plant amino acid sequences coding for ascorbate related genes (Fig. 1). Shade significantly reduced the transcripts of *GMP1, GMP3*, *GME1, GME2*, *VTC2*, *GPP1* and *GPP2* in leaves (Fig. 3a). This down-regulation was very marked for *GME1*, where the transcript number was reduced 13-fold after seven days of shade. Thus, as from step 5 of the AsA biosynthetic pathway, all steps in term of gene expressions appeared to be regulated by light in the leaves, except for the last two genes, *GalDH* and *GLDH* (steps 9 and 10).

In fruits, transcripts of genes of the AsA biosynthetic pathway were less affected by shade than in leaves as only transcripts of *GPP1* and *VTC2* were significantly down-regulated by shade.

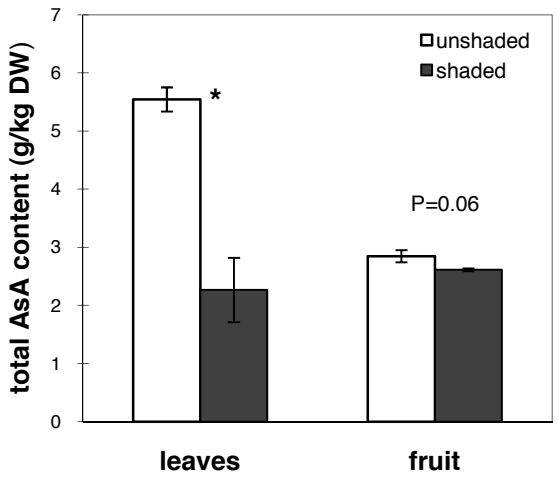


Fig. 2 Total AsA content in S. lycopersicum cv. 'WVa 106' young fully developed leaves and red ripe fruits harvested at midday on plant grown under unshaded (open bars) or shaded (grey bars) conditions after 7 days of shading. Data are means of five replicates (±SE). Asterisks indicate a significant difference between treatments else p-value are noted (Tukey test, P<0.05)

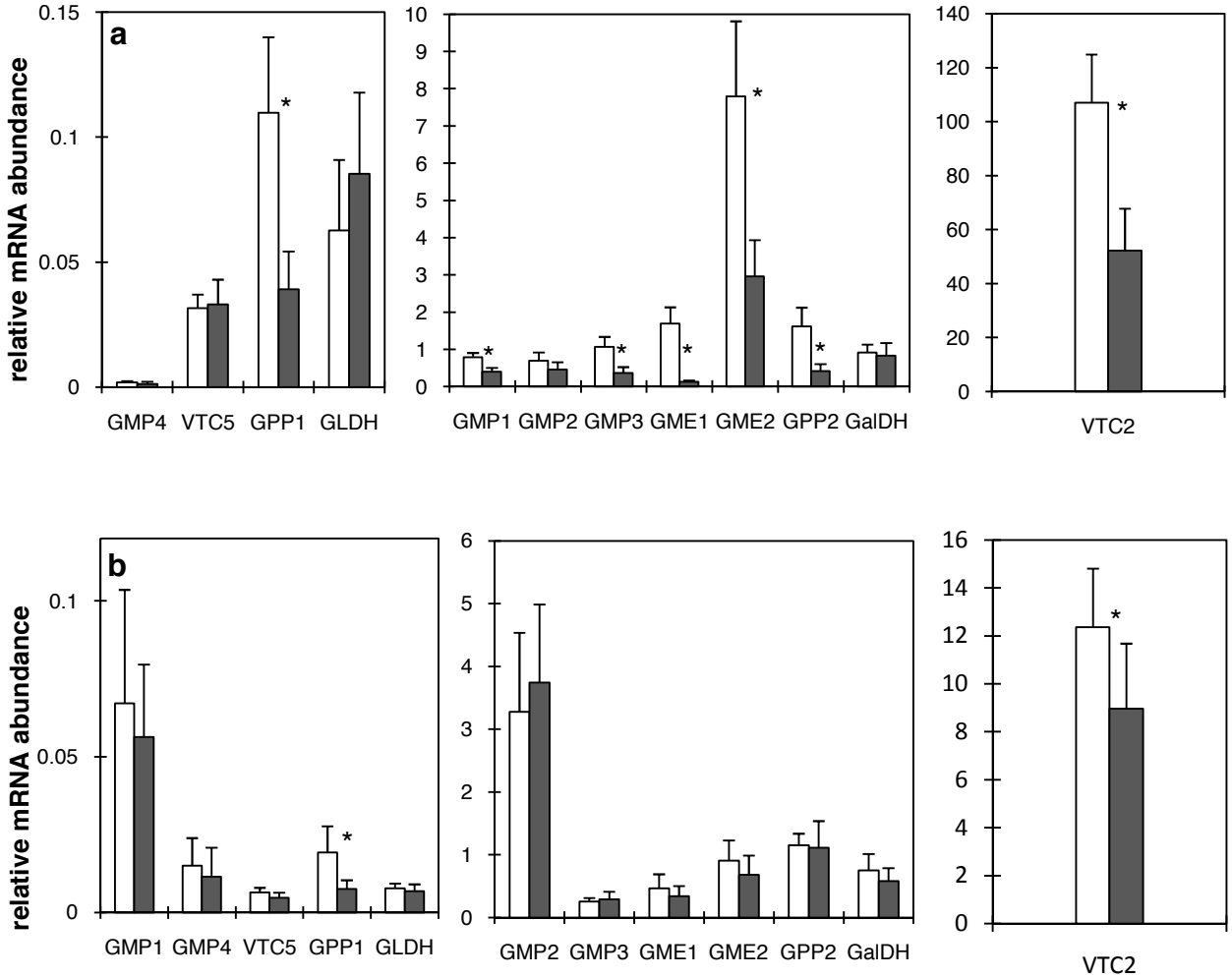


Fig. 3 Relative abundances of ascorbic acid-related mRNAs in S. lycopersicum 'WVa 106' leaves (a) and red ripe fruits (b) harvested at midday on plant grown under unshaded (open bars) or shaded (grey bars) conditions after 7 days of shading. Data were obtained by quantitative real-time PCR normalized against Actin1. Data are means of four replicates (±SD) and asterisks indicate significant differences between treatments (Tukey test, P<0.05)

Vitamin C shows daily fluctuations in leaves but not in fruits

In order to study the short term regulation of AsA content in both leaves and fruits, we subjected plants to natural fluctuations in radiation (over the period of one day) and compared a sunny day with a cloudy day. Variations in AsA levels in leaves followed a bell curve with a maximum at noon and were as strong as for long-term shading (reduction of up to 50% between 12:00 and 20:00, Fig. 4). Leaves sampled during a cloudy day displayed lower levels of AsA. This important regulation of AsA may be linked to its role in different processes at the leaf level (photosynthesis, respiration, etc.) protecting plant against photo-oxidative stress.

For this reason, we monitored how radiation modified the functioning of leaves over a period of one day. Stomatal conductance, leaf respiration and CO_2 assimilation followed radiation level variations during the day (Fig. 5, Fig. S1). As previously shown with AsA content, stomatal conductance, leaf respiration and CO_2 assimilation were lower during a cloudy day. The maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm), used to estimate the functional state of the photosynthetic apparatus, showed a decrease at midday (<0.85, Fig. 4d) during the sunny day, which may indicate a stress during the day (photoinhibition). This decrease was less marked during a cloudy day in accordance with lower light stress. These measurements demonstrated a state of light stress (variations in Fv/Fm) during the day in leaves coupled with changes in photosynthesis and stomatal conductance that could explain AsA daily variations. Indeed AsA content was positively correlated with Fv/Fm ratio (R=0.68, Fig. S2).

In red fruits, however, there were no significant diurnal variations in AsA levels (Supplemental Fig. S3) or between a sunny day and a cloudy day so AsA buffering was more marked in fruits than in leaves.

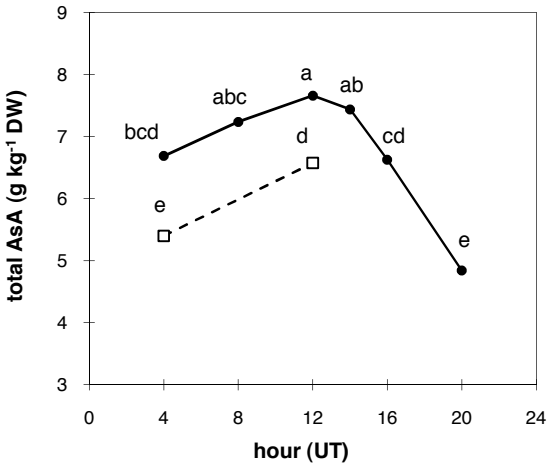


Fig. 4 Total AsA content in S. lycopersicum 'WVa 106' leaves during a sunny (–●–) or a cloudy day (--□--). Values are means of 5 replicates and different letters indicate significant differences (LSD test, P<0.05)

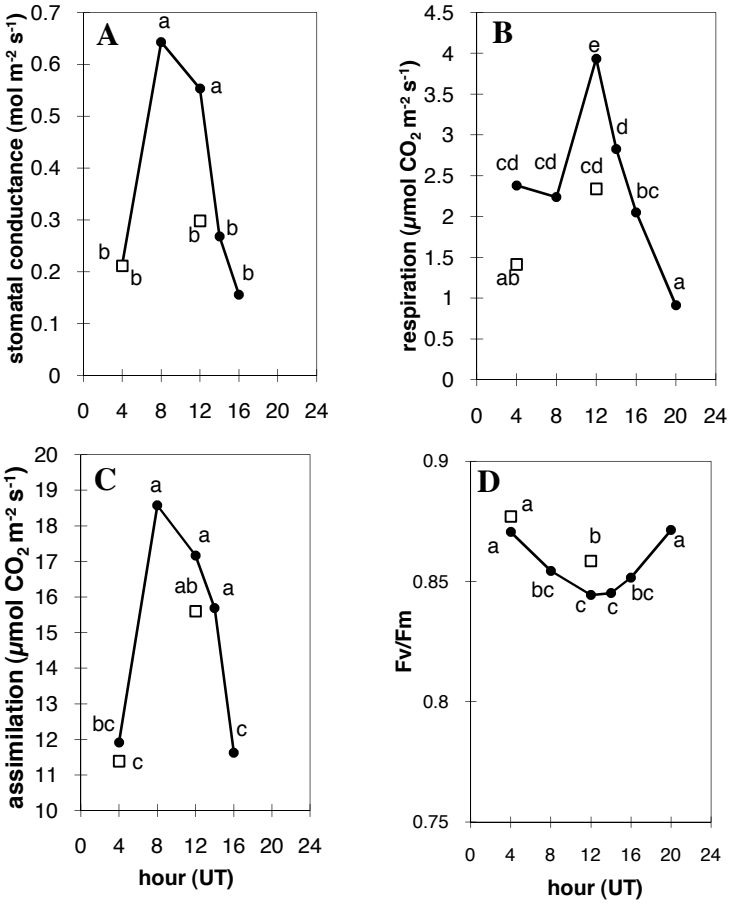


Fig. 5 Impact of irradiance on stomatal conductance (A), leaf respiration (B), assimilation (C) and Fv/Fm ratio (D) during a sunny (-●-) or a cloudy day (□) in young fully developed leaves of S. lycopersicum 'WVa 106' (see materials and methods). Values are means of 5 replicates and different letters indicate significant differences (LSD test, P<0.05)

Two additional genes *GalDH* and *GLDH* respond to daily light fluctuations in leaves

We further studied daily modifications in the expression of genes of the AsA biosynthetic pathway in leaves as only leaves showed daily fluctuations of AsA content. Two different types of transcript accumulation kinetics were thus observed (Fig. 6). The transcripts of *GME1, GME2, VTC2* and *GPP2* were very abundant at dawn and then declined rapidly during the day to reach a minimum at between 12:00 and 20:00. More specifically, we noted that *VTC2* and *GME1* showed very strong variations during the day (respectively 16- and 6-fold higher at dawn than at 20:00). For other genes (*VTC5*, *GalDH*), transcripts were low in the morning and in the evening and peaked at around 16:00. When a sunny day was compared with a cloudy day, light-regulated genes, that responded during long term shading all showed

a reduction in the number of transcripts, starting from dawn. Moreover, two additional genes that did not respond to long-term shade, *GalDH* and *GLDH,* were also reduced at shorter term during a cloudy day (Fig. 7). At midday, radiation levels did not differ markedly between the two days (Supplemental Fig. S1) and a comparison of relative transcript levels between the two days (sunny and cloudy) did not highlight any significant differences (Supplemental Fig. S4).

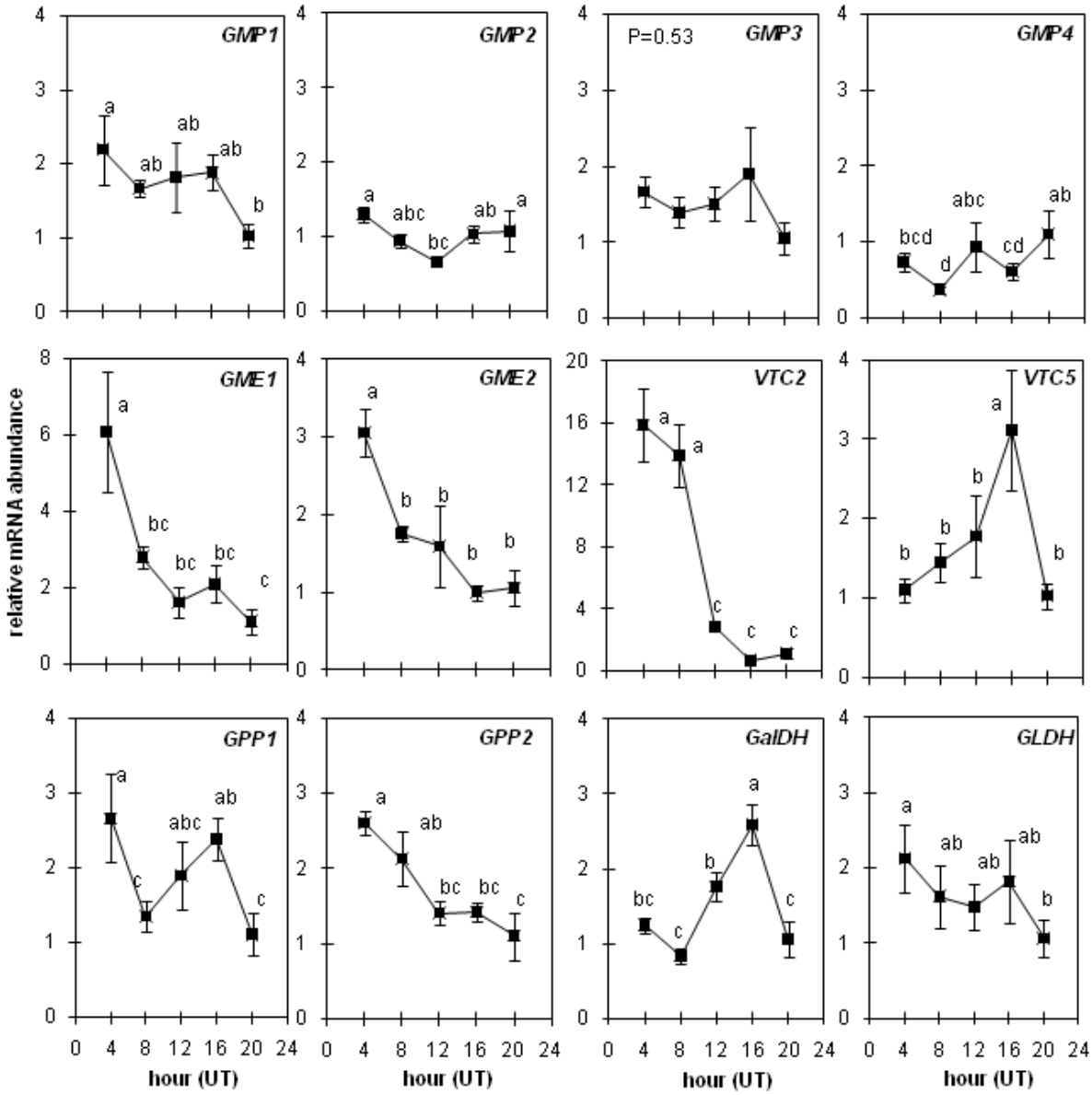


Fig. 6 Diurnal variations of transcript levels of enzymes of the AsA biosynthetic pathway in S. lycopersicum 'WVa 106' leaves during a sunny day. Data were obtained by quantitative real-time PCR normalized against Actin1 and expressed relative to level at 20h. Data are means of four replicates (±SE) and different letters indicate significant differences (LSD test, P<0.05)

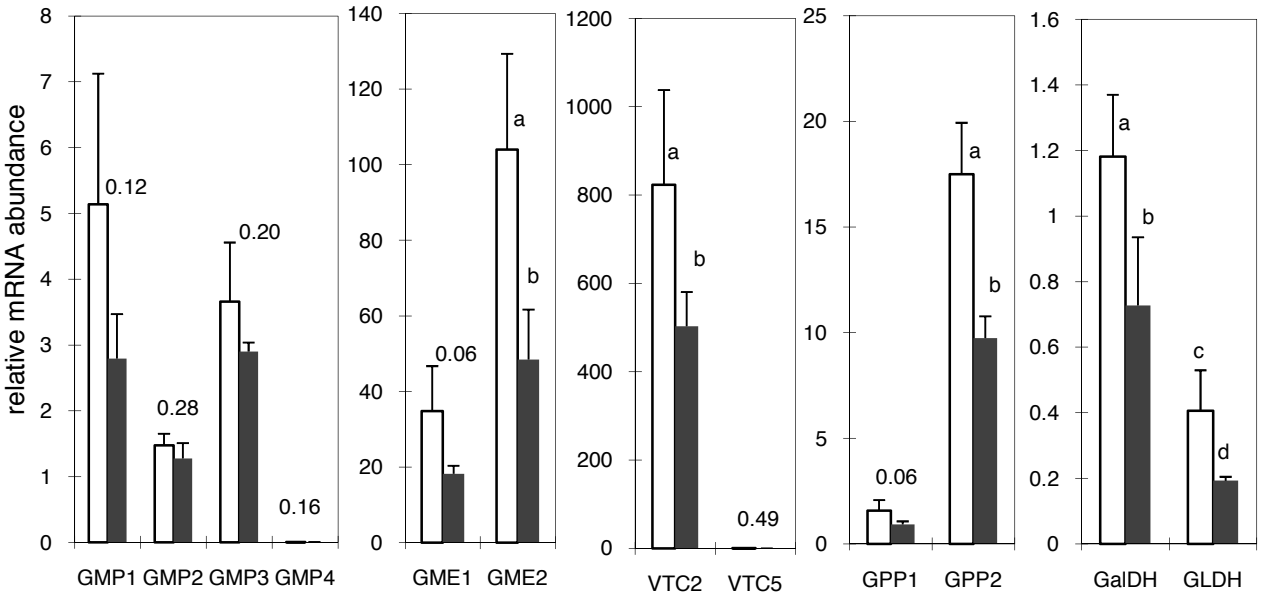


Fig. 7 Relative abundances of ascorbic acid-related mRNAs in S. lycopersicum 'WVa 106' leaves during a sunny (open bars) or a cloudy (grey bars) day at dawn. Data were obtained by quantitative real-time PCR normalized against Actin1. Data are means of four replicates (±SD), different letters indicate values that are significantly different between harvest days else numbers above bars indicate p-values (Tukey test, P<0.05)

Discussion

Light regulation of vitamin C synthesis in leaves

Our results confirm the importance of radiation in the regulation of AsA content in leaves during long-term shading. The diminution of AsA content was related to a reduction in *GMP1, GMP3*, *VTC2*, *GPP1* and *GPP2* gene transcripts as had previously been observed in *Arabidopsis* (Yabuta et al. 2007). However, supplementary genes (step 6, Fig. 1) were markedly regulated by light with the two genes, *GME1* and *GME2* that were down-regulated under shade (a 13-fold and 3-fold reduction in the number of transcripts, respectively). The step controlled by GME constitutes an important control point in AsA synthesis because it lies at the intersection of AsA synthesis and that of cell wall polysaccharides. In tomato, regulation of AsA synthesis related gene expression may be more complex than in *Arabidopsis* as several copies exist coding for the same enzyme. Thus, two of the four copies

of the *GMP* genes (*GMP2*, *GMP4)* did not respond to light. Moreover, it could be seen that during step 7 (GGP, Fig. 1), *VTC2* gene responded to shade, and not *VTC5,* suggesting that these two genes may not play the same role in regulating AsA synthesis. Finally, and contrary to the findings of Li et al. (2009) in apple leaves, the transcription of the last two steps of the AsA synthesis pathway (*GalDH* and *GLDH* genes) was not significantly down-regulated during long-term shading of tomato leaves. A previous study on tomato had indeed shown that the reduction in the expression of the gene coding for GLDH did not affect AsA synthesis in leaves indicating that this step was not limiting for AsA synthesis (Alhagdow et al. 2007).

Furthermore, we demonstrated that AsA levels in leaves showed large fluctuations during the day. Moreover, almost all transcripts in the AsA biosynthesis pathway varied during the day. Previous studies have also reported diurnal fluctuations in leaf AsA content in *Arabidopsis* (Tamaoki et al. 2003; Dowdle et al. 2007), tobacco (Chen and Gallie 2004) or potato (Tedone et al. 2004). However, these periodic oscillations in AsA content were only studied with respect to *VTC2* and *VTC5* gene expression (Dowdle et al. 2007), which displayed a 5-fold increase in *Arabidopsis* during a light cycle. As found in our study, Dowdle et al. (2007) reported that diurnal fluctuations of AsA content were delayed with diurnal fluctuations of *VTC2* and *VTC5* expression as *VTC2* and *VTC5* transcripts peaked in the first few hours of the light cycle, while AsA content and GPP activity increased towards the end of the light period (delay of 6h). In our study, most of the genes peaked early at 4:00 but AsA content increase up to 12:00 (delay of 8h). This delay between gene expression and maximum AsA content could be explained by the time needed to build enzyme involved in AsA synthesis but also by light regulation at a post transcriptional level or enzyme activity level as suggest by the results of Dowdle et al. (2007). Moreover, as AsA pool size is also controlled by recycling, AsA content variations could also be due to light regulation of AsA recycling as reported by Kuzniak (2004) and Chen and Gallie (2004). However, in terms of *VTC2* transcript variations (the gene that mostly varied during the day) we observed a good correlation between *VTC2* transcript level and total AsA content 8 hours later in leaves (R=0.85, Supplemental Fig. S6). Contrary to *VTC2*, *VTC5* peaked at the end of the day (16:00) suggesting complementary expression of these two genes. Finally, our study over the course of a day enabled us to emphasize the important role of *GME1* whose transcript level was also well related to total AsA content 8 hours later (R=0.75, Supplemental Fig. S6), alongside *VTC2,* in the diurnal fluctuations of the AsA biosynthetic pathway in tomato. Indeed, the two steps GME and GGP

(steps 6 and 7) were previously reported as being determinant regulatory points of AsA synthesis in tobacco leaves (Dowdle et al. 2007; Linster and Clarke 2008).

The comparison between a sunny and a cloudy day at dawn underlined that the differences in light intensity (-50% on a cloudy day versus a sunny day between 04:00 and 05:00), caused a significant down-regulation of practically all genes in the biosynthetic pathway including the last two *GalDH* and *GLDH*. It therefore appears that even a weak light signal, at dawn, is sufficient to cause changes in transcript number, which is suggestive of a signal-type regulation (Bartoli et al. 2009). These results underlined the tight regulation of the AsA biosynthetic pathway at diurnal level and according to radiation.

Diurnal variations in AsA levels followed variations in stomatal conductance, respiration, chlorophyll fluorescence and carbon assimilation, which is consistent with the role of AsA in these different processes. Indeed, AsA, through its role as a redox buffer, is involved in the functioning of leaves as a regulator of stomatal opening (Chen and Gallie 2004). It also plays a key role in photosynthesis; firstly, to protect the photosynthetic apparatus from damage caused by the synthesis of reactive oxygen species (Smirnoff 2000), and secondly in the mechanisms that dissipate excess light energy, such as the water-water cycle (Asada 1999) and the xanthophyll cycle (Demmig-Adams and Adams 1996). Finally, because the last enzyme in the biosynthetic pathway is situated in the electron transport chain in mitochondria, AsA is closely linked to respiration (Bartoli et al. 2000). Our study over the course of a day thus confirmed the tight regulation of the AsA content, which may be linked to its important role in these different processes.

Transcripts in leaves and fruits

We found transcripts of all genes of the AsA biosynthetic pathway in red fruits as reported earlier by Ioannidi et al. (2009; steps 5 to 10, Figure 1). These results confirm that tomato fruits are able to synthesize their own AsA, as demonstrated in apple (Razavi et al. 2005) or blackcurrant (Hancock et al. 2007). No others studies reporting AsA related gene expression variations in both fruit and leaf are available, although these two organs accumulated ascorbate differently. Indeed, AsA levels are highly different between these two organs (twice more AsA in leaves than in fruits), and one could suppose that its synthesis and regulation also differ (Badejo et al. 2008; Li et al. 2009). We observed that transcripts of the *GMP2* gene were abundant in red fruits. Gilbert et al. (2009) and Badejo et al. (2008) also found more

GMP transcripts in fruits than in leaves in tomato or acerola, with a strong correlation between *GMP* expression and AsA contents in acerola leaves and fruits. The GMP enzyme produces GDP-D-mannose, a precursor of AsA, and also of cell wall polysaccharides which is essential for N- and O-glycosylation of proteins (Conklin et al., 1999). This protein glycosylation is an important step in the ripening process of tomato (Handa et al., 1985). Indeed, inhibition of glycosylation can delay ripening in tomato. Consequently, the abundance of *GMP2* transcripts that we observed in fruits may be linked to the use of GDP-D-mannose for protein glycosylation during ripening.

Light regulation of vitamin C synthesis in fruits

Even though the effects of light on AsA levels in fruits are important and have been known about since 1945 (Hamner et al. 1945; Mc Collum 1946; Madamba et al. 1974; El-Gizawi et al. 1993), the mechanisms governing the light regulation of AsA biosynthetic pathway have been the subject of little study in fruits (only one study published in apple (Li et al. 2009)). The present study showed that, as in leaves, AsA levels in tomato fruits declined under shade, and that this decline could be linked to a reduction in the expression of two genes, *GPP1* and *VTC2*. This latter gene is also well known as a major factor in regulation of the L-Galactose pathway (Dowdle et al. 2007; Linster and Clarke 2008). This is the first time that light regulation of the expression of these two genes in fruits has been observed. Indeed, Li et al. (2009) recently demonstrated a reduction in the quantity of *GLDH* transcripts in apple that was proportional to the intensity of shade. However, gene transcripts coding for GGP and GPP were not included in that study. Furthermore, these authors did not observe any significant difference in gene expression in fruit flesh, but only in skin. This could be linked to the fact that organs or tissues exposed to radiation, such as fruit skin, respond more markedly to variations in light intensity than flesh (Li et al. 2009; Li et al. 2010). In agreement with this hypothesis, studies have shown that AsA levels decreased from the outside to the inside of the fruit (Li et al. 2010). Another explanation for the small number of genes responding to shade in fruits may be linked to the developmental stage of the fruits in our study. Indeed, several authors have demonstrated that expression of *GMP*, *GME*, *GalDH* and *GLDH* genes diminishes during ripening, while that of *GGP* and *GPP* genes increases (Alhagdow et al. 2007; Ioannidi et al. 2009). During our study, genes that were weakly expressed at red-ripe stage: *GMP*, *GME*, *GalDH* and *GLDH,* did not appear to respond to shade, while *GGP* and *GPP,* which were strongly expressed at red-ripe stage, did respond.

These results suggested that these two steps, GGP and GPP, could be key points of AsA regulation during ripening. It could thus be seen that even in nearly ripe fruits, the radiation conditions affecting the plant might affect the AsA biosynthetic pathway in fruits and consequently their final content at harvest. However, fruits were more buffered, which may be linked to their volume and their light interception capacity. By contrast, the epicarp of fruit might respond much better to light, as suggested by the findings of Li et al. (2009) in apple.

Our results demonstrate the importance of light regulation of AsA synthesis related gene expression in both short and longer terms in leaves and fruits. These light regulated genes could explain part of the light induced changes in AsA content but other regulatory levels by light might also exist at the post-transcriptional stage and in addition light may also directly affect enzyme activity as was reported for GLDH (Tamaoki et al. 2003). Thus complementary experiments in which AsA related synthesis proteins will be quantified may help the understanding of light regulation of the AsA pathway. Moreover, after its synthesis, AsA content also depends on its recycling (Chen and Gallie 2004; Zhou et al. 2009) and its degradation (Pallanca and Smirnoff 2000). Future work to determine the importance of these processes is needed to help the understanding of how AsA level and redox state contribute to the adaptation of plants to their light environment particularly in fruit where light regulation is poorly studied.

Supplemental data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Fig. S1 Photosynthetically active radiation measured during the two experiments.

Supplemental Fig. S2 Relation between total AsA content and Fv/Fm ratio in leaves in the diurnal experiment.

Supplemental Fig. S3 Daily variations of total AsA content in red ripe fruits.

