



HAL
open science

Etude des mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes en conditions d'assimilats contrastés

Sandrine Antoine

► **To cite this version:**

Sandrine Antoine. Etude des mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes en conditions d'assimilats contrastés. Sciences agricoles. Université Pascal Paoli, 2013. Français. NNT : 2013CORT0006 . tel-01088652

HAL Id: tel-01088652

<https://theses.hal.science/tel-01088652v1>

Submitted on 28 Nov 2014

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.



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UMR CNRS 6134 (SPE)



Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN ASPECTS CELLULAIRES ET
MOLECULAIRES DE LA BIOLOGIE
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement par
Sandrine ANTOINE
le 12 juillet 2013

Etude des mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes
en conditions d'assimilats contrastées.

Directeur(s) :

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
Mr François Luro, Dr-HDR, INRA de Corse

Rapporteurs :

Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux
Mr Charles Romieu, Dr-HDR, INRA de Montpellier

Jury

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
Mr François Luro, Dr-HDR, INRA de Corse
Mr Charles Romieu, Dr-HDR, INRA de Montpellier
Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux
Mr Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
Mr Jean-Luc Regnard, Professeur, Supagro Montpellier

N° d'enregistrement au fichier central des thèses :

REMERCIEMENTS

Merci à la collectivité territoriale de Corse pour avoir financé mon travail de thèse.

Merci à Mme Dominique AGOSTINI, présidente du centre INRA de Corse de m'avoir accueillie et permis de réaliser mes travaux. Merci à Mr Olivier PAILLY, directeur de l'unité Génétique et Ecophysiologie de la Qualité des Agrumes (GEQA), de m'avoir aidé pour les différentes expérimentations au champ et lors de la rédaction du manuscrit et pour avoir su me remotiver au cours de ma thèse.

Merci à Mme Liliane BERTI, professeur au laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal et directrice du projet structurant « Ressources Naturelles » de l'Université de Corse, de m'avoir encadrée pour ce travail. Je te remercie pour ton soutien et ton implication tout au long de cette thèse et pour ton investissement lors de la rédaction de ce manuscrit.

Merci à Mr François LURO, chargé de recherche de l'unité GEQA de m'avoir co-encadrée pour ce travail de thèse.

Merci à Mr Pierre BALDET, chargé de recherche au sein de l'UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA de Bordeaux, et à Mr Charles ROMIEU, chargé de recherche au sein de l'unité Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et Tropicales à l'INRA de Montpellier, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Merci à Mr Jean-Luc REGNARD, enseignant-chercheur de l'unité Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et Tropicales, de l'INRA de Montpellier et à Mr Félix Tomi, professeur et directeur du laboratoire de Chimie et Biomasse de l'Université de Corse d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Mr Yves GIBON, directeur de recherche au sein de l'unité Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA de Bordeaux, de m'avoir accueillie sur la plateforme de métabolomique et de m'avoir permis de réaliser des dosages d'activité enzymatique. Je le remercie pour sa disponibilité et sa sympathie. Je tiens à remercier toute son équipe, Patricia, Duyên, Benoît, Guillaume et Carole pour leur accueil chaleureux et pour les bons moments passés en leur compagnie au labo.

Merci à Mr Laurent GOMEZ, ingénieur de recherche au sein de l'unité de recherche Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, à l'INRA d'Avignon, de m'avoir formée à

l'utilisation d'une nouvelle méthode de quantification des sucres. Merci également à Dorianne et Emilie pour leur aide et leur sympathie lors de ma venue.

Merci à Mr Jean GIANETTINI pour la relecture de ce manuscrit.

Merci à Elodie Carcouët, technicienne au sein de l'unité GEQA de l'INRA de San Giuliano, pour sa contribution aux analyses biochimiques.

Merci à Gilles Costantino, technicien au sein de l'unité GEQA de l'INRA de San Giuliano, pour son aide lors de la mise au point des « manips » qPCR, pour sa disponibilité, sa gentillesse et sa sympathie.... Et son fiadone !!!

Merci à Yann Froelicher, chercheur CIRAD, pour son aide, son écoute et son soutien au quotidien. Je n'oublierai pas notre pause thé du matin. Et un grand merci à toute sa « petite » famille.

Merci à l'équipe du domaine, Philippe « Chouinou », Mathieu, Jean-Marc, Stéphane, Jean-Jacques, Abel, Paul-Eric, Emmanuel et Josée pour tous les bons moments passés ensemble, les barbecues et les gâteaux. Et une petite mention spéciale pour Maxime et notre thé rituel du midi.

Merci à Isa et Albert mes voisins de bureaux, pour nos grands « débats » et pour avoir assuré l'animation, la diffusion de « putacci » et la bonne humeur dans notre « recoin ». Merci à Thibault mon dernier « coloc » de bureau.

Merci à Marie et Hajer, doctorantes, pour les bons moments passés ensemble. Et bon courage les filles !!! Et merci aux différents stagiaires, Victoire, Pantxika, Andria, Charlotte, Nadia, Matthieu, Sabrina, Emmanuel et Natacha.

Merci à Jeanine et Jean-Pierre, pour les soirées jeux de société et les repas improvisés.

Merci à l'ensemble du personnel Patricia, latimad, Brigitte, Simone, Franck, Isabelle P., François V., Emmanuelle, Jérôme, Pauline, Jean-Luc, Christophe, Jean, Renaud, Philippe, Paulette, Victor, Geneviève, Camille, René et Christian pour leur bonne humeur quotidienne.

Merci à Marie-Ange, José et Ugo, pour leur accueil chaleureux.

Un grand merci à ma « petite famille de Corse », Florine, Julien et Mourad. Je profite de ces quelques lignes pour vous témoigner toute ma reconnaissance et toute mon amitié.

Merci à mes parents, mon frère et à toute ma famille.

Et un merci un peu spécial à Jérôme...

SOMMAIRE

Introduction bibliographique	16
I. Les agrumes	1
II. Importance économique des agrumes	5
III. Le fruit	7
III.1. La structure du fruit.....	7
III.2. Les stades de développement du fruit.....	8
III.3. Évolution des teneurs en pigments au cours du développement du fruit	9
III.4. Évolution des teneurs en sucres-acides au cours du développement du fruit.....	10
III.5. L'acidité chez les agrumes	11
III.5.1. Variabilité de l'acidité selon les espèces.....	12
III.5.2. Variabilité de l'acidité au sein d'une même espèce	14
IV. Mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes	14
IV.1. Modèle général	15
IV.2. Etude d'un fruit acide et de son variant doux.....	18
IV.2.1. Rapport sucres/acides de ces trois variétés	18
IV.2.2. Le modèle d'accumulation de l'acide citrique chez les fruits acides.....	19
IV.2.3. Le modèle d'accumulation de l'acide citrique chez les fruits doux.....	20
IV.3. Comment l'acide citrique est-il utilisé ?.....	22
IV.3.1. Le stockage.....	22
IV.3.2. La mobilisation de l'acide citrique	24
IV.3.3. Les métabolites issus de la dégradation cytoplasmique de l'acide citrique	25
IV.3.3.1. Le glutamate.....	25
IV.3.3.2. La proline	26
IV.3.4. Le « shunt » du γ -aminobutirate	27

V.	Quels sont les facteurs environnementaux et culturels aboutissant à une variabilité de la teneur en acide citrique ?	30
V.1.	Le porte-greffe.....	30
V.2.	L'irrigation	30
V.3.	Le climat	31
VI.	Comment peut-on faire varier expérimentalement la teneur en acide citrique ?	32
VI.1.	L'annélation.....	33
VI.2.	La diminution de la charge en fruits.....	35
VI.3.	La défoliation partielle	35
VI.4.	L'action sur la dégradation de l'acide citrique	36
VII.	L'objectif de ce travail	37
	Matériel et méthodes	40
I.	Le matériel végétal.....	41
II.	Le dispositif expérimental : réduction de l'alimentation carbonée	41
III.	Identification et quantification des acides organiques et des sucres par chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	42
III.1.	Préparation des échantillons.....	42
III.2.	Conditions d'analyse chromatographique des acides organiques	43
III.3.	Conditions d'analyse chromatographique des sucres	43
III.4.	Identification et quantification des acides organiques et des sucres.....	43
III.5.	Analyse statistique	44
IV.	Dosage de la proline.....	44
V.	Mesure des activités enzymatiques	45
V.1.	Préparation des extraits protéiques.....	45
V.2.	Dosage de la phosphofructokinase	45
V.3.	Dosage de l'isocitrate déshydrogénase.....	46

V.4.	Dosage de la phosphoénolpyruvate carboxylase.....	47
V.5.	Dosage de l'invertase	49
VI.	Les techniques de biologie moléculaire	49
VI.1.	Extraction et quantification des ARN totaux.....	49
VI.2.	Synthèse de l'ADN complémentaire	50
VI.3.	Dosage de l'ADN complémentaire	50
VI.4.	Approche « gènes candidats »	51
VI.4.1.	Sélection des gènes candidats	51
VI.4.2.	La PCR en temps réel	53
	Résultats et discussion	57
I.	L'effet des réductions foliaires sur la croissance du fruit	58
I.1.	Mesure des diamètres.....	58
I.2.	Mesure du poids frais.....	60
II.	L'impact de la réduction foliaire sur le métabolisme	61
II.1.	Le métabolisme des sucres	61
II.1.1.	Mesure des quantités de sucres	61
II.1.1.1.	Le saccharose.....	62
II.1.1.2.	Le glucose et le fructose	64
II.1.2.	Mesure de l'activité de la phosphofructokinase	67
II.1.3.	L'invertase vacuolaire	70
II.1.3.1.	Mesure des transcrits	70
II.1.3.2.	Mesure de l'activité enzymatique	71
II.2.	Le métabolisme des acides organiques.....	74
II.2.1.	Le métabolisme de l'acide malique	74
II.2.1.1.	L'acide malique	74
II.2.1.2.	Mesure de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase.....	77
II.2.2.	Le métabolisme de l'acide citrique	79
II.2.2.1.	Mesure des quantités d'acide citrique	79
II.2.2.2.	L'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique	82

II.2.2.3. Mesure des transcrits du gène codant pour le transporteur CsCit 1	83
II.2.2.4. Mesure des transcrits du gène codant pour la succinate semialdéhyde déshydrogénase	84
II.2.2.5. La voie de la proline	86
II.2.2.5.1. Mesure des quantités de proline	86
II.2.2.5.2. Mesure de la quantité de transcrits de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase	87
II.3. Impact des réductions foliaires sur le métabolisme des sucres et des acides.....	89
Conclusion et perspectives	96
Références bibliographiques	102
Annexes	117

TABLE DES FIGURES

Introduction bibliographique :

Figure 1: Taxonomie de la sous-famille des <i>Aurantioideae</i>	1
Figure 2: Organisation de la diversité du genre <i>Citrus</i> établie grâce à des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.....	3
Figure 3: L'origine et la dispersion des agrumes	4
Figure 4: Représentation graphique des différentes productions fruitières mondiales..	6
Figure 5: Coupe transversale schématique d'une clémentine (<i>Citrus clementina</i> Hort. Ex Tan.).....	7
Figure 6: Croissance et développement de l'orange 'Valencia' au cours du temps	8
Figure 7: Évolution des teneurs en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) de la peau au cours des différents stades du développement d'une orange	9
Figure 8: Evolution des concentrations en sucres et en acides organiques au cours des différents stades de développement d'une orange	11
Figure 9: Analyse en composantes principales des teneurs en métabolites primaires pour différentes espèces du genre <i>Citrus</i>	13
Figure 10: Schéma général du devenir du saccharose dans une cellule végétale.	15
Figure 11: Le devenir du citrate dans le cytoplasme.....	17
Figure 12: Concentrations en acides organiques et en sucres des fruits (exprimées en %) après 50 jours de développement (stade II) pour six variétés.....	19
Figure 13: Modèle fruit acide	20
Figure 14: Modèle fruit doux.....	21
Figure 15: Transport actif primaire : les pompes à protons V-ATPase et V-PPase,	22
Figure 16: Transporteur de citrate.	23
Figure 17: L'homéostasie du citrate dans les cellules des sacs à jus.....	24

Figure 18: Biosynthèse de la proline	26
Figure 19: Le « GABA shunt »	28
Figure 20: Annélation sur une tige ligneuse.....	33
Matériel et méthodes :	
Figure 21: Principe d'action du SYBR® Green.....	54
Figure 22 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	54
Figure 23: Courbe de fusion, dérivée de la fluorescence du SYBR® Green en fonction de la température.	55
Résultats et discussion :	
Figure 24: Diamètre des fruits au cours du développement, en fonction des différents traitements.....	59
Figure 25: Poids frais des fruits au cours du développement, pour les différents traitements.....	60
Figure 26: Quantité de saccharose des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit	62
Figure 27: Quantités de glucose et de fructose des fruits lorsque la réduction est foliaire précoce (A) et (C) et plus tardive (B) et (D) au cours du développement du fruit	64
Figure 28: Activité enzymatique de la phosphofructokinase (PFK) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).	67
Figure 29: Relation entre la phosphofructokinase et l'invertase.....	69
Figure 30: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de l'invertase vacuolaire 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).	70
Figure 31 : Activité enzymatique de l'invertase vacuolaire (INV) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).	71

Figure 32: Synthèse des résultats liés au métabolisme des sucres après la défoliation précoce (SFR1).....	72
Figure 33: Synthèse des résultats liés au métabolisme des sucres après la défoliation tardive.	73
Figure 34: Quantités d'acide malique des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit	75
Figure 35: Activité enzymatique de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.	77
Figure 36: Quantités d'acide citrique des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit	79
Figure 37: Devenir cytoplasmique de l'acide citrique chez la mandarine.....	81
Figure 38: Activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique (NADP-IDH) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.	82
Figure 39: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène du transporteur vacuolaire CsCit 1 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.	83
Figure 40: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.....	85
Figure 41: Quantités de proline 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.	86
Figure 42: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.	88
Figure 43: Quantités d'acides organiques et en sucres des fruits de mandarine en fin de stade II.	89

Figure 44 : Modèle métabolique de la mandarine en fin de stade II.	90
Figure 45 : Modèle métabolique 48h après la réduction foliaire précoce.....	91
Figure 46 : Modèle métabolique sept semaines après la réduction foliaire précoce.....	93
Figure 47 : Modèle métabolique 48h après la réduction foliaire tardive.	94

TABLE DES TABLEAUX

Introduction bibliographique :

Tableau 1: Acidité titrable et pH de différents fruits d'agrumes à maturité.	12
Tableau 2: pH et acidité titrable de différents fruits d'agrumes et de leurs mutants sans acidité	14
Tableau 3: L'effet du porte-greffe sur l'acidité titrable (%).....	30
Tableau 4: Acidité titrable en fonction du déficit hydrique	31
Tableau 5: Influence de la date de l'annélation sur la teneur en sucres solubles et sur la nouaison 25 et 50 jours après l'anthèse sur le développement des ovaires de la mandarine 'Fortune'	34
Tableau 6: Effet de l'annélation et du rapport feuille/fruit sur le volume du fruit et la surface foliaire par fruit chez le kiwi 'Hayward'	36

Matériel et méthodes :

Tableau 7: Sélection des gènes « candidats » à la régulation de l'acidité des fruits	51
Tableau 8 : Séquences des amorces.....	52

Résultats et discussion :

Tableau 9: Quantités de saccharose (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions SFR1 et SFR2.....	63
Tableau 10: Quantités de glucose et de fructose (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions SFR1 et SFR2.	65
Tableau 11 : Quantités d'acide malique (mg/fruit) 48h et une semaine après les deux réductions foliaires.....	75
Tableau 12: Quantités d'acide citrique (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions foliaires SFR1 et SFR2.....	80

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT	Actine
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN _c	Acide désoxyribonucléique complémentaire
BET	Bromure d'éthidium
Cit	Citrate
CoA	Coenzyme A
CsCit1	Symporteur H ⁺ /citrate vacuolaire
DEPC	Diéthyle pyrocarbonate
DTT	DL-dithio éthréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétra acétique
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC. 1.1.1.49)
GABA	Acide γ -aminobutyrique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
IDH	Isocitrate déshydrogénase (NADP ⁺ dépendante, EC 1.1.1.41)
IGP	Indication géographique protégée
INV	Invertase (EC 3.2.1.26)
MDH	Malate déshydrogénase (EC 1.1.1.37)
MDA	Aldéhyde malonique
MF	Matière fraîche
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MTT	Bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium

NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
P2C	Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate
P2CR	Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate réductase (EC 1.5.1.1)
P5C	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate
P5CR	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate réductase (EC 1.5.1.2)
P5CS	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (EC 2.7.2.11)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PEP	Phosphoénolpyruvate
PEPC	Phosphoénolpyruvate carboxylase
PES	Ethosulfate de phénazine
PFK	Phosphofructokinase (EC 2.7.1.11)
PFP	Fructose 6-phosphate 1-phosphotransférase (EC 2.7.1.90)
Pi	Phosphate inorganique
PMS	Méthosulfate de phénazine
PPi	Pyrophosphate inorganique
PVP	Polyvinylepyrrolidone
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
SSADH	Succinate semialdéhyde déshydrogénase (EC 1.2.1.24)
SF	Surface foliaire
SFR	Surface foliaire réduite
Tm	Température de fusion
TPI	Triose phosphate isomérase (EC 5.3.1.1)
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
V-ATPase	Pompe à protons vacuolaire ATP dépendante
V-PPase	Pompe à protons vacuolaire Pyrophosphate dépendante

Introduction bibliographique

I. Les agrumes

Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae*. Ils sont classés dans la sous-famille des *Aurantioideae*, qui est divisée en deux tribus : *Citreae* et *Clauseneae* (**Figure 1**).

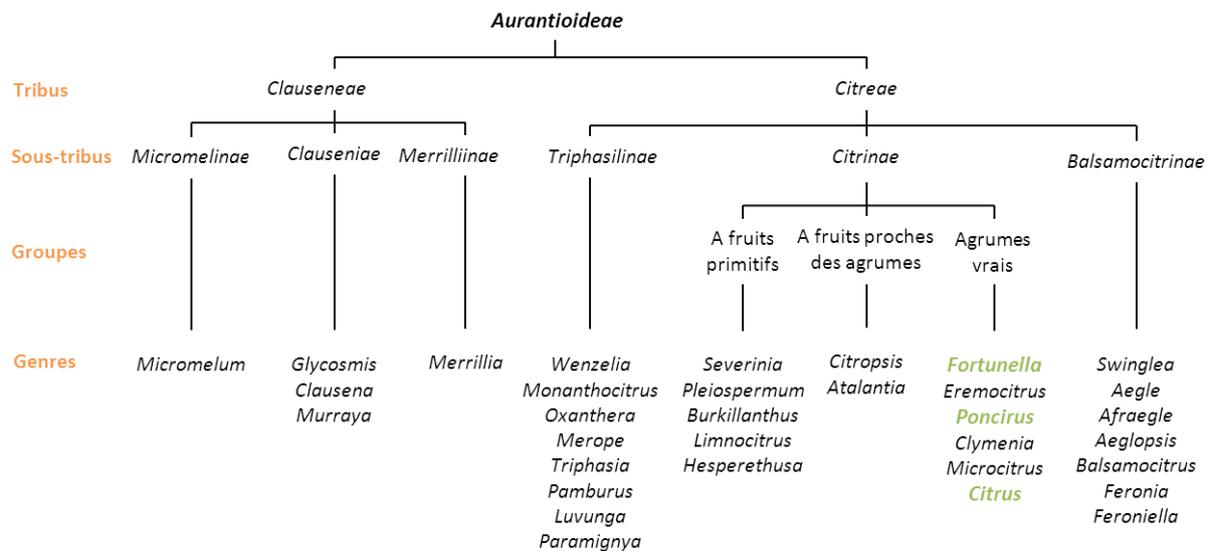


Figure 1: Taxonomie de la sous-famille des *Aurantioideae* d'après Swingle et Reece (1967).