Supplemental Fig. S4 Relative abundances of ascorbic acid-related mRNAs in *S. lycopersicum* 'WVa 106' leaves during a sunny or a cloudy day at midday

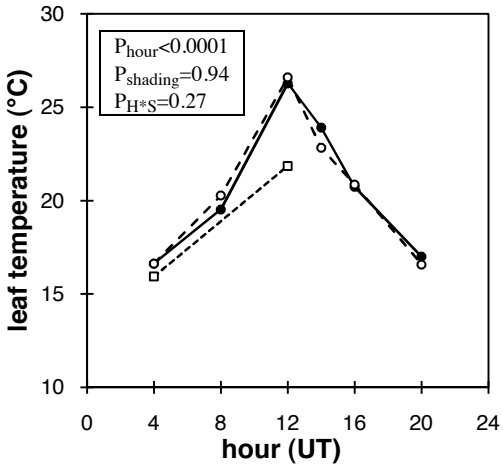
Supplemental Fig. S5 Correlation between relative *VTC2* and *GME1* mRNA abundance and total AsA content 8 hours later.

Supplemental Table S1 PCR primers used to amplify specific regions of genes of interest.

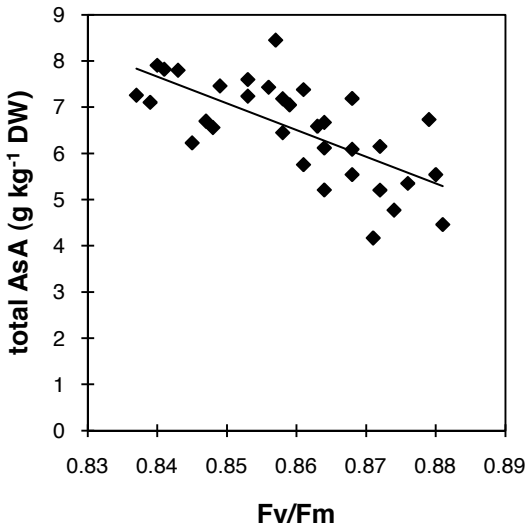
Acknowledgments

We are grateful to the greenhouse experimental team and to Yolande Carretero for taking care of the plants. We thank Claude Courbet and Michel Pradier for fruit harvesting. Cécile Garchery and Louise Gilbert for technical support in Q-PCR analyses and Grazielle Faure, Emilie Rubio, Sylvie Sérino, Doriane Bancel for vitamin C and sugar assays. Finally, we thank Valentina Baldazzi for critical reading of the manuscript.

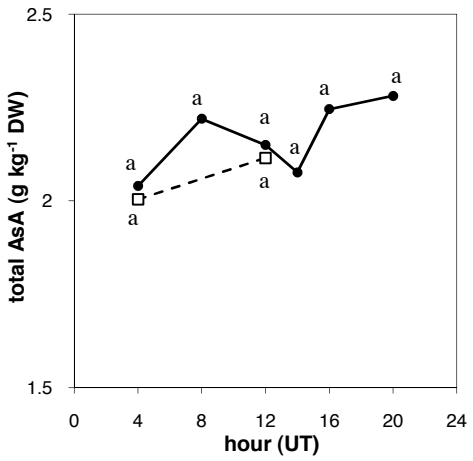
Supplemental data



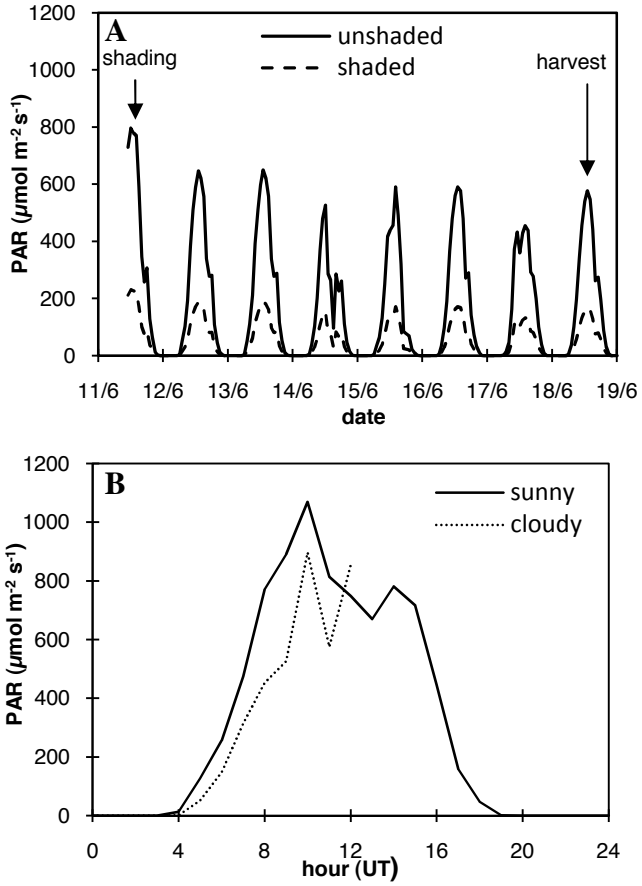
Supplemental Figure S1. Leaf temperature measured during an unshaded sunny day (-●-), a shaded sunny day (--○--) or a cloudy day (-□-) on plants of *S. lycopersicum* 'WVa 106'. Values are means of 5 replicates. P-values of the anova considering the factors hour of the day (P_{hour}), shading treatment ($P_{shading}$) and their interaction (P_{H*S}) were given in the table.



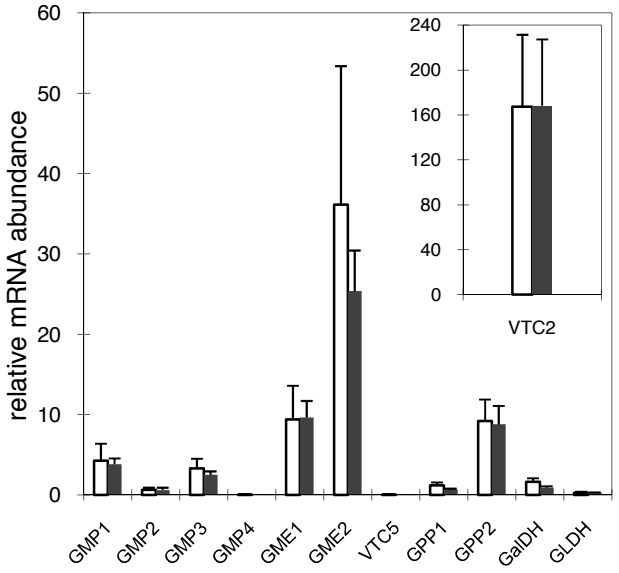
Supplemental Figure S2. Relation between total AsA content and Fv/Fm ratio in leaves in the diurnal experiment. The equation of linear regression is Y= -57.8X+56 (R^2=0.47).



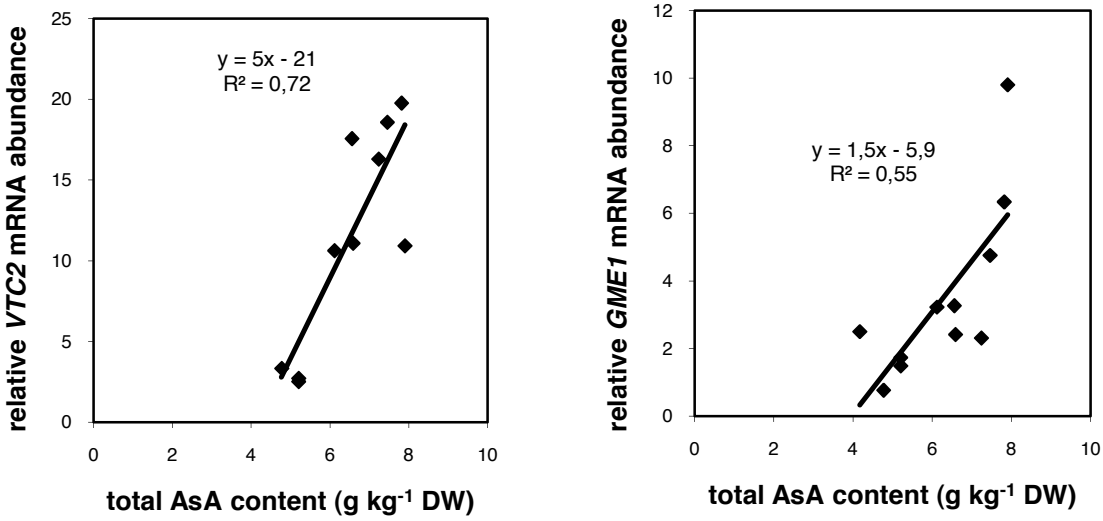
Supplemental Figure S3. Total AsA content in *S. lycopersicum* 'WVa 106' red-ripe fruit, during a sunny (-●-) or a cloudy day (--□--). Values are means of 5 replicates and different letters indicate significant differences (LSD test, P<0.05).



Supplemental Figure S4. Photosynthetically active radiation in μmol m^{-2} s^{-1} measured during long shading experiment (A) and diurnal experiment (B).



Supplemental Figure S5. Relative abundances of ascorbic acid-related mRNAs in *S. lycopersicum* 'WVa 106' leaves during a sunny (open bars) or a cloudy (dark bars) day at midday. Data were obtained by quantitative real-time PCR normalized against *Actin1*. Data are means of four replicates (±SD).



Supplemental Figure S6. Correlation between relative *VTC2* mRNA abundance (A) or relative *GME1* mRNA abundance and total AsA content 8 hours later in leaves of *S. lycopersicum* 'WVa 106'.

Supplemental Table S1. Sets of PCR primers used to amplify specific regions of ascorbate-related genes and reference genes with the corresponding accession number.

Name		Primer sequence 5' → 3'	Accession number
GMP1F	Forward	CATTGTCCTGCCAAACAAGA	SGN-U315592
GMP1R	Reverse	AAAGGGCACTGCCAAATTC	
GMP2F	Forward	CCCACAAGGAGATCAAATC	SGN-U313112
GMP2R	Reverse	TGAAACTGAAAACCAACCAAA	
GMP3F	Forward	TGGTTGGTTTCCAGTTCTCC	SGN-U313111
GMP3R	Reverse	CAAAAATTACACATTTCCCAGTCTT	
GMP4F	Forward	TTCTCCGTCGCCATTTTTAC	SGN-U329408
GMP4R	Reverse	CAGCCTTGTTCCAAAACCTC	
GME1F	Forward	ATTGGAAGCCAATCCATCTG	SGN-U314898
GME1R	Reverse	AAACCAAGAAACGCCAACAA	
GME2F	Forward	TTGTTCGCGTGGAATGTTTA	SGN-U314369
GME2R	Reverse	GTAGGTGCAATGAGGGGATG	
GGP1F	Forward	AAGGCAAAACCATGTTCAATG	SGN-U312646
GGP1R	Reverse	ATGGGTCATTTCACACACCA	
GGP2F	Forward	TGGAGGTTGTAATCCCCAAA	SGN-U316430
GGP2R	Reverse	GCACAGTCAAAACACCAACAA	
GPP1F	Forward	TAGCCGCTACAAACCCTCAT	SGN-U345930
GPP1R	Reverse	TCCGCTTTCCATCTCCTATG	
GPP2F	Forward	GGCCTTGAATGAATAAGAATGA	SGN-U317967
GPP2R	Reverse	GCACATCGCGCAAAACTAT	
GalDHF	Forward	TGTTTGTCAGTTCAACGAGGTC	SGN-U319047
GalDHR	Reverse	TTGTTTTAGATGTCCAAGTGCAA	
GLDHF	Forward	TTGCGAGGAAATTTTTGTCC	SGN-U317657
GLDHR	Reverse	CTTGAAAAATGGCCTCAAGC	
ActinF	Forward	GGACTCTGGTGATGGTGTTAG	SGN-U314757
ActinR	Reverse	CCGTTCAGCAGTAGTGGTG	

Chapitre 4

Synthèse, recyclage, dégradation de la vitamine C à la lumière

CHAPITRE IV : Réponse de la vitamine C à la lumière en fonction de la température

Ce chapitre est présenté sur la forme d'un article en préparation. Il a pour objectif d'approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les variations de teneur en vitamine C des fruits par la lumière et en particulier, l'interaction entre lumière et température qu'il est souvent difficile d'étudier en conditions naturelles. Pour cela, nous avons utilisé des fruits détachés, que nous avons mis en chambre climatique pendant leur maturation. Nous avons comparé des fruits à la lumière et à l'obscurité pour différentes températures en mesurant leur teneur en vitamine C (réduite, oxydée), l'expression des gènes de la voie de synthèse, les activités des enzymes du cycle ascorbate-glutathion et de la catalase et la quantité de thréonate, un des produits de dégradation de l'ascorbate.

Introduction

Vitamin C (AsA) is an important micronutrient essential for plant growth (Alhagdow et al., 2007, Dowdle et al., 2007) that plays major roles in the interaction of plants with environment, pathogens and oxidizing agents (Smirnoff, 2000b). Moreover, AsA is an essential antioxidant to humans. Besides the well known role of vitamin C in preventing scurvy, recent studies have shown that AsA is involved in preventing various oxidative stress-related illnesses such as cancers, cardio-vascular diseases and aging (Koo, 1996, Li and Schellhorn, 2007b, Li and Schellhorn, 2007a). Since humans have lost the ability to synthesize AsA, fruits and vegetables are the major source of dietary AsA for humans. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a fruit produced worldwide and year-round. AsA concentration in tomato fruit is quite low (between 200 to 500 mg kg^{-1} depending on cultivar) but owing to its large consumption, tomato fruit constitutes an important source of AsA intake in our diet. However, as AsA content in fruit strongly varied with environmental factors (Dumas et al., 2003), an improved understanding of regulation of AsA accumulation in fruits is required.

AsA pool size in fruit may increase according to its import, its synthesis and recycling rate (reduction of the oxidized form) and decrease according to its export and its oxidation and degradation. The major biosynthesis pathway in plants (L-Galactose pathway, (Wheeler et al., 1998)) has been fully elucidated in *Arabidopsis* leaves material (Dowdle et al., 2007). It involves ten enzymatic steps from D-Glucose to AsA. The first six steps ending with GDP-D-mannose 3',5' epimerase (GME) are used to synthesize activated nucleotide sugars that are also precursors of cell wall polysaccharides and glycoproteins. The committed pathway starts with GDP-L-galactose phosphorylase (GGP) coded by the two genes *VTC2* and *VTC5* (Dowdle et al., 2007, Laing et al., 2007, Linster et al., 2008). Then, GPP (L-Galactose-1-P-phosphatase) and L-GalDH (L-galactose dehydrogenase) convert L-Galactose-1-phosphate to L-Galactono-1,4-lactone. Finally, GLDH (L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase) convert L-galactose-1-P to L-ascorbate. Interestingly the gene coding for these enzymes were also found in fruits (in apple, (Li et al., 2009) and tomato (Alhagdow et al., 2007, Ioannidi et al., 2009)) indicating that fruit possesses the ability to synthesize its own ascorbate.

However, AsA once synthesized can rapidly be oxidized so that recycling also played an important role to maintain AsA level in plant cell. Indeed, AsA could be oxidized to monodehydroascorbate (MDHA) naturally or enzymatically by ascorbate peroxidase (APX) (Davey et al., 2000) which can spontaneously disproportionate to AsA and dehydroascorbate

(DHA) or be reduced by a NAD(P)H dependant-monodehydroascorbate reductase (MDHAR). DHA can further be degraded or also be reduced enzymatically to AsA by a dehydroascorbate reductase (DHAR) using glutathione as reducing substrate, then glutathione reductase (GR) can reduce back the oxidized glutathione (GSSG). These reactions are well known as the ascorbate-glutathione cycle (AsA-GSH, Foyer and Halliwell, 1976, Noctor and Foyer, 1998).

At last, AsA may be degraded in oxalate, threonate and tartrate (Debolt et al., 2007). A degradation pathway has been proposed recently (Green and Fry, 2005) but some enzymes catalyzing these reactions remained unknown so that AsA degradation is still obscure. Moreover, AsA degradation products showed species differences that were still unsolved: AsA is degraded to tartrate in grapes (Saito and Kasai, 1969, Saito and Kasai, 1984), to oxalate in spinach or clover (Yang and Loewus, 1975) and to threonate in lemon pelargonium or sorrel (Helsper and Loewus, 1982).

It has been reported that tomato fruit AsA content varied all year round (Toor et al., 2006) likely due to light or temperature. Light has been shown to strongly influenced AsA metabolism in photosynthetic tissues. Indeed, in leaves, light increases transcription of AsA biosynthetic pathway, the activity of enzyme involved in AsA biosynthetic pathway (Tamaoki et al., 2003, Dowdle et al., 2007, Yabuta et al., 2007) but also the activity of enzymes involved in AsA recycling (Faria et al., 1996, Chen and Gallie, 2004). Less is known about light regulation of AsA content in fruits. Only one study in apple fruit reported the role of light regulating AsA synthesis gene expression and recycling (Li et al., 2009). AsA degradation has been poorly studied. It appeared from labeled experiment that AsA degradation in darkness was important in detached leaves of Arabidopsis: -40% of AsA pool size after 24h (Conklin et al., 1997). However, as light and temperature are often positively related, the relative impact of temperature on AsA content remains unclear and was rarely taken into account. Studies on temperature impact reported decreased fruit AsA content at high temperature (Richardson et al., 2004, Gautier et al., 2008) that could be related to AsA oxidation and degradation.

The objective of this work was to obtain a new insight on the regulatory mechanism involved in AsA accumulation in fruit. In particular, the relative importance of temperature and irradiance on AsA content remains unclear mainly owing to the difficulty in separating these factors in natural condition. In the present work, the impact of light were studied at different temperature during off-vine ripening tomato fruits excluding thus any import or export to the fruit. We investigated the impact on AsA synthesis by quantifying transcript levels of AsA

biosynthetic genes, AsA recycling by measuring recycling enzymes activity in vitro and AsA degradation by assaying threonate content.

Material and Methods

The study was performed on cherry tomato *Solanum lycopersicum* L. 'West Virginia 106' ('WVa 106')

Plant growth

Plants were grown in a glasshouse in Avignon (Southern France, 44°N). Plants with five growing leaves were transplanted on 31 August 2009 into 5 L pots containing potting soil in a multispan Venlo-type greenhouse, N–S oriented. Plant nutrition, chemical pest and disease control were in accordance with commercial practices. Water was supplied to the plants using a drip irrigation system to maintain 20–30 % drainage. Flowers were mechanically pollinated three times a week. All plant side shoots were removed as they appeared.

Fruit sampling and treatments

Fruits were harvested at breaker stage (corresponding to 32 days after anthesis) at dawn and peduncle scars were covered with Terostat to limit water loss. Fruits were then placed in two growth cabinets (Sanyo, MLR-351H) with controlled temperature and irradiance. Successive experiments were undertaken to determine the impact of irradiance (darkness, D= 0 μmol $m^{-2}s^{-1}$ or light, L: 150 μmol $m^{-2}s^{-1}$) at 31°C, 27°C, 23°C, 17°C and 12°C. To adjust fruit temperature between light and darkness, additional fruits at breaker stage were harvested and fruit temperature was measured every minute with very fine thermocouples (0.2 mm copper–constantan). Thermocouples were inserted to a depth of 2 mm into the upper exposed side of fruits and temperature measurements were averaged and recorded every 30 min by a delta logger (Delta-T DL2e, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, UK). Air temperature of lighted cabinet was slightly decreased (-0.5°) in order to obtain similar fruit temperature.

Fruits used within each temperature treatment came from a given truss number at similar developmental stage but due to the duration of each experiment, fruits were harvested on trusses 2 to 5 for successive temperature experiments. Vapor pressure deficit was identical for all temperatures tested (0.56 kPa).

Fruit measurements

After 56h, fruits were collected and evaluated individually for physical traits, including fresh weight (FW). External color was characterized near the pistil scar by a Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta, France SA) using the Hunter color coordinates L, a, and b; (L lightness, a ranging from green to red, b ranging from blue to yellow). Then, fruits were cut on ice, seeds and gel were discarded, and pericarp tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before grinding in liquid nitrogen.

Measurement of fruit ascorbate concentration, RNA extraction and QPCR analysis

Assays of total, reduced and oxidized AsA content were carried out on ground powder conserved at -80°C as previously described by Stevens et al. (Stevens et al., 2006).

Total RNA was isolated from 250 mg ground powder conserved at -80°C by phenol-chloroform extraction. Samples were homogenized with 1mL of TRI Reagent® Solution (Ambion). After 10 min at room temperature, 500μL of chloroform were added and samples were homogenized. They were incubated for 5 min at room temperature and then centrifuged for 15 min at 12,000g. The aqueous phase was collected and mixed with 0.7 volume of isopropanol. Samples were homogenized by inversion and after incubation at room temperature for 10 min, they were centrifuged for 10 min at 12,000g and 4°C. The supernatants were discarded and pellets were washed with 70% ethanol. After centrifugation, ethanol was removed and pellets were dissolved in 50μL of RNAse free water and stocked at -20°C before reverse transcription. To eliminate DNA contamination, 15μg of total RNA was treated with RQ1 RNAse free DNAse (Promega). Then, reverse transcription was performed with 5μg of DNA free RNA, treated with Rnasin (Promega) to inhibit RNAse activity, using oligo $(dT)_{21}$ (10μM) and SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted 5 fold in water and 2μL aliquots were stored before use. Quantitative real-time PCR analyses were performed with the Stratagene Mx3005P® thermocycler (Stratagene, Cedar Creek, TX) using the Gotaq® qPCR Master Mix (Promega) according to manufacturer's instructions in a reaction volume of 24.5μL. Expression analyses of genes were performed for the six last step of AsA biosynthesis. We analyzed four GDP-D-mannose pyrophosphorylase genes [SlGMP1 (SGN-U315592), SlGMP2 (SGN-U313112), SlGMP3(SGN-U313111) and SlGMP4 (SGN-U329408)], two GDP-L-galactose phosphorylase genes [SlVTC2 (SGN-U312646), SlVTC5 (SGN-U316430)] , two L-galactose-1-phosphate phosphatase genes [SlGPP1 (SGN-U345930), SlGPP2(SGN-U317967)], an L-galactose dehydrogenase gene [SlGalDH (SGN-

U319047)] and an L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase gene [SlGLDH (SGN-U317657)]. For each reaction, two technical replicates were run. Relative gene expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method using PCR efficiencies of the target and endogenous reference genes (Livak and Schmittgen, 2001). *Actin1* [SlActin (SGN-U314757)] and *EIF-4A-2* (U213502) were used as internal controls for calculation of normalization factor using Genorm method. Primer sequences are detailed in supplemental Table S1.

Assay of enzyme activities

Extraction of enzymes. Proteins extraction was performed according to the method described by Murshed et al. (2008). Briefly, 125 mg of frozen fruit powder was homogenized in 1mL of 50mM MES/KOH buffer (pH=6.0) containing 40mM KCl, 2mM $CaCl_2$ and 1mM d'AsA for 3min at room temperature. Extracts were centrifuged at 4°C for 15min at 16 000g and the supernatants were analyzed immediately for enzyme activities.

Enzyme assays. APX, MDHAR, DHAR and GR activities were measured according to the method described by Murshed et al. (2008) slightly modified as following. Assays were realized at 28°C using a microplate sprectrophotometer Infinite 200® (Tecan, Switzerland) in an UV-microplate (Hellma) for APX and DHAR and in a plastic microplate (Nunc) for MDHAR and GR.

APX activity was measured in a reaction mixture containing 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.25 mM AsA, 25μL of enzymatic extract and 10μL of 50mM H_2O_2 (2.5mM) to start the reaction, in a final volume of 200μL. Activity was determined by measuring the disappearance of AsA at 290nm using an extinction coefficient of 2.8mM^{-1} cm^{-1}.

MDHAR activity was measured in a reaction mixture containing 100mM Hepes buffer (pH 7.6), 2,5mM AsA, 0.25mM NADH, 20μL of enzymatic extract and 5μL of 17U/mL ascorbate oxidase to start the reaction, in a final volume of 200μL. Activity was determined by measuring the disappearance of NADH at 340nm using an extinction coefficient of 6.22mM^{-1} cm^{-1}.

DHAR activity was measured in a reaction mixture containing 50mM Hepes buffer (pH 7.0), 0.01mM EDTA, 2.5mM GSH, 15μL of enzymatic extract and 15μL of 2.7mM dehydroascorbic acid (0.19mM) to start the reaction, in a final volume of 215μL. Activity was determined by measuring the appearance of AsA at 265nm using an extinction coefficient of 14mM^{-1} cm^{-1}.

GR activity was measured in a reaction mixture containing 50mM Hepes buffer (pH 8), 2,5mM AsA, 0.25mM NADPH, 30μL of enzymatic extract and 5μL of 20mM reduced

gluthatione (0.5mM) to start the reaction, in a final volume of 200μL. Activity was determined by measuring the disappearance of NADPH at 340nm using an extinction coefficient of 6.22mM^{-1} cm^{-1}.

We also measured catalase (CAT) activity, an enzyme scavenging H_2O_2 that may neutralize an excessive production of reactive oxygen species produced during oxidative stress. CAT activity was measured using a method adapted from that of (Aebi, 1984) in a reaction mixture containing 50mM phosphate buffer (pH 7.0), 7.5mM H_2O_2 and 20μL of enzymatic extract, in a final volume of 200μL. Activity was determined by measuring the disappearance of H_2O_2 at 240 nm using an extinction coefficient of 43.6M^{-1} cm^{-1}.

Extraction, derivation and analysis of fruit threonate content using GC-MS. Tomato fruit samples were extracted as described by (Roessner-Tunali et al., 2003) with slight modifications. 250mg of frozen fruit powder was homogenized and extracted with 3mL of methanol and 120μL of internal standard (0.2mg ribitol mL^{-1} water). The mixture was extracted for 15min at 70°C, mixed vigorously with 1.5mL of water and centrifuged at 2800g for 15 min. Then 5μL was taken and dried in vacuo for 3h. The dried residue was redissolved and derivatized for 2h at 37°C in 60μL of 60mg mL^{-1} methoxyamine hydrochloride in pyrimidine followed by a 30 min treatment at 37°C with 120μL MSTFA (*N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl)trifluoroacetamide. 10μL of retention time standard mixture (0.03% w/v time standard mixture (0.029% [v/v] n-dodecane, n-pentadecane,n-nonadecane, n-docosane dissolved in pyridin) was added before trimethylsilylation. Sample volumes of 1 μL were then injected into the GC column using a hot needle technique.

Standard substance of threonate used for peak identification was dissolved in water (0.5g L^{-1}). Different volumes of standard solution were dried in vacuo and derivatized with 60μL of 60mg mL^{-1} methoxyamine hydrochloride in pyridine and 120μL MSTFA as described above. The GC-MS system used comprised an AS 2000 autosampler, a TraceGC 2000 gas chromatograph, and a Polaris ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific). Gas chromatography was performed on a 30m VF5-MS Column with 0.25mm inner diameter and 0.25μm film thickness (Varian). Injection temperature was 230°C, the interface set to 250°C and the ion source adjusted to 200°C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1mL min^{-1}. The analysis was performed under the following temperature program, 5 min of isothermal heating at 70°C, followed by 5°C min^{-1} oven temperature ramp to 350°C and a final 5 min heating at 330°C. The system was then temperature equilibrated for 1min at 70°C before injection of the next sample. Mass spectra were recorded with a mass-to-charge ratio of

60 to 600 scanning range. Both chromatograms and mass spectra were evaluated using the Xcalibur program 1.2 (Thermo Scientific). The absolute concentration of threonate was calculated using calibration standard curve response ratio. The standard curve was obtained by derivation of various amounts of threonate, following the same protocol described for tissue samples, with ribitol as internal standard.

Statistical analysis

Analyses of variance considering two factors 'temperature' and 'light' and their interaction were performed. Significant differences among treatments were assessed using a Tukey test at 5 %.

Results

Impact of light at different temperature during fruit off-vine ripening on fruit external coloration (a/b) and fruit fresh weight

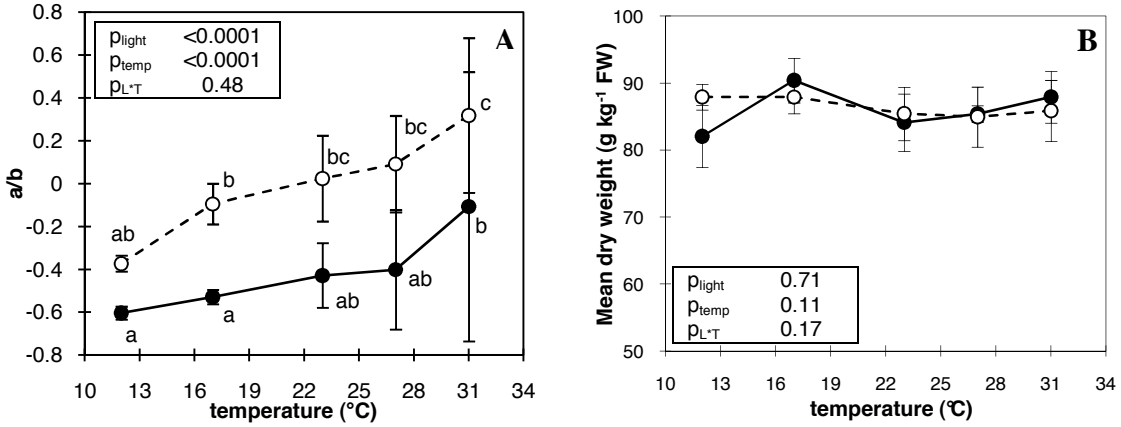


Figure 1. fruit external coloration determined from a/b ratio (A) and mean dry weight (B) of fruits after 56h in growth cabinet under darkness (—●—) or light (--○--) at different fruit temperatures. Data are means ±se of 4 replicates (corresponding to 12 fruits). P-values of the two way anova considering the factors light (p_{light}) and temperature (p_{temp}) and their interactions (p_{L*T}) were given in the tables. Different letters indicate significant differences (Tukey test, P<0.05)

The changes in external fruit color were assessed by the a/b ratio that was previously shown to linearly increase during tomato fruit ripening (Gómez et al., 1998, Gautier et al., 2008). In our study, we observed higher a/b ratios under light than in darkness although initial a/b ratio were similar (data not shown) suggesting a higher synthesis of lycopene under light (Fig. 1A). a/b ratio also increased with temperature whatever the irradiance likely due to faster maturation with higher temperature. Mean fresh weight at harvest were similar for fruit kept in darkness or under light and whatever the temperature (Fig. 1B).

Fruit vitamin C content after 56h in growth cabinet depends on light and temperature

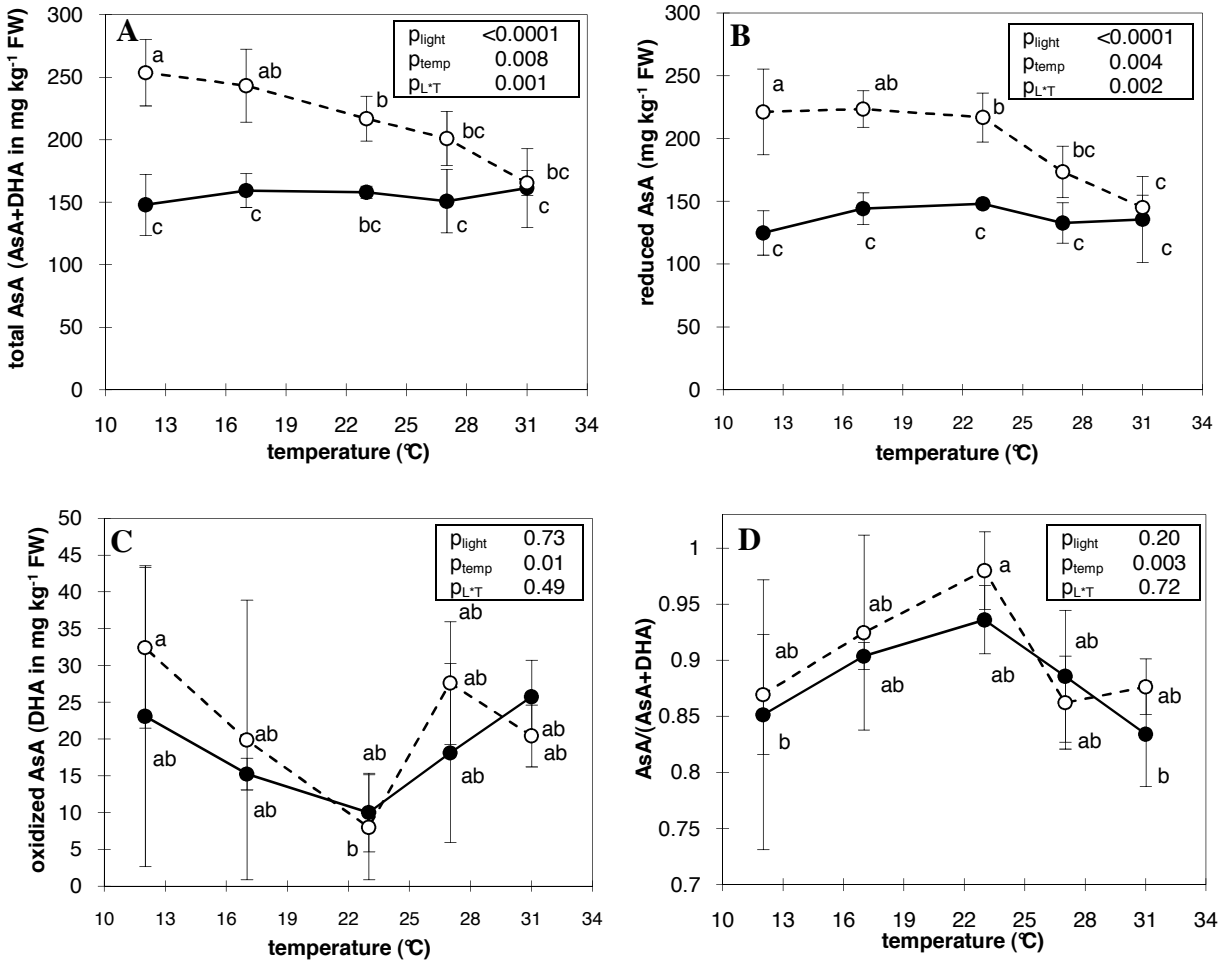


Figure 2. Total (AsA+DHA), reduced (AsA), oxidized (DHA) AsA content and the ratio reduced/total (AsA/(AsA+DHA)) in fruits after 56h in growth cabinet under darkness (-●-) or light (--○--) at different fruit temperatures. Data expressed in mg kg^{-1} fresh weight are means ±SD of 4 replicates (corresponding to 12 fruits). Legend similar to figure 1.

At harvest, total, reduced and oxidized AsA in fruits were not significantly different between successive experiments (around 150mg total AsA kg^{-1} FW, data not shown). After 56h in darkness, total, reduced and oxidized AsA content were not modified compared to initial value at harvest for the successive experiments at different temperature (data not shown). Moreover, oxidized AsA (DHA) content was also not modified by light. In contrast, under light, total and reduced AsA content were higher (up to 67% depending on fruit temperature, Fig. 2). The higher increase under light was observed at 12°C but light impact decreased as temperature increased so that at 31°C, there was no more increase in total and reduced AsA

content (Fig. 2). Although total and reduced AsA were higher under light, the redox ratio (AsA/(AsA+DHA) remained similar between darkness and light and not significantly different from the redox ratio at harvest suggesting that after harvest, changes in light environment do not affect fruit AsA redox state. We observed slight differences in redox state between harvest (particularly between fruits used for experiment at 23°C and 27°C) which may be due to difference in environmental factors the day before fruit harvest which were not controlled.

To understand the mechanisms of AsA content regulation with light and temperature, we further analyzed the transcript levels of genes involved in the major AsA biosynthesis pathway as an indicator of AsA synthesis, the enzyme activities of the AsA-GSH cycle involved in AsA recycling and the threonate content, a likely AsA degradation product.

Regulation of vitamin C metabolism by light and temperature

In darkness, the transcript level of the genes involved in the five last steps of AsA synthesis were low whatever the temperature indicating that ascorbate related gene expressions were weakly expressed (Fig. 3). Under irradiance, the transcript level increased compared to darkness. However, we observed two different patterns of responses: transcripts of *VTC2*, *GPP2* and *GalDH* increased similarly whatever the temperature experiment, whereas transcripts of *GME1*, *GME2*, *GPP1* and *GLDH*, transcript level only increased under light at 12°C.

Light response of AsA-GSH cycle enzyme activities strongly depends on temperature. At temperature lower that 23°C, light increased DHAR, MDHAR and APX while at temperature higher than 23°C, it did not modify or decrease these activities. GR activity did not vary with light except at 31°C where light decrease GR activity.

We observed opposite response to temperature of AsA oxidase and reductases: APX activity increased when temperature increased, whatever the irradiance conditions, while MDHAR and DHAR decreased suggesting a higher oxidation of AsA pool which could lead to higher degradation at high temperature as reductase activities are low. Catalase activity was increased by light and temperature suggesting a high need in detoxifying H_2O_2 in these conditions.

Threonate content increased from experiment at low temperature to experiment at higher temperature (Fig. 5). As threonate is one of the potential degradation products of AsA, these

results suggest a higher degradation of AsA content which could be due to high temperature or fruit ripening.

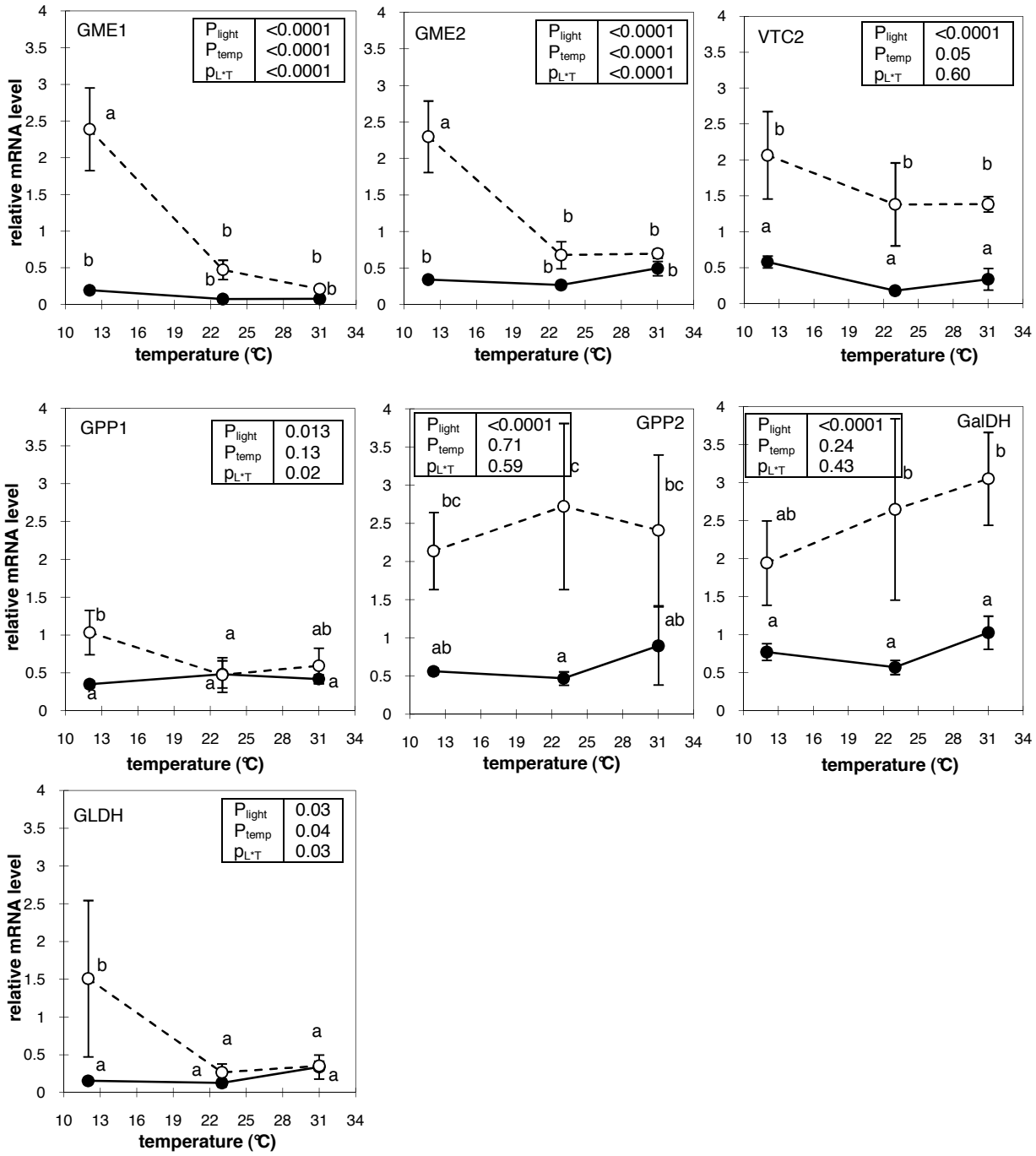


Figure 3. Transcript levels of genes of the AsA biosynthesis pathway in fruits after 56h in growth cabinet under darkness (–●–) or light (--○--). Data are the mean value ±SD of four replicates. Legend similar to figure 1.

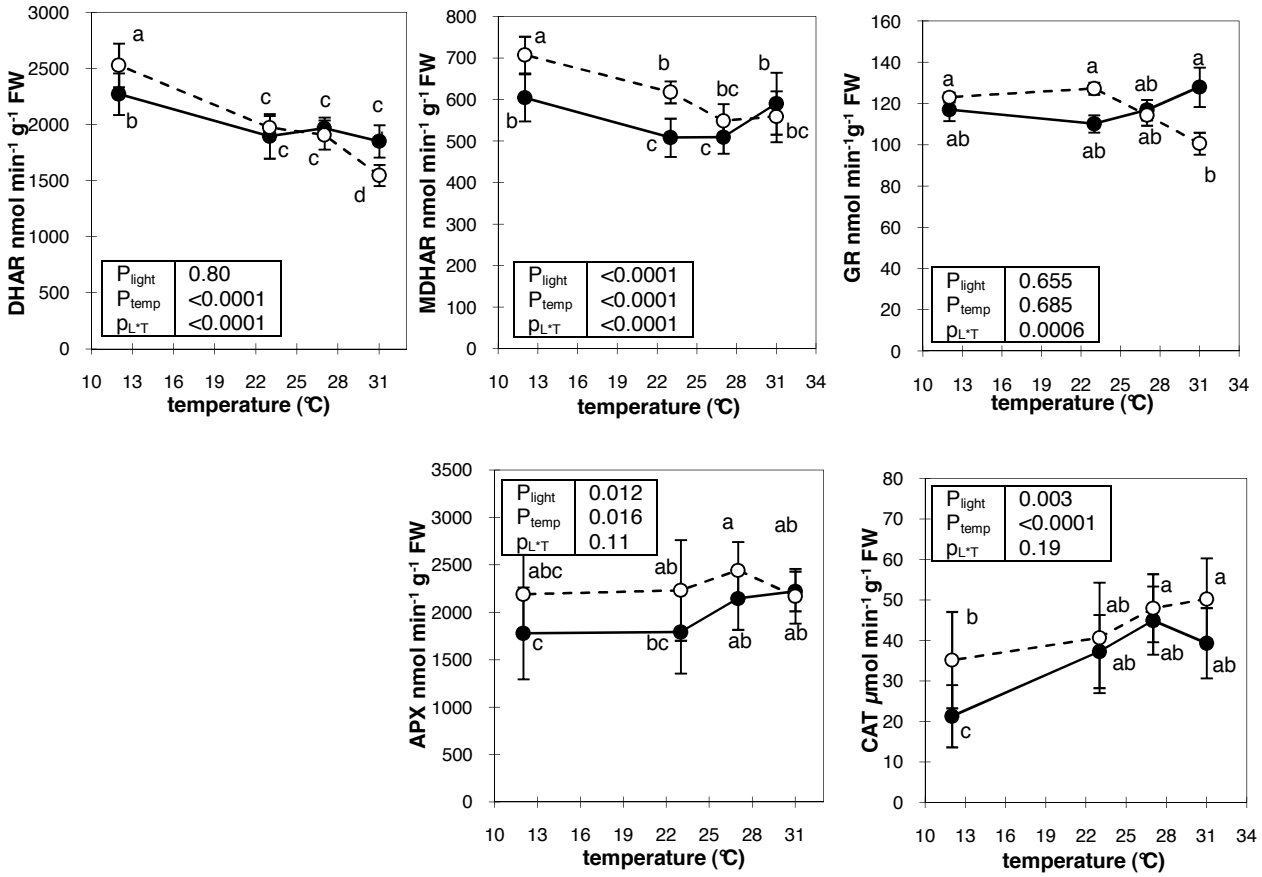


Figure 4. Transcript level of enzymes of the ascorbate/glutathione cycle in fruits after 56h in growth cabinet under darkness (–●–) or light (--○--) at different fruit temperatures. Data are the mean value ±SD of four replicates. Legend similar to figure 1.

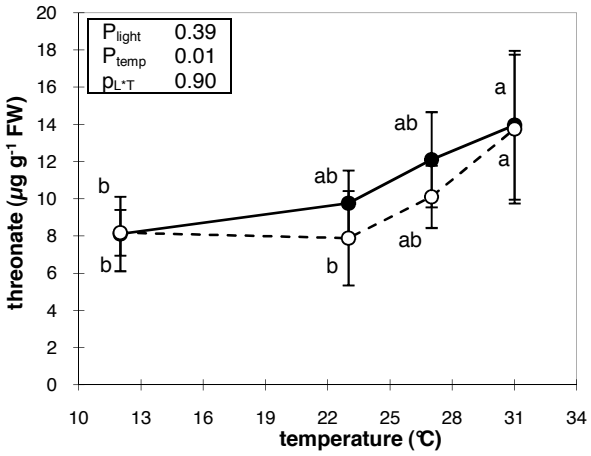


Figure 5. Threonate content in fruits after 56h in growth cabinet under darkness (–●–) or light (--○--) at different fruit temperatures. Data are means ±se of 4 replicates. Legend similar to Figure 1.

The figures 6A, 6B, 6C summarized significant changes in gene expression, enzyme activities or threonate content when comparing fruit kept in darkness and under light at 23, 31 and 12°C respectively. At 23°C, light increased fruit AsA content likely due to an increase in three genes of the AsA synthesis pathway combined to an increased AsA reduction (Fig. 6A). Studying fruit AsA regulation at higher temperature (31°C) showed that light did not increase AsA content despite an increased AsA synthesis gene expression likely due to lower recycling and higher degradation (Fig 6B). At 12°C, light induced a strong increase in the expression of the genes coding to the last five steps of AsA synthesis and in AsA recycling (both DHAR and MDHAR) leading to high fruit AsA content. In addition, these particular conditions increased APX and CAT activity suggesting a need to detoxify H_2O_2 likely due to oxidative stress. These results showed how temperature strongly interacts with light in fruit AsA regulation, directly or by its impact on fruit ripening.

Discussion

Vitamin C regulation by light in fruits

Lighted fruits during off-vine ripening contained up to 67% more AsA (total and reduced) than fruits kept in darkness. This is in agreement with data obtained during on-vine ripening where AsA content were lower for shaded plant (Venter, 1977, El-Gizawi et al., 1993) and confirmed the direct impact of light reaching the fruit itself on fruit ascorbate content (Gautier et al., 2008, Gautier et al., 2009). This increase in fruit AsA content was related to increased *VTC2*, *GPP2* and *GalDH* transcript level by light. The impact of irradiance on AsA synthesis related gene expression in fruits has only been reported once in apple by Li et al. (2009). However, the authors only studied the last two genes *GalDH* and *GLDH* which transcript level decreased in shaded fruits. The present data may be compared to different studies monitored to understand light regulation of AsA pool size in leaves (Dowdle et al., 2007, Yabuta et al., 2007). Briefly in leaves, light increased *GMP, VTC2, VTC5, GPP* transcript levels in Arabidospis leaves (Dowdle et al., 2007, Yabuta et al., 2007) while shading or darkness decreased *GLDH* expression in tobacco (Pignocchi et al., 2003), *Arabidopsis* (Yabuta et al., 2007) or apple leaves (Li et al., 2009b). In our study, we considered genes coding for step 6 (GME) to 10 (GLDH). VTC5 transcript level was very low in the fruits so

that we did not consider it in this study. Our study showed that the three genes increased by light in fruit are coding for three enzymes of the four last steps of AsA synthesis. Particularly, we found that *GalDH* transcript levels increased between darkness and light, such a response had never been reported in leaves. Moreover, in our experiment, *GLDH* transcripts coding for the final enzyme catalyzing AsA synthesis were not light regulated in tomato fruits contrary to the results of Li et al. (2009) in apple. Our results agreed with previous studies reporting that GLDH was not rate limiting in tomato and kiwifruit (Alhagdow et al., 2007, Bulley et al., 2009). We underlined that AsA recycling plays an important role in maintaining AsA levels as previously shown in transgenic plants over-expressing DHAR, enzyme involved in the recycling of oxidized AsA (Chen et al., 2003). The study of AsA-GSH cycle enzyme activities showed increased APX and MDHAR activities with light exposure at 23°C and 12°C as previously shown by Torres et al. (2006) and Li et al. (2009) in tomato and apple fruits. These results suggest a higher use and recycling of AsA under light that could be explained by the role of AsA in photoprotection (Conklin, 2001). In contrast at 31°C, light did not increase APX and MDHAR activities. The absence of light regulation of APX and MDHAR at 31°C may be related to inhibition at high temperature as reported in leaves of tomato by Rivero et al. (2004) after 30 days at 35°C.

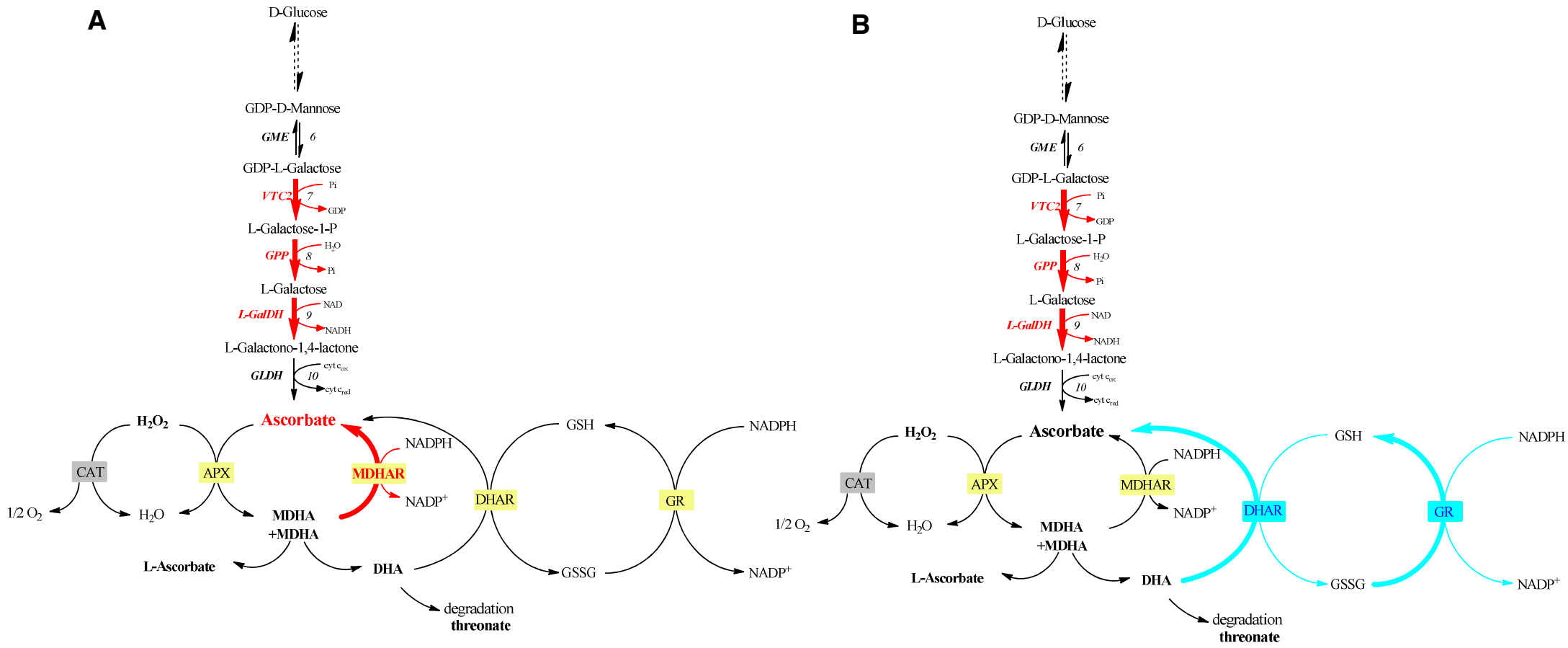


Figure 6. AsA regulation at 23°C (A), 31°C (B) and 12°C (C) for fruits moved from darkness to light. A blue color (red color respectively) indicates a significant increase (decrease respectively) assessed by Tukey test (P=0.05). We investigated the impact on vitamin C synthesis by quantifying transcript levels of vitamin C biosynthetic genes, vitamin C recycling by measuring recycling enzymes activity in vitro and vitamin C degradation by assaying threonate content.

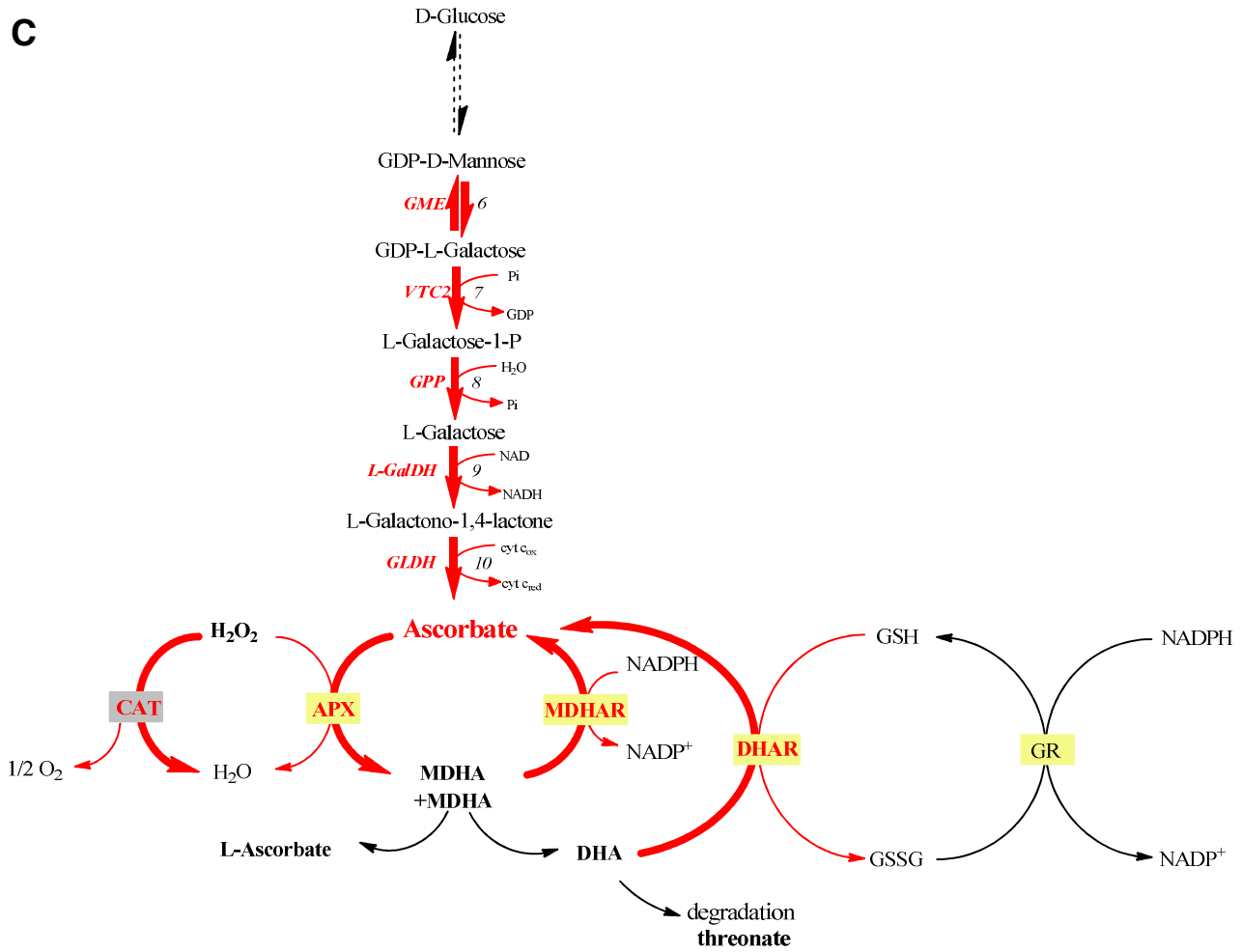


Figure 6. AsA regulation at 23°C (A), 31°C (B) and 12°C (C) for fruits moved from darkness to light. A blue color (red color respectively) indicates a significant increase (decrease respectively) assessed by Tukey test (P=0.05). We investigated the impact on vitamin C synthesis by quantifying transcript levels of vitamin C biosynthetic genes, vitamin C recycling by measuring recycling enzymes activity in vitro and vitamin C degradation by assaying threonate content.

Vitamin C and oxidative stress

Increasing irradiance under low temperature increased the transcripts of the genes coding the five last steps of vitamin C synthesis coupled with increased activity of both MDHAR and DHAR leading to high fruit vitamin C content (+67% compared to fruit at darkness). This result showed that light at low temperature stimulates AsA content and AsA metabolism likely due to photo-oxidation occurring in these conditions (Wise and Naylor, 1987, Foyer et al., 1994b). This hypothesis was supported by the increase of APX and CAT activity, two enzymes that helped to scavenge H_2O_2 meaning that the content of reactive oxygen species should be high.

Moreover, we observed that CAT activity increased with temperature that could be due to direct impact of temperature triggering oxidative stress in fruits (Torres and Andrews, 2006, Chen et al., 2008) or to ripening which is associated with increased oxidative stress in fruit (Martin et al., 1979).

Vitamin C regulation by temperature

Analysis of vitamin C content regulation by temperature was not possible in the present experiment as temperature affects developmental rate that strongly influenced vitamin C content (Massot et al., 2010) and vitamin C metabolism in tomato fruit (Torres and Andrews, 2006, Alhagdow et al., 2007, Ioannidi et al., 2009). So that interpretation of temperature effect on AsA regulation may be distorted by developmental variations. An important result is the high threonate content found at 31°C supposing that threonate is vitamine C degradation product, this result may indicate a higher degradation at higher temperature as previously suggested by (Richardson et al., 2004, Gautier et al., 2008) unlikely due to developmental variations as threonate content decrease during ripening in tomato (Carrari et al., 2006).

Conclusion

This study on off-vine ripening fruit showed that direct light regulation on fruit was important and could lead to strong vitamin C content variations in interaction with temperature. The specific impact of temperature on fruit vitamin C content remained hard to study because of temperature impact on developmental stage. Further experiments are still needed to clarify the impact of temperature either by studying the impact of temperature at short time (after few hours) supposing that this impact on vitamin C variations is fast or by using thermal time as developmental scale and harvesting fruit at the same developmental stage which could be then compared.