Au sein de la tribu des *Citreae*, les agrumes (sous-tribu des *Citrinae*) regroupent six genres sexuellement compatibles. Le genre ***Citrus*** renferme la majorité des espèces dont nous consommons les fruits (les oranges, les mandarines, les citrons, les pomelos...). Le genre ***Fortunella***, dont les fruits sont connus sous le nom de kumquat, ne comprend que deux à sept espèces selon les auteurs (Rahman et Nito, 1994; Swingle, 1915). Le genre ***Poncirus*** est monospécifique : *Poncirus trifoliata*. Il se distingue des autres agrumes par ses feuilles trifoliées et caduques. Ses fruits ne sont pas comestibles, mais il occupe une place importante en agrumiculture car il est utilisé comme porte-greffe du fait de ses résistances à plusieurs contraintes biotiques et de son adaptation aux basses températures (Praloran, 1971). Le genre ***Microcitrus*** rassemble sept espèces (Swingle et Reece, 1967; Winters, 1976). Les fruits de *Microcitrus australasica*, également appelés « lime digitée d'Australie » sont cultivés et commercialisés seulement depuis quelques années. Le genre ***Eremocitrus*** est composé d'une seule espèce : *Eremocitrus glauca* dont les fruits sont également appelés « lime du désert australien ». Le genre ***Clymenia*** comporte deux espèces (Stone, 1985). Les

feuilles de *Clymenia* présentent un pétiole court et étroit ce qui les distingue de la plupart des autres agrumes.

La taxonomie du genre *Citrus* est assez complexe et confuse, du fait de nombreuses hybridations inter et intra-spécifiques, de la fréquence élevée des mutations, d'une longue histoire de culture et d'une large dispersion (Nicolosi *et al.*, 2000). La classification établie par Tanaka (1977) élève au rang d'espèce de nombreux hybrides (162 espèces référencées), alors que la classification de Swingle et Reece (1967) ne comporte que seize espèces. La grande diversité phénotypique observée au sein du genre *Citrus* est probablement à l'origine de ces désaccords.

Les études de phylogénie effectuées par Scora (1975) et Barrett et Rhodes (1976) basées sur des marqueurs biochimiques et morphologiques suggèrent que la plupart des agrumes cultivés appartenant au genre *Citrus* seraient issus de trois espèces vraies : *Citrus medica* L. (cédratier), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinier), *Citrus maxima* L. Obseck (pamplemoussier). Des études plus récentes portant sur la diversité des caractères morphologiques (Ollitrault *et al.*, 2003), de l'analyse des métabolites secondaires (Fanciullino *et al.*, 2006) et primaires (Luro *et al.*, 2011) ont montré que la diversité phénotypique des agrumes comestibles résulte principalement de la différenciation de ces trois taxons de bases. Les études réalisées à l'aide de marqueurs moléculaires (García-Lor *et al.*, 2012; Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2012) ont confirmé le rôle central joué par ces trois taxons de base, ainsi que *C. micrantha* représentant du groupe des *Papeda* en tant qu'espèce la plus primitive (Hodgson, 1967; Nicolosi *et al.*, 2000). La participation de ce taxon à la genèse de *Citrus aurantifolia* Swing. (limettier de type « Mexicain ») et de *Citrus macrophylla* Wester est suggérée par différentes études de diversité et de marquage génétique (Bayer *et al.*, 2009; Froelicher *et al.*, 2011; Ollitrault *et al.*, 2012) (**Figure 2**). Les autres espèces dites secondaires seraient issues d'hybridation entre ces quatre espèces ancestrales.

Ainsi, les orangers et les bigaradiers seraient apparus à la suite de croisements entre le pamplemoussier et le mandarinier (**Figure 2**). Le bigaradier serait un hybride de première génération tandis que l'oranger découlerait de deux croisements de type backcross ou de type testcross (Gmitter *et al.*, 2012; Ollitrault *et al.*, 2012). Le citronnier serait un hybride entre le bigaradier et le cédratier (Nicolosi *et al.*, 2000). Le pomelo serait issu d'un croisement entre l'oranger et le pamplemoussier (Barrett et Rhodes, 1976; de Moraes *et al.*,

2007; Scora *et al.*, 1982). La lime de type « mexicaine » résulterait d'un croisement entre *C. micrantha* et le cédratier (Barkley *et al.*, 2006; Nicolosi *et al.*, 2000). Le clémentinier serait un hybride entre un mandarinier de type 'Willowleaf' et un oranger (Deng *et al.*, 1996).

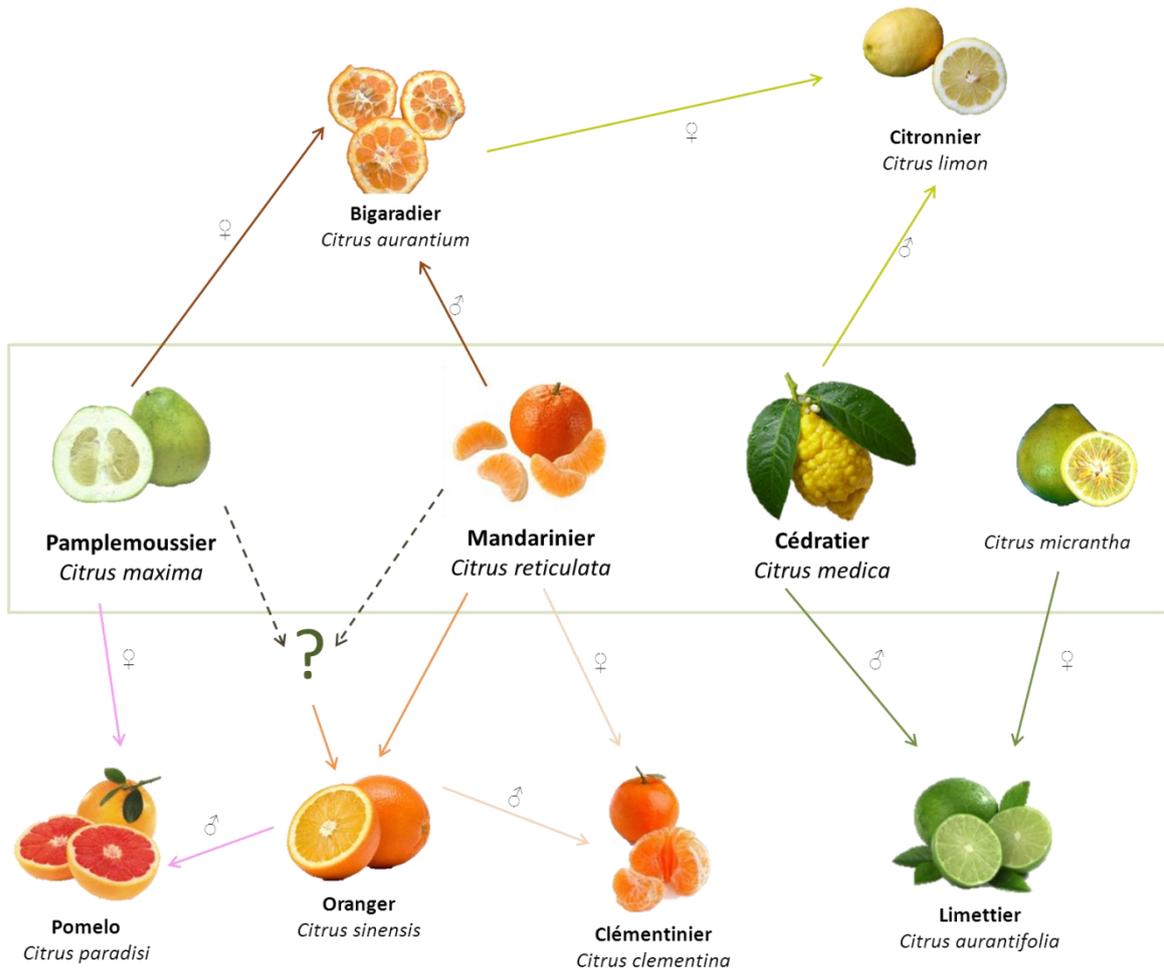


Figure 2: Organisation de la diversité du genre *Citrus* établie grâce à des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires (Barkley *et al.*, 2006; Barrett et Rhodes, 1976; Luro *et al.*, 2000; Nicolosi *et al.*, 2000; Scora, 1975).

De plus, la difficulté à établir une classification chez les agrumes se retrouve également au sein même d'un groupe tel que les mandariniers. En effet, la diversité génétique, la polyembryonie, les hybridations et les mutations rendent complexe la classification des mandariniers (Coletta Filho *et al.*, 1998). Webber (1943) classe les mandariniers en quatre groupes : King, Satsuma, Mandarine et Tangerine. Tanaka (1954) reconnaît finalement trente-six espèces qu'il a classées en cinq groupes taxonomiques : le groupe I regroupe les espèces typiques telles que *C. nobilis* Lour. (cultivar 'King') et *C. unshiu* (cultivar 'Satsuma') ; le groupe II rassemble des espèces d'une faible importance économique ; le groupe III

contient quatorze espèces dont les espèces qui ont une grande importance économique *C. reticulata* ('Ponkan'), *C. deliciosa* ('Willowleaf' ou méditerranéenne), *C. clementina* ('Clémentine') et *C. tangerina* ('Dancy'); les espèces les plus représentatives du groupe IV sont *C. reshni* ('Cléopâtre') et *C. sunki* Hort ex Tanaka ('Sunki') et le groupe V regroupe des espèces telles que *C. depressa* ('Shekwasha') et *C. lycopersicaeformis*. Swingle et Reece (1967) ont regroupé tous les mandariniers en une seule espèce, *Citrus reticulata* Blanco. Hodgson (1967) a revu la classification établie par Tanaka (1954) pour suggérer que les mandariniers ayant une importance économique soient regroupés en quatre espèces : *C. unshiu* ('Satsuma'), *C. reticulata* Blanco ('Ponkan', 'Dancy', 'Clémentine'), *C. deliciosa* Tenore ('Willowleaf') et *C. nobilis* Loureiro ('King').

Différentes hypothèses ont été formulées quant à l'origine des agrumes. Les espèces appartenant au genre *Citrus* seraient originaires des régions tropicales et subtropicales du sud-est asiatique (Calabrese, 1992; Webber, 1967), du nord-est de l'Inde, du sud de la Chine, de la péninsule Indochinoise et de l'archipel Malais (Nicolosi, 2007). Puis ils ont été propagés sur les autres continents au fur et à mesure des conquêtes, des croisades ou du développement des échanges commerciaux (**Figure 3**) (Ollitrault *et al.*, 2003; Papavinasundaram *et al.*, 2005; Turk *et al.*, 2004).

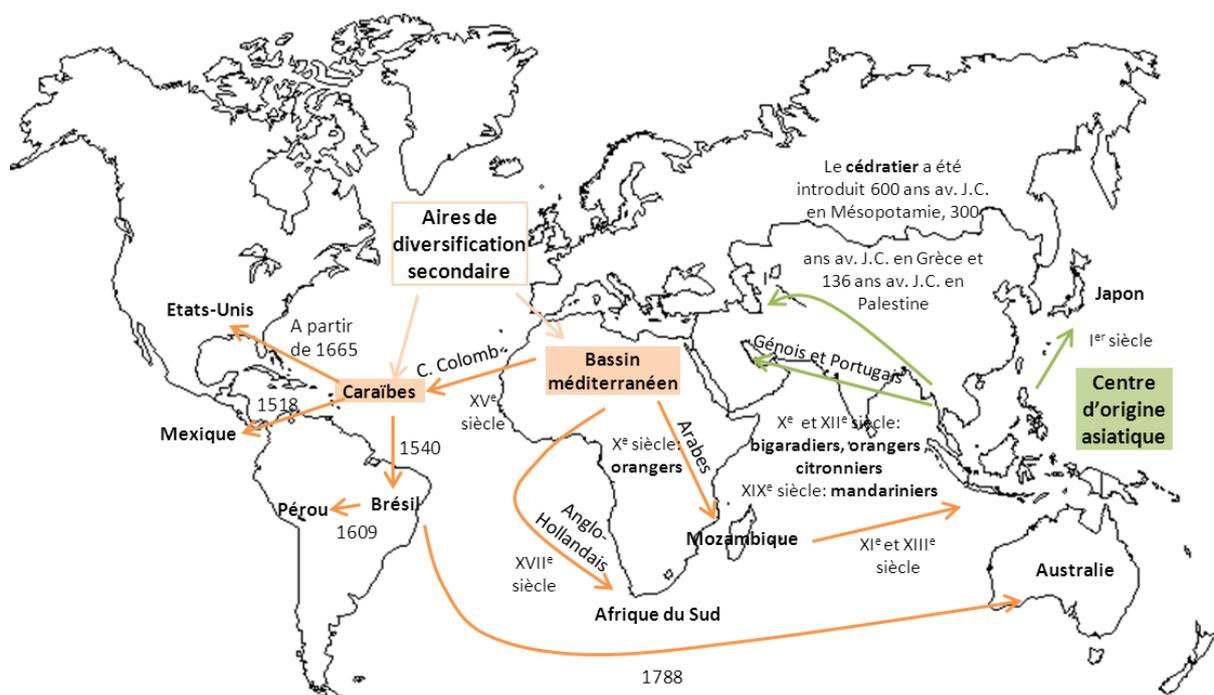


Figure 3: L'origine et la dispersion des agrumes d'après Ollitrault *et al.* (2003).

Ainsi les agrumes ont été diffusés dans plusieurs régions du monde. De ce fait, la zone de production, qui s'étend du 40^{ème} parallèle nord (Corse, Japon) au 40^{ème} parallèle sud (Nouvelle-Zélande) (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996), couvre une diversité climatique très importante. La température est le principal facteur limitant l'expansion géographique de la culture des agrumes. En effet, le froid et les gelées endommagent le fruit et l'arbre lui-même si la période de froid est prolongée. Les températures basses limitent la croissance, le développement et la maturation du fruit (Goldschmidt, 1997). Parmi les agrumes, seul, *Poncirus trifoliata* a des feuilles caduques, caractère qui démontre une adaptation marquée aux températures plus froides des zones Nord-Est asiatique (Monselise et Halevy, 1985).

En outre, le climat affecte aussi la qualité du fruit. Les fruits qui se développent dans un climat tropical chaud ont tendance à être plus riches en sucres que les fruits des climats plus frais (Goldschmidt, 1997), ce qui présente un avantage pour la transformation en jus. Mais ces fruits ont une acidité plus faible, limitant leur intérêt pour le marché du fruit frais. En revanche, les régions subtropicales, plus fraîches, sont préférables pour la production de mandarines et d'oranges destinées au marché du fruit frais (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

II. Importance économique des agrumes

Les agrumes sont les fruits dont la production est la deuxième plus importante au monde avec 122,6 millions de tonnes (Mt) après la production de tomates (151,7 Mt) et devant la production de bananes (102 Mt), de pommes (69,5 Mt) et de raisin (67,1 Mt) (FAO, 2010) (**Figure 4**).

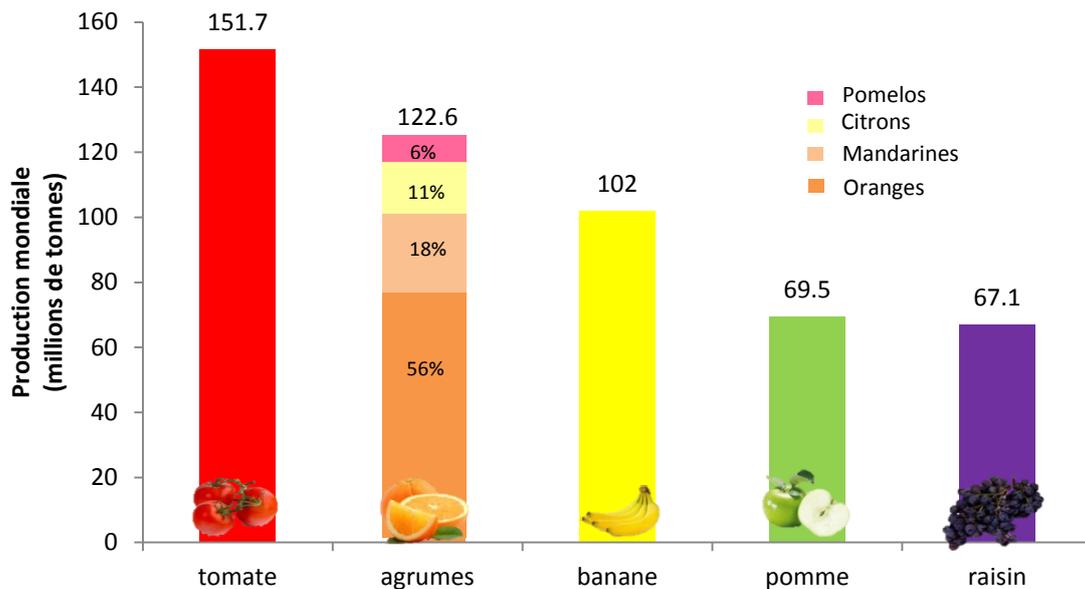


Figure 4: Représentation graphique des différentes productions fruitières mondiales. Les productions fruitières sont exprimées en Mt et le détail de la production des agrumes est exprimé en % d'après les données de la FAO (2010). La tomate (■), les agrumes (■), la banane (■), la pomme (■) et le raisin (■) sont représentés.

Les oranges représentent 56% de la production totale des agrumes, tandis que les petits agrumes tels que la clémentine et la mandarine ne représentent que 18%, les citrons 11% et les pomelos 6% (FAO, 2010).

Les principaux pays producteurs d'agrumes sont la Chine (23,9 Mt), le Brésil (20,31 Mt), les États-Unis (9,98 Mt), l'Inde (9,6 Mt) et le Mexique (6,86 Mt) (FAO, 2010). Le bassin méditerranéen produit 18 Mt d'agrumes. L'Espagne est le plus gros producteur (5,4 Mt) mais aussi le premier exportateur de « petits fruits » d'agrumes, représentés par les mandarines et hybrides de mandarines ('Clémentine', 'Fortune' et 'Afourer'). Les autres producteurs sont la Turquie (3,57 Mt), l'Égypte (3,52 Mt), l'Italie (3,19 Mt) et le Maroc (1,36 Mt) (FAO, 2010). La production d'agrumes en Corse est de 28 300 tonnes pour les clémentines et de 3 200 tonnes pour les pomelos en 2011.