Acknowledgements

We are grateful to the greenhouse experimental team and to Michel Pradier for taking care of the plants and technical support during harvest. We thank Sylvie Sérino for ascorbate analyses, Doriane Bancel for enzymes activities, Guy Costagliola for threonate analyses and Cécile Garchery for her help with RT-QPCR.

supplemental Table S1. Sets of PCR primers used to amplify specific regions of ascorbate-related genes and reference genes with the corresponding accession number.

Name		Primer sequence 5' → 3'	Accession number
GMP1F	Forward	CATTGTCCTGCCAAACAAGA	SGN-
GMP1R	Reverse	AAAGGGCACTGCCAAATTC	U315592
GMP2F	Forward	CCCACAAGGAGATCAAATC	SGN-
GMP2R	Reverse	TGAAACTGAAAACCAACCAAA	U313112
GMP3F	Forward	TGGTTGGTTTCCAGTTCTCC	SGN-
GMP3R	Reverse	CAAAAATTACACATTTCCCAGTCTT	U313111
GMP4F	Forward	TTCTCCGTCGCCATTTTTAC	SGN-
GMP4R	Reverse	CAGCCTTGTTCCAAAACCTC	U329408
GME1F	Forward	ATTGGAAGCCAATCCATCTG	SGN-
GME1R	Reverse	AAACCAAGAAACGCCAACAA	U314898
GME2F	Forward	TTGTTCGCGTGGAATGTTTA	SGN-
GME2R	Reverse	GTAGGTGCAATGAGGGGATG	U314369
GGP1F		AAGGCAAAACCATGTTCAATG	SGN-
GGP1R	Forward	ATGGGTCATTTCACACACCA	U312646
GGP2F		TGGAGGTTGTAATCCCCAAA	SGN-
GGP2R	Forward	GCACAGTCAAAACACCAACAA	U316430
GPP1F		TAGCCGCTACAAACCCTCAT	SGN-
GPP1R	Forward	TCCGCTTTCCATCTCCTATG	U345930
GPP2F		GGCCTTGAATGAATAAGAATGA	SGN-
GPP2R	Forward	GCACATCGCGCAAAACTAT	U317967
GalDHF	Forward	TGTTTGTCAGTTCAACGAGGTC	SGN-
GalDHR	Reverse	TTGTTTTAGATGTCCAAGTGCAA	U319047
GLDHF	Forward	TTGCGAGGAAATTTTTGTCC	SGN-
GLDHR	Reverse	CTTGAAAAATGGCCTCAAGC	U317657
ActinF	Forward	GGACTCTGGTGATGGTGTTAG	SGN-
ActinR	Reverse	CCGTTCAGCAGTAGTGGTG	U314757
EIF-4A-2F	Forward	GATCAGCGTATCCTTCAGAG	U213502
EIF-4A-2R	Reverse	GGCATTGTAGCAGAGAAAAC	

Chapitre 5

Vers un modèle simplifié de la teneur en vitamine C totale dans les fruits de tomate

CHAPITRE V : Vers un modèle simplifié de la teneur en vitamine C totale dans les fruits de tomate

Les chapitres précédents ont montré la complexité des mécanismes de variation des teneurs en la vitamine C dans le fruit. Ainsi, nous avons vu qu'il existait des dynamiques différentes d'accumulation de la vitamine C au cours du développement du fruit, avec un génotype à gros fruit qui accumule de la vitamine C essentiellement dans les premiers stades de croissance du fruit, et un génotype de type cerise pour lequel la vitamine C s'accumule à la fois dès le début de croissance du fruit mais également de façon considérable pendant la maturation. Cette complexité nous a conduits à proposer un modèle simplifié d'accumulation de la vitamine C totale. Ce modèle est basé sur des hypothèses simplificatrices où le transport et le recyclage n'interviennent pas dans les modifications du pool de vitamine C et permet d'appréhender l'élaboration de ce caractère complexe au cours du développement du fruit. Cette partie présente les résultats préliminaires d'un travail de modélisation en cours de réalisation.

Dans les chapitres précédents, nous avons pu démontrer que la régulation de la vitamine C dans les fruits de tomate était complexe variant de manière importante avec le stade de développement et l'environnement. Les variations de vitamine C dans le fruit résultent des variations des différents processus de synthèse, de recyclage et de dégradation contrôlant le pool de vitamine C, auxquels peuvent venir s'ajouter des transports en provenance des feuilles. Chez la tomate, les expériences d'ombrages sélectifs ont permis de mettre en évidence l'importance de la synthèse du fruit par rapport aux transports en provenance des feuilles sur les variations de teneur en vitamine C (voir chapitre II).

L'objectif de la modélisation est de mieux appréhender l'élaboration du caractère complexe qu'est la vitamine C à l'échelle du fruit.

Variations des teneurs en vitamine C totale pendant le développement du fruit de tomate

1. Objectif et données expérimentales

Cette première partie a pour objectif de prédire le pool total de vitamine C au cours du développement du fruit comme une fonction de sa synthèse et de sa dégradation. Nous avons pour cela utilisé deux jeux de données recueillis sur deux génotypes différents *Solanum lycopersicum* 'Cervil' tomate de type cerise et *Solanum lycopersicum* 'Levovil' tomate de calibre intermédiaire. Les conditions de culture des plantes et les données sont présentées dans le chapitre I. Les fruits ont été prélevés tous les 3 jours pendant l'ensemble du développement de 6 à 58 jours après anthèse (JAP) pour 'Cervil' et de 9 à 67 JAP pour 'Levovil' sur deux bouquets différents (B6 et B7 pour 'Cervil' et B2 et B3 pour 'Levovil'). Ces données sont disponibles pour deux traitements de charge différents, une charge forte (20 et 5 fruits par bouquet pour 'Cervil' et 'Levovil' respectivement) et une charge faible (5 et 2 fruits par bouquet pour 'Cervil' et 'Levovil' respectivement).

2. Construction du modèle

Dans cette partie, nous allons, dans un premier temps, exposer les hypothèses simplificatrices qui ont conduit à la construction du modèle puis, nous verrons l'estimation des paramètres du modèle et enfin nous testerons l'hypothèse de l'absence de limitation par les sucres de la synthèse de vitamine C.

2.1.Hypothèses simplificatrices

Ce modèle concerne le pool total de vitamine C au cours du développement du fruit sans distinguer les formes réduites ou oxydées de la vitamine C, ni le recyclage, et en négligeant les transports entre feuilles et fruits. En s'inspirant de la voie majeure de biosynthèse de la vitamine C dans les plantes qui part du D-glucose, nous avons supposé que la quantité de vitamine C synthétisée (molécule en C6) dans les fruits était dépendante de la quantité de sucres (nous utiliserons ici les hexoses c'est-à-dire glucose+fructose). Par ailleurs, la quantité de vitamine C dégradée est considérée comme dépendante de la taille du pool de vitamine C comme observé par marquage par Pallanca et Smirnoff (2000).

Ainsi, la variation de vitamine C totale dans les fruits à un temps *t* (nombre de jour après anthèse, JAA) peut être exprimée comme suit:

$$\frac{dVitC}{dt} = k \cdot Sucres - g \cdot VitC \ (1)$$

où VitC est la quantité de vitamine C totale dans le fruit (en mg)

k le taux relatif de synthèse (en J^{-1}),

g le taux relatif de dégradation (en J^{-1}),

"Sucres" représente la quantité de glucose+fructose dans le fruit (en mg)

Le pas de temps considéré est le jour

On peut calculer l'évolution de la concentration en vitamine C (c'est-à-dire [VitC]=VitC/Volume) si l'on exprime l'équation (1) en prenant en compte le volume du fruit. Les variations de vitamine C au cours du développement sont alors dépendantes des modifications de la quantité de vitamine C totale et des variations de volume du fruit :

$$\frac{d[VitC]}{dt} = \frac{dVitC}{dt} \cdot \frac{1}{Volume} - \frac{[VitC]}{Volume} \cdot \frac{dVolume}{dt} \ (2)$$

Si on utilise alors l'équation (1), on a :

$$\frac{d[VitC]}{dt} = k \cdot [Sucres] - \left(g + \frac{1}{Volume} \cdot \frac{dVolume}{dt}\right)[VitC] \ (3)$$

La masse fraîche (MaF) peut être utilisée comme indicateur du volume du fruit (en supposant la densité du fruit constante pendant le développement). On obtient alors à partir de l'équation (3):

$$\frac{d[VitC]}{dt} = k \cdot [Sucres] - \left(g + \frac{1}{MaF} \cdot \frac{dMaF}{dt}\right)[VitC] \ (4)$$

Avec [Sucres] en mg/100g MF et [VitC] en mg/100g MF

2.2.Estimation des paramètres *k* et *g* au cours du développement du fruit

La qualité de l'ajustement entre le modèle et les valeurs observées est obtenue en calculant les différences entre les valeurs observées (y) et les valeurs estimées par le modèle (ŷ). Ce calcul correspond au RMSE (root mean square error) soit la racine carrée de l'erreur quadratique :

$$RMSE = \sqrt{E((y - \hat{y})^2)}$$

Plus cet indicateur est faible et plus les valeurs modélisées sont proches des valeurs prédites. Avec *k* et *g* constant, l'ajustement obtenu pour les deux génotypes n'est pas très satisfaisant et les valeurs des paramètres sont incohérentes avec les données bibliographiques. Par exemple, pour 'Cervil' le meilleur ajustement est obtenu pour un taux relatif de dégradation proche de zéro (Figure 1) ce qui est en contradiction avec les observations de Pallanca et Smirnoff (2000) qui suggèrent que la vitamine C se renouvelle rapidement dans les feuilles (13% du pool d'AsA dégradé par heure).

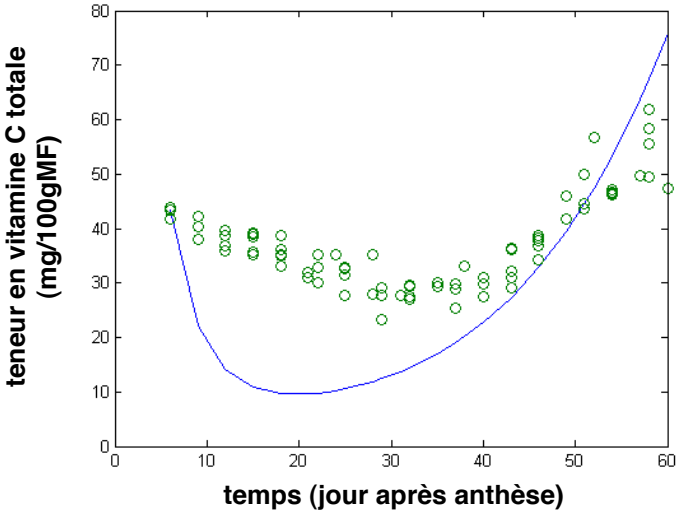


Figure 1 : Teneurs en vitamine C observées (○) et estimées (—) (en mg/100g MF) par le modèle (équation 4) avec des taux relatifs de synthèse *k* et de dégradation *g* constants pour 'Cervil'(B6+B7, faible charge) (RMSE=16.57).

La mauvaise qualité de l'ajustement laisse supposer que le taux relatif de synthèse et le taux relatif de dégradation peuvent dépendre du stade de développement du fruit. La dégradation ayant été très peu étudiée jusqu'à présent, nous avons considéré, dans un premier temps, que le taux relatif de dégradation *g* était constant au cours du développement. Par ailleurs, des études ont montré que l'expression des gènes de la voie de biosynthèse variait au cours du développement du fruit de tomate (Alhagdow et al., 2007, Ioannidi et al., 2009). Si on suppose g constant et connu, on peut déterminer l'expression de la dépendance temporelle du taux de synthèse *k* à partir des mesures de vitamine C, de masse du fruit et de sucres :

$$k = \left[\frac{d[VitC]}{dt} + [VitC] \cdot \left(g + \frac{1}{MaF} \cdot \frac{dMaF}{dt}\right)\right] \cdot \frac{1}{[Sucres]} \quad (5)$$

Le taux relatif de dégradation *g* est en première estimation déterminé par la pente initiale entre les deux premiers points de prélèvements ce qui correspond à $g = 0.02\ J^{-1}$ pour 'Cervil' et $g = 0.14\ J^{-1}$ pour 'Levovil'.

Pour chacun des génotypes, nous avons obtenu un taux de synthèse qui diminue avec le temps et qui peut être estimé par l'équation suivante (figure 2) :

$$k(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1 \ (6)$$

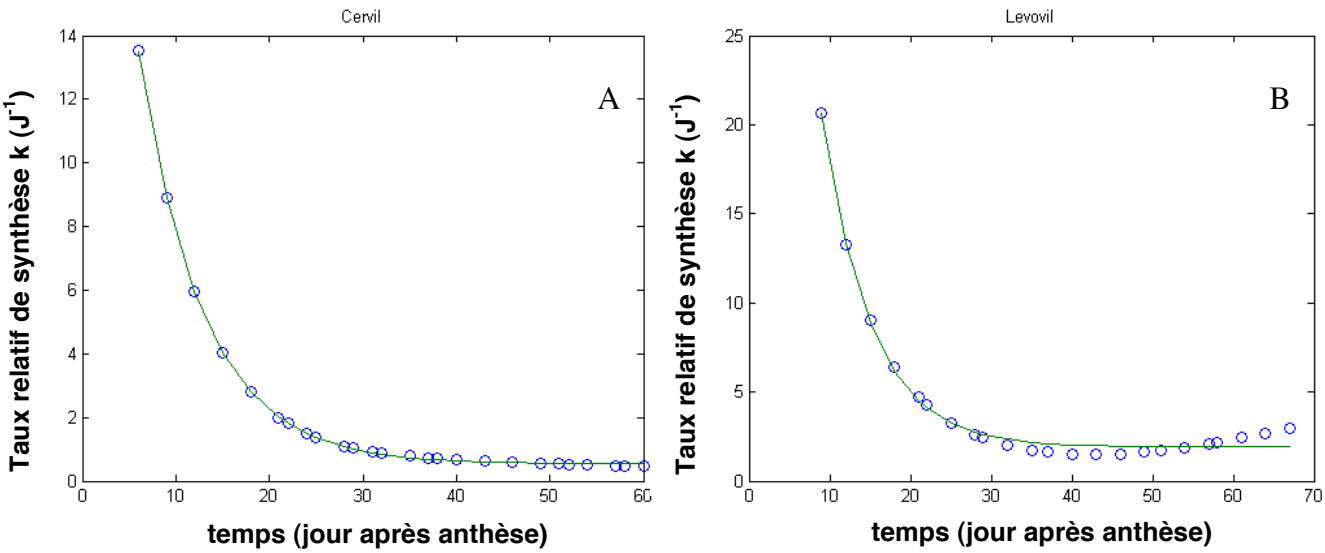


Figure 2 : Evolution du taux relatif de synthèse k pendant le développement du fruit pour 'Cervil' (A) et 'Levovil' (B). k calculés à partir des données en vitamine C, masse fraîche et sucres mesurées en faible charge (○) et estimés (—) par la fonction $k(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1$.

Cette diminution du taux de synthèse au cours du développement du fruit est cohérente avec les données bibliographiques rapportées par Ioannidi et al. (2009) qui trouvent que l'expression de la majorité des gènes de la voie de biosynthèse diminue au cours du développement de la tomate.

En utilisant cette expression de *k(t)* nous avons estimé tous les paramètres (k_0, a, k_1 et g) à partir des données vitamine C en faible charge puis avons évalué la qualité du modèle prédisant les concentrations à partir du RMSE sur nos deux génotypes. La qualité de l'ajustement obtenu est bonne pour 'Cervil' (RMSE=3.39, Figure 3A). En revanche, la qualité de l'ajustement est un peu moins bonne pour 'Levovil' (RMSE=7.5, Figure 3B) en partie due à des données plus bruitées pour ce génotype.

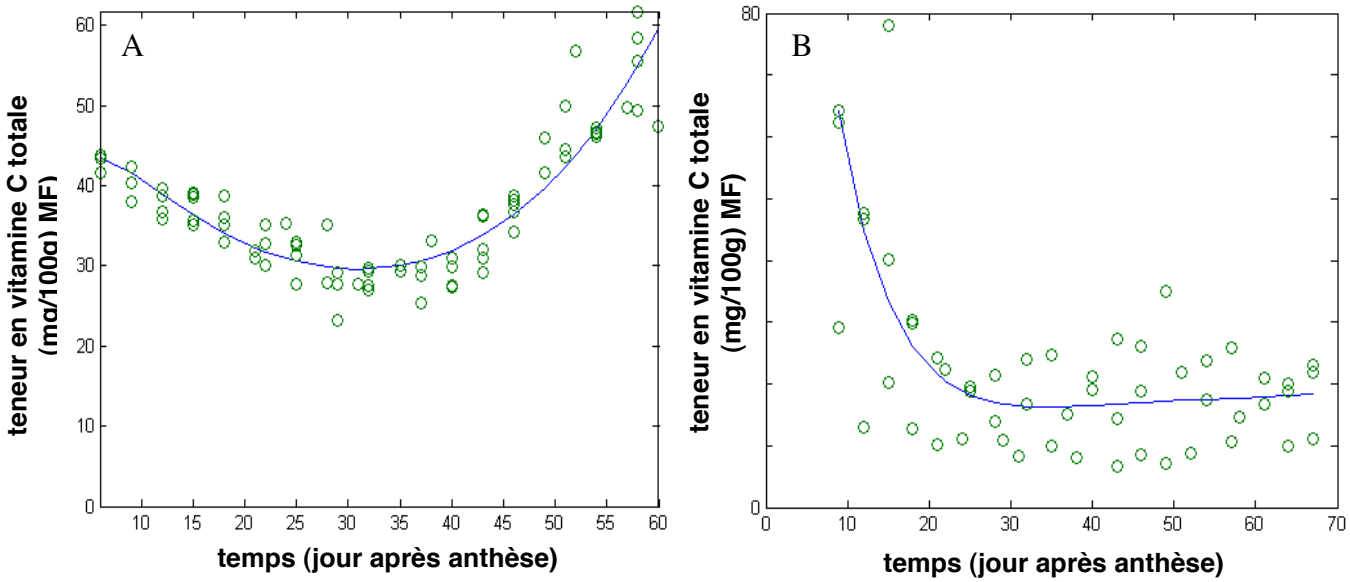


Figure 3 : Teneurs en vitamine C observées (○) et estimées (—) (en mg/100g MF) par le modèle (équation 4) pour 'Cervil' (A, données des bouquets 6 et 7, faible charge) et 'Levovil' (B, données des bouquets 2 et 3, faible charge) avec un taux relatif de synthèse $k(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1$. Les paramètres estimés pour 'Cervil' sont k_1=0,54.10^{-3} ; k_0= 1,36. 10^{-3} ; g=0,0198 ; a=6,75 et 'Lévovil' k_1=0,0016 ; k_0= 0,009 ; g=0,132 ; a=4,80 dans cette première approche, l'estimation de ces paramètres doit encore être améliorée.

2.3.Importance de la disponibilité en sucres sur la concentration en vitamine C totale

Nous avons montré au chapitre I une absence probable de limitation par les sucres de la synthèse de vitamine C. Dans cette partie, notre objectif est alors d'utiliser la modélisation pour tester la dépendance aux sucres de la synthèse de vitamine C avec le modèle suivant :

$$\frac{d[VitC]}{dt} = V - \left(g + \frac{1}{MaF} \cdot \frac{dMaF}{dt}\right)[VitC] \quad (7)$$

Comme précédemment, le taux de dégradation est estimé constant et déterminé en première approximation par la pente initiale entre les deux premiers points de prélèvements. Le taux de synthèse est fonction du développement du fruit et a été calculée sur les données obtenues en faible charge. Dans le modèle sans sucres, le taux de synthèse augmente légèrement en fin de

développement pendant la maturation (Figure 4). La meilleure expression mathématique du taux de synthèse V a été déterminée :

$$V(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1 t \ (8)$$

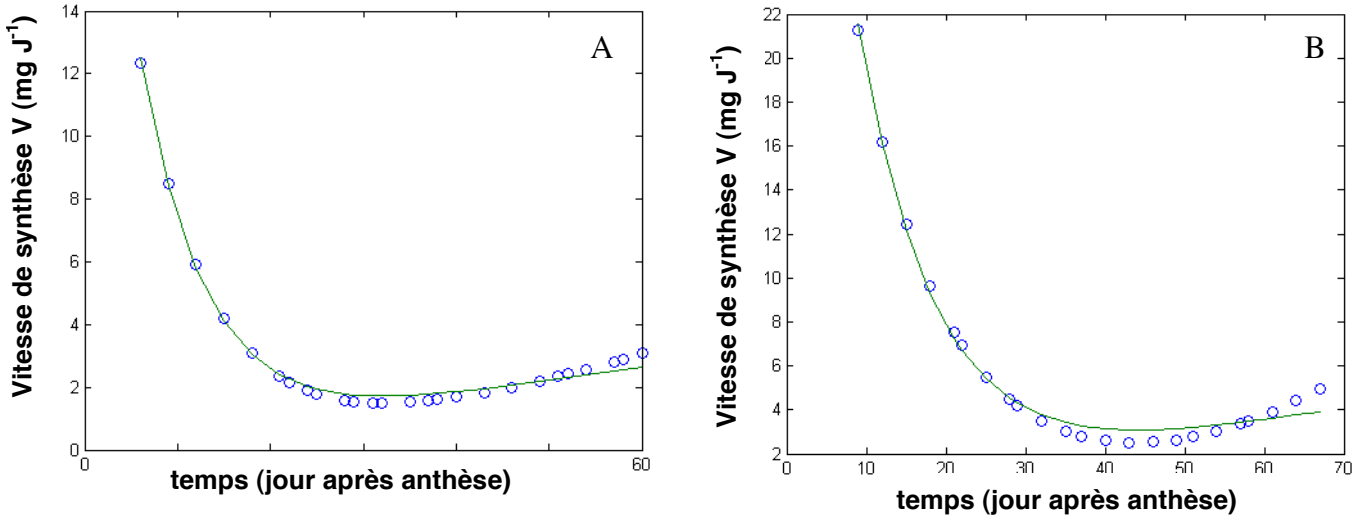


Figure 4 : Evolution du taux de synthèse V(t) pendant le développement du fruit pour 'Cervil' (A) et 'Levovil' (B). V calculées (○) et estimées (—) par la fonction $V(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1 t$.

Nous avons d'abord estimé les paramètres sur les données en faible charge, puis nous avons utilisé ces paramètres avec les données sucres et masse fraîche en forte charge pour estimer les teneurs en vitamine C à forte charge afin de déterminer l'impact d'un changement de la disponibilité en sucres (en forte charge) sur les concentrations en vitamine C. La qualité de prédiction montre que pour toutes les données récoltées sur 'Cervil', le modèle sans la dépendance sucre donne les meilleurs résultats (RMSE les plus faibles, tableau 1). Par ailleurs, lorsque la synthèse est indépendante des sucres, il y a un bon ajustement aux données (Figure 5). Nous en déduisons que les sucres ne sont pas limitants dans nos conditions.

Tableau 1 : RMSE calculés sur les données en forte charge sur 'Cervil' (B6 : bouquet 6, B7 : bouquet 7) en utilisant les paramètres estimés sur les données en faible charge. $k(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1$ et $V(t) = k_0 exp^{\frac{-t}{a}} + k_1 t$.

Data	Modèle avec sucres et k(t)	Modèle sans sucres et V(t)
B6	20.81	9.65
B7	17.63	5.20
B6+B7	18.48	5.67

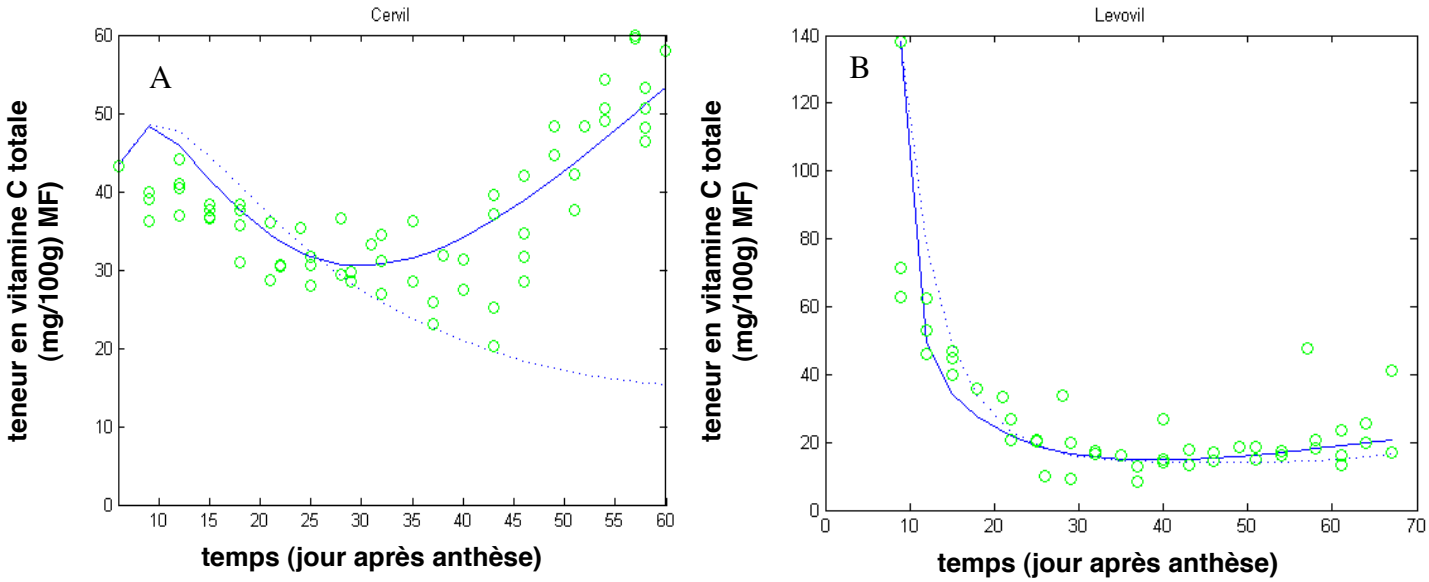


Figure 5 : Comparaison des teneurs en vitamine C observées (○) et prédites (en mg/100g MF) pour 'Cervil' (A) (bouquets 6 et 7 en forte charge) et 'Levovil' (B) (bouquet 3) par le modèle sucres (……) et le modèle sans sucres (-) dont les paramètres ont été estimés sur les données obtenues en charge faible. Les paramètres pour 'Cervil' estimés sur les données en faible charge sont k_1=13,94 ; k_0= 0,043 ; g=0,02 ; a=6.4 et pour 'Levovil' k_1=0,125 ; k_0= 33,78; g=0,31 ; a=8.44 dans cette première approche, l'estimation de ces paramètres doit être encore améliorée.

3. Conclusion et perspectives

En conclusion, cette première approche permet une modélisation des variations des teneurs en vitamine C totale au cours du développement du fruit. Avec le modèle proposé, le taux de synthèse varie de manière importante au cours du développement. L'utilisation des sucres pour réguler la synthèse de la vitamine C ne permet pas de rendre compte des résultats mesurés sur les deux jeux de données forte et faible charge. Les sucres peuvent donc être considérés comme non limitants pour la synthèse de vitamine C comme nous l'avons par ailleurs démontré dans le chapitre I. Le modèle proposé considère le taux de dégradation constant et le taux de synthèse variable avec le temps. D'après la bibliographie décrivant l'expression des gènes de la voie de biosynthèse de l'AsA chez la tomate au cours du développement, il semblerait que la synthèse soit effectivement dépendante du temps. Cependant, l'absence d'étude sur la dégradation ne nous permet pas de conclure quant à dépendance au temps de la dégradation. Ainsi, un modèle avec des taux de dégradation et de synthèse dépendant du temps $g = g(t)$ et $k = k$ (t) pourrait être envisagé et comparé au modèle proposé au niveau de la qualité de prédiction. Enfin, le modèle obtenu doit être validé avec un nouveau jeu de données indépendant.

Impact de la température et du rayonnement sur la teneur en vitamine C du fruit de tomate

1. Objectif et données expérimentales

Dans cette deuxième partie, nous avons cherché à modéliser, pour un stade de développement donné (fruits au stade tournant), l'impact de la lumière et de la température sur la teneur en vitamine C dans les fruits. L'objectif de ce modèle est d'évaluer l'influence de chacun de ces facteurs sur la synthèse et la dégradation de la vitamine C. Ce modèle est à une échelle de temps plus courte avec un pas de temps qui est l'heure. Pour construire ce deuxième modèle, nous avons utilisé les données recueillies sur le génotype 'WVa106'. Les expérimentations ont été réalisées en chambre climatique sur des fruits détachés. Les conditions de culture et les données sont présentées dans le chapitre IV. Les fruits étaient mis en chambre très tôt le matin (en fin de nuit) à différentes combinaisons de température et de rayonnement constants puis récoltés au bout de 56h.