La production d'agrumes alimente deux filières : celle des fruits frais, qui représente 65% du marché mondial et celle des produits transformés. La production du Brésil et de la Floride est essentiellement destinée à la transformation et, à l'inverse, celle de la Chine et du bassin méditerranéen est orientée vers le marché du fruit frais (Imbert, 2005).

Les agrumes étant des fruits non-climactériques, la commercialisation en fruits frais nécessite une récolte à maturité. La maturation ne se fait donc que sur l'arbre.

III. Le fruit

III.1. La structure du fruit

Les fruits d'agrumes présentent une diversité pomologique importante. La forme des fruits varie d'aplatie à oblongue et la couleur du jaune au rouge foncé. Le poids d'un fruit peut aller de quelques grammes (kumquat) à plusieurs kilogrammes (pamplemousse).

Malgré cette diversité les fruits d'agrumes présentent la même structure anatomique à savoir une baie pluriloculaire composée de deux parties distinctes : le péricarpe et l'endocarpe (Milind, 2008) (**Figure 5**).

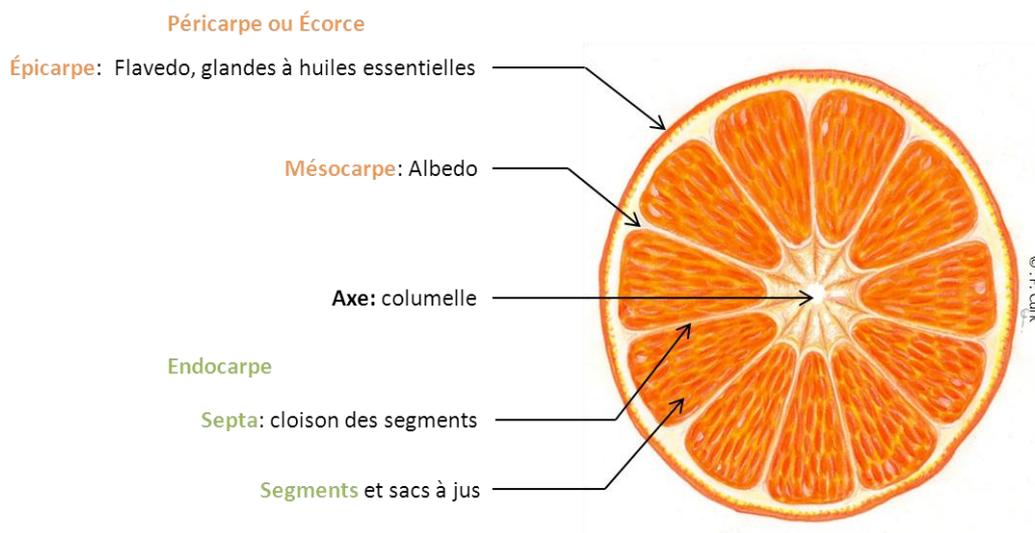


Figure 5: Coupe transversale schématique d'une clémentine (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.), d'après Praloran (1971) et Milind (2008).

Le péricarpe est divisé en deux parties, l'épicarpe et le mésocarpe. L'épicarpe, riche en glandes à huiles essentielles et le mésocarpe externe forment le « flavedo ». L'« albedo » correspond au mésocarpe interne qui est plus blanc et dont l'épaisseur varie en fonction des espèces. L'endocarpe ou « pulpe » est issu d'un seul ovaire constitué de plusieurs carpelles soudés. Ces différentes cavités forment les segments ou « quartiers » dont le nombre varie entre 5 et 18. Les quartiers sont entourés d'une membrane formée à partir de l'épiderme

interne des carpelles. Les sacs à jus sont implantés autour d'un axe central et leurs vacuoles se remplissent de jus au cours du développement du fruit.

III.2. Les stades de développement du fruit

Le développement du fruit est divisé en trois stades majeurs : la division cellulaire qui correspond au stade I, le grossissement cellulaire au stade II et la maturation du fruit au stade III (Bain, 1958) (**Figure 6**).

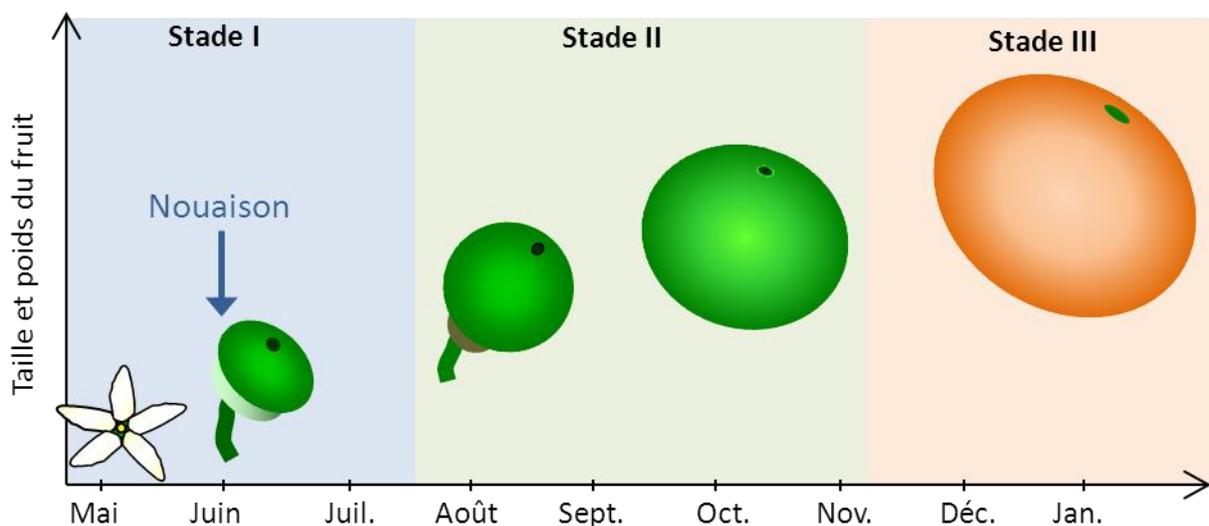


Figure 6: Croissance et développement de l'orange 'Valencia' au cours du temps, d'après Bain (1958).

La période de la division cellulaire (stade I) débute immédiatement après l'anthèse et se poursuit pendant quatre à neuf semaines. L'augmentation de la taille du fruit à cette période est la conséquence de la division des cellules (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

Le stade II est la phase du grossissement cellulaire. Les sacs à jus s'agrandissent et combler les segments (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Le stade II dure de quatre à six mois (Mehouachi *et al.*, 1995). Le stade II est caractérisé par l'accumulation d'eau, des sucres et des acides dans la vacuole des cellules des sacs à jus.

Le stade III est connu sous le nom de maturation du fruit (Bain, 1958). La croissance du fruit est fortement ralentie et le fruit commence son processus de maturation non-climactérique. La respiration du fruit diminue lentement tout au long du stade III et la

synthèse d'éthylène chez les fruits d'agrumes n'évolue presque pas (Aharoni, 1968; Eaks, 1970; Goldschmidt *et al.*, 1993).

III.3. Évolution des teneurs en pigments au cours du développement du fruit

Les principaux pigments chez les agrumes sont les chlorophylles et les caroténoïdes. Les chlorophylles sont responsables de la couleur verte de la pulpe et de la peau au stade I alors que les caroténoïdes confèrent à la pulpe ou à la peau la couleur rose ou jaune orangée au stade III.

Au cours du développement du fruit, l'accumulation des caroténoïdes est concomitante avec la dégradation des chlorophylles de la peau (**Figure 7**).

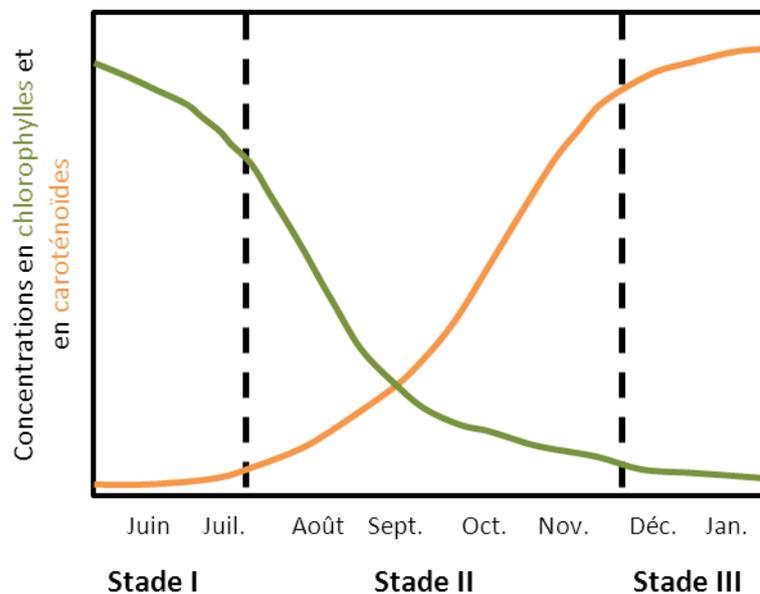


Figure 7: Évolution des teneurs en pigments (chlorophylles et caroténoïdes) de la peau au cours des différents stades du développement d'une orange d'après Tadeo *et al.* (2008).

Les changements visibles lors de la maturation du flavedo sont comparables à ceux observés durant la sénescence des autres tissus chlorophylliens, comme le révèle la transformation des chloroplastes en chromoplastes (Goldschmidt, 1988). La diminution des teneurs en chlorophylles de la peau prend plusieurs mois et le début de l'accumulation des caroténoïdes coïncide avec la disparition des chlorophylles (Kato *et al.*, 2004). La dégradation de la chlorophylle est dépendante de la variation de la température ambiante et est accélérée par l'éthylène. Dans les zones où la température varie amplement au cours de

la saison et entre le jour et la nuit, la dégradation des chlorophylles s'opère précocement au cours de la maturation. C'est ainsi que les clémentines (agrumes à maturité précoce) produites en Corse atteignent la coloration orangée de façon naturelle tandis que celles produites dans des pays plus au sud n'atteignent cette coloration qu'après un traitement artificiel à l'éthylène.

III.4. Évolution des teneurs en sucres-acides au cours du développement du fruit

Les sucres principaux de la pulpe des agrumes sont le saccharose, le glucose et le fructose dont les concentrations varient en fonction des espèces (Cercos *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2004). Chez l'orange, les teneurs en sucres de la pulpe augmentent régulièrement tout au long du développement du fruit (**Figure 8**) (Tadeo *et al.*, 2008). L'accumulation des sucres commence à la fin du stade I, est croissante lors du stade II et atteint un palier au stade III.

Plus précisément, l'orange mature accumule du saccharose, du glucose et du fructose dont le rapport est de 2 : 1 : 1 (Iglesias *et al.*, 2007).

Les principaux acides organiques de la pulpe des agrumes sont l'acide citrique, l'acide malique, l'acide succinique, l'acide ascorbique et l'acide oxalique. L'accumulation d'acides organiques dans la pulpe du fruit (**Figure 8**) débute à la fin du stade I, avec un maximum d'accumulation au milieu du stade II. Puis après cette accumulation, la quantité d'acides organiques diminue en fin de phase II pour atteindre pendant la phase III une plus faible quantité d'acides organiques (Erickson, 1968; Iglesias *et al.*, 2007).

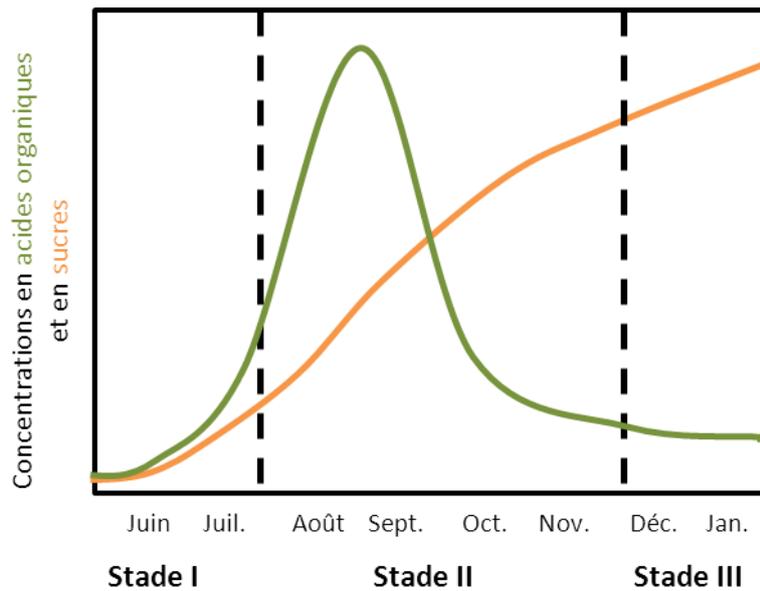


Figure 8: Evolution des concentrations en sucres et en acides organiques au cours des différents stades de développement d'une orange, d'après Tadeo *et al.* (2008).

La baisse de l'acidité au cours de la maturation du fruit n'est pas aussi marquée, voire absente, chez les fruits très acides (citron, lime et cédrat) (Sinclair, 1984).

III.5. L'acidité chez les agrumes

L'acidité est l'un des principaux déterminants du goût des fruits charnus. La saveur acide est liée à la perception de l'ion H^+ . La mesure de l'acidité est définie par trois paramètres : le pH, l'acidité titrable et la composition en acides organiques et aminés (Ulrich, 1970).

L'acidité très élevée de la pulpe est la principale caractéristique des agrumes. Elle est liée à la composition de la pulpe en acides organiques et plus particulièrement en acide citrique (Pierre et Queiroz, 1979; Scheible *et al.*, 2008; Sinclair, 1984; Vandercook, 1977). L'acide citrique, en général, représente de 60% chez les fruits dits « intermédiaires » (orange, clémentine et mandarine) à plus de 90% chez les fruits dits « acides » (citron et lime) des acides organiques totaux (Sinclair, 1984; Vandercook, 1977).

III.5.1. Variabilité de l'acidité selon les espèces

Le pH et l'acidité titrable de la pulpe des fruits d'agrumes à maturité diffèrent selon les espèces (**Tableau 1**).

Tableau 1: Acidité titrable et pH de différents fruits d'agrumes à maturité.

Fruits	Acidité titrable (g/100g)	pH	Références
Citron	6,0	2,4	Karadeniz, 2004 ; Marsh <i>et al.</i> , 2003
Lime	6,3	2,6	Ziena, 2000
Mandarine	1,1	3,5	Karadeniz, 2004
Orange	2,1	3,3	Marsh <i>et al.</i> , 2003 ; Karadeniz, 2004
Pamplemousse Siamese	0,06	ND	Marsh <i>et al.</i> , 2003
Pamplemousse Chandler	0,9	ND	Marsh <i>et al.</i> , 2003
Pomelo	1,3	3,0	Pailly <i>et al.</i> , 2004 ; Karadeniz, 2004

Les citrons et les limes présentent les valeurs de pH les plus faibles (2,4 et 2,6, respectivement) suivi du pomelo (pH de 3,0) et du groupe des oranges et des mandarines (pH supérieur à 3,0). D'un point de vue génétique, les agrumes peuvent être divisés en deux groupes : celui des acides (citrons et limes) et celui des intermédiaires (oranges, mandarines, pomelos...) (Ollitrault *et al.*, 2003). En effet, l'acidité titrable des citrons et des limes est la plus forte (respectivement 6,0 et 6,3%) comparée à celle des oranges (2,1%), des pomelos (1,3%) et des mandarines (1,1%).

Les trois espèces ancestrales du genre *Citrus* se distinguent nettement par leurs teneurs en métabolites primaires : les sucres et les acides organiques (Luro *et al.*, 2011) (**Figure 9**).

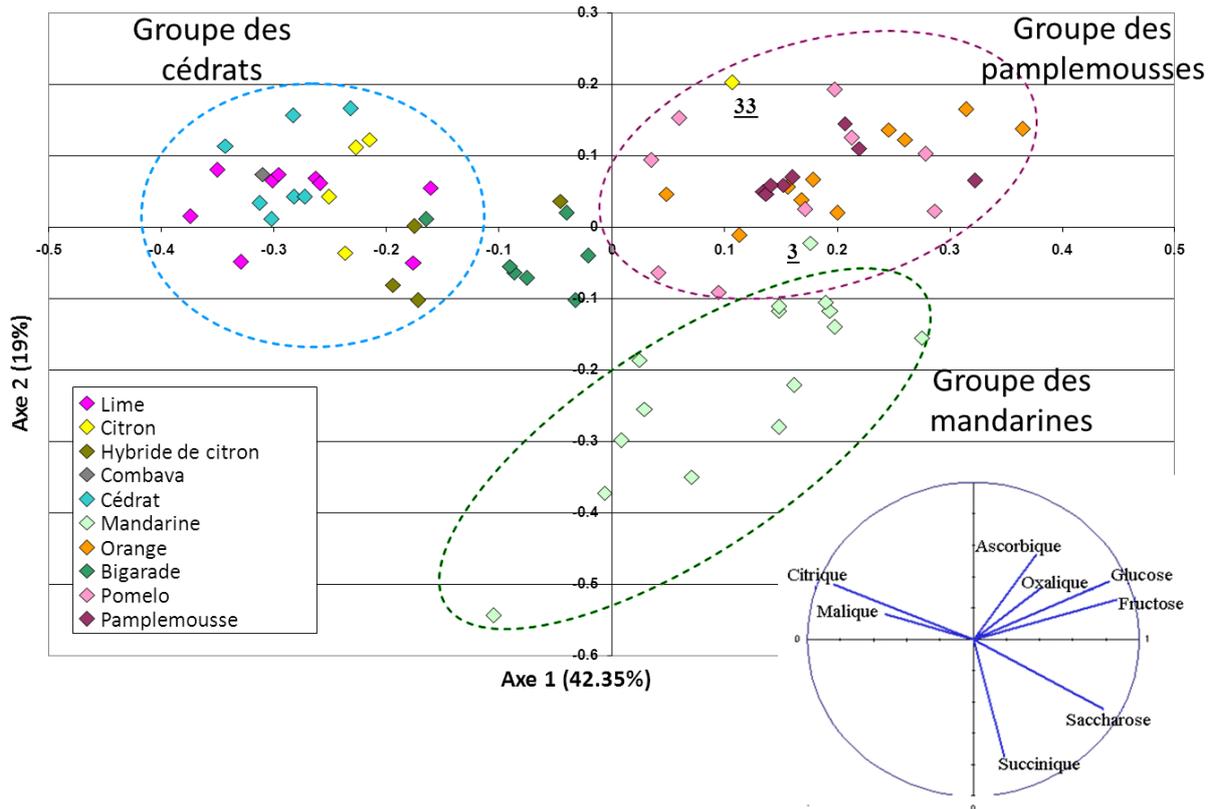


Figure 9: Analyse en composantes principales des teneurs en métabolites primaires pour différentes espèces du genre *Citrus*, d'après Luro *et al.*(2011).

Le groupe des acides (limes, citrons, hybrides de citron, combava et cédrats) est caractérisé par de très fortes teneurs en acides citrique et malique, celui des pamplemoussiers (orange, pomelo et pamplemousse) dont les teneurs en glucose et fructose permettent de le différencier des autres et celui des mandariniers dont les concentrations en acide succinique et en saccharose sont plus élevées par rapport aux deux autres groupes. Les bigarades présentent une composition en métabolites intermédiaire aux trois autres groupes.

L'organisation de la diversité basée sur les métabolites primaires est proche de la distribution de la diversité des agrumes établie grâce à des marqueurs moléculaires neutres de type microsatellites (Barkley *et al.*, 2006; Luro *et al.*, 2000; Nicolosi *et al.*, 2000; Ollitrault *et al.*, 2003).

III.5.2. Variabilité de l'acidité au sein d'une même espèce

Il existe des mutants dits « sans acidité » pour différentes espèces. Ils sont caractérisés par une moindre accumulation de l'acide citrique au cours du développement du fruit. Ces variants sans acidité, apparus spontanément, résulteraient de mutations qui auraient affecté le déroulement normal du processus d'accumulation de l'acide citrique. Leurs fruits présentent donc une acidité titrable inférieure à celle des fruits acides des variétés du même groupe (**Tableau 2**).

Tableau 2: pH et acidité titrable de différents fruits d'agrumes et de leurs mutants sans acidité (Albertini, 2007).

Variétés	pH	Acidité titrable (g/100gMF)
Citron acide	2,6	100
Citron doux	4	15
Lime acide	2,5	102
Lime douce	6,5	1
Orange acide	3	28
Orange douce	6,5	1

Cette différence d'acidité entre les fruits acides et leur mutants doux serait liée à l'absence de la pompe H⁺-ATPase (AHA10) sur la membrane vacuolaire des mutants doux (Aprile *et al.*, 2011).

L'utilisation de ces trois variétés (citron, lime et orange) et leurs mutants sans acidité a permis d'élaborer deux modèles métaboliques « fruit acide » et « fruit doux » (Albertini, 2007).

IV. Mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes

Le métabolisme des sucres est indissociable de la respiration cellulaire qui fournit l'énergie, sous forme d'ATP, nécessaire à la cellule pour fonctionner. Le principal substrat respiratoire des cellules végétales est le saccharose (Kruger, 1990).

IV.1. Modèle général

Le modèle général représenté dans la **Figure 10** montre les voies possibles en fonction de l'état énergétique de la cellule : si la cellule favorise la production d'énergie donc d'ATP et/ou si celle-ci privilégie les synthèses (lipides, acides organiques et aminés).

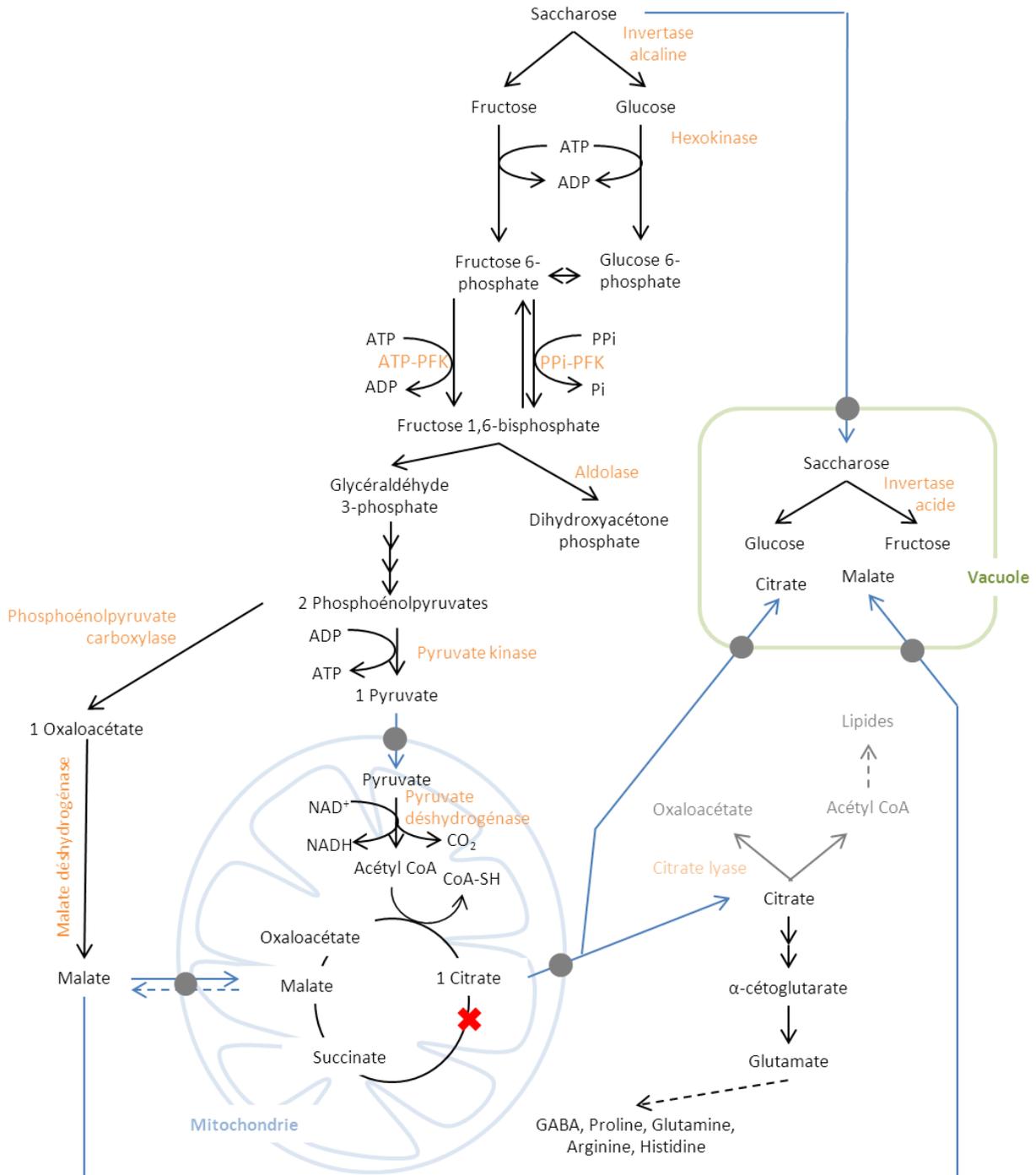


Figure 10: Schéma général du devenir du saccharose dans une cellule végétale. La croix rouge représente l'éventuelle interruption du cycle de Krebs et les ronds gris les transporteurs.

Le saccharose issu de la photosynthèse qui entre dans les cellules des sacs à jus a plusieurs issues possibles :

- il peut être clivé en glucose et en fructose *via* l'invertase alcaline (pH 7,0 à 7,8) (Echeverria et Burns, 1989) qui vont emprunter la voie de la glycolyse
- et/ou être stocké dans la vacuole où il pourra être clivé en glucose et en fructose *via* l'invertase acide (pH 4,0 à 5,3) (Echeverria, 1990).

Le glucose et le fructose produits sont ensuite phosphorylés par une hexokinase (EC. 2.7.1.1) pour former, respectivement, le glucose 6-phosphate et le fructose 6-phosphate.

Le glucose 6-phosphate est isomérisé en fructose 6-phosphate *via* la glucose 6-phosphate isomérase (EC. 5.3.1.9). Le fructose 6-phosphate est le substrat des phosphofruktokinases dont il existe deux types chez les végétaux, l'une est dépendante de l'ATP (ATP-PFK, EC. 2.7.1.11) et l'autre du pyrophosphate (PPI-PFK ou PFP, EC. 2.7.1.90) (Buchanan *et al.*, 2000). Ces deux enzymes catalysent la conversion du fructose 6-phosphate en fructose 1,6-bisphosphate. Ces deux enzymes sont activées par le pyrophosphate inorganique et inhibée par la présence de phosphoénolpyruvate (PEP) et de citrate (Goren *et al.*, 2000; Taiz et Zeiger, 2006). L'activité de la PFK a été mise en évidence chez l'orange « Valencia » à maturité (Echeverria et Valich, 1988) et celle de la PFP chez la mandarine, la lime douce et le citron (Tzur *et al.*, 1992).

La réaction irréversible catalysée par la phosphofruktokinase est l'étape régulatrice de la glycolyse (Botha *et al.*, 1988; Cawood *et al.*, 1988; Dennis et Greyson, 2006; Knowles *et al.*, 1990).

Le fructose 1,6-bisphosphate donne du phosphoénolpyruvate après plusieurs réactions catalysées par différentes enzymes, deux voies sont ensuite possibles en fonction de l'état énergétique de la cellule :

- si la cellule a des besoins énergétiques importants, le phosphoénolpyruvate est transformé en pyruvate par la pyruvate kinase. Le pyruvate va entrer dans la mitochondrie où il va être décarboxylé en acétylCoA. L'acétylCoA se condense à l'oxaloacétate et le cycle de Krebs fonctionne pour produire de l'énergie.
- si les besoins énergétiques de la cellule sont couverts et que les besoins sont orientés vers la synthèse d'acides organiques tels que le citrate, un phosphoénolpyruvate donnera un pyruvate qui produira ensuite de l'acétylCoA et le second phosphoénolpyruvate

fournira de l'oxaloacétate lors de la réaction catalysée par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC, EC. 4.1.1.31). Cet oxaloacétate va donner du malate *via* la malate déshydrogénase cytoplasmique. Le malate ainsi formé va entrer dans la mitochondrie et va entrer dans le cycle de Krebs et ainsi fournir de l'oxaloacétate grâce à la malate déshydrogénase mitochondriale. L'acide citrique est ensuite formé par la condensation de l'acétylCoA et de l'oxaloacétate par la citrate synthase (EC. 2.3.3.1). L'inhibition de l'isocitrate déshydrogénase mitochondriale (EC. 1.1.1.41) (Bogin et Wallace, 1966; Lemaitre *et al.*, 2007; Sadka *et al.*, 2000b) permet la sortie de l'acide citrique de la mitochondrie par un transporteur spécifique.

Dans le cytoplasme le citrate a plusieurs devenir possibles (**Figure 11**) :

- Il peut être clivé par la citrate lyase (EC. 4.1.3.6) pour donner de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. L'acétylCoA ainsi formé est précurseur de la biosynthèse des lipides.
- Il peut être stocké dans la vacuole.
- Il peut être transformé en α -cétoglutarate, *via* l'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante (EC. 1.1.1.42) (Chen et Gadai, 1990; Hanning et Heldt, 1993; Sadka *et al.*, 2000c)

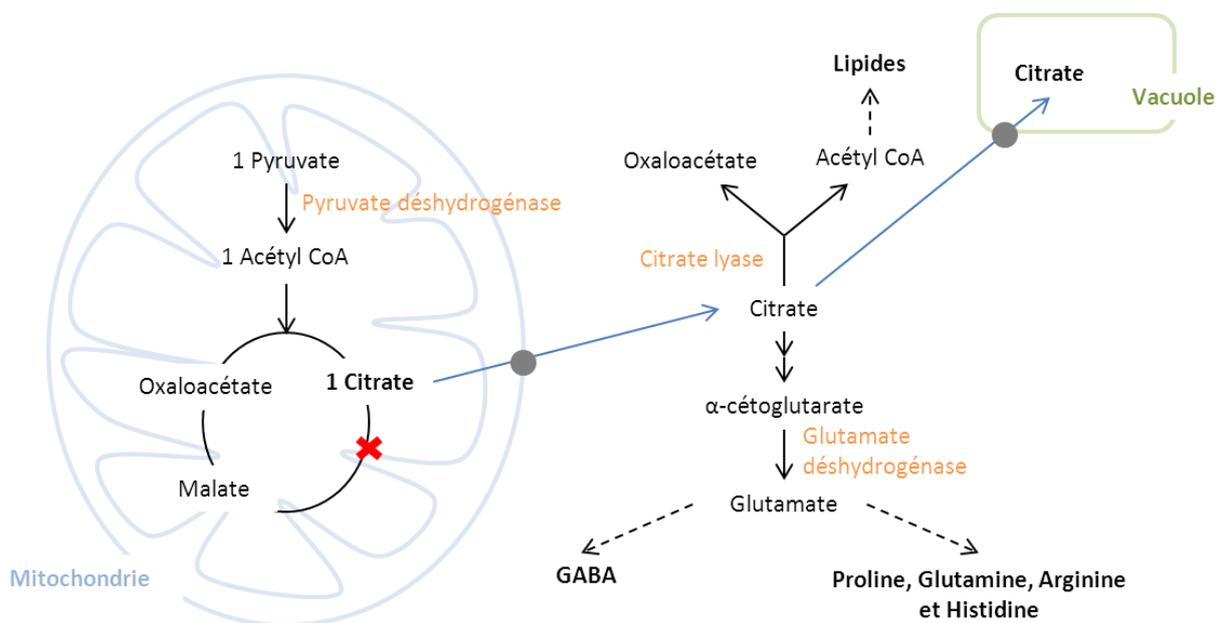


Figure 11: Le devenir du citrate dans le cytoplasme.

La croix rouge représente l'éventuelle interruption du cycle de Krebs et les ronds gris les transporteurs.

L'utilisation de l' α -cétoglutarate implique sa transamination en glutamate qui pourra être converti soit en glutamine soit en proline. Le glutamate, *via* le « GABA shunt », pourra former du succinate et éventuellement permettre la synthèse de sucres. La voie du GABA semblerait être impliquée dans la dégradation de l'acide citrique (Cercos *et al.*, 2006). Il a également été suggéré par Chen *et al.* (2012) que la voie du GABA jouerait un rôle important dans la dégradation de l'acide citrique chez les agrumes.

Les acides organiques jouant un rôle très important dans la qualité du fruit, la perte de l'acidité, au cours de la maturation, a des répercussions économiques. Pour comprendre les mécanismes d'acidification et d'accumulation des sucres de la pulpe des fruits d'agrumes, une étude a été réalisée par une approche fruit acide et variant doux avec trois variétés : l'orange, le citron et la lime (Albertini, 2007).

IV.2. Etude d'un fruit acide et de son variant doux

IV.2.1. Rapport sucres/acides de ces trois variétés

Les analyses biochimiques ont permis d'établir le rapport entre la quantité de sucres et celle des acides organiques (**Figure 12**).

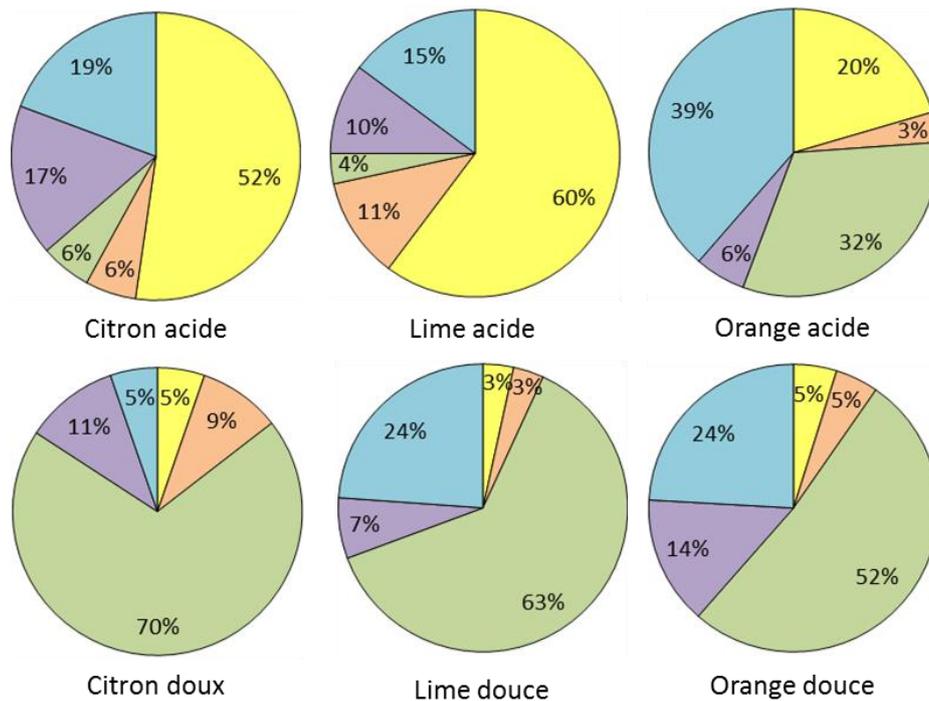


Figure 12: Concentrations en acides organiques et en sucres des fruits (exprimées en %) après 50 jours de développement (stade II) pour six variétés d'après Albertini (2007). Les acides représentés sont l'acide citrique (■) et l'acide malique (■) et les sucres représentés sont le fructose (■), le saccharose (■) et le glucose (■).

Les fruits acides (citrons et limes) présentent davantage d'acide citrique (52 et 60%, respectivement) que les variétés douces où il ne représente que 5 et 3%, respectivement, des acides organiques totaux (**Figure 12**). La variation d'acidité entre les fruits acides et doux semble essentiellement liée à l'augmentation de la concentration en acide citrique chez les variétés acides et à l'augmentation des concentrations en fructose pour les fruits doux. L'étude de la variation de la composition en sucres chez les fruits doux montre une prédominance du fructose (Albertini, 2007).

Chez les fruits doux, le fructose est majoritaire (52 à 70%) (Albertini, 2007).

Ces résultats ont permis de proposer deux modèles d'accumulation de l'acide citrique: un modèle d'accumulation de l'acide citrique chez un fruit acide et un autre chez un fruit doux.

IV.2.2. Le modèle d'accumulation de l'acide citrique chez les fruits acides

La particularité du fruit acide est sa capacité à stocker une quantité importante d'acide citrique dans sa vacuole selon le modèle suivant (**Figure 13**) (Albertini, 2007).

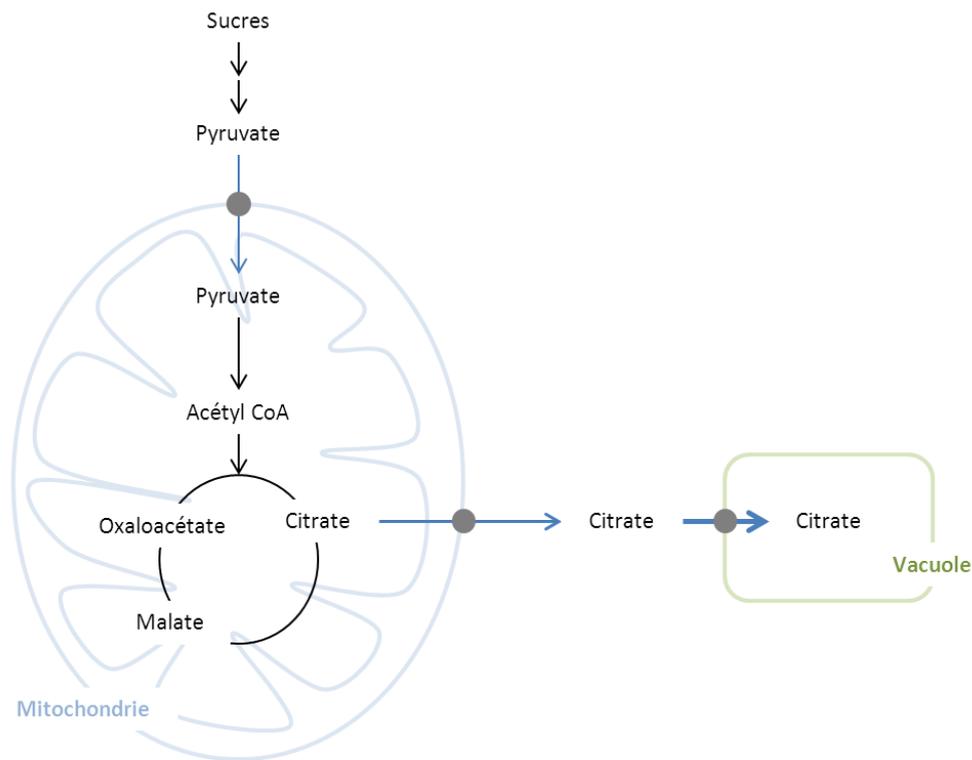


Figure 13: Modèle fruit acide, d'après Albertini (2007).
Les ronds gris représentent les transporteurs.