2. Construction du modèle

2.1.Hypothèses simplificatrices

Pour ce modèle, nous avons étudié, comme précédemment, le pool total de vitamine C, sa synthèse et sa dégradation sans prendre en compte le recyclage et les différentes formes de la vitamine C. De plus, le modèle retenu ne tient pas compte de la teneur en sucres qui ne semble pas limitante pour la synthèse de vitamine C. Le poids du fruit est considéré comme constant pendant les 56h de l'expérimentation. Le fruit étant détaché de la plante, son poids ne peut que diminuer par transpiration ou respiration. Nous avons veillé à limiter les variations de poids par transpiration en utilisant une humidité relative importante et en couvrant la cicatrice pédonculaire. Les variations de synthèse de vitamine C liées au stade de développement sont négligées (c'est-à-dire que le taux de synthèse est considéré constant en fonction du temps mais peut varier avec le rayonnement ou la température). Par conséquent le modèle proposé se présente sous la forme suivante :

$$\frac{d[VitC]}{dt} = V - g \cdot [VitC] \text{ (9)}$$

où les taux de synthèse '*V*' et de dégradation '*g* 'peuvent dépendre de la température (T) et du rayonnement (R) c'est-à-dire : V = *V(T,R)* et/ou *g = g(T,R)*

le pas de temps considéré est l'heure

2.2. Impact du rayonnement et de la température sur les taux de synthèse et de dégradation de la vitamine C

Nous avons testé différentes hypothèses sur l'impact du rayonnement et de la température sur le taux de synthèse et de dégradation de la vitamine C :

- Une dépendance stricte à la température de la dégradation et/ou de la synthèse (modèles 1-2)
- Une dépendance stricte au rayonnement de la synthèse et/ou de la dégradation (modèles 3-5)
- Un effet combiné de la température et du rayonnement (modèles 6-11):
    - une réponse de type seuil (réponse tout ou rien) pour le rayonnement (modèles 6-8) couplée à une réponse linéaire à la température
    - une dépendance du rayonnement sur la synthèse et de la température sur la dégradation (modèle 9)
    - une combinaison linéaire des deux facteurs (modèles 10-11)

Les RMSE obtenus pour ces différents modèles sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : RMSE calculés pour les différents modèles proposés avec des fonctions de dépendance des taux de synthèse et de dégradation au rayonnement et à la température différents. $s^+(R)$ est une fonction positive de type seuil ($s^+(R) = \begin{Bmatrix} 1\ R > \theta \\ 0\ R < \theta \end{Bmatrix}\ avec\ \theta = 5\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$) ; *b*, *c*, *d*, g_0 sont des paramètres constants.

n° modèle	*V*	*g*	RMSE	nb de paramètres
1	constant	$g_0 \cdot T + d$	≥ 4.30	3
2	$b \cdot T + c$	$g_0 \cdot T + d$	≥ 4.30	4
3	$b \cdot R + c$	constant	3.6	3
4	constant	$g_0 \cdot R + d$	≥ 4.7	3
5	$b \cdot R + c$	$g_0 \cdot R + d$	3.4	4
6	$(b \cdot T + c) \cdot s^+(R)$	constant	≥ 8	3
7	constant	$(g_0 \cdot T + d) \cdot s^+(R)$	No fit	3
8	constant	$(g_0 \cdot T) \cdot s^+(R) + d$	4.7	2
9	$b \cdot R + c$	$g_0 \cdot T + d$	2.6	4
10	$b \cdot T + c \cdot R + d$	constant	2.65	4
11	$b \cdot T + c \cdot R + d$	$g_0 \cdot T$	2.65	4

Les meilleurs modèles (RMSE les plus faibles) sont les modèles 9 à 11 (dépendance linéaire de k et g à la température). Les teneurs en vitamine C observées et simulées sont représentées pour les trois modèles dans la figure 6. Après ajustement des paramètres, on obtient pour ces trois modèles :

$$\frac{d[VitC]}{dt} = 0{,}038 \cdot R + 20 - (0{,}018 \cdot T + 0{,}88) \times [VitC] \quad (modèle\ 9)$$

$$\frac{d[VitC]}{dt} = -0{,}265 \cdot T + 0{,}025 \cdot R + 20 - 0{,}88 \times [VitC] \quad (modèle\ 10)$$

$$\frac{d[VitC]}{dt} = 24{,}94 \cdot T + 0.87 \cdot R + 0.004 - (1.54 \cdot T) \times [VitC] \quad (modèle\ 11)$$

A la lumière des résultats présentés dans le chapitre IV, il semblerait que la dégradation de la vitamine C soit dépendante de la température ce qui nous conduirait à privilégier les modèles 9 et 11. Cependant dans ces deux modèles, les lois empiriques traduisant une dépendance linéaire de la synthèse à la température et au rayonnement ne sont pas en adéquation avec les variations de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse que nous avons mesurées. Par

conséquent, des ajustements sur la réponse de la synthèse à la température et à la lumière doivent être envisagés (avec d'autres types de dépendances à la lumière et à la température).

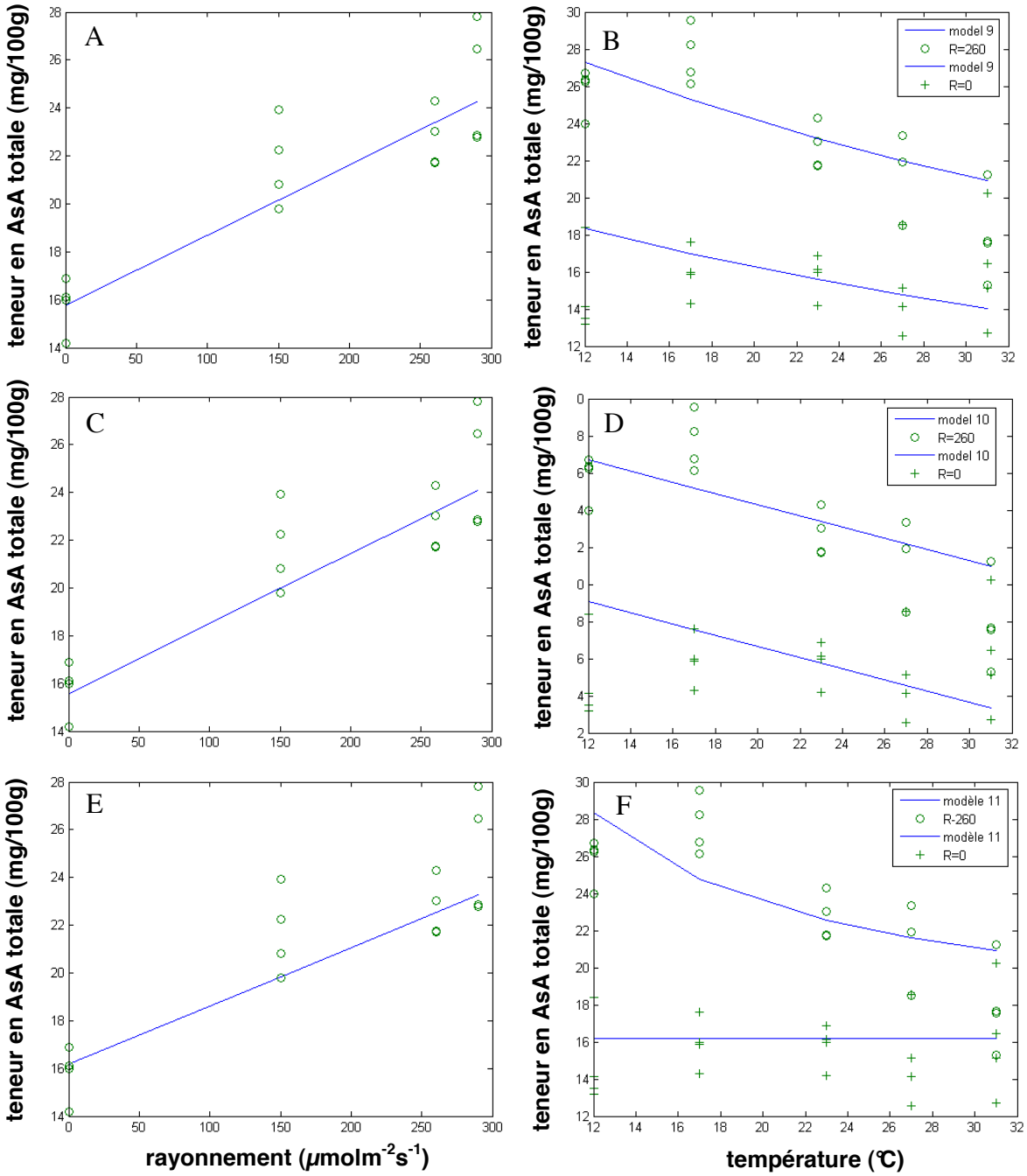


Figure 6 : Teneurs en vitamine C observées (○) et simulées (—) (en mg/100g MF) par les modèles 9 (A et B), 10 (C et D) et 11 (E et F) sur des fruits détachés de 'WVa 106'. A, C et E illustrent les variations des teneurs en vitamine C totale à 23°C en fonction de la lumière. B, D et F indiquent les variations des teneurs en vitamine C totale en fonction de la température (à 0 et 260 μmol m^{-2}s^{-1}).

3. Conclusion et perspectives

Les données recueillies sur les variations de la synthèse et de la dégradation par la lumière et la température, dans les fruits détachés, et présentées dans le chapitre IV devraient nous permettre d'affiner les expressions de la dépendance des taux de synthèse et de dégradation à la lumière et à la température.

Par ailleurs, ce modèle est basé sur un système d'étude simplifié : des fruits détachés de la plante et placés en conditions environnementales contrôlées et constantes. On peut, par conséquent, se poser la question de la validité d'un tel modèle pour un fruit resté sur la plante et des expériences complémentaires seront nécessaires pour le vérifier. De plus, comme un seul stade de développement a été étudié, il serait intéressant de regarder si les autres stades répondent de la même manière à la lumière et à la température. Enfin, le modèle obtenu doit être validé avec un nouveau jeu de données indépendant.

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

La qualité nutritionnelle des fruits et légumes est un nouvel enjeu de la profession pour une valorisation sur les filières de commercialisation en frais. Cette qualité nutritionnelle s'appuie sur les composés antioxydants présents en faible quantité dans la plante et qui ont été peu étudiés par la communauté scientifique jusqu'à présent malgré leur rôle dans le fonctionnement de la plante et leurs effets bénéfiques connus ou supposés sur la santé humaine (Koo, 1996, Li and Schellhorn, 2007a, Li and Schellhorn, 2007b). Parmi ces composés, la vitamine C est essentielle à l'homme qui a perdu la capacité de la synthétiser. Cependant, des variations importantes de teneur en vitamine C dans les fruits et légumes ont été décrites et observées en fonction de la saison et des conditions de culture. Chez la tomate, par exemple, les teneurs en vitamine C pour une même variété peuvent varier de 84 à 590 mg kg^{-1} MF (Dumas et al., 2003). Dès 1945, Hamner et al. ont suggéré que la lumière était le principal facteur de régulation de la teneur en vitamine C dans les fruits. Pourtant, si des études montrent que la teneur en vitamine C augmente avec le rayonnement reçu par le fruit (El-Gizawi et al., 1993, Li et al., 2009), les mécanismes de cette régulation par la lumière restent peu étudiés dans le fruit contrairement aux feuilles. **L'objectif de mon travail de thèse était de comprendre l'impact de la lumière sur les variations de teneur en vitamine C du fruit de tomate:** la lumière pouvant modifier la teneur en vitamine C des fruits

i) de manière indirecte, en jouant sur des transports de vitamine C ou de précurseurs en provenance des feuilles,

ii) en modifiant la teneur en sucres, eux-mêmes jouant sur la voie de synthèse de la vitamine C en tant que substrat ou régulateur de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse ou le recyclage de la vitamine C,

iii) de manière directe en modifiant la synthèse, le recyclage et la dégradation de la vitamine C en interaction avec la température.

Au cours de ma thèse, j'ai considéré successivement ces différentes hypothèses pour expliquer l'impact du rayonnement sur les variations du pool de vitamine C dans le fruit.

Y a-t-il un transport de vitamine C ou de précurseurs des feuilles vers les fruits ?

Deux observations suggèrent que la teneur en vitamine C dans le fruit pourrait dépendre des transports de molécules des feuilles vers les fruits. D'une part, les feuilles de tomate contiennent 2 à 5 fois plus de vitamine C que les fruits (Alhagdow et al., 2007, Gilbert et al., 2009). D'autre part, la teneur en vitamine C est plus faible pour les fruits détachés mûris en dehors de la plante que pour ceux restés sur la plante pendant la maturation (Giovanelli et al., 1999). **Notre objectif était de déterminer de façon indirecte le poids d'une diminution d'accumulation de vitamine C dans les feuilles sur la vitamine C dans le fruit.** Pour cela, nous avons fait varier l'éclairement reçu par les feuilles en faisant l'hypothèse que la teneur en vitamine C dans le fruit pouvait être modulée par i) l'intensité lumineuse arrivant aux feuilles modifiant la production de vitamine C et de sucres dans les feuilles et ensuite leur transport vers les fruits et nous avons fait varier l'éclairement reçu par les fruits supposant que ii) l'intensité lumineuse arrivant aux fruits modifiait le métabolisme de la vitamine C.

Nos résultats montrent que la teneur en vitamine C réduite dans le fruit est plus régulée par la lumière reçue par les fruits que par la lumière reçue par les feuilles (-30% de vitamine C dans les fruits lorsqu'ils sont ombrés et -10% lorsque les feuilles sont ombrées par rapport aux fruits non ombrés). Ces résultats confirment l'importance du microclimat radiatif du fruit sur l'accumulation de vitamine C dans les fruits qui avait été décrite précédemment sur fruits détachés (Gautier et al., 2008).

Par ailleurs, nous avons observé que l'ombrage des feuilles diminuait de façon importante la teneur en sucres des fruits mais que son impact sur la teneur en vitamine C semblait être plus complexe puisqu'il variait avec le stade de développement du fruit. En effet, seuls les fruits au stade orange ont des teneurs en vitamine C réduite diminuées. Cependant, comme l'ombrage des feuilles a entrainé un retard de maturation des fruits (retard de coloration rouge des fruits), l'interprétation de l'impact de l'ombrage des feuilles pourrait être biaisée par les variations naturelles de vitamine C dans le fruit au cours du développement, puisque la vitamine C réduite augmente au cours de la maturation du fruit (Gautier et al., 2008).

Ces résultats soulignent la complexité de la régulation de la teneur en vitamine C dans les fruits qui dépend principalement du rayonnement intercepté par les fruits mais également du rayonnement intercepté par les feuilles, et interagit probablement avec le stade de développement du fruit. L'ombrage des feuilles pourrait diminuer la synthèse de vitamine C

ou des sucres dans les feuilles entrainant une diminution du transport des feuilles vers les fruits, de sucres, de vitamine C ou d'autres précurseurs. En effet, un tel transport de vitamine C ou de précurseurs a déjà été démontré chez *Arabidopsis thaliana*, *Medicago sativa*, *Impatiens walleriana* ou encore chez la pomme de terre (Hancock et al., 2003, Tedone et al., 2004). Cependant, nos résultats confirment que sa contribution, en comparaison à la synthèse propre du fruit, est faible comme observé par Hancock et al. (2007) sur le cassis.

Quel est le rôle des sucres dans la synthèse de la vitamine C ?

La corrélation entre hexoses et vitamine C dans le fruit a été observée dans de nombreuses études et sur de nombreuses variétés (Mc Collum, 1946, Causse et al., 2003, Stevens et al., 2007). Cette corrélation pourrait être liée i) au rôle des sucres comme substrat pour la synthèse de vitamine C (Wheeler et al., 1998), mais également ii) à leur rôle comme signal promouvant l'expression des gènes (Smeekens, 2000, Hanson and Smeekens, 2009). En effet, Nishikawa et al. (2005) ont observé une augmentation de l'expression des gènes de la voie de synthèse de la vitamine C dans les chloroplastes alimentés en saccharose chez le brocoli.

Notre objectif était d'étudier la corrélation entre sucres et vitamine C et de déterminer si la teneur en sucres pouvait réguler la teneur en vitamine C des fruits en étudiant l'impact d'une augmentation de la teneur en sucres sur la teneur en vitamine C.

Nous avons travaillé sur deux génotypes présentant des teneurs en vitamine C très différentes à maturité ('Cervil' et 'Levovil') et suivi l'élaboration de la teneur en vitamine C pour expliquer ces différences. Les fruits de tomate cerise 'Cervil' accumulent la vitamine C et les hexoses principalement pendant la maturation. Au contraire, les fruits de calibre moyen 'Levovil' contiennent beaucoup de vitamine C et de sucres au début du développement du fruit (phase de division cellulaire) puis la teneur en vitamine C diminue rapidement pendant la croissance du fruit et réaugmente légèrement pendant la maturation du fruit. A maturité, nous avons observé que 'Cervil' contenait plus de sucres et de vitamine C exprimés en matière fraîche et en matière sèche que 'Levovil', ces différences ne semblent, par conséquent, pas être dues à une augmentation des flux d'eau pendant la deuxième partie du développement chez les gros fruits. Cette relation négative entre taille du fruit et teneur en sucres et en vitamine C a déjà été reportée par Navez et al. en comparant des fruits 16 génotypes récoltés au stade rouge mûr (Navez et al., 2004).

Nos résultats ont montré que l'augmentation des teneurs en hexoses dans le fruit à l'automne (obtenue par réduction de la charge en fruit) n'augmente pas la teneur en vitamine C du fruit, pour les deux génotypes. Ainsi, comme déjà démontré chez d'autres organes non photosynthétiques, les variations de teneur en vitamine C du fruit ne semblent pas étroitement liées au métabolisme primaire et à la teneur en sucres (Pallanca and Smirnoff, 1999, Richardson et al., 2004, Hancock et al., 2007).

Nous avons obtenu des teneurs en vitamine C maximales l'été, en plein champ, avec jusqu'à 20% de vitamine C supplémentaire par rapport aux tomates cultivées en automne sous serre. Néanmoins, ces fortes teneurs en vitamine C n'ont jamais été atteintes en automne malgré l'augmentation des teneurs en hexoses au même niveau que celles mesurées en été. Ces résultats soulignent que les hexoses ne sont pas limitants pour l'accumulation de vitamine C dans le fruit. La différence d'intensité lumineuse entre l'extérieur en été et l'intérieur de la serre en automne est probablement à l'origine des différences de teneur en vitamine C dans les fruits (Hamner et al., 1945, Mc Collum, 1946, Venter, 1977).

Finalement, la forte corrélation décrite chez 'Cervil' entre teneur en hexoses et teneur en vitamine C est principalement due à leur augmentation concomitante pendant la maturation du fruit. En effet, aucune relation positive entre teneur en sucres et en vitamine C n'a pu être mise en évidence dans les fruits de 'Levovil' car contrairement à 'Cervil', ceux-ci n'accumulent pas ces composés pendant la maturation.

Nos résultats ont montré qu'une limitation du nombre de fruits par bouquet en hiver permet d'augmenter la taille des fruits et leur qualité gustative en liaison avec l'augmentation de la teneur en sucres dans le fruit. Par contre, cette pratique n'a pas d'effet sur la teneur en vitamine C du fruit, qui reste essentiellement dépendante du rayonnement intercepté par le fruit.

Comment la lumière modifie-t-elle la voie de synthèse de la vitamine C ?

Chez les fruits, on connait peu de choses sur la régulation du métabolisme de la vitamine C par la lumière qui parait plus complexe que celle des feuilles. D'après nos résultats, la vitamine C du fruit dépend en grande partie des modifications du métabolisme de la vitamine C à l'échelle du fruit et dans une moindre mesure du rayonnement intercepté par les feuilles. Les variations de teneurs en vitamine C pourraient être liées à des différences de synthèse, de recyclage ou de dégradation de la vitamine C. **Afin de mieux comprendre l'impact de la lumière sur la synthèse de la vitamine C**, nous avons comparé les modifications de l'expression des gènes de la voie de synthèse de la vitamine C à l'échelle de la feuille et du fruit.

1. Impact de la lumière sur la voie de synthèse de la vitamine C dans les feuilles

Nos résultats confirment l'importance de la lumière sur l'accumulation de vitamine C et l'expression des gènes de sa voie de synthèse dans les feuilles. Nous avons observé que la diminution de la teneur en vitamine C sous ombrage était liée à une réduction des transcrits des gènes *GMP1, GMP3*, *VTC2*, *GPP1* et *GPP2* comme cela avait été décrit chez *Arabidopsis* (Yabuta et al. 2007). Cependant, deux gènes supplémentaires ont également été considérablement sous exprimés par l'ombrage long: *GME1* and *GME2* (avec une diminution respectivement par 13 et par 3 du nombre de transcrits). L'étape contrôlée par GME constitue un important point de contrôle de la synthèse de vitamine C car elle se trouve à l'intersection entre la synthèse de vitamine C et de polysaccharides pariétaux. Contrairement aux résultats de Li et al. (2009) dans les feuilles de pommier, la transcription des deux derniers gènes de la voie de biosynthèse de la vitamine C (*GalDH* et *GLDH*) n'a pas été diminuée par un ombrage long lors de nos expérimentations sur la tomate. Ceci pourrait confirmer une étude précédente sur tomate qui a montré que la réduction de l'expression du gène codant pour GLDH n'affectait pas la teneur en vitamine C dans les feuilles indiquant que cette étape n'était pas limitante (Alhagdow et al. 2007).

A l'échelle de la journée, nous avons mis en évidence d'importantes fluctuations de vitamine C dans les feuilles : presque tous les gènes de la voie de synthèse de la vitamine C étudiés varient au cours de la journée. De telles fluctuations ont déjà été observées dans les

feuilles d'*Arabidopsis* (Tamaoki et al. 2003; Dowdle et al. 2007), de tabac (Chen and Gallie 2004) ou de pomme de terre (Tedone et al. 2004). Elles n'ont été étudiées qu'en relation avec l'expression de deux gènes *VTC2* et *VTC5* codant pour GPP chez *Arabidopsis* (Dowdle et al. 2007). Comme dans notre étude, Dowdle et al. (2007) ont observé des fluctuations journalières de vitamine C décalées dans le temps par rapport aux fluctuations de l'expression de *VTC2* (quantité de transcrits multipliée par 5 entre la nuit et le jour). En effet, l'expression de *VTC2* est maximale dans les premières heures de la journée, alors que la teneur en vitamine C et l'activité GPP sont maximales 6h plus tard. Dans notre étude, la plupart des gènes ont une expression maximale dès l'aube (4h du matin, heure TU) mais la teneur en vitamine C est maximale à midi (délai de 8h). Ce délai pourrait être expliqué par le temps nécessaire pour synthétiser l'enzyme, par des modifications au niveau post-transcriptionnel ou de l'activité de l'enzyme comme suggéré par les résultats de Dowdle et al. (2007). D'autre part, comme le pool de vitamine C est aussi modifié par le recyclage, les variations de teneur en AsA pourraient également être liées à des modifications par la lumière du recyclage de la vitamine C comme reporté par Kuzniak (2004) et Chen and Gallie (2004). Il faut tout de même souligner, que nous avons observé une bonne corrélation entre les variations de transcrits de *VTC2* et *GME1* (les deux gènes qui varient le plus durant la journée) et la teneur en vitamine C totale mesurée 8 h plus tard dans les feuilles (R=0.85 et R=0.75 respectivement). Ces deux étapes de la synthèse pourraient donc être deux points de régulation importants dans les feuilles comme précédemment démontré chez le tabac (Dowdle et al. 2007; Linster and Clarke 2008). La comparaison des niveaux d'expression entre une journée ensoleillée et couverte dès le début de journée a montré qu'une faible différence d'intensité lumineuse (diminution de 50% du rayonnement entre 4 et 5h) diminue l'expression de presque tous les gènes de la voie de biosynthèse *GalDH* et *GLDH* inclus. Nous avons observé d'importantes variations du nombre de transcrits, induites par de faibles variations du rayonnement dès l'aube, qui évoquent une réponse de type 'signal' Bartoli et al. (2009). Ces résultats suggèrent une adaptation fine de la teneur en AsA dans les feuilles au cours de la journée en fonction du rayonnement.

Les variations rapides de vitamine C observées au cours de la journée pourraient être liées aux variations de conductance stomatique, de respiration, de fluorescence de chlorophylle et d'assimilation de carbone en accord avec le rôle de la vitamine C dans ces différents processus. En effet la vitamine C, par l'intermédiaire de son rôle dans le statut redox est impliquée dans le fonctionnement de la feuille comme régulateur de l'ouverture stomatique (Chen and Gallie 2004). Elle joue un rôle important dans la photosynthèse

premièrement, en protégeant l'appareil photosynthétique des dommages causés par les formes actives de l'oxygène (Smirnoff 2000), et deuxièmement, dans les mécanismes de dissipation de l'énergie lumineuse en excès comme le cycle eau-eau (Asada 1999) et le cycle des xanthophylles (Demmig-Adams and Adams 1996). Finalement, comme la dernière enzyme de la voie de biosynthèse est située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie et participe aux transports d'électron de la chaine respiratoire, la teneur vitamine C augmente avec la respiration (Bartoli et al., 2000).

2. Impact de la lumière sur la voie de synthèse de la vitamine C dans les fruits

2.1. Fruits in situ

On savait que les fruits de tomates possédaient les gènes impliqués dans la synthèse de la vitamine C (Alhagdow et al., 2007, Ioannidi et al., 2009), cependant, on ne savait pas dans quelle mesure leur expression pouvait être modulée par l'environnement lumineux. Les expérimentations d'ombrage ont permis de comparer l'expression de ces gènes dans les fruits et dans les feuilles (connues pour répondre de façon importante au rayonnement). Nos résultats ont montré que la teneur en vitamine C du fruit diminue sous ombrage et que cette diminution pouvait être reliée à une diminution de l'expression de deux gènes *GPP1* et *VTC2*. C'est la première fois qu'une régulation par la lumière de ces deux gènes est observée dans les fruits. En effet, Li et al. (2009) ont démontré récemment que la réduction de la quantité des transcrits de *GLDH* et *GalDH* dans les pommes était proportionnelle à l'intensité de l'ombrage mais ils n'avaient pas étudié l'expression des autres gènes de la voie de synthèse. Après ombrage, nous avons observé dans les fruits une diminution de la teneur en vitamine C et de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse relativement plus faible que celle observée chez les feuilles. Une explication pourrait être la plus faible interception de la lumière par le fruit de tomate comparé aux feuilles. En effet, chez la pomme, les auteurs n'observent pas de différence d'expression de ces gènes dans la pulpe du fruit mais seulement dans la peau. Cela peut être expliqué par le fait que les organes ou tissus exposés au rayonnement, comme la peau des fruits, répondent de manière plus marquée aux variations d'intensité lumineuse que la pulpe (Li et al. 2009; Li et al. 2010). En effet, Li et al. (2009) ont montré que la pulpe des pommes ne répondait pas aux variations de rayonnement à la différence de la peau pour laquelle le niveau des transcrits des gènes augmentait avec le rayonnement. En accord avec cette hypothèse, la teneur en vitamine C diminue de l'extérieur

vers l'intérieur du fruit (Li et al. 2010). Les fruits dans le couvert végétal étaient moins exposés au rayonnement que les feuilles sur lesquelles nous avons effectué le prélèvement et qui étaient situées dans le haut du couvert, bien exposées à la lumière. Une autre explication possible du faible nombre de gènes répondant à l'ombrage dans les fruits pourrait être le stade de développement étudié. En effet, de nombreux auteurs ont démontré que l'expression de *GMP*, *GME*, *GalDH* et *GLDH* diminuait au cours de la maturation, alors que celle des gènes *VTC2* et *GPP* augmente (Alhagdow et al. 2007; Ioannidi et al. 2009). Pendant cette étude, les gènes faiblement exprimés au stade rouge mûr: *GMP*, *GME*, *GalDH* and *GLDH,* ne semblent pas répondre à l'ombrage, alors que *VTC2* et *GPP,* fortement exprimés au stade rouge mûr répondent. Ces résultats suggèrent que ces deux étapes, GGP et GPP, pourraient être des points de régulation importants pendant la maturation du fruit. Nos résultats soulignent que même dans les fruits presque mûrs, l'environnement lumineux peut affecter la voie de biosynthèse et la teneur en vitamine C des fruits à la récolte. Cependant, les fruits semblent plus tamponnés, ce qui pourrait être dû à leur volume et leur capacité d'interception de la lumière dans le couvert végétal. Au contraire, l'épicarpe du fruit pourrait répondre de manière plus importante aux variations de lumière (Li et al. 2009).

2.2.Fruits détachés

Nous avons affiné l'étude des réponses à la lumière sur des fruits détachés placés à différentes températures. A 23°C, les variations de teneurs en vitamine C observées sur fruits détachés (diminution de 30% de la teneur en vitamine C totale à l'obscurité comparé à la lumière) sont cohérentes avec les variations de teneur en vitamine C mesurées dans les fruits après ombrage (diminution de 10% de la teneur en vitamine C sous ombrage comparé à la lumière). L'utilisation de fruits détachés en chambre climatique permet de contrôler les facteurs de l'environnement (lumière et température). Nous avons ainsi confirmé la régulation par la lumière de deux étapes clés de la voie de synthèse de la vitamine C avec une augmentation des transcrits de *VTC2* et *GPP2*, codant pour GGP et GPP, deux étapes dont nous avons déjà suggéré l'importance chez les fruits restés sur la plante. Par ailleurs, nous avons également observé une augmentation des transcrits de *GalDH* comme cela avait été observé dans les pommes (Li et al. 2009). A 12°C, en conditions de faible température, nous avons observé une augmentation spécifique des transcrits des gènes *GME1*, *GME2*, *GPP1* et *GLDH* sur les fruits éclairés, c'est aussi dans cette situation que la teneur en vitamine C est la plus importante probablement en liaison avec un stress photo-oxydatif créé par les conditions

environnementales spécifiques de lumière couplée à une faible température (Wise and Naylor, 1987).