Pour les fruits acides, l'acide citrique serait directement accumulé dans la vacuole contre le gradient osmotique. Il n'y a pas de diminution de formation de l'acide citrique au cours du développement du fruit. Il ne semble donc y avoir aucune dégradation cytoplasmique de l'acide citrique ce qui est compatible avec l'absence d'activation de l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique.

IV.2.3. Le modèle d'accumulation de l'acide citrique chez les fruits doux

A la différence des fruits acides, les fruits doux accumulent peu d'acide citrique mais beaucoup de fructose (**Figure 14**).

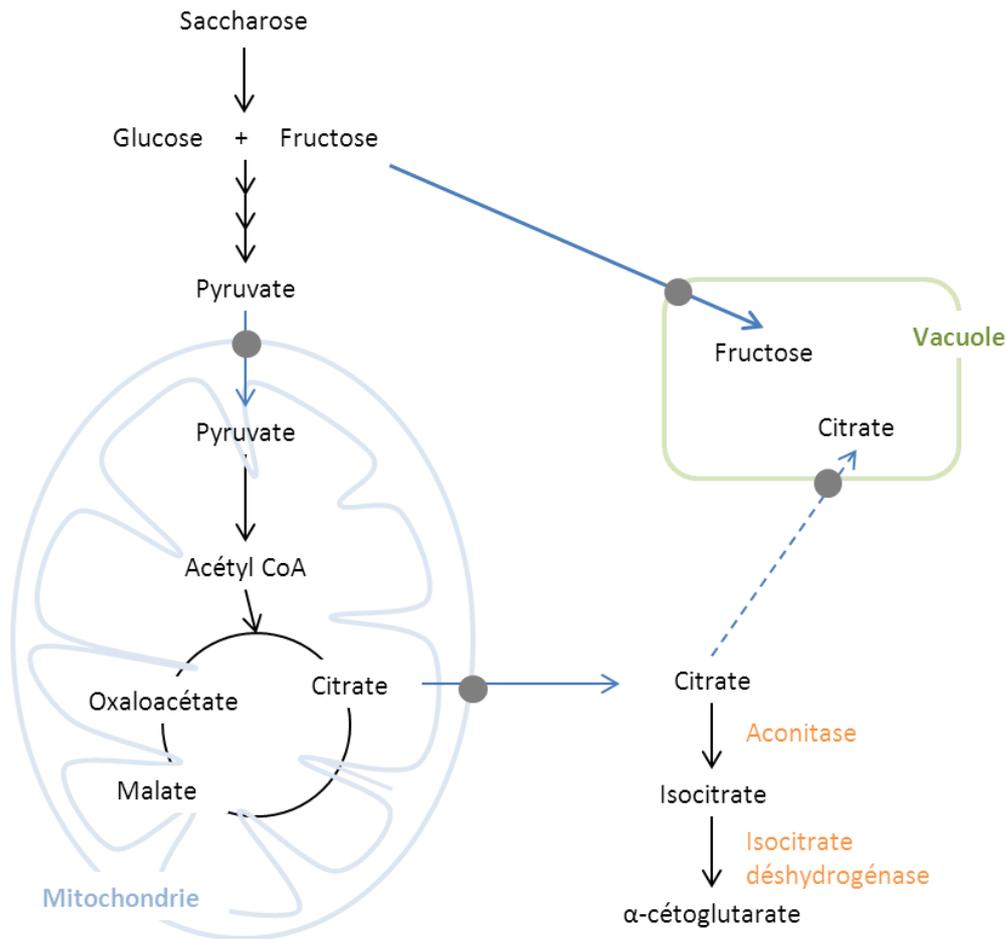


Figure 14: Modèle fruit doux, d'après Albertini (2007).
Les ronds gris représentent les transporteurs.

Le fructose est stocké dans la vacuole contre un gradient osmotique. Une augmentation des transcrits du gène codant pour l'invertase vacuolaire a été observée ainsi qu'une augmentation de l'activité enzymatique chez les fruits doux (Albertini, 2007).

Chez les fruits doux, le citrate est peu stocké dans la vacuole. Dans le cytoplasme, le citrate donne de l'isocitrate puis de l' α -cétoglutarate par action de l'isocitrate déshydrogénase (Lee *et al.*, 2010). L'augmentation de la quantité de transcrits de l'isocitrate déshydrogénase ainsi que la mesure de l'activité enzymatique confirment cette transformation. L' α -cétoglutarate pourra ensuite être transformé en glutamate qui donnera soit des acides aminés (proline, arginine, glutamine) soit sera décarboxylé en GABA. Cercos *et al.* (2006) ont mis en évidence l'activation de la voie du GABA « shunt » chez la clémentine lors de la maturation.

IV.3. Comment l'acide citrique est-il utilisé ?

Chez les fruits acides, l'acide citrique va être majoritairement stocké dans la vacuole, il va permettre la synthèse d'acides aminés de façon plus minoritaire.

IV.3.1. Le stockage

L'acidification de la vacuole des cellules végétales est essentielle pour maintenir un gradient de potentiel électrochimique. Le transport des acides organiques vers la vacuole est possible grâce à une différence de concentration en ions H^+ dans la membrane tonoplastique. Cette différence de concentration est générée par deux pompes à protons, une V-ATPase (ATPase vacuolaire) et une V-PPase (pyrophosphatase vacuolaire)(Rea et Sanders, 1987). Ce potentiel électrochimique fournit l'énergie aux transporteurs actifs secondaires des sucres, des acides aminés, des ions et de nombreux métabolites secondaires (Leigh, 1997). Le transport actif secondaire utilise la force électrochimique générée par les pompes du transport actif primaire (**Figure 15**).

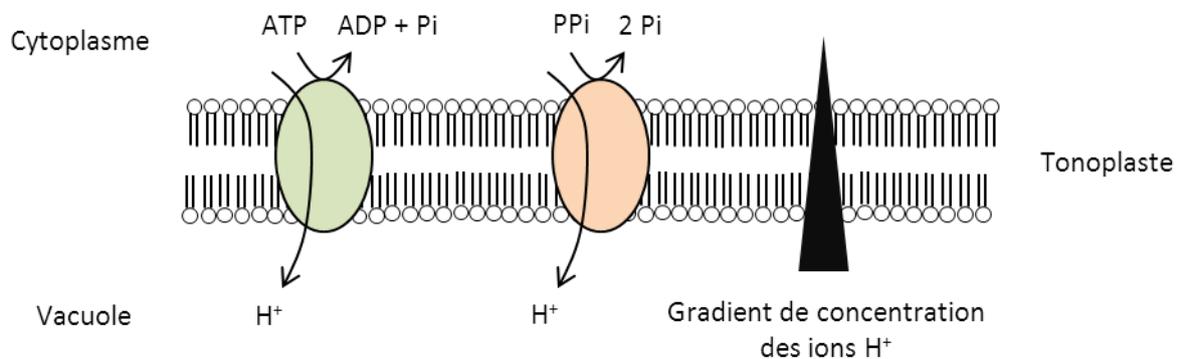


Figure 15: Transport actif primaire : les pompes à protons V-ATPase et V-PPase, d'après Taiz et Zeiger (2006).

La pompe V-ATPase permet l'entrée d'ions H^+ suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. La pompe V-PPase a la même fonction mais hydrolyse une molécule de pyrophosphate (Taiz et Zeiger, 2006).

Ces deux pompes font entrer dans la vacuole des ions H^+ contre leur gradient de concentration (**Figure 15**). Le pH de la vacuole est alors plus acide que celui du cytoplasme

ce qui entraîne un gradient de pH entre ces deux compartiments. Ce gradient est nécessaire à l'entrée du citrate dans la vacuole (Muller *et al.*, 1997).

L'entrée du citrate dans la vacuole dépend d'une protéine spécifique de type antiport citrate/H⁺. Le transport du citrate *via* les transporteurs est également appelé transport actif secondaire (**Figure 16**).

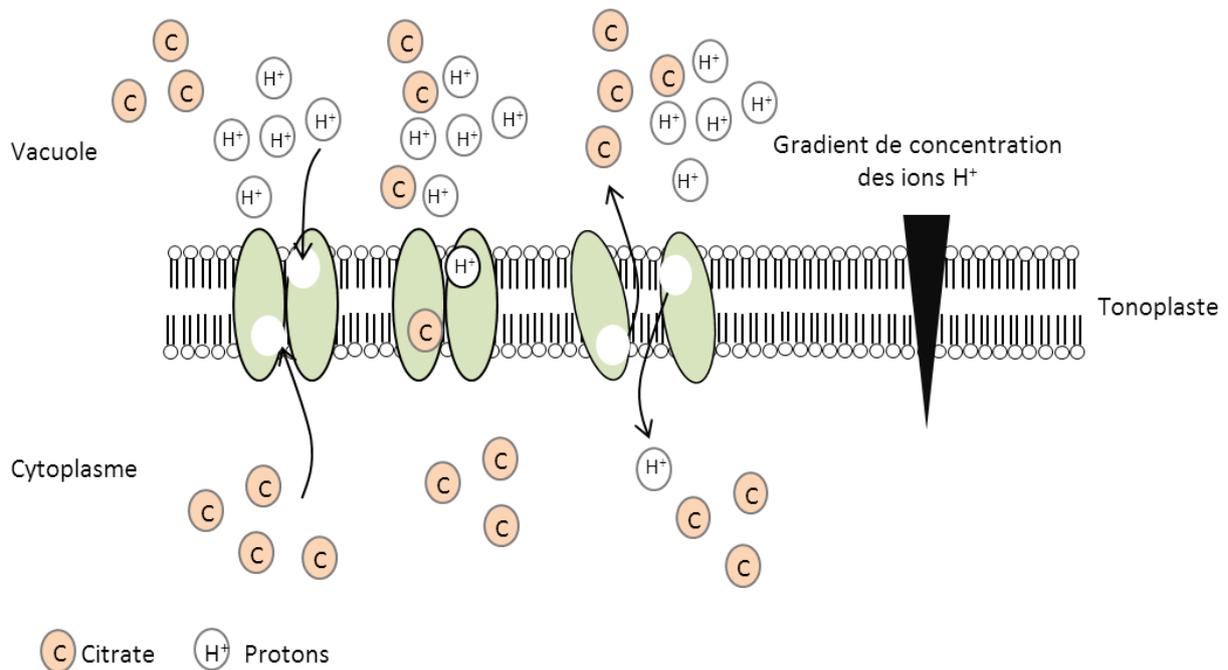


Figure 16: Transporteur de citrate, d'après Taiz et Zeiger (2006).

Au niveau de l'antiport, les ions H⁺ sortent de la vacuole. Cette force est utilisée pour transporter le citrate contre son gradient de concentration et ainsi le faire entrer dans la vacuole.

Les acides organiques peuvent également entrer dans la vacuole grâce à une protéine « canal ». Les protéines « canal » permettent la diffusion facilitée des acides organiques à travers le tonoplaste, selon leur gradient électrochimique. Les protéines « canal » agissent comme des pores dans la membrane vacuolaire et leur spécificité est déterminée principalement par les propriétés biophysiques du canal lui-même (Taiz et Zeiger, 2006).

IV.3.2. La mobilisation de l'acide citrique

L'acide citrique stocké dans la vacuole peut être mobilisé par la cellule grâce au transporteur citrate/ H^+ nommé CsCit1 (Shimada *et al.*, 2006). Le transport du citrate *via* CsCit1 est de type symport (**Figure 17**).

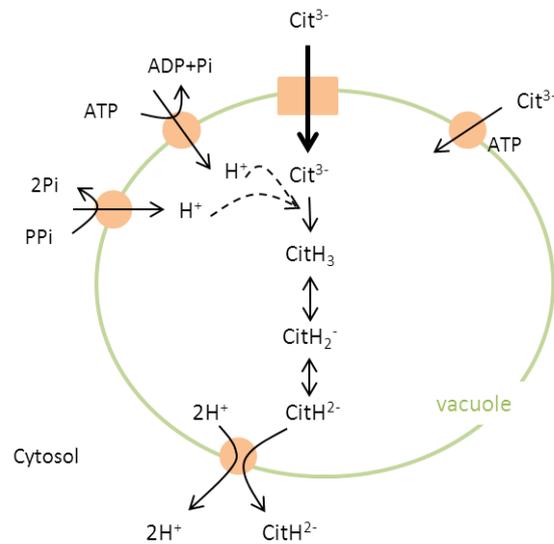


Figure 17: L'homéostasie du citrate dans les cellules des sacs à jus, d'après Shimada *et al.* (2006).

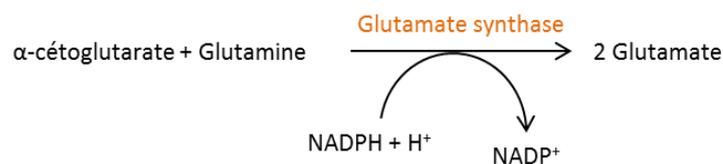
L'anion citrate³⁻ (Cit³⁻) qui entre dans la vacuole *via* des canaux (Ratajczak *et al.*, 2003; Rentsch et Martinoia, 1991) et aussi *via* la pompe ATP-dépendante (Brune *et al.*, 1998; Canel *et al.*, 1995; Ratajczak *et al.*, 2003) est protoné dès son entrée dans la vacuole en citrate H₃, citrate H₂⁻ et citrate H²⁻. Lors du développement du fruit, le pH vacuolaire augmente ainsi que la quantité de citrate H²⁻ qui est exportée en dehors de la vacuole *via* le transporteur CsCit1 (**Figure 17**). La spécificité de CsCit1 pour le citrate H²⁻ et la faible perméabilité du tonoplaste pour ce dernier contribuent à maintenir le pH acide de la vacuole (Shimada *et al.*, 2006).

IV.3.3. Les métabolites issus de la dégradation cytoplasmique de l'acide citrique

Une fois dans le cytoplasme, le citrate est transformé en isocitrate puis en α -cétooglutarate, le précurseur du glutamate.

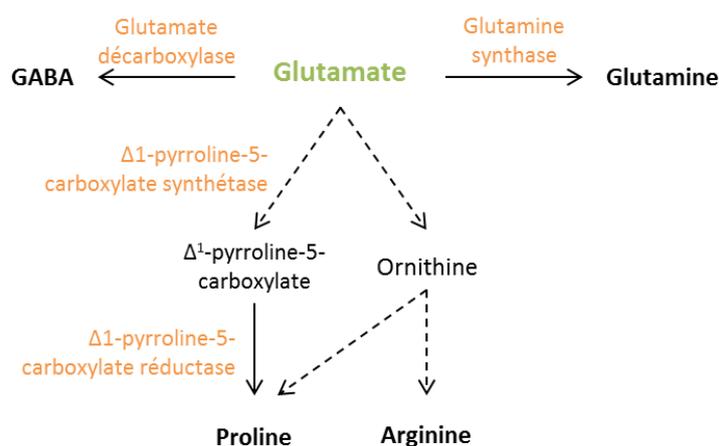
IV.3.3.1. Le glutamate

L' α -cétooglutarate cytoplasmique pourra ensuite être transformé par la glutamate synthase (EC. 1.4.1.14).



Le glutamate ainsi que la glutamine, sont les premiers acides aminés synthétisés par l'intégration de l'ion ammonium sur un squelette carboné. Le glutamate représente un précurseur pour d'autres acides aminés. Les aminotransférases catalysent le transfert d'un groupement aminé, très souvent issu du glutamate, sur un squelette carboné.

Le glutamate est un important carrefour métabolique.



Chez les agrumes, les concentrations en glutamate ne varient pas entre les jeunes fruits et les fruits matures (Aristoy *et al.*, 1989) mais l'expression des gènes impliqués dans la

synthèse du glutamate augmente. Ces résultats suggèrent que le glutamate est consommé au cours de la maturation du fruit (Cercos *et al.*, 2006). Nous allons nous intéresser à la proline et au GABA qui sont formés à partir du glutamate.

IV.3.3.2. La proline

Le glutamate est précurseur de la proline, acide aminé cyclisé. La chaîne de réaction commence par la réduction du glutamate, par la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS, EC. 1.5.1.12) (**Figure 18**), en glutamyl- γ -semialdéhyde qui se cyclise spontanément en Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate qui est réduit ensuite en proline *via* la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate réductase (P5CR, EC. 1.5.1.2) (Delauney et Verma, 1993). L'ornithine est également précurseur du Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate (P2C) qui est transformé en proline par l'action de la Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate réductase (P2CR, EC. 1.5.1.21) (Schindler *et al.*, 1989). Contrairement à la majorité des acides aminés synthétisés essentiellement dans le chloroplaste, la synthèse de la proline à partir du glutamate est cytoplasmique alors que la transamination de l'ornithine en P5C se produit dans la mitochondrie (Hare et Cress, 1997).

La Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase est l'étape limitante de la biosynthèse de la proline (Lehmann *et al.*, 2010). Cette voie est inhibée par la proline (Hu *et al.*, 1992).

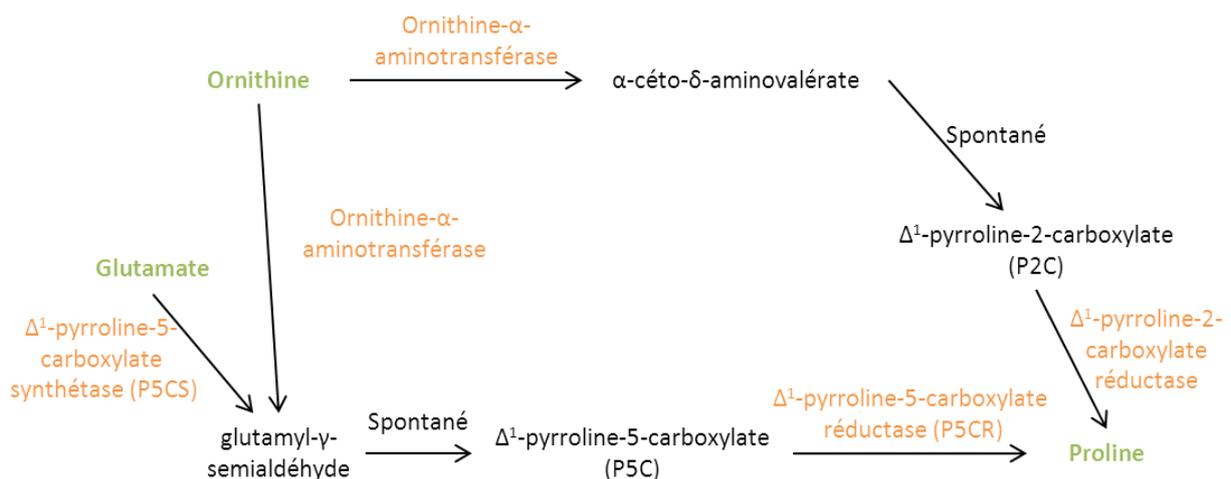


Figure 18: Biosynthèse de la proline, d'après Delauney et Verma (1993).

Chez les agrumes, la proline serait l'acide aminé majoritaire chez l'orange et le citron, dans des fruits récoltés à maturité (Ting et Attaway, 1971). La concentration en proline

augmenterait au cours du développement du fruit (d'environ 10 à 40 et 100 mg 100 mL⁻¹, respectivement pour le citron et l'orange) (Erickson, 1968).

La proline joue le rôle de soluté osmo-régulateur chez les plantes soumises à des stress osmotiques (Delauney et Verma, 1993). L'accumulation de proline permettrait également de réguler le pH cytoplasmique et d'équilibrer le statut redox de la cellule (Lehmann *et al.*, 2010). De plus, cet acide aminé semble être impliqué dans la signalisation du stress en influençant les réponses adaptatives (Lehmann *et al.*, 2010; Maggio *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'accumulation de la proline dans les tissus végétaux en réponse à différents stress abiotiques joue un rôle important contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Mohanty et Matysik, 2001).

La photosynthèse augmente la quantité de sucres qui favorise l'accumulation de proline (Pesci, 1993; Stewart *et al.*, 1966). Une forte concentration en saccharose et en glucose entraîne une accumulation de proline plus importante dans les feuilles de *Brassica napus* (Larher *et al.*, 1993). Cette régulation est probablement due à un contrôle au niveau transcriptionnel du métabolisme de la proline, puisque le niveau de transcrits du gène codant pour la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase augmente alors que le gène codant pour la proline déshydrogénase, enzyme du catabolisme de la proline, est réprimé par le saccharose (Hanson *et al.*, 2008; Kiyosue *et al.*, 1996; Nakashima *et al.*, 1998). Donc cette accumulation de proline permettrait d'agir sur la répartition du saccharose entre les organes-source et les tissus-puits (Rook *et al.*, 1998).

IV.3.4. Le « shunt » du γ -aminobutyrate

Cette voie de dégradation cytoplasmique de l'acide citrique, chez les agrumes a été décrite par Cercos *et al.* (2006). Le GABA « shunt » est une voie métabolique qui comporte trois réactions (**Figure 19**) (Bouche et Fromm, 2004).

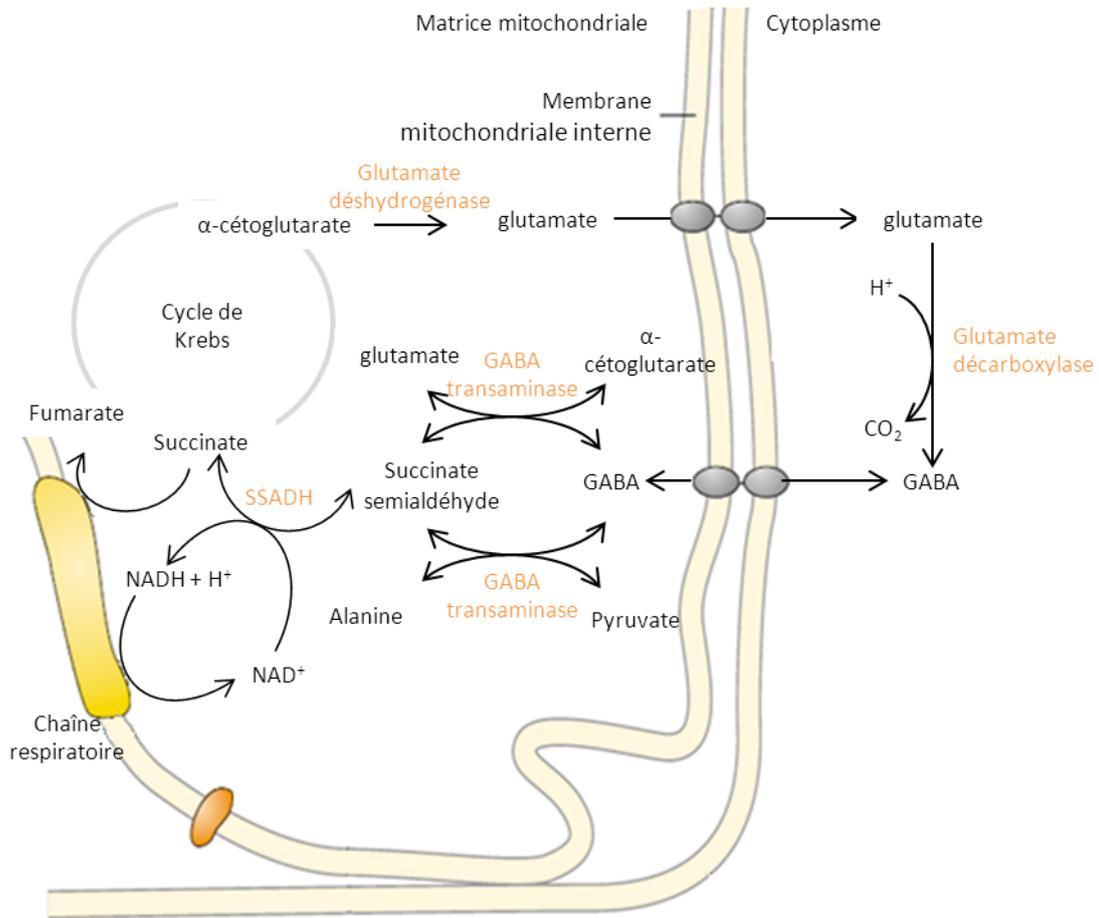
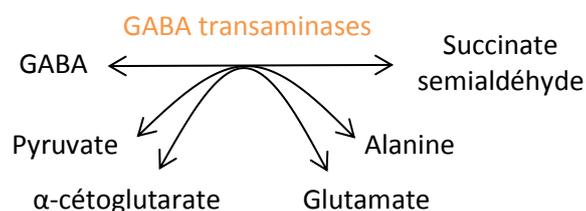


Figure 19: Le « GABA shunt », d'après Bouche et Fromm (2004).
 SSADH : Succinate semialdéhyde déshydrogénase.

La synthèse du GABA est une réaction qui consomme des protons et est catalysée par la glutamate décarboxylase (EC. 4.1.1.15) (Bown et Shelp, 1997).



La seconde étape du GABA « shunt » est catalysée par la GABA-transaminase (EC. 2.6.1.19), qui est une enzyme mitochondriale. Le transporteur du GABA, permettant son entrée dans la mitochondrie n'est pas encore connu (Fait *et al.*, 2008).



La GABA transaminase permet la conversion du GABA en succinate semialdéhyde. Les GABA transaminases peuvent utiliser l' α -cétoglutarate ou le pyruvate comme accepteur de groupements aminés (Bouche et Fromm, 2004). Chez les plantes, la GABA transaminase pyruvate dépendante est plus active que celle dépendante de l' α -cétoglutarate (Narayan et Nair, 1990).

La dernière étape du GABA « shunt » est la conversion du succinate semialdéhyde en succinate. Cette étape est catalysée par la succinate semialdéhyde déshydrogénase (EC. 1.2.1.16).



La succinate semialdéhyde déshydrogénase est inhibée par l'ATP et le NADH. La régulation de la succinate semialdéhyde par l'ATP est le point-clé de la régulation de l'entrée du succinate produit par le GABA « shunt » dans la chaîne respiratoire (Bouche et Fromm, 2004). De plus, cette étape du GABA « shunt » fournit du NADH à la chaîne respiratoire et du succinate. L'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs est concomitante à la réduction du FAD lié à la succinate déshydrogénase en FADH₂ qui transférera ses électrons à l'ubiquinone. La dégradation du GABA pourrait ainsi limiter l'accumulation de ROS lors d'un stress oxydatif (Bouche et Fromm, 2004).

La régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes du GABA « shunt » pourrait représenter un facteur-clé dans la régulation de la répartition du carbone et de l'azote, et reliant ainsi le métabolisme des acides aminés avec le cycle de Krebs (Fait *et al.*, 2008). Le GABA « shunt » est associé à différentes réponses physiologiques, telles que la régulation du pH cytoplasmique, du flux de carbone entrant dans le cycle de Krebs, la protection des cellules vis à vis du stress oxydatif, la défense contre les insectes, l'osmorégulation et la signalisation (Bouche et Fromm, 2004). Chez la tomate (Rothan *et al.*, 1997) et dans des suspensions de cellules de carotte (Carroll *et al.*, 1994), la glutamate décarboxylase est activée suite à un stress. La synthèse du GABA est stimulée par une diminution de la concentration en protons dans le cytoplasme (Bown et Shelp, 1997).

Les travaux de Cercos *et al.* (2006) ont confirmé que chez les agrumes le GABA « shunt » jouait un rôle central dans la régulation de l'acidité dans le cytoplasme des sacs à jus.

V. Quels sont les facteurs environnementaux et culturels aboutissant à une variabilité de la teneur en acide citrique ?

V.1. Le porte-greffe

Chez les agrumes, le porte-greffe influence les caractéristiques du fruit à savoir la taille, la forme, l'épaisseur de la peau, la quantité de jus et les concentrations en sucres et en acides de la pulpe du fruit (Castle *et al.*, 1993; Wutscher, 1977; Wutscher, 1988) (**Tableau 3**).

Tableau 3: L'effet du porte-greffe sur l'acidité titrable (%), d'après Wutscher (1988).

Variété	Porte-greffes	Acidité titrable (g/100g)
Pamplemousse « Red »	Bigaradier	1,16 ^b
	« Rough lemon »	1,06 ^a
Orange Hamlin	Bigaradier	0,8 ^b
	Volkameriana	0,55 ^a

Les différentes lettres (a et b) montrent les différences significatives entre les porte-greffes.

Les porte-greffes de la famille des citrons (Rough lemon et Volkameriana) entraînent une diminution de l'acidité titrable chez le pomelo et l'orange (Wutscher, 1988) comparativement au bigaradier.

V.2. L'irrigation

La qualité des fruits d'agrumes semble très affectée par un déficit hydrique (Navarro *et al.*, 2010). En effet, les propriétés du jus sont différentes : les quantités de sucres et l'acidité sont augmentées (Navarro *et al.*, 2010) ce qui entraîne une diminution de la qualité du fruit (Mougheith *et al.*, 1977).

García-Tejero *et al.*(2010) ont montré les effets d'un déficit d'irrigation sur l'acidité titrable de l'orange Salustiana (**Tableau 4**).

Tableau 4: Acidité titrable en fonction du déficit hydrique (García-Tejero *et al.*, 2010).

Traitements	Acidité titrable (g.L ⁻¹)		
	2005	2006	2007
Déficit hydrique sévère	0,92 ^a	0,64 ^c	1,12 ^b
Déficit hydrique modéré	0,81 ^b	0,58 ^b	1,04 ^{ab}
Déficit hydrique faible	0,80 ^b	0,54 ^a	1,03 ^{ab}
Témoin	0,71 ^b	0,59 ^b	0,95 ^a

Les différentes lettres (a, b et c) montrent les différences significatives entre les traitements.

Les fruits des arbres qui ont subi un stress hydrique sévère présentent une acidité titrable plus élevée que les fruits témoins quelle que soit l'année de mesure. La réduction de l'irrigation lors du développement du fruit appliquée de façon plutôt tardive entraîne une augmentation de l'acidité titrable et des concentrations en sucres solubles (Castel et Buj, 1990; González-Altozano et Castel, 1999; Hutton *et al.*, 2007; Peng et Rabe, 1998).

V.3. Le climat

Les variations de la qualité du fruit peuvent être imputées aux conditions environnementales telles que les températures, lorsque les fruits sont encore sur l'arbre (Hutton et Landsberg, 2000). Hutton et Landsberg (2000) ont montré que l'acidité titrable du fruit diminue à mesure que les températures augmentent. Richardson *et al.* (1997) ont montré chez la mandarine Satsuma, qu'une légère augmentation de la température lors des premières semaines du premier stade de développement du fruit a une conséquence dramatique sur la croissance et sur la composition du fruit en sucres et en acides. En effet, ces conditions de températures entraînent une augmentation du rapport sucres/acidité titrable.

VI. Comment peut-on faire varier expérimentalement la teneur en acide citrique ?

Le fait qu'un organe ou un tissu constitue une source ou un puits dépend du sens dans lequel s'effectue le transport des assimilats (Dickson, 1990), un organe ou un tissu qui produit plus d'assimilats qu'il n'est nécessaire pour maintenir son activité métabolique ou sa croissance est une source. Une source est donc un producteur ou un exportateur, autrement dit, il exporte plus d'assimilats qu'il n'en importe. Les feuilles adultes et tous les autres tissus qui ont une photosynthèse active constituent les principales sources chez la plupart des plantes, à l'inverse, un puits est un importateur ou un consommateur de photoassimilats. Les racines, les tissus de la tige et les fruits en cours de développement sont les tissus ou les principaux organes qui se comportent comme des puits. Le principe qui régit le transport par le phloème est que les photo-assimilats sont transportés d'une source vers un puits. Les organes puits utilisent les photo-assimilats soit en les faisant entrer dans leur métabolisme respiratoire, soit en les utilisant pour structurer leur cellule et leur cytoplasme, soit enfin pour les mettre en réserve sous forme d'amidon ou d'autres glucides (Hopkins, 2003).

Pour jouer sur la diminution de la production d'acide citrique, il faut diminuer l'entrée de carbone donc de sucres, deux voies sont alors possibles, soit en diminuant la taille du puits, soit en diminuant la taille de la source.

Il existe plusieurs méthodes pour limiter les apports en sucres : l'annélation qui est une incision, de quelques centimètres, de l'écorce d'une branche afin de bloquer le transport des assimilats de la photosynthèse et ainsi isoler le rameau du reste de l'arbre (Goldschmidt *et al.*, 1996) ; la suppression de fruits qui consiste à diminuer la charge en fruits de l'arbre ; la défoliation partielle, où une certaine proportion de feuilles (entre 66 et 75%) est enlevée de l'arbre (Iglesias *et al.*, 2002).

VI.1. L'annélation

Cette technique permet d'intervenir au niveau du transport de la sève élaborée, circulant dans le phloème. La distribution des produits de la photosynthèse et des phytohormones peut être bloquée de cette manière.

L'annélation consiste à couper les conductions phloémiennes (**Figure 20A**). Le tissu phloémien peut être prélevé en séparant le phloème du xylème (vaisseau conducteur de la sève brute constituée d'eau et de sels minéraux) (le bois) au niveau du cambium vasculaire. En pratique la technique revient à enlever une bande d'écorce large de 1 cm sur la branche à étudier (**Figure 20B**).

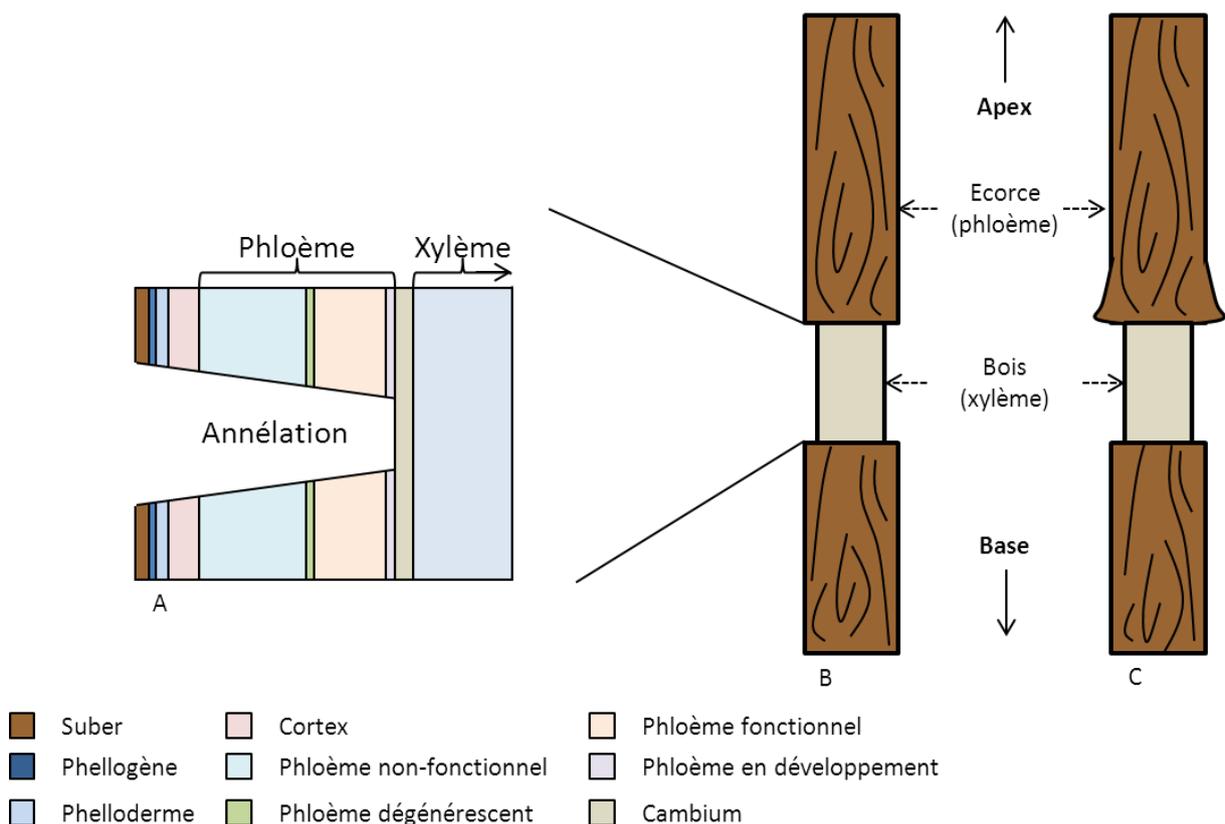


Figure 20: Annélation sur une tige ligneuse.

A : illustration schématique de l'anatomie de l'annélation, d'après Schneider (1954) ; **B :** morphologie de l'annélation d'une branche ligneuse ; **C :** résultat d'une annélation, d'après Hopkins (2003).

Les plantes ayant subi une annélation présentent un renflement caractéristique des tissus de l'écorce, juste au-dessus de la zone de décortication (Mataa *et al.*, 1998) (**Figure**

20C). Ce renflement caractéristique est dû, en partie, à une accumulation de photoassimilats transportés dans le flux descendant qui se trouve bloqué au niveau de l'annélation. Le flux descendant renferme également des composés azotés et probablement des hormones qui interviennent dans la stimulation de la prolifération et de la croissance de cellules situées en amont du point de blocage (Hopkins, 2003). L'annélation est utilisée pour modifier le rapport organe-source/organe-puits sur les arbres fruitiers en isolant une branche fructifère du reste de l'arbre (Fishler *et al.*, 1983), par exemple. Un tel système expérimental permet la création de modèles de développement du fruit (Génard *et al.*, 1998). L'annélation est largement utilisée chez la vigne, les agrumes, le pommier et le pêcher pour modifier expérimentalement le rendement, la taille et la qualité du fruit. La largeur de l'annélation n'a pas d'incidence sur l'intensité de la réponse. Chez les agrumes, l'annélation permet d'augmenter le calibre du fruit (Simões Júnior *et al.*, 1999) et la quantité de sucres solubles (Yamanishi *et al.*, 1995). Les fruits des branches annelées présentent une couleur plus attrayante et le rapport sucres/acidité est amélioré (Peng et Rabe, 1996).