Nos travaux ont montré une bonne corrélation entre expression des gènes de la voie de biosynthèse et teneur en vitamine C dans les feuilles qui suggère un rôle important de la synthèse dans la régulation du pool de vitamine C. Cependant d'autres régulations post-transcriptionnelles peuvent intervenir. Le pool de vitamine C étant également régulé par le recyclage (Chen and Gallie 2004; Zhou et al. 2009) et la dégradation (Pallanca and Smirnoff 2000). L'étude de ces processus devrait permettre de mieux comprendre la régulation de la teneur en vitamine C par la lumière particulièrement dans les fruits où la régulation par la lumière reste peu étudiée.

Comment la lumière influence-t-elle le recyclage et la dégradation de la vitamine C dans les fruits?

La taille du pool de vitamine C peut augmenter en fonction des importations, de la synthèse et du recyclage de la vitamine C et diminuer par exportation, oxydation et dégradation. En plus de la synthèse, le recyclage joue un rôle important dans le maintien des teneurs en vitamine C comme démontré dans les plantes transgéniques sur-exprimant des enzymes de recyclage de la vitamine C oxydée (Chen et al., 2003). Dans les fruits in situ et détachés, nous avons mis en évidence des fluctuations des niveaux de transcrits des gènes de la voie de biosynthèse à la lumière. Nous avons ensuite analysé l'impact de la lumière sur le recyclage et la dégradation de la vitamine C afin de caractériser leur importance dans la régulation du pool de vitamine C. Par ailleurs, la lumière étant souvent positivement corrélée à la température en conditions naturelles, nous nous sommes intéressés aux interactions qu'il pouvait y avoir entre ces deux facteurs sur la régulation de la teneur en vitamine C dans les fruits.

Notre objectif était d'étudier l'impact de la lumière et de la température sur les mécanismes impliqués dans le recyclage et la dégradation de la vitamine C dans les fruits. Une solution pour séparer ces deux facteurs a été de travailler sur des fruits détachés en chambre climatique.

Cette première série d'expérience n'a pas permis d'étudier l'effet de la température seul car des différences de maturation des fruits ont été observées après 56h selon les

températures. Nous avons donc comparé les fruits placés à l'obscurité et ceux placés sous rayonnement pour chaque température étudiée (12, 23 et 31°C).

Nos résultats montrent que les fruits restés à la lumière présentent des activités APX et MDHAR plus importantes à 23°C comme précédemment démontrés par Torres et al. (2006) et Li et al. (2009) chez la tomate et la pomme. Ces résultats suggèrent une augmentation de l'utilisation et du recyclage de la vitamine C à la lumière qui pourrait être liée à son rôle dans la photo-protection (Conklin, 2001). A 12°C, la lumière augmente l'activité DHAR en plus de l'activité MDHAR couplée à une augmentation des activités APX and CAT, deux enzymes qui permettent la détoxication d'H_2O_2, suggérant un fort besoin de détoxication dans ces conditions probablement causé par un stress photo-oxydatif (Wise and Naylor, 1987). De plus, l'activité de l'APX et de la CAT augmentent avec la lumière et la température, deux facteurs qui sont connus pour augmenter le stress oxydatif dans les fruits (Torres et al. 2006, Chen et al. 2008).

L'absence de stimulation par la lumière à 31°C de ces deux activités APX et MDHAR pourrait être causée par une inhibition des enzymes à températures élevées comme reporté par Rivero et al. (2004) sur feuille de tomate après 30 jours à 35°C.

Nous avons démontré qu'à forte température (31°C), la teneur en thréonate était très élevée alors que la maturation du fruit était plus avancée. Par ailleurs, Carrari et al. ont montré que le thréonate dans le fruit de tomate diminuait au cours du développement (Carrari et al., 2006). Si l'on suppose que le thréonate est produit lors de la dégradation de la vitamine C chez la tomate, ce résultat indiquerait que la dégradation est plus importante à forte température comme suggéré par différentes expérimentations (Richardson et al., 2004, Gautier et al., 2008). Cette étude sur l'impact de la dégradation de la vitamine C démarre tout juste dans l'unité. Elle semble cependant jouer un rôle important dans l'explication des variations de teneur en vitamine C et nécessitera d'être approfondie à l'avenir.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude sur les mécanismes responsables des variations de teneur en vitamine C du fruit de tomate s'inscrit dans une optique de promotion de la qualité nutritionnelle des fruits et légumes pour une valorisation par les producteurs sur le marché en frais.
Pour cela, une des sites permettant d'améliorer les teneurs en vitamine C des fruits serait l'utilisation de la variabilité génétique naturelle par la sélection et le croisement de génotypes à forte teneur en vitamine C. Ce type d'approche est réalisé en collaboration avec les généticiens et passe par la recherche de gènes candidats colocalisant avec des QTL de fortes teneurs en vitamine C (Stevens et al., 2007). Elle pourrait également être réalisée par la transformation génétique mais celle-ci n'est, à l'heure actuelle, pas acceptée par les consommateurs.

L'autre piste d'amélioration des teneurs en vitamine C dans les fruits sur laquelle nous avons travaillée concerne le contrôle de la teneur en vitamine C par facteurs environnementaux en pré-récolte. Durant ce travail, j'ai obtenu de nombreux résultats sur l'impact de la lumière et du stade de développement du fruit sur la synthèse, le recyclage et la dégradation de la vitamine C.

Vers un modèle simplifié de l'accumulation de vitamine C dans le fruit

Un premier modèle intègre ces résultats et rend compte des variations de teneur en vitamine C totale au cours du développement du fruit pour deux génotypes contrastés. Dans le modèle, les variations de teneur en vitamine C sont contrôlées par un module de synthèse et un module de dégradation pour lesquels nous avons utilisé des lois empiriques. Ce modèle prédit une diminution de la synthèse au cours du développement, ce qui est conforme aux résultats de Ioannidi et al. (2007) montrant une diminution de l'expression des gènes de synthèse de la vitamine C au cours du développement du fruit. En revanche, l'impact du stade de développement et de la lumière sur la dégradation de la vitamine C a été très peu étudié.

Dans un premier temps, nous avons considéré le taux relatif de dégradation comme constant au cours du développement, la dégradation étant proportionnelle à la concentration en vitamine C. Ce premier modèle ne prend pas en compte l'impact de l'environnement sur l'accumulation de la vitamine C dans le fruit mais permet toutefois de simuler l'accumulation de vitamine C dans des génotypes très contrastés. Nous allons poursuivre le développement de ce modèle afin de prendre en compte de l'impact de la lumière et de la température sur la

teneur en vitamine C totale. Pour cela, nous ferons dépendre la synthèse et la dégradation à la fois du stade de développement et de l'environnement. Pour affiner la fonction de dégradation de la vitamine C, il sera nécessaire d'approfondir les connaissances sur les différents composés produits après dégradation de la vitamine C (tartrate, acide 2,3-diketo-L-gulonique…) afin de confirmer le rôle supposé du thréonate comme indicateur du taux de dégradation de la vitamine C. Les résultats préliminaires sur fruits détachés montrent que le thréonate augmente avec la température. Ces premiers résultats sont encourageants puisqu'ils confirment les hypothèses émises dans la bibliographie sur la dégradation dans le fruit laissant penser que le thréonate pourrait être un candidat intéressant pour analyser la dégradation de la vitamine C. Une meilleure caractérisation de l'impact de l'environnement sur la dégradation de la vitamine C est à présent nécessaire pour comprendre les variations de teneur en vitamine C dans le fruit.

Des travaux supplémentaires seront utiles pour améliorer les lois empiriques de réponse de la synthèse de vitamine C à l'environnement. Il serait ensuite intéressant de pouvoir valider le modèle sur des fruits restés sur la plante et prélevés à différents stades de développement. Cette approche permettrait également de mettre en évidence des importations ou des exportations de vitamine C dans les fruits en comparant les fruits poussant sur la plante avec les fruits détachés.

L'objectif, à plus long terme, est de développer un modèle couplé prenant en compte les variations temporelles au cours du développement (modèle 1) et environnementales (modèle 2) de la vitamine C ce qui permettra de tester des hypothèses sur les interactions stade de développement/facteurs environnementaux pour expliquer les variations de la teneur en vitamine C dans le fruit.

A présent, le modèle prédit la teneur en vitamine C totale dans le fruit, il existe, par ailleurs, un autre modèle à l'échelle du chloroplaste décrivant l'évolution des pools de vitamine C réduite et oxydée en réponse à l'augmentation des formes actives de l'oxygène (Polle, 2001, Valero et al., 2009). Ce modèle a pour objectif de comprendre le fonctionnement du cycle AsA-GSH en interaction avec la détoxication des espèces réactives de l'oxygène dans les feuilles et est basé sur le flux d'électrons et les vitesses de réaction des enzymes impliquées dans le cycle AsA-GSH dans le chloroplaste. A plus long terme, il serait intéressant de le coupler avec notre modèle afin de prédire l'équilibre redox de la vitamine C en fonction du rayonnement et du stade de développement. Le potentiel redox de la vitamine C semble en effet jouer un rôle très important dans la réponse des plantes à leur

environnement (Foyer and Noctor, 2009) et notamment dans la conservation des fruits après passage à 4°C (Stevens et al., 2008, Gest et al., 2010).

Rôle de la vitamine C dans l'adaptation de la plante à son environnement

La vitamine C est un important antioxydant qui joue de nombreux rôles dans l'adaptation de la plante à son environnement en piégeant les formes actives de l'oxygène. A l'échelle de la plante, le fruit est généralement moins affecté que les feuilles par des contraintes hydriques ou minérales. Ainsi, en situation de limitation des apports azotés (Bénard et al., 2009), sa croissance et son développement sont peu modifiés comparé au reste de la plante. Toutefois, il peut recevoir des informations sur son environnement par le biais de signaux en provenance des feuilles via le phloème. Concernant la lumière, nous avons observé que l'ombrage des feuilles modifiait le teneur en vitamine C des fruits au stade orange suggérant un transfert des feuilles vers les fruits de précurseurs, de vitamine C ou de signaux. Ces transferts feuille/fruit sont, en partie, à l'origine des variations de teneurs en vitamine C dans le fruit en réponse au changement de conditions lumineuses, même si leur importance semble être moindre par rapport à l'impact direct de la lumière sur le fruit. L'importance de ces transferts pourrait être approfondie par l'étude directe de recueils d'exsudats de phloème ou suivi de vitamine C ou de précurseurs marqués introduit dans les feuilles qui permettrait d'être plus précis sur la nature et la dynamique de ces transferts des feuilles vers les fruits.

En situations de contraintes (limitation des ressources en eau, en minéraux, augmentation de la salinité ou du rayonnement…), la vitamine C joue un rôle en tant qu'antioxydant majoritaire permettant à la plante de limiter le stress oxydatif. Mais il existe également d'autres molécules antioxydantes (glutathion, NAD(P)H…) et des enzymes antioxydantes qui participent avec les formes actives de l'oxygène à l'adaptation de la réponse de la plante à son environnement. Ainsi, nous avons mis en évidence qu'une augmentation de la salinité au niveau racinaire entrainait différentes réponses selon les génotypes (Gautier et al., 2010). Pour certains génotypes (tomate cerise 'Cervil'), la salinité modifie peu leur teneur en vitamine C mais stimule les activités antioxydantes (SOD, APX). Au contraire, il existe des génotypes à plus gros fruit ('Marmara' et 'Levovil') pour lesquels l'augmentation de la salinité entraine une augmentation importante de la teneur en vitamine C qui peut également être couplée ('Levovil') ou non ('Marmara') selon les génotypes à une augmentation des activités enzymatiques antioxydantes.

Ces résultats illustrent la complémentarité et la complexité des mécanismes de réponse au stress oxydatif. Ils soulignent, par ailleurs, le fait que les mêmes processus peuvent être

impliqués dans la réponse à différents facteurs de l'environnement (lumière, salinité, ou au stress oxydatif liée à la maturation). A l'avenir, l'étude couplée de la vitamine C à celle d'autres antioxydants (glutathion, le NAD(P)H et les protéines de la famille des thiorédoxines) et d'autres signaux (H_2O_2, NO…) marqueurs du stress oxydatif pourrait nous permettre d'avoir une vision plus synthétique des réponses et de la capacité d'adaptation de la plante à son environnement.

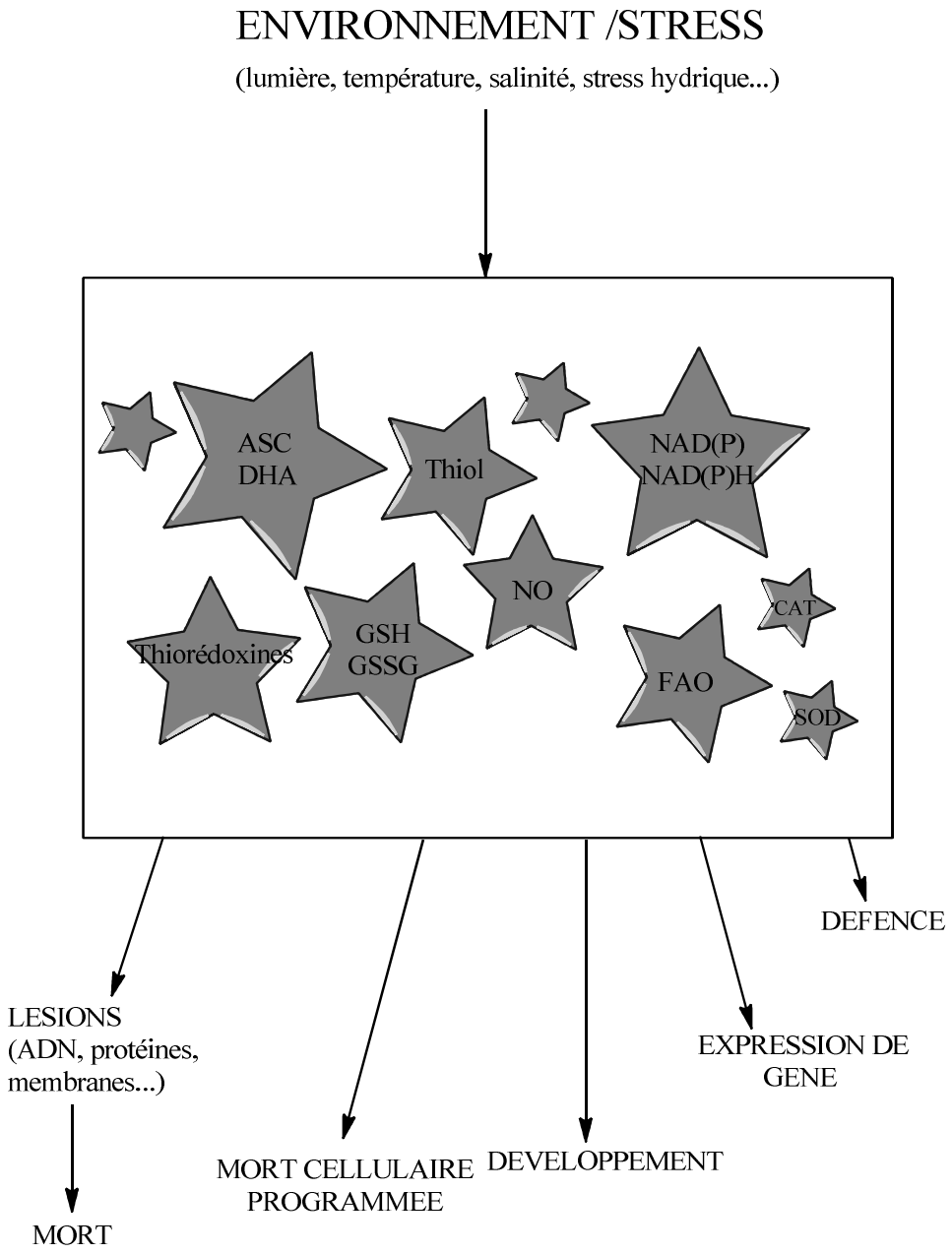


Figure 9 : Interaction de différents signaux permettant à la plante de connaitre son environnement et de répondre à différents stress, d'après Potters et al. (2010)

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aebi H. 1984. isolation, purification, characterization and assay of antioxygenic enzymes: catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. Academic Press.

Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology,* **21**: 177-181.

Ahn T, Schofield A, Gopinadhan P. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities during tomato fruit development. *Physiology and Molecular Biology of Plants,* **8**: 241-249.

Alhagdow M. 2006. *Caractérisation fonctionnelle de la GDP-D-Mannose-3',5'-épimérase et de la Galactono-1,4-lactone deshydrogenase, enzymes de la voie de biosynthèse de la vitamine C chez la tomate,* sur article, Bordeaux I, Bordeaux.

Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P. 2007. Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology,* **145**: 1408-1422.

Alves RE, Filgueiras HAC, Moura CFH, Araujo NCC, Almeida AS. 2002. Camu-camu (Myrciaria dubia McVaugh): a rich natural source of vitamin C. *48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Tegucigalpa, Honduras, 7-11 October, 2002*., Interamerican Society for Tropical Horticulture.

Anderson JW, Foyer CH, Walker DA. 1983. Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. *Planta,* **158**: 442-450.

Arrigoni O, De Tullio MC. 2000. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology,* **157**: 481-488.

Arrigoni O, De Tullio MC. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta,* **1569**: 1-9.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **50**: 601-639.

Asard H, Horemans N, Caubergs RJ. 1995. Involvement of ascorbic acid and a b-type cytochrome in plant plasma membrane redox reactions. *Protoplasma,* **184**: 36-41.

Asard H, Kapila J, Verelst W, Berczi A. 2001. Higher-plant plasma membrane cytochrome b. *Selected papers from the Fifth International Conference of Plasma Membrane Redox Systems and Their Role in Biological Stress and Disease, Hamburg, Germany, 26-29 March 2000*., Springer-Verlag Wien.

B

Badejo AA, Tanaka N, Esaka M. 2008. Analysis of GDP-D-Mannose Pyrophosphorylase gene promoter from acerola (Malpighia glabra) and increase in ascorbate content of transgenic tobacco expressing the acerola gene. *Plant and Cell Physiology,* **49**: 126-132.

Barth C, Moeder W, Klessig DF, Conklin PL. 2004. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1. *Plant Physiology,* **134**: 1784-1792.

Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH. 2000. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology,* **123**: 335-343.

Bartoli CG, Yu JP, Gomez F, Fernandez L, McIntosh L, Foyer CH. 2006. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in Arabidopsis thaliana leaves. *Journal of Experimental Botany,* **57**: 1621-1631.

Bartoli CG, Tambussi EA, Diego F, Foyer CH. 2009. Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in Phaseolus vulgaris leaves. *FEBS Letters,* **583**: 118-122.

Beck E, Burkert A, Hofmann M. 1983. Uptake of L-Ascorbate by Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiology,* **73**: 41-45.

Bénard C, Gautier H, Bourgaud F, Grasselly D, Navez B, Caris-Veyrat C, Weiss M, Genard M. 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (Solanum lycopersicum) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **57**: 4112-4123.

Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schunemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W. 2009b. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in Arabidopsis indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experimental Botany,* **60**: 765-778.

C

Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanor MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology,* **142**: 1380-1396.

Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffe P, Rousselle P, Buret M. 2002. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany,* **53**: 2089-2098.

Causse M, Buret M, Robini K, Verschave P. 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science,* **68**: 2342-2350.

Chaïb J. 2007. *Caractérisation des déterminants génétiques et moléculaires de composantes de la texture du fruit de tomate*, Ecole Nationale Supérieure de Montpellier, Montpellier.

Chen L-S, Li P, Cheng L. 2008. Effects of high temperature coupled with high light on the balance between photooxidation and photoprotection in the sun-exposed peel of apple. *Planta,* **228**: 745-756.

Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **100**: 3525-3530.

Chen Z, Gallie DR. 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell,* **16**: 1143-1162.

Citterio S, Sgorbati S, Scippa S, Sparvoli E. 1994. Ascorbic-acid effect on the onset of cell-proliferation in pea root. *Annual Meeting Abstracts of Scientific Papers,* **92**: 601-607.

Colville L, Smirnoff N. 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient Arabidopsis thaliana vtc mutants. *Journal of Experimental Botany,* **59**: 3857-3868.

Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnoff N. 1997. L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vtc1. *Plant Physiology,* **115**: 1277-1285.

Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **96**: 4198-4203.

Conklin PL. 2001. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell and Environment,* **24**: 383-394.

Conklin PL, Barth C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment,* **27**: 959-970.

Córdoba-Pedregosa MdC, Córdoba F, Villalba JM, González-Reyes JA. 2003. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase, and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiology,* **131**: 697-706.

D

Davey MW, Montagu Mv, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain JJ, Favell D, Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **80**: 825-860.

Davey MW, Kenis K, Keulemans J. 2006. Genetic control of fruit vitamin C contents. *Plant Physiology,* **142**: 343-351.

Davies JN, Hobson GE. 1981. The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* **15**: 205-280.

De Tullio MC, Paciolla C, Dalla Veechia F, Rascio N, D'Emerico S, De Gara L, Liso R, Arrigoni O. 1999. Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta,* **209**: 424-434.

De Tullio MC, Ciraci S, Liso R, Arrigoni O. 2007. Ascorbic acid oxidase is dynamically regulated by light and oxygen. A tool for oxygen management in plants? *Journal of Plant Physiology,* **164**: 39-46.

Debolt S, Melino V, Ford CM. 2007. Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany,* **99**: 3-8.

Demmig-Adams B, Adams WW, Heber U, Neimanis S, Winter K, Kruger A, Czygan FC, Bilger W, Bjorkman O. 1990. Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy-dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiology,* **92**: 293-301.

Demmig-Adams B, Adams WW. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science,* **1**: 21-26.

Dorais M, Ehret DL. 2008. Agronomy and the nutritional quality of fruit. In: Tomás-Barberán FA, Gil MI eds. *Improving the Health-promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*. Taylor & Francis.

Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N. 2007. Two genes in Arabidopsis thaliana encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant Journal,* **52**: 673-689.

Dumas Y, Dadomo M, Di Lucca G, Grolier P. 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **83**: 369-382.

Dutilleul C, Garmier M, Noctor G, Mathieu C, Chetrit P, Foyer CH, de Paepe R. 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell,* **15**: 1212-1226.

E

El-Gizawi AM, Abdallah MMF, Gomaa HM, Mohamed SS. 1993. Effect of different shading levels on tomato plants. 2. Yield and fruit quality. *Acta Horticulturae,* **323**: 349-354.

Endres S, Tenhaken R. 2009. Myoinositol oxygenase controls the level of myoinositol in Arabidopsis, but does not Increase ascorbic acid. *Plant Physiology,* **149**: 1042-1049.

Eskling M, Arvidsson PO, Akerlund HE. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum,* **100**: 806-816.

Eskling M, Akerlund HE. 1998. Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light. *Photosynthesis Research,* **57**: 41-50.

F

Faria T, Garcia-Plazaola JI, Abadia A, Cerasoli S, Pereira JS, Chaves MM. 1996. Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (Quercus suber) during summer. *Tree Physiology,* **16**: 115-123.

Fernandez-Ruiz V, Sanchez-Mata MC, Camara M, Torija ME, Chaya C, Galiana-Balaguer L, Rosello S, Nuez F. 2004. Internal quality characterization of fresh tomato fruits. *Hortscience,* **39**: 339-345.

Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in [Spinach] chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta,* **133**: 21-25.

Foyer CH, Rowell J, Walker D. 1983. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta,* **157**: 239-244.

Foyer CH, Descourvieres P, Kunert KJ. 1994a. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment,* **17**: 507-523.

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. 1994b. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum,* **92**: 696-717.

Foyer CH, Lelandais M. 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf

mesophyll cells. *Special issue: vegetation stress II. First international symposium on vegetation stress, Munich, Germany, 19-21 June 1995.*

Foyer CH, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling,* **11**: 861-905.

Franceschi VR, Tarlyn NM. 2002. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology,* **130**: 649-656.

G

Galiana-Balaguer L, Rosello S, Nuez F. 2006. Characterization and selection of balanced sources of variability for breeding tomato (Lycopersicon) internal quality. *Genetic Resources and Crop Evolution,* **53**: 907-923.

Gara Ld, Pinto MCd, Arrigoni O. 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum,* **100**: 894-900.

Garcia-Plazaola JI, Artetxe U, Becerril JM. 1999. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean schlerophyll tree Quercus ilex (L) during winter. *Plant Science* **143**: 125-133.

Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N. 2002. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in Arabidopsis thaliana provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant Journal,* **30**: 541-553.

Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Reich M, Buret M, Bourgaud F, Poëssel JL, Caris-Veyrat C, Génard M. 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **56**: 1241-1250.

Gautier H, Massot C, Stevens R, Serino S, Génard M. 2009. Regulation of tomato fruit ascorbate content is more highly dependent on fruit irradiance than leaf irradiance. *Annals of Botany* **103**: 495-504.

Gautier H, Lopez-Lauri F, Massot C, Murshed R, Marty I, Grasselly D, Keller C, Sallanon H, Génard M. 2010. Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascrbate recycling. *Functional Plant Science and Biotechnology,* **4**: 66-75.

Gechev T, Willekens H, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W, Toneva V, Minkov I. 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology,* **160**: 509-515.

Gest N, Page D, Birtić S, Gouble B, Gilbert L, Garchery C, Causse M, Stevens R. 2010. Response of the fruit antioxidant system to the post-chilling period in two different tomato lines. *Functional Plant Science and Biotechnology,* **4**: 76-83.

Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V, Petit J, Stevens R, Causse M, Fernie AR, Lahaye M, Rothan C, Baldet P. 2009. GDP-D-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant Journal,* **60**: 499-508.

Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. 1993. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell,* **5**: 1439-1451.

Giovanelli G, Lavelli V, Peri C, Nobili S. 1999. Variation in antioxidant components of tomato during vine and post-harvest ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **79**: 1583-1588.

Gomez L, Rubio E, Auge M. 2002. A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **82**: 360-369.

Gomez L, Bancel D, Rubio E, Vercambre G. 2007. The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of sugars in plant tissues - validation of a micro-method. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **87**: 1893-1905.

Gómez R, Varón R, Amo M, TardáGuila J, Pardo J. 1998. Differences in the rate of coloration in tomato fruit. *Journal of Food Quality,* **21**: 329-339.

Grace SC, Logan BA. 1996. Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. *Plant Physiology,* **112**: 1631-1640.

Green MA, Fry SC. 2005. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature (London),* **433**: 83-87.

H

Hagimori M, Watanabe N, Saito H, Yui M, Kato N, Shirai T, Mizuno H, Ohsaki S. 2005. Breeding of tomato with high L - Ascorbic acid content by clonal selection. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science,* **74**: 16-22.

Hamner KC, Bernstein L, Maynard LA. 1945. Effects of light intensity, day length, temperature, and other environmental factors on the ascorbic acid content of tomatoes. *Journal of Nutrition,* **29**: 85-97.

Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. 2003. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology,* **3**: 7.

Hancock RD, Walker PG, Pont SDA, Marquis N, Vivera S, Gordon SL, Brennan RM, Viola R. 2007. L-ascorbic acid accumulation in fruit of Ribes nigrum occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway. *Functional Plant Biology,* **34**: 1080-1091.

Hancock RD, Chudek JA, Walker PG, Pont SDA, Viola R. 2008. Ascorbic acid conjugates isolated from the phloem of Cucurbitaceae. *Phytochemistry,* **69**: 1850-1858.

Handa AK, Singh NK, Biggs MS. 1985. Effect of tunicamycin on in vitro ripening of tomato pericarp tissue. *Physiologia Plantarum,* **63**: 417-424.

Hanson J, Smeekens S. 2009. Sugar perception and signaling -- an update. *Current Opinion in Plant Biology,* **12**: 562-567.

Helsper JP, Loewus FA. 1982. Metabolism of L-threonic acid in Rumex X acutus L. and Pelargonium crispum (L.) L'Her. *Plant Physiology,* **69**: 1365-1368.

Hernandez JA, Escobar C, Creissen G, Mullineaux PM. 2006. Antioxidant enzyme induction in pea plants under high irradiance. *Biologia Plantarum,* **50**: 395-399.

Horemans N, Potters G, Caubergs RJ, Asard H. 1998. Transport of ascorbate into protoplasts of Nicotiana tabacum bright yellow-2 cell line. *Protoplasma,* **205**: 114-121.

Horemans N, Foyer CH, Asard H. 2000a. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science,* **5**: 263-267.

Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H. 2000b. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry,* **38**: 531-540.

I

Innocenti AM, Bitonti MB, Arrigoni O, Liso R. 1990. The size of quiescent centre in roots of Allium cepa L. grown with ascorbic acid. *New Phytologist,* **114**: 507-509.

Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK. 2009. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany,* **60**: 663-678.

Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N. 2006. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum,* **126**: 343-355.

Ishikawa T, Shigeoka S. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry,* **72**: 1143-1154.

Ito M, Kodama H, Komamine A, Watanabe A. 1998. Expression of extensin genes is dependent on the stage of the cell cycle and cell proliferation in suspension-cultured Catharanthus roseus cells. *Plant Molecular Biology,* **36**: 343-351.

J

Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P. 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta,* **214**: 751-758.

K

Kerk NM, Feldman LJ. 1995. A biochemical-model for the initiation and maintenance of the quiescent center-implications for organization of root-meristems. *Development,* **121**: 2825-2833.

Kollist H, Moldau H, Oksanen E, Vapaavuori E. 2001. Ascorbate transport from the apoplast to the symplast in intact leaves. *Physiologia Plantarum,* **113**: 377-383.

Koo LC. 1996. Diet and lung cancer 20+ years later: More questions than answers? *International Union Against Cancer Workshop on Nutrition and Cancer*. Nagoya, Japan, Wiley-Liss.

Kubo A, Aono M, Nakajima N, Saji H, Tanaka K, Kondo N. 1999. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Research,* **112**: 279-290.