Tableau 5: Influence de la date de l'annélation sur la teneur en sucres solubles et sur la nouaison 25 et 50 jours après l'anthèse sur le développement des ovaires de la mandarine 'Fortune', d'après Rivas *et al.* (2006).

Traitement	25 jours après anthèse			50 jours après anthèse		
	Saccharose ¹	Sucres réducteurs ¹	Nouaison ²	Saccharose ¹	Sucres réducteurs ¹	Nouaison ²
Témoin	13,7 ^c	7,6 ^a	13 ^c	10,5 ^a	5,2 ^a	3,5 ^c
Annélation						
15 jours avant anthèse	21,1 ^b	6,7 ^a	46 ^b	6,5 ^b	5,3 ^a	6,5 ^b
Annélation anthèse	33,4 ^a	6,5 ^a	60 ^a	0,7 ^c	5,3 ^a	9,0 ^a

Les résultats sont exprimés : ¹ en mg.g⁻¹ MS et ² en %.

Les différentes lettres (a, b et c) montrent les différences significatives entre les traitements.

Chez la mandarine 'Fortune' (**Tableau 5**), la nouaison est plus importante sur les branches annelées que sur les branches-témoins non annelées. La concentration en saccharose varie entre les fruits des branches annelées et ceux des branches témoins et est

plus importante après l'annélation (Rivas *et al.*, 2006). La disponibilité accrue en sucres, résultant de l'annélation, pour les jeunes fruits, semble être l'explication la plus plausible quant à l'augmentation de la nouaison (Rivas *et al.*, 2006).

VI.2. La diminution de la charge en fruits

La technique consiste à enlever des fruits des rameaux qui sont au préalable annelés pour les isoler du reste de l'arbre. Les fruits de chaque rameau sont enlevés afin d'avoir le rapport feuilles/fruits souhaité. Cette technique peut être utilisée sur des espèces comme le pêcher, car la chute physiologique des petits fruits est très faible. Les agrumes sont des arbres fruitiers qui produisent une profusion de fleurs. Après la floraison, l'abscission de nombreux ovaires en développement est suivie par une vague de chutes des petits fruits (Goldschmidt, 1999). Le nombre de fruits arrivant à maturité au final est de moins de 2% par rapport au nombre de fleurs formées (Ruiz *et al.*, 2001). Par conséquent, le nombre de fleurs produites par les agrumes est très supérieur au nombre de fruits récoltés (Iglesias *et al.*, 2003). La diminution de la charge en fruits n'est donc pas adaptée à ce modèle d'étude.

VI.3. La défoliation partielle

Les sucres jouent un rôle-clé dans tout le métabolisme de la plante. Le manque de sucres initie chez la plante des réponses variées et de profonds effets sur le métabolisme et le processus de développement de la plante (Yu, 1999). En effet, différentes études ont montré qu'une carence en sucres déclenche différentes réactions : un arrêt de la multiplication cellulaire, une consommation rapide des stocks de sucres de la cellule et une diminution de la respiration, une dégradation des lipides et des protéines, une augmentation de l'accumulation de phosphate inorganique, de phosphorylcholine et des acides aminés libres et une diminution de l'activité des enzymes glycolytiques (Aubert *et al.*, 1996; Brouquisse *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1994; Dieuaide *et al.*, 1992; Journet *et al.*, 1986). En général, une carence en sucre entraîne une surexpression des gènes de la photosynthèse des feuilles, de la remobilisation et de l'exportation des sucres des feuilles vers les puits. Les gènes codant pour le stockage des sucres sont réprimés. La réduction du rapport source/puits par une défoliation partielle entraîne une diminution de la concentration des

sucres dans les feuilles et une augmentation de la photosynthèse (Iglesias *et al.*, 2002). De plus, la stimulation de la photosynthèse par un effeuillage partiel est un phénomène défini comme étant « une photosynthèse compensatrice » (Nowak et Caldwell, 1984). Chez la mangue, la taille du fruit diminue proportionnellement à la diminution du rapport feuille/fruit, probablement à cause d'un manque d'assimilats disponibles. Pour la pêche, un faible rapport feuille/fruit entraîne une réduction de la taille du fruit et réduit le temps de maturation du fruit (Léchaudel *et al.*, 2005). Chez le kiwi, pour que le fruit se développe correctement, il faut également un nombre de feuilles suffisant (**Tableau 6**).

Tableau 6: Effet de l'annélation et du rapport feuille/fruit sur le volume du fruit et la surface foliaire par fruit chez le kiwi 'Hayward', d'après Lai *et al.* (1989).

Rapport feuille/fruit	Volume final du fruit (cm ³)	Surface foliaire par fruit (cm ²)
Avec annélation		
1/1	78 ^a	96 ^a
2/1	110 ^b	239 ^b
Sans annélation		
1/1	106 ^b	102 ^a
2/1	104 ^b	246 ^b

Les différentes lettres (a et b) montrent les différences significatives entre les traitements.

L'expérience chez le kiwi sans annélation montre que les sucres peuvent être apportés au fruit d'une autre partie de l'arbre afin d'en assurer sa croissance. En revanche l'expérience avec annélation montre que le rapport feuille/fruit de 1 n'est pas suffisant pour permettre au fruit de croître normalement (Lai *et al.*, 1989). Le déséquilibre source-puits par le biais de l'annélation, de la défoliation, de la suppression de fruits a été utilisé chez les agrumes pour étudier le rôle des sucres non-structuraux situés dans les feuilles dans la régulation de la photosynthèse (Iglesias *et al.*, 2002; Syvertsen *et al.*, 2003).

VI.4. L'action sur la dégradation de l'acide citrique

Quelques études ont été réalisées pour induire la dégradation de l'acide citrique quand sa teneur à maturité est incompatible avec la commercialisation des fruits. Au cours du développement du fruit, des vaporisations d'arsenic ont été réalisées chez le tangelo

Minneola et chez Natsudaidai pour réduire les teneurs en acide citrique à maturité mais ce traitement ne peut pas être utilisé à cause de sa toxicité (Kubo *et al.*, 2002; Sadka *et al.*, 2000a).

Les traitements à la chaleur sont normalement utilisés pour contrôler les maladies provoquées par les champignons, pour détruire les insectes mais également pour maintenir la qualité des fruits pendant le stockage (Kim *et al.*, 2009; Schirra *et al.*, 2008). Des travaux récents ont été réalisés sur la mandarine Ponkan (Chen *et al.*, 2012) qui est riche en acides organiques à maturité ce qui en fait un excellent modèle pour étudier leur dégradation. Un traitement à l'air chaud (40°C pendant 2 jours) a été appliqué après récolte des fruits et a montré une dégradation de l'acide citrique et une accumulation des sucres solubles (glucose et fructose).

VII. L'objectif de ce travail

Dans les pays producteurs d'agrumes de la zone méditerranéenne, il a été remarqué ces dernières années que l'acidité des agrumes, de la famille des « intermédiaires » en termes d'acidité (orange, clémentine et mandarine), tend à diminuer de façon importante lors de la maturation. Il a été constaté que les changements climatiques ont un impact sur la qualité du fruit. Par exemple, chez la pomme, ces changements entraînent une hausse des concentrations en sucres (Moretti *et al.*, 2010) et chez la vigne une diminution des concentrations en acide malique et tartrique (Coombe, 1987). Une Les modifications générales du climat, en l'occurrence des automnes de plus en plus doux observés, peuvent induire une respiration plus élevée des fruits. Parallèlement, la photopériode en automne est courte, la photosynthèse est donc plus limitée. Ces deux constats nous ont amenés à émettre l'hypothèse que les teneurs plus faibles d'acidité obtenues à maturité des fruits dans ces nouvelles conditions climatiques seraient dues à un déséquilibre de l'alimentation carbonée des fruits. Afin de tester cette hypothèse, notre stratégie envisagée est donc de créer artificiellement un déséquilibre carboné. Ce déséquilibre peut être obtenu de deux manières, soit par une diminution des apports carbonés soit par une augmentation. La stratégie de l'augmentation de l'apport carboné peut être réalisée par un ajout de saccharose dans les vaisseaux conducteurs ou par une saturation de l'air en CO₂ afin de favoriser la photosynthèse, ce qui est très difficilement réalisable sur des arbres adultes en

plein champ. Nous avons donc opté pour la limitation de l'apport carboné en utilisant la technique de l'annélation suivie d'une défoliation partielle. Nous avons également opté d'effectuer cette défoliation à deux périodes clés dans le développement du fruit, lors de la phase d'accumulation des acides organiques dans la pulpe (début du stade II) et juste avant le début de la maturation (fin du stade II).

Afin de vérifier l'impact de la défoliation sur le métabolisme du fruit, il est nécessaire d'établir (1) dans un premier temps, un bilan sucres-acides des fruits soumis aux différentes réductions d'apport carboné et d'identifier la ou les périodes où la réduction de l'apport carboné a, le cas échéant, le plus d'impact sur les quantités de sucres et/ou d'acides organiques, (2) d'étudier l'activité d'enzymes clés du métabolisme glucidique (phosphofructokinase et invertase acide) ou impliquées dans le métabolisme des acides organiques (phosphoénolpyruvate carboxylase et isocitrate déshydrogénase cytoplasmique), (3) d'analyser l'expression de gènes d'intérêt comme le transporteur qui permet le déstockage de l'acide citrique depuis la vacuole (CsCit1) et les gènes potentiellement impliqués dans la dégradation cytoplasmique de l'acide citrique par la voie du GABA « shunt » (transcrits de la succinate semialdéhyde déshydrogénase) ou par la voie de la proline (transcrits de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase). Enfin, il sera éventuellement possible d'établir des modèles pour représenter l'impact des réductions carbonées sur le métabolisme primaire.

Pour notre étude, nous avons, dans un premier temps, choisi d'étudier quatre espèces appartenant à la famille des « intermédiaires » en termes d'acidité (un clémentinier, deux orangers et un mandarinier). En effet, pour ces quatre espèces une diminution de l'acidité au cours de la maturation est observée. Après des expériences préliminaires, nous avons choisi de travailler uniquement sur la mandarine même si la clémentine est le produit phare de l'agrumiculture en Corse. Les raisons qui expliquent notre choix sont les suivantes : la clémentine et l'orange ont le même parent : la mandarine. La mandarine leur transmet ses mitochondries et la synthèse de l'acide organique majoritaire des agrumes, l'acide citrique, est réalisée dans la mitochondrie lors de la première réaction du cycle de Krebs.

La mandarine Willowleaf est également appelée Baladi, commune, de Nice, de Valence, Belady, Beldi, Beledi, Blida, Bodrum, etc... (Cottin, 2002). Le nombre excessif de noms par lesquels est désigné cette mandarine témoigne de sa popularité sur les pourtours méditerranéens (Hodgson, 1967). De plus au cours des quinze dernières années les

mandarines et les agrumes de type mandarine sont les plus nombreux à avoir été mis en circulation dans le monde (Nicotra, 2001), même si la clémentine (hybride naturel de la mandarine willowleaf) l'a supplantée en termes de volume de production. L'alternance de la production ainsi que la présence de nombreux pépins ont contribué à son déclin. Le goût caractéristique de « mandarine », lié à la présence d'une molécule le N-méthylanthranilate (Chisholm *et al.*, 2003), reste malgré tout recherché. Cette variété est aussi très utilisée dans les programmes de création variétale (Grosser *et al.*, 2010). Un hybride triploïde, nommé Mandalate, issu d'un croisement avec mandarine a récemment été sélectionné (Recupero *et al.*, 2005) pour ses qualités organoleptiques et pour son caractère « sans pépin ».

Matériel et méthodes

I. Le matériel végétal

Les essais ont été réalisés sur le mandarinier (*Citrus reticulata* Blanco selon Swingle et Reece (1967) ou *Citrus deliciosa* selon Tanaka (1977)). Ils sont réalisés sur des arbres ayant atteint la maturité productive (> 10 ans), cultivés en plein champ sur le site de la station de recherche agronomique INRA-CIRAD de San Giuliano, Corse (42°18'55" Nord, 9°29'29" Est ; 51m a.s.l.). Les mandariniers de la variété Willowleaf sont greffés sur le porte-greffe *Poncirus trifoliata* (L) Raf et sont tous situés sur la même parcelle. Tous les arbres ont une hauteur d'environ 2,5 m, ils sont espacés de 4m dans un même rang et l'espace entre les rangs est de 6 m. Les expérimentations ont été réalisées sur des arbres irrigués, indemnes de maladies et soumis aux mêmes conditions culturales (fertilisation et traitements phytosanitaires).

II. Le dispositif expérimental : réduction de l'alimentation carbonée

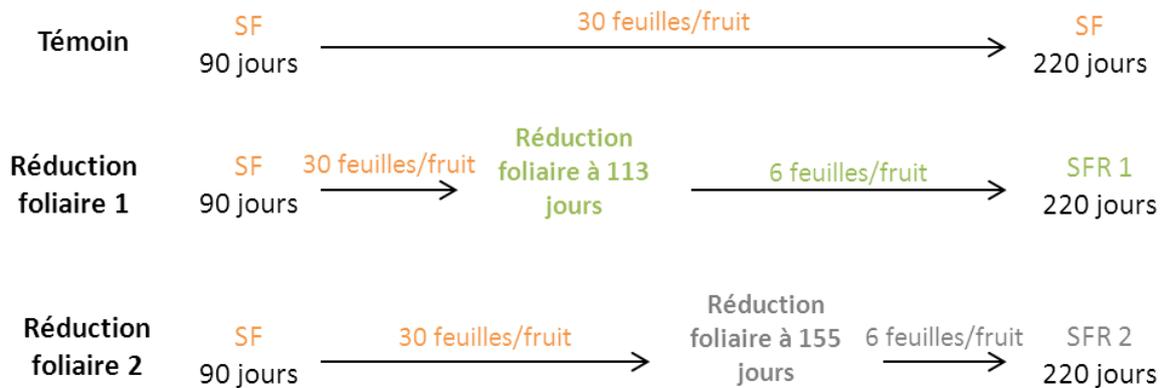
Les rameaux sélectionnés sont composés de pousses âgées de moins d'un an. Ils sont situés sur la face Est des arbres et à hauteur d'homme (environ 1,50 m). Les rameaux sont répartis sur quatre arbres, ont un diamètre équivalent et sont exposés de manière similaire.

La pleine floraison est observée mi-avril et les rameaux sont annelés, quel que soit le traitement appliqué, après la chute physiologique, 90 jours après la nouaison. L'annélation consiste à enlever un morceau d'écorce large de 1 à 1,5 cm au milieu de la tige principale de chaque rameau afin d'empêcher tout transport des assimilats depuis les rameaux vers le reste de l'arbre, ou inversement. Seules les connexions phloémiennes ont été supprimées.

Les traitements sont appliqués aléatoirement. Chaque rameau possède un seul fruit. Pour les fruits SF, les rameaux ont été annelés à 30 feuilles, ce rapport feuilles/fruit a été choisi en fonction d'études précédentes et il garantit un approvisionnement optimal en sucres (Souplet, 2002). Cette condition est considérée comme la condition témoin.

Pour les fruits SFR1 une réduction de nombre de feuilles, de 30 à 6, est effectuée à 113 jours de développement en début de stade II, avant la phase d'accumulation des acides organiques.

Pour les fruits SFR2, la réduction du nombre de feuille est effectuée à 155 jours de développement en milieu de stade II juste pendant la phase d'accumulation des acides organiques.



Les prélèvements ont été réalisés à 90 jours de développement jusqu'à 220 jours et quatre fruits par traitement ont été récoltés.

Un suivi de croissance non destructif est effectué en mesurant le diamètre des fruits grâce à un pied à coulisse solaire Mitutoyo (Kanagawa, Japon) pendant toute la durée de la campagne d'échantillonnage.

A chaque prélèvement, les fruits sont pesés au champ, leur diamètre est mesuré, puis ils sont pelés à vif et plongés directement dans l'azote liquide. Les échantillons pour les études de biologie moléculaire et d'enzymologie sont conservés à -80°C tandis que ceux pour les analyses de sucres et d'acides organiques sont lyophilisés.

III. Identification et quantification des acides organiques et des sucres par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

III.1. Préparation des échantillons

Les quartiers de fruits lyophilisés sont réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur à bille (MM 200, Retsh, Haan, Allemagne). 100 mg de poudre sont solubilisés dans 5 mL d'eau bi-distillée, homogénéisés au Dounce pendant une minute puis au vortex. Cette suspension est centrifugée pendant 10 min à 5000 g à température ambiante. Le surnageant est filtré sur une membrane d'acétate de cellulose de porosité $0,2\ \mu\text{m}$ (VWR, West Chester, États-

Unis) et est analysé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (Perkin Elmer, Série 200).

III.2. Conditions d'analyse chromatographique des acides organiques

Les différents acides organiques sont identifiés par HPLC, en phase inverse sur colonne Spheri-5 RP 18 (220 x 4,6 mm, 5 μm) maintenue à une température constante de 20°C. L'élution des acides organiques est réalisée en mode isocratique dans un tampon phosphate 25 mM à pH 2,4 avec un débit de 1 mL.min⁻¹. L'analyse se fait en plusieurs étapes : dix minutes d'équilibrage de la colonne, quinze minutes d'élution et une minute de lavage avec 30% d'acétonitrile (VWR, West Chester, États-Unis). Les acides organiques sont détectés à une longueur d'onde de 210 nm. Ils sont identifiés en fonction de leur temps de rétention sur la colonne en comparaison avec celui des cinq standards suivants : acide oxalique, acide malique, acide ascorbique, acide citrique et acide succinique (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne).

III.3. Conditions d'analyse chromatographique des sucres

Les différents sucres sont identifiés par HPLC sur une colonne échangeuse de cations Sugar pak I column, Waters (3,5 mm x 500 mm) maintenue à une température constante de 85°C. L'élution des sucres est réalisée en mode isocratique dans une solution d'EDTA sous forme de sel de calcium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) à 50 mg.L⁻¹ pH 5,5 avec un débit de 0,6 mL.min⁻¹. L'analyse se fait en plusieurs étapes : deux minutes d'équilibrage de la colonne, dix-huit minutes d'élution et une minute de rinçage (Gomez *et al.*, 2002). Les sucres sont détectés en fonction de leur indice de réfraction en comparaison avec celui de trois standards : glucose, fructose et saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne).

III.4. Identification et quantification des acides organiques et des sucres

Les différents composés sont identifiés par comparaison des temps de rétention ou des indices de réfraction des standards. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide du logiciel TotalChromTM version 6,2 (Perkin Elmer Instruments, Shelton, États-Unis). Les quantités d'acides organiques et de sucres sont exprimées en mg/fruit.