Kuzniak E. 2004. Ascorbate and ascorbate-dependent enzymes in detached tomato leaves under conditions modulating the ascorbate pool. *Acta Physiologiae Plantarum,* **26**: 327-333.

L

Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM. 2007. The missing step of the l-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an l-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **104**: 9534-9539.

Lamb C, Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **48**: 251-275.

Lester GE. 2004. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, beta-carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *Colloquium on Making Fruits and Vegetables Flavorful, Nutritive and Convenient to Eat*. Austin, TX, American Society of Horticultural Science.

Li M, Ma F, Zhang M, Pu F. 2008a. Distribution and metabolism of ascorbic acid in apple fruits (Malus domestica Borkh cv. Gala). *Plant Science,* **174**: 606-612.

Li PM, Castagnoli S, Cheng LL. 2008b. Red 'Anjou' pear has a higher photoprotective capacity than green 'Anjou'. *Physiologia Plantarum,* **134**: 486-498.

Li M, Ma F, Shang P, Zhang M, Hou C, Liang D. 2009. Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. *Planta,* **230**: 39-51.

Li M, Ma F, Guo C, Liu J. 2010. Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiology and Biochemistry,* **48**: 216-224.

Li Y, Schellhorn HE. 2007a. Can ageing-related degenerative diseases be ameliorated through administration of vitamin C at pharmacological levels? *Medical Hypotheses.,* **68**: 1315-1317.

Li Y, Schellhorn HE. 2007b. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition,* **137**: 2171-2184.

Li Y, Ren X, Song Y, Hou X. 2008c. Enhancement of GLDHase activity by light in maintaining AsA content in leaves of Brassica campestris ssp. chinensis. *Proceedings of the International Symposium on Endogenous and Exogenous Plant Bioregulators, IHC 2006, Seoul, Korea, 13-19 August 2006*., International Society for Horticultural Science (ISHS).

Lin LS, Varner JE. 1991. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (Cucurbita pepo L.). *Plant Physiology,* **96**: 159-165.

Linster CL, Adler LN, Webb K, Christensen KC, Brenner C, Clarke SG. 2008. A second GDP-L-galactose phosphorylase in Arabidopsis en route to vitamin C: covalent intermediate and substrat requirements for the conserved reaction. *Journal of Biological Chemistry,* **283**: 18483-18492.

Linster CL, Clarke SG. 2008. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends in Plant Science,* **13**: 567-573.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods,* **25**: 402-408.

Loewus FA, Loewus MW, Seib PA. 1987. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences,* **5**: 101 - 119.

Lopez-Andreu FJ, Lamela A, Esteban RM, Collado JG. 1986. Evolution of quality parameters in the maturation stage of tomato fruit. *Symposium on Protected Cultivation of Solanacea in Mild Winter Climates*. Albufeira, Portugal.

Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. 2004. myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology,* **134**: 1200-1205.

M

Madamba LSP, Morales ER, Villanueva TG. 1974. Some factors affecting the ascorbic acid contents of tomato fruits. *Philippine Journal of Nutrition,* **27**: 7-12.

Martin BA, Gauger JA, Tolbert NE. 1979. Changes in activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and 3 peroxisomal enzymes during tomato fruit-development and ripening. *Plant Physiology,* **63**: 486-489.

Massot C, Génard M, Stevens R, Gautier H. 2010. Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry,* **48**: 751-757.

Mc Collum J. 1946. Effect of sunlight exposure on the quality of constituents of tomato fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science,* **48**: 413-416.

Mieda T, Yabuta Y, Rapolu M, Motoki T, Takeda T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. 2004. Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant and Cell Physiology,* **45**: 1271-1279.

Mishra NP, Fatma T, Singhal GS. 1995. Development of antioxidative defense system of wheat seedlings in response to high light. *Physiologia Plantarum,* **95**: 77-82.

Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum,* **15**: 473-497.

Murneek AE, Maharg L, Wittner SH. 1954. Ascorbic acid (vitamin C) content of tomatoes and apples. *University of Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin,* **568**: 3-24.

Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H. 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry,* **383**: 320-322.

N

Navez B, Jost M, Buret M, Causse M. 2004. Intérêt nutritionnel de la tomate: impact des variétés et des itinéraires post-récoltes. *Infos CTIFL*. Centre Technique des Fruits et Légumes.

Nishikawa F, Kato M, Hyodo H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M. 2005. Effect of sucrose on ascorbate level and expression of genes involved in the ascorbate biosynthesis and recycling pathway in harvested broccoli florets. *Journal of Experimental Botany,* **56**: 65-72.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **49**: 249-279.

Noctor G. 2006. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment,* **29**: 409-425.

Nuss RF, Loewus FA. 1978. Further studies on oxalic acid biosynthesis in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiology,* **61**: 590-592.

O

Otter T, Polle A. 1994. The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (Picea abies L.). *Plant and Cell Physiology,* **35**: 1231-1238.

P

Padh H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology,* **68** 1166-1173.

Pallanca JE, Smirnoff N. 1999. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1, 4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology,* **120**: 453-461.

Pallanca JE, Smirnoff N. 2000. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *Journal of Experimental Botany,* **51**: 669-674.

Pastori GM, Kiddle G, Antoniw J, Bernard S, Veljovic-Jovanovic S, Verrier PJ, Noctor G, Foyer CH. 2003. Leaf vitamin c contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell,* **15**: 939-951.

Pateraki I, Sanmartin M, Kalamaki MS, Gerasopoulos D, Kanellis AK. 2004. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany,* **55**: 1623-1633.

Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH. 2003. The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiology,* **132**: 1631-1641.

Polle A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology,* **126**: 445-462.

Potters G, Gara Ld, Asard H, Horemans N. 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry,* **40**: 537-548.

Potters G, Horemans N, Jansen MAK. 2010. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry,* **48**: 292-300.

R

Rautenkranz A, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ. 1994. Transport of Ascorbic and Dehydroascorbic Acids across Protoplast and Vacuole Membranes Isolated from Barley (Hordeum vulgare L. cv Gerbel) Leaves. *Plant Physiology,* **106**: 187-193.

Rayle DL, Cleland RE. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology,* **99**: 1271-1274.

Razavi F, Keulemans J, Davey MW. 2005. A study of the L-ascorbate biosynthetic capacity of apple fruit. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences,* **70**: 213-6.

Richardson AC, Marsh KB, Boldingh HL, Pickering AH, Bulley SM, Frearson NJ, Ferguson AR, Thornber SE, Bolitho KM, Macrae EA. 2004. High growing temperatures reduce fruit carbohydrate and vitamin C in kiwifruit. *Plant, Cell and Environment,* **27**: 423-435.

Rivero RM, Ruiz JM, Romero L. 2004. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology,* **79**: 560-564.

Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR. 2003. Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiology,* **133**: 84-99.

S

Saito K, Kasai Z. 1969. Tartaric acid synthesis from L-ascorbic acid-1-14C in grape berries. *Phytochemistry (Oxford),* **8**: 2177-2182.

Saito K, Kasai Z. 1984. Synthesis of L-(+)-tartaric acid from L-ascorbic acid via 5-keto-D-gluconic acid in grapes. *Plant Physiology,* **76**: 170-174.

Shao H-b, Chu L-y, Shao M-a, Jaleel CA, Hong-mei M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies,* **331**: 433-441.

Sharples SC, Fry SC. 2007. Radioisotope ratios discriminate between competing pathways of cell wall polysaccharide and RNA biosynthesis in living plant cells. *Plant Journal,* **52**: 252-262.

Smeekens S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **51**: 49-81.

Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany,* **78**: 661-669.

Smirnoff N, Pallanca JE. 1996. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions,* **24**: 472-478.

Smirnoff N. 2000a. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences,* **355**: 1455-1464.

Smirnoff N. 2000b. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology,* **3**: 229-235.

Smirnoff N, Wheeler GL. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences,* **19**: 267-290.

Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* **52**: 437-467.

Stevens MA. 1986. Inheritance of tomato fruit quality components. *Plant Breeding Reviews,* **4**: 273-311.

Stevens R, Buret M, Garchery C, Carretero Y, Causse M. 2006. Technique for rapid, small-scale analysis of vitamin C levels in fruit and application to a tomato mutant collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **54**: 6159-6165.

Stevens R, Buret M, Duffe P, Garchery C, Baldet P, Rothan C, Causse M. 2007. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology,* **143**: 1943-1953.

Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M. 2008. Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, Cell and Environment,* **31**: 1086-1096.

Suzuki Y, Ogiso K. 1973. Development of ascorbate oxidase activity and its isoenzyme pattern in the roots of pea seedlings. *Physiologia Plantarum,* **29**: 169-172.

T

Tabata K, Takaoka T, Esaka M. 2002. Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry,* **61**: 631-635.

Takahama U. 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the

apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of Vigna angularis. *Plant and Cell Physiology,* **34**: 809-817.

Tamaoki M, Mukai F, Asai N, Nakajima N, Kubo A, Aono M, Saji H. 2003. Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono- gamma -lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in Arabidopsis thaliana. *Plant Science,* **164**: 1111-1117.

Tedone L, Hancock R, Alberino S, Haupt S, Viola R. 2004. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology,* **4**: 16.

Toor RK, Savage GP, Lister CE. 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis,* **19**: 1-10.

Torres CA, Andrews PK. 2006. Developmental changes in antioxidant metabolites, enzymes, and pigments in fruit exocarp of four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes: beta -carotene, high pigment-1, ripening inhibitor, and 'Rutgers'. *Plant Physiology and Biochemistry,* **44**: 806-818.

Torres CA, Andrews PK, Davies NM. 2006. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *Journal of Experimental Botany,* **57**: 1933-1947.

V

Valero E, Gonzalez-Sanchez MI, Macia H, Garcia-Carmona F. 2009. Computer Simulation of the Dynamic Behavior of the Glutathione-Ascorbate Redox Cycle in Chloroplasts. *Plant Physiology,* **149**: 1958-1969.

Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology,* **117**: 1103-1114.

Veljovic-Jovanovic SD, Pignocchi C, Noctor G, Foyer CH. 2001. Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of arabidopsis is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiology,* **127**: 426-435.

Venter F. 1977. Solar radiation and vitamin C content of tomato fruits. *Acta Horticulturae*: 121-127.

Viola R, Vreugdenhil D, Davies HV, Sommerville L. 1998. Accumulation of L-ascorbic acid in tuberising stolon tips of potato (Solanum tuberosum L.). *Journal of Plant Physiology,* **152**: 58-63.

W

Walker MA, McKersie BD. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology,* **141**: 234-239.

Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature,* **393**: 365-369.

Williams M, Loewus FA. 1978. Biosynthesis of (+)-tartaric acid from L-[4-14C]ascorbic acid in grape and geranium. *Plant Physiology,* **61**: 672-674.

Wise RR, Naylor AW. 1987. Chilling-enhanced photooxidation - the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastucture. *Plant Physiology,* **83**: 272-277.

Wokes F, Organ JG. 1943. Oxidizing enzymes and vitamin C in tomatoes. *Biochemical Journal,* **37**: 259-265.

Wolucka BA, Van Montagu M. 2003. GDP-mannose 3 ',5 '-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry,* **278**: 47483-47490.

Wolucka BA, Van Montagu M. 2007. The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: An opinion. *Phytochemistry (Oxford),* **68**: 2602-2613.

Wonnacott TH, Wonnacott RJ. 1991. Statistique. Paris, Economica.

Y

Yabuta Y, Mieda T, Rapolu M, Nakamura A, Motoki T, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S. 2007. Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany,* **58**: 2661-2671.

Yahia EM, Contreras-Padilla M, Gonazalez-Aguilar G. 2001. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology,* **34**: 452-457.

Yang JC, Loewus FA. 1975. Metabolic conversion of L-ascorbic acid to oxalic acid in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiology,* **56**: 283-285.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology,* **123**: 223-233.

Z

Zanor MI, Rambla J-L, Chaib J, Steppa A, Medina A, Granell A, Fernie AR, Causse M. 2009. Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of Experimental Botany,* **60**: 2139-2154.

Zhang W, Lorence A, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL. 2009. AMR1, an Arabidopsis Gene That Coordinately and Negatively Regulates the Mannose/L-Galactose Ascorbic Acid Biosynthetic Pathway. *Plant Physiology,* **150**: 942-950.

Zhou Y, Zhang Y, Zhao X, Yu H, Shi K, Yu J. 2009. Impact of light variation on development of photoprotection, antioxidants, and nutritional value in Lactuca sativa L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **57**: 5494-5500.

Annexes

ANNEXES

Annexe I

INRA Unité PSH	**MODE OPERATOIRE**	MO-AL-09-A
	Extraction de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche	Page 1 sur 4

Avant toute utilisation de ce document, vérifier sur le réseau informatique de l'unité qu'il est toujours en vigueur.

1. OBJECTIFS :

Décrire les différentes étapes nécessaires pour réaliser l'extraction de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche.

2. DOMAINES D'APPLICATION :

Ce mode opératoire constitue la 1ère partie (sur 2) de l'analyse de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche. Il s'applique au laboratoire d'analyses de PSH.

3. DESTINATAIRES :

Toute personne devant réaliser ce mode opératoire.

4. MODIFICATIONS APPORTEES :

Première version du document.

Nom du rédacteur : Sylvie Sérino Date et signature **:**	**Nom du vérificateur :** Capucine Massot Date et signature **:**
Nom de l'approbateur: Doriane Bancel Fonction **:** Date et signature **:**	**Validation par le directeur d'unité** Nom : Laurent Gomez Date et signature **:**

5. HYGIENE ET SECURITE :

Manipuler les produits chimiques, particulièrement l'azote liquide, avec les précautions d'usage.

6. DOCUMENTS RATTACHES :

Notices et instructions d'utilisation des matériels (balance de précision, micropipette, centrifugeuse de paillasse, agitateur de microtubes, bain à ultrasons).

Référence bibliographique:

Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, No.19, pp. 61593-6165, 2006,* Rebecca Stevens et al.

7. MATERIELS ET PRODUITS :

7-1 Matériels :

Appareillage : agitateur de type Vortex, centrifugeuse (Eppendorf 5415R), micropipettes, balances de précision (1/10 mg et 1/10 g), distributeur de glace pilée, banque froide (~ -30°C).

Consommables : microtubes (2 mL et 1,5 mL), pointes micropipettes, portoirs, verrerie courante de laboratoire, glace pilée, azote liquide et récipient adapté, pailles et piston adapté.

7-2 Produits :

- Azote liquide en quantité suffisante
- Acide trichloroacétique (TCA) CAS [76-03-9]
- Eau ultra pure MilliQ (eau UP)

7-3 Préparation du solvant d'extraction (acide trichloroacétique 6% = TCA 6%) :

- Peser **30 g** de TCA dans une fiole de 500ml (balance 1/10 g).
- Solubiliser avec de l'eau UP, QSP **500 mL**, homogénéiser et conserver à +4°C.

8. CONTENU :

Ce mode opératoire décrit les opérations à réaliser pour **extraire la vitamine C** contenue dans la **poudre végétale fraîche**.

8-1 Précautions relatives à l'extraction de la vitamine C :

La **Vitamine C** dans les végétaux est **instable** et s'oxyde rapidement. Pour conserver son intégrité, il est nécessaire de maintenir dans l'**azote liquide** les flacons contenant les poudres végétales fraîches. Les **prises d'essai**, immédiatement placées en **milieu acide** afin d'améliorer la stabilité de la vitamine C, sont stockées dans de la **glace pilée**. Les extraits finaux, eux aussi maintenus dans de la glace pilée, doivent immédiatement après leur préparation être utilisés pour le dosage et ne peuvent être congelés.

8-2 Extraction de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche :

Les étapes suivantes en italique peuvent être éxécutées la veille.

- Mettre en route la **banque froide le plus tôt possible dans la journée**.
- Mettre en route la **centrifugeuse** (4°C).
- Placer l'**agitateur** de type Vortex à proximité immédiate de la banque froide.
- ***Identifier et tarer*** *(précision 1/10 mg) autant de microtubes de* ***2mL*** *que d'échantillons à analyser (20 maxi/jour de manipulation).*
- *Ajouter* ***600 µL*** *de solution de* ***TCA 6%*** *froide (~+ 4°C).*
- ***Peser*** *les microtubes 2 mL contenant le TCA 6% avant de les stocker à +4°C.*
- *Identifier autant de microtubes de 1,5 mL que d'échantillons.*
- Placer dans la banque froide (environ à mi-hauteur) un récipient de glace pilée avec les microtubes de 2 mL contenant le solvant d'extraction et ceux de 1,5 mL vides.
- Dans la banque froide, **placer dans l'azote liquide, en veillant à ce qu'il n'en manque jamais, les flacons de poudre végétale fraîche** (conservés à -80°C) ainsi que les pailles et le piston servant au prélèvement.

Pour une analyse de qualité, effectuer le plus rapidement et le plus rigoureusement possible les étapes suivantes :

- Introduire dans chaque **microtube de 2 mL**, (carottage avec paille et piston par exemple), une **prise d'essai adéquate, la plus faible possible,** de poudre végétale fraîche à analyser. A titre indicatif, la prise d'essai pour la tomate varie entre 300 et 600 mg pour les fruits et 100 et 150 mg pour les feuilles.
- Replacer aussitôt dans l'azote liquide le flacon de prélèvement contenant la poudre végétale fraîche.
- **Immédiatement après l'ajout de la prise d'essai**, **agiter au Vortex** le microtube correspondant, jusqu'à **homogénéisation complète** (~ 30 s), le solvant d'extraction stabilisant la Vitamine C.
- Mettre en attente le microtube à l'envers dans la glace pilée.
- Lorsque tous les prélèvements sont effectués, replacer à -80°C les flacons contenant les poudres fraîches.
- **Extraire la vitamine C par agitation au Vortex, en homogénéisant** à nouveau quelques secondes le contenu de tous les microtubes.
- Sécher et **peser** chaque microtube afin de déterminer la valeur de la prise d'essai (balance 1/10 mg).
- **Centrifuger** les extraits pendant 15 minutes (4°C, à 13200 tr.min^{-1}).
- **Transférer** ~ 500µl de **surnageant** dans les microtubes de 1,5 mL numérotés. Si des particules végétales sont prélevées par inadvertance, effectuer une nouvelle centrifugation (2 min) afin de les éliminer.
- **Placer dans la glace pilée les microtubes contenant les extraits prêts à être dosés.**

<u>Procéder immédiatement au dosage de la vitamine C</u>, celle-ci se dégradant rapidement malgré les précautions, en appliquant le mode opératoire approprié :

- MO-AL-26-* Dosage de la vitamine C (méthode manuelle)
- MO-AL-20-* Dosage de la vitamine C (méthode robotisée)

**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.***

8-3 Schéma du protocole d'extraction de la vitamine C :

Respecter les précautions relatives à l'extraction de la vitamine C

Identifier et tarer les microtubes de 2 mL
Ajouter 600 µL de solution TCA 6% froide
Peser à nouveau les microtubes de 2 mL avant de les stocker à + 4°C
Peser autant de microtubes de 1,5 mL que d'échantillons

Préparation possible la veille, 30

↓

Introduire une prise d'essai adéquate dans chaque microtube de 2 mL taré contenant 600µL de TCA 6 % (4°C)

↓

Homogénéiser complètement et immédiatement au Vortex (~ 30 s)
Mettre en attente dans la glace pilée (microtube à l'envers)

1H10min

↓

Extraire la vitamine C par agitation (Vortex)
Sécher, peser et replacer le microtube dans la glace pilée

40 min

↓

Centrifuger pendant 15 min (13200 tr/min, 4°C)
(séparation des phases)

15 min

↓

Transférer le surnageant dans un microtube de 1,5 mL
Stocker dans la glace pilée et doser immédiatement

15 min

⇩

MO-AL-26-* Dosage de la vitamine C (méthode manuelle)

MO-AL-20-* Dosage de la vitamine C (méthode robotisée)

**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.***

Unité PSH	MODE OPERATOIRE	MO-AL-26-A
	Dosage colorimétrique manuel de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche (par microplaque)	Page 1 sur 6

Avant toute utilisation de ce document, vérifier sur le réseau informatique de l'unité qu'il est toujours en vigueur.

1. OBJECTIF :

Décrire les différentes étapes nécessaires pour réaliser l'extraction de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche.

2. DOMAINE D'APPLICATION :

Ce mode opératoire constitue la 2ème partie (sur 2) de l'analyse de la vitamine C dans la poudre végétale fraîche. Il s'applique au laboratoire d'analyses de PSH.

3. DESTINATAIRES :

Toute personne devant réaliser ce mode opératoire.

4. MODIFICATIONS APPORTEES :

Première version du document.

Nom du rédacteur : Sylvie Sérino Date et signature **:**	**Nom du vérificateur :** Capucine Massot Date et signature **:**
Nom de l'approbateur: Doriane Bancel Fonction : RAQ Date et signature **:**	**Validation par le directeur d'unité** Nom : Laurent Gomez Date et signature **:**

5. HYGIENE ET SECURITE :

Manipuler les produits chimiques avec les précautions d'usage relatives à leur toxicité (hotte aspirante, gants et lunettes), particulièrement le N-éthylmaléimide (NEM), le 2,2-Dipyridyl et l'acide orthophosphorique.

6. DOCUMENTS RATTACHES :

Notices et instructions d'utilisation des matériels (lecteur de microplaques, pH-mètre, étuve, balance de précision, micropipette, agitateurs de microtubes, bain à ultrasons).

Référence bibliographique:
Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 54, No.19, pp. 61593-6165, 2006*, Rebecca Stevens et al.

7. MATERIELS ET PRODUITS :

7-1 Matériels :

Appareillage : agitateur de type Vortex, pH-mètre, étuve, micropipettes, distributeur de glace pilée, balances de précision (1/10 mg, 1/100mg et 1/10 g), bain à ultrasons, lecteur de microplaques, appareillage de filtration sous vide (type Millipore), agitateur magnétique, pompe à vide.

Consommables : microtubes eppendorf (1,5 mL), pointes micropipettes, portoirs, verrerie courante de laboratoire, solutions d'étalonnage pour pH-mètre, glace pilée, barreau aimanté, nacelles de pesée, filtres pour solution aqueuse, D = 47mm ; porosité = 0,45μm (exemple HATF de Millipore).
.

7-2 Produits :

- Acide orthophosphorique (H_3PO_4) 85% CAS [7664-38-2]
- Acide trichloroacétique (TCA) CAS [76-03-9]
- Ascorbate de sodium CAS [134-03-2]
- Chlorure ferrique ($FeCl_3$) CAS [7705-08-0]
- DL-Dithiothréitol (DTT) CAS [3483-12-3]
- 2,2-Dipyridyl CAS [366-18-7]
- Ethanol CAS [64-17-5],
- $Na_2HPO_4.12H_2O$ (di-sodium hydrogen orthophosphate 12-hydrate) CAS [10039-32-4]
- $NaH_2PO_4.1H_2O$ (sodium dihydrogen orthophosphate 1-hydrate) CAS [10049-21-5]
- N-éthylmaléimide (NEM) CAS [128-53-0]
- Eau ultra pure MilliQ (eau UP)

8. CONTENU :

Ce mode opératoire décrit les opérations à réaliser pour **doser la vitamine C** contenue dans des extraits issus de poudre végétale fraîche.

8-1 Précautions relatives à la vitamine C :

Les extraits utilisés pour doser la vitamine C contenue dans les poudres végétales fraîches sont préparés selon le mode opératoire **MO-AL-09-A** et maintenus dans la glace pilée pendant la durée du dosage.

8-2 Principe simplifié du dosage :

Cette méthode colorimétrique par microplaque permet le **dosage simultané** de la **forme réduite naturelle de la Vitamine C** (ascorbate) et de la **Vitamine C totale**, dosée sous forme réduite après réduction de la forme oxydée par le DTT (agent réducteur). La quantité de **Vitamine C oxydée** (déhydroascorbate) initialement présente dans les échantillons est obtenue par différence. Cette méthode permet le dosage simultané de 20 échantillons. Pour de plus amples détails, se référer à l'article cité en référence au paragraphe 6.

8-3 Préparation des Réactifs :

- **Acide trichloroacétique 6% (TCA 6%) :**

- Solubiliser 30 g de **TCA** dans une fiole jaugée de 500ml avec de l'eau UP. Conserver à 4°C.

- **Tampon phosphate 0,4M – pH 7,4 :**

- Introduire 35,8 g de **$Na_2HPO_4.12H_2O$** dans une fiole jaugée de 250 mL. Ajouter ~ 50 mL d'eau UP. Placer dans le bain à ultrasons jusqu'à dissolution complète et ajuster le volume (***Solution (1)***).
- Introduire 5,52 g de **$NaH_2PO_4.1H_2O$** dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajouter ~ 50 mL d'eau UP. Placer dans le bain à ultrasons jusqu'à dissolution complète et ajuster le volume (***Solution (2)***).
- Transvaser la ***solution (1)*** dans un flacon muni d'un barreau aimanté. Tout en agitant, ajuster la valeur du pH à 7,4 avec la ***solution (2)***.
- Filtrer sous vide et conserver ce **tampon phosphate 0,4M – pH 7,4** à 4°C (avec le barreau aimanté).

- **DL-Dithiothréitol (DTT) 5mM (m/v, agent réducteur) :**

- Peser 40 mg de **DTT** dans un flacon.
- Solubiliser avec 50 mL de **tampon phosphate 0,4M – pH7,4**.
- Stocker la solution à ~ -20°C dans des microtubes, sous forme d'aliquotes de 1 mL.

- **N-ethylmaléimide (NEM) 0,5% (m/v, neutralise l'excès de DTT) :**

- Peser 250 mg de **NEM** dans un flacon.
- Solubiliser avec 50 mL d'eau UP.
- Stocker la solution à ~ -20°C dans des microtubes, sous forme d'aliquotes de 1,2 mL.

- **Réactif de coloration :**

Instable, ce réactif est préparé **juste avant utilisation** dans un flacon protégé de la lumière en mélangeant **13,2 mL de *réactif (a)*** et **4,8 mL de *réactif (b)***, quantités nécessaires pour 2 microplaques.

- ***Réactif (a)*** ⇔ 4,6% (m/v) TCA + 31% H_3PO_4 + 0,6% (m/v) $FeCl_3$:
  - Mesurer 18,5 mL d'**acide orthophosphorique 85%** dans une éprouvette graduée.
  - Mesurer 31,5 mL d'**eau UP** dans une autre éprouvette.
  - Introduire, dans un flacon en verre, la moitié de l'eau UP **puis** la totalité de l'acide.
  - Ajouter 2,3 g de **TCA**, en rinçant la nacelle de pesée avec une partie de l'eau UP restante.
  - Ajouter 0,3g de **$FeCl_3$**, en rinçant la nacelle de pesée avec le reste d'eau UP.

Le réactif (a) de coloration se conserve **2 à 3 semaines à 4°C et à l'abri de la lumière**.

- ***Réactif (b)*** ⇔ 4% (m/v) 2,2-Dipyridyl dans éthanol 70% (v/v) :
  - Préparer de l'éthanol à 70% (v/v) en mélangeant 70 mL d'éthanol et 30 mL d'eau UP.
  - Dans un flacon en verre, solubiliser 2 g de 2,2-Dipyridyl avec 50 mL d'éthanol à 70%, en rinçant la nacelle de pesée.

Le réactif (b) de coloration se conserve **2 à 3 semaines à 4°C et à l'abri de la lumière**.

- **Acide ascorbique 5mM (sel de sodium, solution mère (SM) de la gamme étalon) :**

Préparer **quotidiennement**, juste avant de commencer le dosage, une **SM d'ascorbate de sodium** à 1mg/mL dans du TCA 6% froid (4°C) :

- Peser 20 mg d'ascorbate de sodium dans une nacelle de pesée (balance 1/100 mg).
- Transvaser dans une fiole jaugée de 20 mL entourée de papier aluminium et contenant quelques mL de TCA 6% froid.
- Solubiliser et ajuster au trait de jauge avec du TCA 6%, en rinçant la nacelle de pesée.
- Homogénéiser et transvaser la **SM** dans un flacon maintenu dans la **glace pilée**, à l'**abri de la lumière**.

8-4 Préparation de la gamme étalon d'ascorbate de sodium :

La gamme d'étalonnage est préparée juste avant le dosage, dans des microtubes de 1,5 mL identifiés G0 à G7 et refroidis dans la glace pilée.
En se référant au tableau suivant, introduire dans chaque microtube le volume de **TCA 6%** froid puis celui de **SM** d'ascorbate de sodium adéquat. Homogénéiser et conserver les microtubes dans la glace pilée.

Point de gamme	**G0**	**G1**	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**	**G6**	**G7**
Volume de TCA 6% froid (μL)	200	195	190	180	170	160	140	120
Volume de SM 5mM d'ascorbate de Na (μL)	0	5	10	20	30	40	60	80
[C] en ascorbate de Na (nmole/20 μL ou /puits)	0	2,5	5	10	15	20	30	40

8-5 Dosage de la vitamine C dans les extraits :

8-5-1 Préparation au dosage :

Les actions suivantes sont à effectuer la veille ou le plus tôt possible le matin :

- Renseigner le fichier de **suivi de numérotation des microplaques**, dans « labo_chimie », pour obtenir **2 N° de microplaques**.
- Faire un copier - coller de la feuille de calcul vierge en vigueur pour l'analyse de la vitamine C, renommer avec le N° de microplaque et remplir le plan de plaque pour identifier les échantillons à doser.

Les actions suivantes sont à effectuer le jour même, à l'avance:

- Mettre en route et régler l'étuve à 37°C.
- Décongeler 3 aliquotes de solution de DTT 5mM et 2 aliquotes de solution de NEM 0,5%.
- Sortir le tampon phosphate du réfrigérateur et homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique.
- Mettre en route le lecteur de microplaque.

8-5-2 Préparation et schéma d'une microplaque :

Pour chaque échantillon, 2 répétitions sont réalisées pour doser la vitamine C totale (⇔ avec DTT) et 2 pour doser la forme réduite naturelle (⇔ sans DTT), **le tout sur 2 microplaques simultanément**.
Les extraits d'échantillons sont déposés dans les puits des microplaques au même moment pour la Vitamine C totale (colonnes 3 à 7) et pour la forme réduite (colonnes 8 à 12), conformément au schéma ci dessous. *Par exemple, pour l'échantillon 1 (E1T et E1R), l'extrait est déposé dans 8 puits au total : A3 ; B3 ; A8 et B8 des 2 microplaques.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	G0	G0	E1T	E5T	E9T	E13T	E17T	E1R	E5R	E9R	E13R	E17R
B	G1	G1	E1T	E5T	E9T	E13T	E17T	E1R	E5R	E9R	E13R	E17R
C	G2	G2	E2T	E6T	E10T	E14T	E18T	E2R	E6R	E10R	E14R	E18R
D	G3	G3	E2T	E6T	E10T	E14T	E18T	E2R	E6R	E10R	E14R	E18R
E	G4	G4	E3T	E7T	E11T	E15T	E19T	E3R	E7R	E11R	E15R	E19R
F	G5	G5	E3T	E7T	E11T	E15T	E19T	E3R	E7R	E11R	E15R	E19R
G	G6	G6	E4T	E8T	E12T	E16T	E20T	E4R	E8R	E12R	E16R	E20R
H	G7	G7	E4T	E8T	E12T	E16T	E20T	E4R	E8R	E12R	E16R	E20R

Légende du plan de microplaque :

- Colonnes1 et 2 : **G0 à G7: points de gamme, dans l'ordre croissant de concentration en ascorbate de sodium (2 répétitions avec DTT)**
- **Colonnes 3 à 7 :** E1T à E20T ; Dosage de la Vitamine C totale contenue dans les échantillons E1 à E20 (⇔ forme réduite naturelle + forme oxydée réduite par le DTT ; 2 répétitions).
- **Colonnes 8 à 12 :** E1R à E20R ; Dosage de **la Vitamine C réduite naturelle** contenue dans les échantillons (⇔sans DTT ; 2 répétitions).

8-5-3 Dosage de la vitamine C :

En se référant au plan de microplaque ci-dessus afin d'identifier les échantillons, **respecter étape par étape et colonne par colonne, le tableau** suivant afin de procéder au **dosage de la vitamine C**.

Etape	**Colonnes 1 et 2** *gamme ascorbate*	**Colonnes 3 à 7** *Vitamine C totale/échantillon*	**Colonnes 8 à 12** *Vitamine C réduite naturelle/échantillon*
	Respecter le plan de microplaque pour les dépôts dans les puits		
1	Déposer **20µl** d'étalon ascorbate	Déposer **20µl** d'extrait d'échantillon	Déposer **20µl** d'extrait d'échantillon
2	Ajouter **20µl** de solution de **DTT**		Ajouter **20µl** de **tampon phosphate 0,4M pH 7,4**
	Agiter avec le lecteur de microplaque		
3	Couvrir d'un couvercle et laisser **incuber** dans l'étuve à **37°C** pendant **20 minutes** **Préparer le réactif de coloration** (paragraphe 8.3)		
4	Ajouter **10µl** de solution de **NEM**		Ajouter **10µl** de **tampon phosphate 0,4M pH 7,4**
	Agiter avec le lecteur de microplaque		
5	Ajouter **80µl de réactif de coloration** Agiter avec le lecteur de microplaque		
6	Couvrir d'un couvercle et laisser **incuber** dans l'étuve à **37°C** pendant **50 minutes**		
7	Agiter avec le lecteur de microplaques et effectuer la **mesure de l'absorbance** dans les puits des **2 microplaques** à la longueur d'onde de **550 nm**		

8-5-4 Traitement des données :

Enregistrer les fichiers issus de la lecture des microplaques et copier les données brutes dans les feuilles de calcul respectives. Suivre les instructions des feuilles de calcul pour obtenir les résultats du dosage de la vitamine C.

Annexe II

INRA Unité PSH	**MODE OPERATOIRE**	MO-AL-01-A
	Micro-Extraction des acides organiques, des sucres solubles et de l'amidon (dosage HPLC)	Page 1 sur 5

Avant toute utilisation de ce document, vérifier sur le réseau informatique de l'unité qu'il est toujours en vigueur.

1- OBJECTIF :

Décrire les différentes étapes nécessaires à l'extraction des sucres solubles, des acides organiques et de l'amidon ainsi qu'à la purification de l'extrait contenant les sucres solubles et les acides organiques à partir de 10 mg de poudre végétale, en vue d'un dosage par HPLC.

2- DOMAINE D'APPLICATION :

Ce mode opératoire s'applique au protocole destiné à doser les composés cités ci-dessus.

3- DESTINATAIRES :

Toute personne devant réaliser ce mode opératoire.

4- MODIFICATIONS APPORTEES :

Première version du document.

Nom du rédacteur : Mouhamadou DIAGNE Date et signature **:**	**Nom du vérificateur :** Doriane Bancel Date et signature **:**
Nom de l'approbateur: Guy Costagliola Fonction **:** Date et signature **:**	**Validation par le directeur d'unité** Nom : Laurent Gomez Date et signature **:**

5- HYGIENE ET SECURITE :

Le chloroforme et le méthanol sont à manipuler avec des gants et sous la hotte aspirante en raison des vapeurs toxiques qu'ils libèrent et de leur toxicité par contact avec la peau.

6- DOCUMENTS RATTACHES:

Notices et instructions d'utilisation des matériels (balance de précision, étuve sous vide, concentrateur centrifugeuse sous vide (SpeedVac), micropipette, centrifugeuse de paillasse)

IN-AL-03-* : Instruction pour l'utilisation de la Base de données BASILE

**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.***

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES: *

* The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of Sugars in plant tissues – validation of a micro-method *J Sci Food Agric* 87:1893–1905 (2007) Laurent Gomez, Doriane Bancel, Emilie Rubio and Gilles Vercambre

*A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants *J Sci Food Agric* 82:360–369 (online: 2002) Laurent Gomez, Emilie Rubio and Magali Augé

7- MATERIELS ET PRODUITS NECESSAIRES :

7-1 Matériels:

Appareillage : étuve sous vide, agitateur vortex, concentrateur centrifugeuse sous vide (SpeedVac SC 200 Savant), centrifugeuse (Eppendorf 5415R), micropipette, rotateur à disque = roue de paillasse (Stuart-SB3), balance de précision, distributeur, portoirs, béchers, pain de glace **très froid**, pompe à vide.
Consommables : microtubes 2 ml et 1.5 ml, 2 seringues plastiques (20ml, 1 dédiée pour le méthanol et 1 dédiée pour l'eau), seringues à insuline 1ml (Tuberculin de TERUMO Ribbon pack), cartouche C-18 (WAT020515 Sep-Pak plus Waters), tubes HPLC (22476 Waters), filtre GHP (0.2μm et 13mm de diamètre, réf 514.4121 VWR), pointes micropipettes, seringue distributeur.

7-2 Produits :

Eau ultra-pure (H_2O)
polyvinylpolypyrrolidone PVPP (P-6755 sigma réf protocole Klepper et Hageman 1969, CAS : [25249-54-1])
chloroforme ($CHCl_3$) CAS : [67-66-3]
méthanol (CH_3OH) CAS : [67-56-1]
éthanol (CH_3CH_2OH) CAS : [64-17-5].

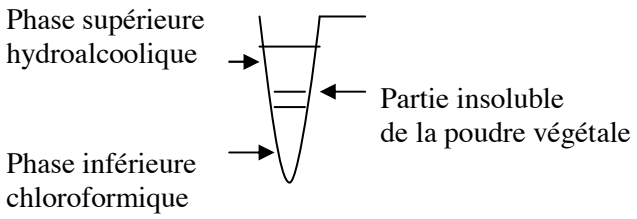
Solution A : 500 ml eau UP+ 500 ml méthanol

8- CONTENU:

8-1 Pesée et Extraction :

Disposer les poudres végétales 1h à l'étuve sous vide 30°C.
Numéroter une série de 32 microtubes (2 ml).
Opération à répéter 2 fois pour l'ensemble du mode opératoire (1 fois avec des microtubes 2 ml et 1 fois avec des microtubes 1.5 ml).
Si l'amidon est demandé sur ces échantillons, tarer la **1ère série** de microtube 2 ml, à vide en utilisant le logiciel Basile ou en faisant une saisie manuelle.
Sortir les poudres végétales de l'étuve sous vide
Peser environ **10mg** de poudre végétale dans chaque microtube.
Conserver la pesée exacte sur Basile ou sur un support papier.
Disposer les microtubes sur un portoir au-dessus d'un pain de glace.
A l'aide d'un distributeur, ajouter **1ml** de mélange de la solution A (mélange eau-méthanol).
Ajouter **300µl** de chloroforme.
Agiter au vortex puis sur la roue de paillasse pendant 20min, 40rpm à +4°C.
Centrifuger 5min ,13200tr/min à + 4°C, on observera alors 2 phases liquides :

Phase supérieure (milieu hydroalcoolique), phase inférieure (milieu chloroformique). Les 2 phases sont séparées par la partie insoluble de la poudre végétale.



8-2 Séparation des extraits :

**Préparation des extraits acides organiques et sucres solubles :*
Les microtubes sont toujours disposés sur un portoir au-dessus d'un pain de glace.
Pipeter **800µl** de **surnageant** (phase supérieure hydroalcoolique) et conserver cet extrait dans une 2ème série de microtubes 2ml numérotés pour la micro-purification (cf. 8-3).

NB : Si les extraits ne sont pas immédiatement évaporés, il faut les conserver à -20°C (durée de stockage non testée, max 15 jours).

**Préparation de l'extrait amidon :*
Si l'amidon est dosé.
Ajouter 1 ml de méthanol sur le reste d'extrait et le culot. Agiter au vortex puis avec la roue de paillasse pendant 20min, 40rpm à +4°C.
Centrifuger 15 min ,13200tr/min à + 4°C.
Jeter le surnageant par transvasement ou par aspiration avec la pompe à vide. La consistance du culot est variable selon le type de végétal et d'organe, choisir la méthode la plus adaptée pour éliminer le surnageant.
Ajouter 100 µL d'éthanol au dessus du culot et conserver à -20 °C (durée de stockage non testée, max 3 mois).

Pour la suite de la préparation de l'extrait amidon en vue d'un dosage sur microplaque se référer au Mode Opératoire **MO-AL-02-***. (**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*).***

8-3 Evaporation et purification de l'extrait des sucres solubles et acides organiques :

Evaporer **à sec**, au SpeedVac sans chauffage, pendant environ 3h.
Les microtubes sont toujours disposés sur un portoir au-dessus d'un pain de glace.
A l'aide d'une micropipette, ajouter **1600µl** d'eau ultra pure.
Vortexer le mélange et laisser au repos 10 min à +4°C.
Ajouter environ **10mg** de PVPP pour l'élimination des phénols
Vortexer fortement 10 secondes chaque microtube, laisser les microtubes à +4°C pendant 5 min et refaire l'opération 2 fois **ou** disposer les microtubes sur la roue de paillasse pendant 20 min à +4°C.
Centrifuger 10 min (13200trs/min à +4°C).
Récupérer à l'aide d'une pipette le maximum de surnageant dans la 3ème série de microtubes (1.5 ml) numérotés.

La purification s'effectue avec un passage de l'extrait sur une cartouche d'extraction en phase solide C18 qui permet l'élimination des chaînes apolaires et sur un filtre de 0.2µm de diamètre de pores pour l'élimination des grosses particules.

Pour chaque microtube de la série d'échantillons, réaliser les étapes suivantes :

Etape1 : Conditionnement de la cartouche C-18 :

Injecter sur la C-18 **5ml** de méthanol (avec la seringue 20 ml dédiée méthanol) puis **15ml** d'eau ultra-pure (avec la seringue 20 ml dédiée eau).
Sécher la C-18 avec la seringue 20 ml (dédiée eau) remplie d'air (2 fois) et tapoter sur du papier absorbant.
Prélever **1ml** d'extrait avec la seringue à insuline et charger la C-18 pour l'imprégner.
Eliminer ce filtrat.

Etape2 : Récupération du filtrat :

Prélever le reste d'extrait (environ 500 µL), adapter en même temps la seringue à insuline, la C-18 et le filtre 0.2 µm.
Eliminer les premières gouttes sur un bécher à poubelle.
Récupérer le reste du filtrat dans un tube HPLC numéroté.
Déconnecter la seringue à insuline, la remplir d'air, la connecter à nouveau à la cartouche C18 couplée au filtre et injecter l'air afin de récupérer les dernières gouttes de filtrat dans le tube HPLC.

NB : *Ne pas remplir complètement le tube HPLC (500µl au maximum).*
Il faut changer la cartouche C18 tous les 32 échantillons (environ).
Pour un gain de temps, il est possible de traiter deux échantillons simultanément sur 2 cartouches distinctes.

Stocker ces extraits à -20°C (durée de stockage non testée, max 3 mois) ou les doser directement en HPLC selon les modes opératoires (**MO-AL-10-*et/ou MO-AL-11-***)
**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.***

8-4 Schéma du protocole :

Mettre les poudres végétales 1H à l'étuve sous vide 30°C
Préparer des microtubes de 2ml
Ajouter environ **10 mg** de poudre végétale

↓

Ajouter **1ml** de mélange méthanol-eau (**v/v,** solution A) et **300µl** de chloroforme

↓

Vortexer et agiter pendant 20min, 40rpm +4°C (roue de paillasse : Rotateur Stuart SB3)

↓

Centrifuger 5min à+ 4°C, 13200trs/mn (Eppendorf 5415R)

↓

Traitement extrait SS AO

Récupérer **800µl** du surnageant dans des cupules 2ml pour la préparation de l'extrait SS et AO

↓

Evaporer **à sec**, environ 3H au SpeedVac **sans chauffage**

↓

Reprendre dans **1600µl** d'eau UP
Vortexer et laisser au repos pendant 10min

↓

Ajouter **10mg** de PVPP, Vortexer à plusieurs reprises ou vortexer et agiter sur la roue à 4°C, 20min, 40 rpm

↓

Centrifuger 10 min, 13200 trs/mn et transvaser le maximum de surnageant dans le microtube 1.5 ml
Conditionner la C-18 avec **5ml** de méthanol, 1**5ml** d'eau UP , **40 ml** d'air et **1ml** de surnageant

↓

Combiner la C-18 avec le filtre 0.2 µm, remplir au maximum la seringue à insuline avec l'extrait (jeter les premières gouttes), récupérer le filtrat dans les tubes HPLC numérotés

→

Stocker à -20°C (durée du stockage non testée, max 3 mois) ou doser directement par HPLC

Si l'amidon est dosé

Traitement du culot et du reste de filtrat pour la préparation de l'extrait amidon

↓

Ajouter 1 ml de méthanol dans les microtubes.initiaux
Vortexer et agiter sur la roue à 4°C, 20min, 40 rpm
Centrifuger 15 min, 13200 tr/min à +4°C
Eliminer le surnageant (transvasement ou aspiration)
Conserver le culot, en ajoutant 100 µL d'éthanol et stocker à -20°C
(durée du stockage non testée, max 3 mois)

Pour les besoins de préparation d'extrait d'amidon, se référer

SS : sucre soluble
AO : acide organique
**** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-****

Annexe III

INRA Unité PSH	**MODE OPERATOIRE**	MO-AL-02-A
	Préparation de l'extrait amidon pour un dosage par microplaque	Page : **1/4**

1- OBJECTIF :

Décrire les différentes étapes nécessaires à la préparation de l'extrait amidon issu de la poudre végétale en vue d'un dosage sur microplaque.

2- DOMAINE D'APPLICATION :

Ce mode opératoire s'applique au protocole de la préparation de l'extrait amidon avec **5** ou **10 mg** de poudre végétale en micro-extraction.

3- DESTINATAIRES :

Toute personne devant faire cette préparation dans le laboratoire de l'unité PSH.

4- MODIFICATIONS APPORTEES :

Première version du document.

Nom du rédacteur : Rubio Emilie Date et signature **:**	**Nom du vérificateur :** Sérino Sylvie Date et signature **:**
Nom de l'approbateur: Bancel Doriane Fonction : RAQ Date et signature **:**	**Validation par le directeur d'unité** Nom : Gomez Laurent Date et signature **:**

5- HYGIENE ET SECURITE :

Le chloroforme et le méthanol sont à manipuler avec des gants et sous la hotte aspirante en raison des vapeurs toxiques qu'ils libèrent et de leur toxicité par contact avec la peau.

6- DOCUMENTS RATTACHES:

Notices et instructions d'utilisation des matériels (balance de précision, concentrateur centrifugeuse sous vide (SpeedVac), micropipette, centrifugeuse de paillasse, rotateur à disque, autoclave, pH-mètre, bain-marie.

MO-AL-01-* : Micro-extraction des acides organiques, des sucres solubles et de l'amidon (dosage HPLC)
MO-AL-03-* : Micro-extraction des acides organiques, des sucres solubles et de l'amidon (dosage enzymatique, microplaque)
IN-AL-03-* : Utilisation de la Base de données BASILE.

** : la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.*

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE:

The microplate reader: an efficient tool for the separate enzymatic analysis of Sugars in plant tissues – validation of a micro-method, *J Sci Food Agric* 87:1893–1905 (2007), Laurent Gomez, Doriane Bancel, Emilie Rubio and Gilles Vercambre

7-MATERIELS ET PRODUITS NECESSAIRES :

7-1 Matériels :

Appareillage : agitateur vortex, concentrateur centrifuge sous vide (SpeedVac SC 200 Savant), centrifugeuse (Eppendorf 5415R), micropipette, rotateur à disque = roue de paillasse (Stuart-SB3 40rpm), balance de précision, bain-marie, pH-mètre, barreau aimanté, agitateur magnétique, pompe à vide, portoirs, béchers, fioles jaugées 500 mL, cocotte, plaque chauffante.
Consommables : microtubes de 1.5 mL jaune, tube 10 mL jetable, papier absorbant, papier aluminium, aiguille.

7-2 Produits :

Eau ultra-pure (H_2O)
chloroforme ($CHCl_3$) CAS : [67-66-3]
méthanol (CH_3OH, RP-Normapur) CAS : [67-56-1]
amyloglucosidase (Fluka réf 10115 70U/mg) CAS : [9032-08-0]
éthanol (C_2H_5OH) CAS : [64-17-5]
acide acétique 100% ($C_2H_4O_2$) CAS : [64-19-7]
hydroxyde de sodium (NaOH) CAS : [1310-73-2]

***Préparation de la solution tampon pH 4.6* :**

Mettre environ **400 mL** d'eau ultra pure dans un bécher de 500 mL.
Ajouter **12 g** d'acide acétique à 100% et **4.9 g** d'hydroxyde de sodium (NaOH).
Plonger un barreau aimanté et dissoudre le mélange par agitation à l'aide de l'agitateur magnétique.
Transvaser dans une fiole de 500 mL et ajuster au trait de jauge avec de l'eau ultra pure.
Transférer dans un bécher et contrôler le pH de la solution. Ce dernier doit être égal à **4.6**. Si toutefois ce n'est pas le cas, ajuster à pH 4,6 avec une solution de NaOH 10M ou avec de l'acide acétique.

Conserver ce tampon à 4°C pendant plusieurs semaines.

***Préparation de la solution* S1** (1 mg d'amyloglucosidase/mL de tampon pH 4,6 soit 70 U/mL) **:**

Concentration = 1 mg/ml quand il y a 5 ou 10 mg de poudre végétale

Préparer une quantité suffisante de solution S1 (100μl par tube d'échantillon) en corrélant toujours le volume de tampon avec la masse d'amyloglucosidase.
Peser la quantité d'amyloglucosidase nécessaire puis dissoudre dans la solution tampon pH 4,6 (volume en adéquation avec la pesée d'amyloglucosidase).

Exemple :
Pour faire 32 échantillons :
Il faut au minimum 3,2 mL de solution d'amyloglucosidase (S1), on peut préparer 4 mL.
Si on avait pesé 5 ou 10 mg de poudre végétale, il faudra peser 4 mg d'amyloglucosidase pour 4 mL de solution tampon pH 4,6.

Cette préparation est à effectuer avant chaque manipulation.

8-CONTENU:

8-1 Préparation de l'extrait amidon :

Rappel* :** Cette préparation s'effectue sur le culot recouvert d'éthanol issu du mode opératoire **MO-AL-01-* ou MO-AL-03-
(* ***: la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*).***

L'éthanol a pour objectifs d'éviter le développement bactérien et permet un rinçage supplémentaire du culot.

Evaporer **à sec**, sur le concentrateur centrifuge sous vide (SpeedVac SC 200) sans chauffage, pendant environ 25min ou avec chauffage pendant 10 min.
Ajouter **500 μL** d'eau ultra pure dans chaque microtube. NE PAS VORTEXER.
Percer d'un petit trou les couvercles des microtubes à l'aide d'une aiguille.

Placer les microtubes sur un portoir autoclavable.
Couvrir le portoir de papier absorbant afin d'éviter la présence d'eau sur les couvercles des microtubes et du papier aluminium par-dessus.
Passer à l'autoclave pendant 1h à 120°C et 1 bar pour disperser l'amidon.
Sortir le portoir de l'autoclave et enlever les papiers.
S'assurer du refroidissement des tubes et ajouter **100 μL** de la solution S1.
Refermer et vortexer chaque microtube.
Mettre les microtubes sur un support rond et léger puis les disposer dans le bain marie à **56°C** pendant 1h30min avec une légère agitation.
Plonger dans la cocotte d'eau bouillante (100°C) 2 min pour stopper l'activité enzymatique.
Laisser refroidir et sécher les microtubes avec du papier absorbant.

Procéder à la saisie des pesées dans BASILE ou manuellement.
Centrifuger pendant 5 min à 4°C (13200 tr/min).
Récupérer le surnageant, à l'aide d'une pipette (environ **400 μL**), sans aucune trace de culot et transférer dans la série de microtubes de 1.5 mL jaune numérotés.
Doser directement sur microplaque (**MO-AL-06-***) ou stocker à -20°C pour un dosage ultérieur.

* ***: la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*.***

8-2 Schéma du protocole de la préparation de l'extrait :

Rappel : Cette préparation s'effectue sur le culot recouvert d'éthanol issu du mode opératoire **MO-AL-01-* ou MO-AL-03-***
(* ***: la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-*).***

Evaporer les microtubes à sec
Speed VAC (environ 25min)
Sans chauffage ou 10 min avec chauffage

↓

Ajouter **500 µL d'eau UP** (NE PAS VORTEXER)
puis percer les couvercles des microtubes

↓

Autoclave : 1h , 120°C, 1 bar

↓

Quand les microtubes ont refroidis,
Y ajouter 100 µL de solution d'amyloglucosidase
S1 (1mg/mL) puis vortexer

↓

Incubation **bain-marie** : 1h30min à 56°C

↓

Arrêt de la réaction en plongeant les microtubes
dans une **cocotte d'eau bouillante 2min**

↓

Saisir les **pesées** dans BASILE

↓

Centrifuger 5min à +4°C (13200 trs/min)
Récupérer le **surnageant** (400 µL)
et **stocker** à -20°C si nécessaire

⇩

Dosage de l'amidon sur microplaque cf MO-AL-06-*

* ***: la version à utiliser est indiquée dans la liste des documents en vigueur EN-AQ-08-****

Annexe IV

Annexe IV. Amorces utilisées pour les RT-QPCR, gènes de référence et numéro d'accession.

Nom		Séquence d'amorce 5' → 3'	Numéro d'accession
GMP1F	Sens	CATTGTCCTGCCAAACAAGA	SGN-U315592
GMP1R	Antisens	AAAGGGCACTGCCAAATTC	
GMP2F	Sens	CCCACAAGGAGATCAAATC	SGN-U313112
GMP2R	Antisens	TGAAACTGAAAACCAACCAAA	
GMP3F	Sens	TGGTTGGTTTCCAGTTCTCC	SGN-U313111
GMP3R	Antisens	CAAAAATTACACATTTCCCAGTCTT	
GMP4F	Sens	TTCTCCGTCGCCATTTTTAC	SGN-U329408
GMP4R	Antisens	CAGCCTTGTTCCAAAACCTC	
GME1F	Sens	ATTGGAAGCCAATCCATCTG	SGN-U314898
GME1R	Antisens	AAACCAAGAAACGCCAACAA	
GME2F	Sens	TTGTTCGCGTGGAATGTTTA	SGN-U314369
GME2R	Antisens	GTAGGTGCAATGAGGGGATG	
GGP1F	Sens	AAGGCAAAACCATGTTCAATG	SGN-U312646
GGP1R	Antisens	ATGGGTCATTTCACACACCA	
GGP2F	Sens	TGGAGGTTGTAATCCCCAAA	SGN-U316430
GGP2R	Antisens	GCACAGTCAAAACACCAACAA	
GPP1F	Sens	TAGCCGCTACAAACCCTCAT	SGN-U345930
GPP1R	Antisens	TCCGCTTTCCATCTCCTATG	
GPP2F	Sens	GGCCTTGAATGAATAAGAATGA	SGN-U317967
GPP2R	Antisens	GCACATCGCGCAAAACTAT	
GalDHF	Sens	TGTTTGTCAGTTCAACGAGGTC	SGN-U319047
GalDHR	Antisens	TTGTTTTAGATGTCCAAGTGCAA	
GLDHF	Sens	TTGCGAGGAAATTTTTGTCC	SGN-U317657
GLDHR	Antisens	CTTGAAAAATGGCCTCAAGC	
ActinF	Sens	GGACTCTGGTGATGGTGTTAG	SGN-U314757
ActinR	Antisens	CCGTTCAGCAGTAGTGGTG	
EIF-4A-2F	Sens	GATCAGCGTATCCTTCAGAG	U213502
EIF-4A-2R	Antisens	GGCATTGTAGCAGAGAAAAC	

Notes

NOTES

RESUME

Les fruits et légumes constituent la principale source de vitamine C dans l'alimentation humaine, mais leur concentration en vitamine C varie fortement en fonction de la saison et des conditions de culture. Au cours de cette thèse, nous avons testé successivement différentes hypothèses afin de mettre en évidence le rôle de la lumière dans ces variations, en prenant comme modèle le fruit de tomate. Nous avons supposé i) un effet direct du rayonnement intercepté par les fruits sur le métabolisme de la vitamine C (synthèse, recyclage, dégradation), ou ii) un effet du rayonnement sur les feuilles augmentant le transport de molécules (sucres, vitamine C, …) favorisant l'accumulation de vitamine C dans le fruit. Nos résultats ont souligné la complexité de la régulation de la teneur en vitamine C dans les fruits par la lumière, qui dépend principalement du microclimat radiatif du fruit et dans une moindre mesure du rayonnement intercepté par les feuilles, en interaction avec le stade de développement du fruit. L'étude de la relation sucres/vitamine C dans les fruits a montré que les sucres n'étaient pas limitants pour la synthèse de vitamine C. L'impact du rayonnement sur le métabolisme de la vitamine C a été étudié, en interaction avec la température, sur fruits détachés. Le rayonnement augmente les teneurs en vitamine C des fruits pour les températures inférieures ou égales à 23°C en liaison avec l'augmentation des expressions des gènes de la voie de biosynthèse et des activités des enzymes de recyclage, particulièrement à 12°C. À forte température (31°C), la lumière ne modifie pas la teneur en vitamine C du fruit malgré l'augmentation de l'expression de certains gènes de la voie de synthèse, mais on observe une diminution du recyclage de la vitamine C (DHAR) et une augmentation d'un produit de dégradation de la vitamine C (thréonate). Les données recueillies ont permis d'initier un modèle d'accumulation de la vitamine C au cours du développement du fruit qui dans le futur prendra en compte les facteurs de l'environnement.

MOTS CLES : *Solanum lycopersicum*, fruit de tomate, lumière, vitamine C, sucres, transport, métabolisme, synthèse, recyclage, dégradation

---

ABSTRACT

Fruits and vegetables are the major source of vitamin C in human diet; however, their vitamin C content varies with environmental conditions and agricultural practices. In this work, we successively tested different hypotheses concerning light impact on these variations, using tomato fruit as model. We hypothesized that i) light reaching fruit could have a direct impact on vitamin C metabolism (synthesis, recycling and degradation) or that ii) light reaching leaves could increase the transport of molecules triggering vitamin C accumulation in fruit (sugars, vitamin C…). Our results showed that vitamin C variations with light are complex and depend mostly on light reaching the fruit and to a lesser extent on light reaching leaves, according to fruit developmental stage. The study of vitamin C/sugars relationship in fruit showed that sugars were not determinant in explaining variations in vitamin C. Light impact on vitamin C metabolism were studied, in interaction with temperature, on off-vine fruit ripening. Light increased fruit vitamin C content for temperature lower or equal to 23°C by increasing transcripts of vitamin C biosynthetic pathway and activity of vitamin C recycling enzyme, particularly at low temperature (12°C). At high temperature (31°C), light did not increase fruit vitamin C content but it decreased DHAR activity and increased threonate content likely produced from vitamin C degradation. The data obtained were used to initiate the building of a model describing vitamin C content during fruit development that will integrate environmental factors in the future.

KEY-WORDS: *Solanum lycopersicum*, tomato fruit, light, vitamin C, sugars, transport, metabolism, synthesis, recycling, degradation