III.5. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne \pm des écarts types. Ils ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du « package *agricolae* » du logiciel R (<http://R-project.org>). Le test t ($P < 0,05$) a été utilisé pour déterminer la plus petite différence significative (lsd) entre les moyennes.

IV. Dosage de la proline

Cette méthode est adaptée de celle décrite par Troll et Lindsley (1955). Les quartiers de fruits congelés sont réduits en poudre fine à l'aide d'un broyeur à billes (MM 200, Retsch, Haan, Allemagne). 20 mg de poudre sont homogénéisés dans 10 mM de tampon HEPES-KOH à pH 7 contenant 20% d'éthanol (v/v). L'homogénat est ensuite chauffé à 80°C pendant 10 min, 200 μ L de tampon HEPES-KOH à 50 mM et à pH 7 sont ensuite ajoutés, le mélange est agité puis centrifugé 5 min à 14000 g. Le surnageant est conservé à 4°C et le culot est resuspendu deux fois dans 200 μ L de tampon HEPES-KOH à 50 mM et à pH 7, agité à l'aide d'un vortex et centrifugé 5 min à 14000 g, les deux surnageants obtenus par lavage des culots sont rajoutés au surnageant initial, le volume final est de 600 μ L. A 50 μ L de surnageant sont ajoutés 100 μ L de réactif contenant 1% de ninhydrine (p/v) 60% d'acide acétique (v/v) et 20% d'éthanol (v/v). Le mélange est agité puis incubé à 95°C à l'abri de la lumière pendant 20 minutes, refroidi dans la glace, avant la lecture de l'absorbance à 520 nm au spectrophotomètre (Specord 205, Analytic Jena (Wembley, Angleterre)). Une solution de proline (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) est utilisée pour générer une courbe de calibrage, de 0 mM à 10 mM, afin de quantifier la concentration en proline dans la pulpe des agrumes. Les quantités sont exprimées en μ mol/fruit.

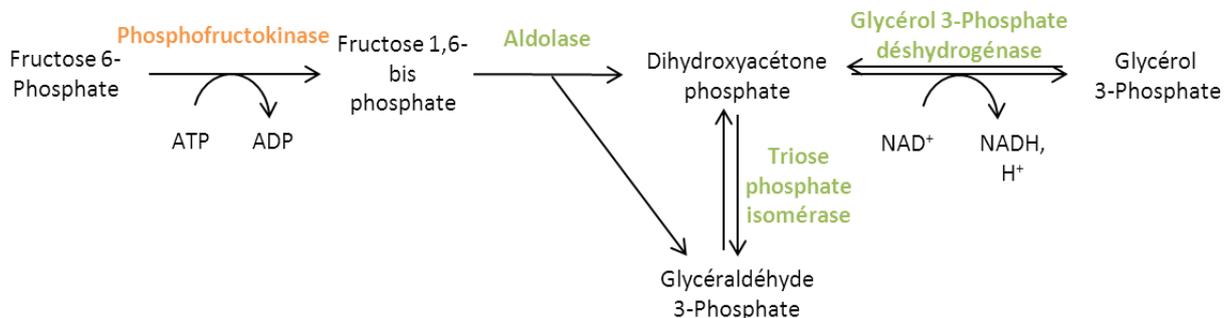
V. Mesure des activités enzymatiques

V.1. Préparation des extraits protéiques

Un quartier de fruit est broyé en fine poudre à l'aide d'azote liquide. 20 mg de cette poudre sont resuspendus dans du tampon selon le protocole décrit par Dieuaide-Noubhani *et al.* (1997). Le tampon d'HEPES à 500 mM et à pH 7,5 contient 10 mM de $MgCl_2$, 10 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA, 10 mM de benzamidine, 10 mM d'acide ϵ -aminocaproïque, 2,5% (p/v) d'albumine bovine sérique, 2mM de leupeptine, 0,5 mM de DTT, 10% (v/v) de Triton X100, 1% (p/v) PVP et 20% (v/v) de glycerol. Après centrifugation à 14000 g pendant 5 minutes à 4°C, le surnageant est prélevé et conservé dans la glace.

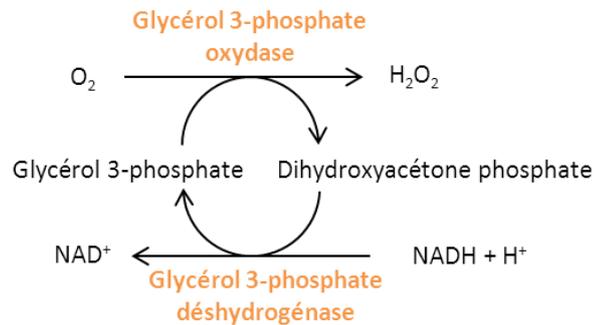
V.2. Dosage de la phosphofructokinase

L'activité enzymatique de la PFK est difficile à suivre directement, nous utilisons donc le couplage de réactions suivant :



2 μ L de surnageant sont ajoutés à 500 mM de tampon Tricine-KOH à pH 8,5 contenant 25 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de NADH, 7,5 mM de fructose 6-phosphate, 1 U.mL⁻¹ d'aldolase, 1 U.mL⁻¹ de triose phosphate isomérase, 1 U.mL⁻¹ de glycérol 3-phosphate déshydrogénase. La réaction démarre par l'ajout d'ATP dont la concentration finale est de 1 mM pour les essais. Les témoins sont réalisés sans ATP. La réaction est arrêtée au bout de 20 minutes par l'ajout de 20 μ L de HCL à 0,5 M. Les microplaques, contenant le mélange réactionnel, sont ensuite agitées et centrifugées pendant 2 min à 2000 g, puis 20 μ L de soude à 0,5 M sont ajoutés afin d'ajuster le pH à 9.

La suite du protocole consiste à étudier le cycle entre la glycéról 3-phosphate oxydase (EC. 1.1.3.21) et la glycéról 3-phosphate déshydrogénase (EC. 1.1.1.8).

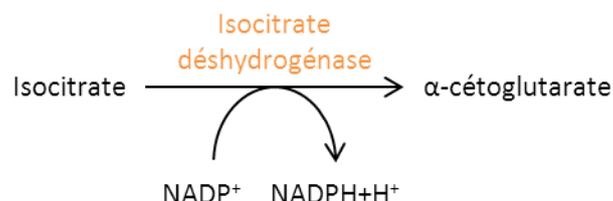


La glycéról 3-phosphate oxydase catalyse la conversion d'oxygène dépendante du glycéról 3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate et la glycéról 3-phosphate déshydrogénase convertit la dihydroxyacétone phosphate en glycéról 3-phosphate en oxydant le NADH. La diminution de la concentration en NADH se traduit par une diminution de l'absorbance à 340 nm.

Au mélange réactionnel précédent sont ajoutés 100 mM de Tricine-KOH à pH 8 contenant 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de NADH, 1,8 $U \cdot mL^{-1}$ de glycéról 3-phosphate oxydase et 0,7 $U \cdot mL^{-1}$ de glycéról 3-phosphate déshydrogénase, selon le protocole décrit par Gibon *et al.* (2004). La diminution de l'absorbance est lue à 340 nm pendant 30 min.

V.3. Dosage de l'isocitrate déshydrogénase

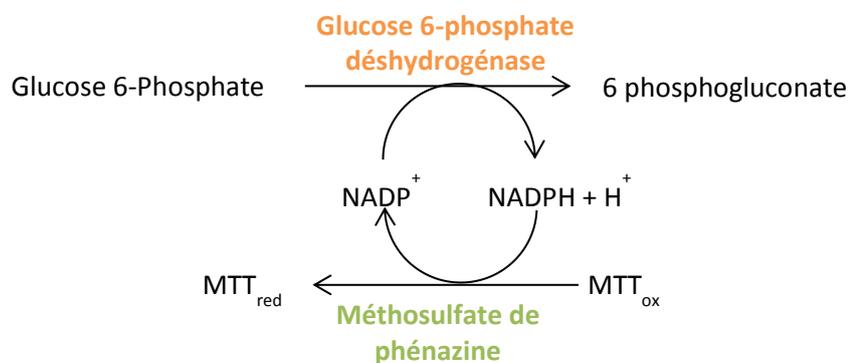
Le dosage de l'activité de l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique est adapté du protocole décrit par Sadka *et al.* (2000c). La réaction catalysée par l'IDH cytoplasmique est la suivante :



Le mélange réactionnel est le suivant : 2 μL de surnageant sont ajoutés au tampon Tricine-KOH à 100 mM et à pH 8 contenant 4 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de $NADP^+$. La réaction

est initiée par l'ajout d'isocitrate dont la concentration finale est de 2 mM pour les essais. Les témoins sont réalisés sans isocitrate. Après 20 min d'incubation à 25°C la réaction est arrêtée par l'ajout de 20 µL de soude 0,5M. Les microplaques, contenant le mélange réactionnel, sont ensuite agitées puis centrifugées 2 min à 2000 g. Elles sont ensuite scellées avec du papier aluminium puis chauffées à 95°C pendant 5 min afin de détruire la NADP⁺ résiduel qui pourrait interférer avec la suite du dosage. Après avoir refroidi les microplaques sur la glace, 20 µL de HCL 0,5 M sont ajoutés afin d'ajuster le pH à 9.

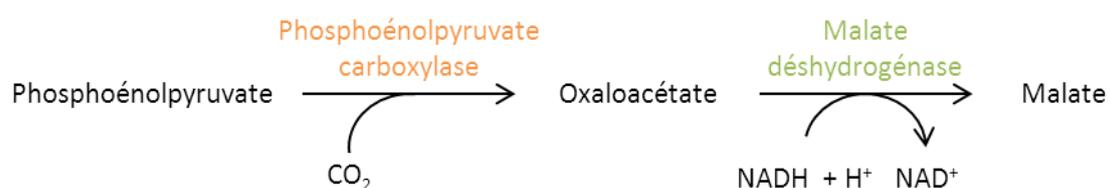
Le NADPH formé au cours de la réaction précédente est quantifié grâce à la conversion MTT oxydé en MTT réduit par l'action du méthosulfate de phénazine (PMS).



La quantité de NADPH formée est mesurée selon la méthode décrite par Gibon *et al.* (2002). Au mélange réactionnel précédent sont ajoutés 45 µL de Tricine-KOH à 100 mM et à pH 9 qui contient 5 mM de MgCl₂, 4 mM d'EDTA, 0,1 mM PMS, 0,6 mM de MTT, 3 mM de glucose 6-phosphate et 3 U.mL⁻¹ de G6PDH. L'augmentation de l'absorbance est lue à 570 nm pendant 30 min et à 30°C.

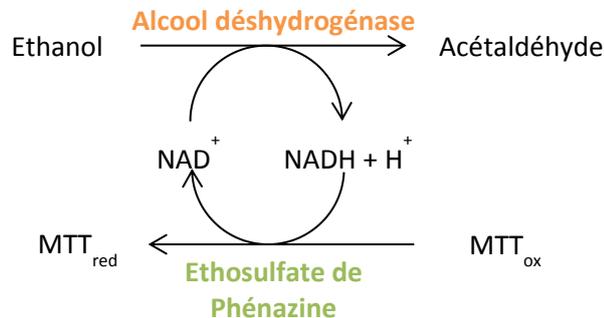
V.4. Dosage de la phosphoénolpyruvate carboxylase

Le dosage de l'activité de la PEPC (EC. 4.1.1.31) a été adapté du protocole de Uedan et Sugiyama (1976) et utilise le couplage de réactions suivant :



2 μL de surnageant sont ajoutés au tampon Tricine-KOH à 100 mM et à pH 8 contenant 20 mM de MgCl_2 , 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de malate déshydrogénase (EC. 1.1.1.37), 10 mM de bicarbonate de sodium et 0,1 mM de NADH. Les contaminations de la solution-mère de NADH par le NAD^+ sont évitées en la chauffant à 95°C pendant 5 min. La réaction est initiée par l'ajout de phosphoénolpyruvate dont la concentration finale est de 2 mM pour les essais. Les témoins sont réalisés sans phosphoénolpyruvate. Au bout de 20 min la réaction est arrêtée par l'ajout de 20 μL de HCl à 0,5 M. Les microplaques, contenant le mélange réactionnel, sont agitées puis centrifugées 2 min à 2000 g. Elles sont ensuite scellées avec du papier aluminium puis chauffées à 95°C pendant 5 min afin de détruire le NADH résiduel. Après un refroidissement rapide sur la glace, 20 μL de soude à 0,5 M sont ajoutés afin d'ajuster le pH à 9.

Le NAD^+ formé au cours de la réaction précédente est quantifié grâce à la conversion du MTT oxydé en MTT réduit par l'action de l'éthosulfate de phénazine (PES).



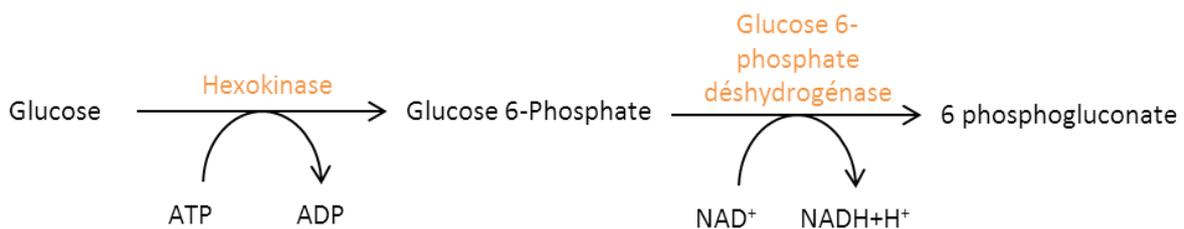
La quantité de NAD formée est mesurée selon la méthode décrite par Gibon *et al.* (2002). Au mélange réactionnel précédent sont ajoutés 45 μL de Tricine-KOH à 100 mM et à pH 9 qui contient 6 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'alcool déshydrogénase (EC. 1.1.1.1), 4 mM d'EDTA, 0,1 mM de PES, 0,6 mM de MTT et 500 mM d'éthanol. L'augmentation de l'absorbance est lue à 570 nm pendant 30 min.

V.5. Dosage de l'invertase

La réaction catalysée par l'invertase acide est la suivante :



Le mélange réactionnel (200 μL) contient 50 mM d'acétate de sodium à pH 4,6 et 125 mM de saccharose. La réaction est initiée par l'addition de l'extrait protéique (10 μL de surnageant) pour les essais puis elle est arrêtée par l'ajout de 40 μL de Tris à 300 mM et à pH 9 au bout de 5 min. Pour les témoins, l'extrait protéique est ajouté une fois que le pH est ajusté à 9. La quantité de glucose formé au cours de la réaction précédente est dosée grâce à un kit Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Le principe de ce kit est de suivre la formation de NADH lors de la réaction catalysée par la glucose 6-phosphate déshydrogénase lors du couplage de réactions suivant :



L'augmentation de l'absorbance à 340 nm pendant une heure à 25°C est proportionnelle à la concentration en glucose formé.

VI. Les techniques de biologie moléculaire

VI.1. Extraction et quantification des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit Qiagen (Dusseldorf, Allemagne) « RNeasy plant mini kit » à partir de 80 mg de poudre de pulpe. Le protocole a été adapté à la pulpe d'agrumes. En effet, le pH de la pulpe des agrumes n'est pas compatible avec l'extraction

des ARN. Au moment d'utiliser le tampon d'hydrochlorate de guanidine, il est nécessaire d'ajouter 6 μL de soude à 1 N afin de remonter le pH à 7.

La qualité des ARN totaux extraits est contrôlée par électrophorèse dans un tampon TAE (40 mM de Tris-acétate et 1 mM d'EDTA à pH 8) sur un gel d'agarose à 2%. Les ARN ribosomiques 28 S (4,7 kb) et 18 S (1,8 kb), très abondants, peuvent être visualisés sous UV (330 nm) après imprégnation du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (1 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) selon le protocole de Sambrook *et al.* (1989).

Les ARN totaux extraits sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm grâce au NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, États-Unis).

VI.2. Synthèse de l'ADN complémentaire

Pour la synthèse de l'ADN complémentaire, 500 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ d'ARN sont ajoutés à 1 μL d'oligo(dT)₁₈ (Fermentas, Canada), le volume est ajusté à 12,5 μL avec de l'eau traitée au diéthyle pyrocarbonate stérile. Ce mélange est incubé pendant 5 min à 65°C, puis plongé dans la glace.

A ce mélange sont ajoutés 4 μL du tampon 5x (Fermentas, Canada), 0,5 μL d'inhibiteur de RNase (Fermentas, Canada), 2 μL du mélange de dNTP (Fermentas, Canada) et 1 μL de transcriptase inverse (Fermentas, Canada). Le mélange est incubé 90 min à 42°C, puis la réaction est arrêtée par inactivation de l'enzyme à 70°C (10 min). Le produit de la transcription inverse peut être utilisé directement ou stocké à -20°C.

VI.3. Dosage de l'ADN complémentaire

Les ADN complémentaires néoformés sont dosés par fluorimétrie avec le NanoDrop™ 3300 fluorospectrometer (Thermo Scientific, Waltham, États-Unis). La méthode de quantification est celle proposée par le fabricant du kit Quant-it™ OliGreen® Dye (Invitrogen, Carlsbad, États-Unis).

VI.4. Approche « gènes candidats »

VI.4.1. Sélection des gènes candidats

Nous avons recherché dans la littérature ou dans les bases de données telles que NCBI, des gènes « candidats » impliqués dans le métabolisme et dans le transport des sucres, des acides organiques et des acides aminés. Des amorces ont été définies pour permettre l'amplification d'une fraction de ces gènes, à partir de leurs ADN_c. Les variations de la quantité de transcrits de ces gènes sont évalués par PCR en temps réel.

Les gènes « candidats » sélectionnés sont identifiés dans le tableau suivant (**Tableau 7**) :

Tableau 7: Sélection des gènes « candidats » à la régulation de l'acidité des fruits

Fonction	Identité	Origine	Accession	Références
Métabolisme				
Sucre	Invertase acide	<i>C. unshiu</i>	AB074885	Banque NCBI
Acides organiques	Isocitrate déshydrogénase	<i>C. limon</i>	AF176669	Sadka <i>et al.</i> , 2000
	Succinate sémialdéhyde déshydrogénase	<i>C. clementina</i>		Cercos <i>et al.</i> , 2006
Acides aminés	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase	<i>C. sinensis</i>	Acl174Contig2	Mouhaya <i>et al.</i> , 2010
Transport	Symporteur citrate/H ⁺	<i>C. sinensis</i>	EF028327	Shimada <i>et al.</i> , 2006
Témoin	Actine	<i>C. sinensis</i>	BQ623464	Pillitteri <i>et al.</i> , 2004

Les amorces utilisées pour l'amplification spécifique des ADN_c des gènes Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS), isocitrate déshydrogénase (IDH), invertase acide (INV), symporteur citrate/H⁺ (CsCit1), succinate sémialdéhyde déshydrogénase (SSADH) sont présentées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8 : Séquences des amorces

	Fonctions	Abréviations	Séquences	Taille attendue (pb)
Métabolisme	Isocitrate déshydrogénase	IDH	5'-GGCTTATTCCAGGCTGGACAA 3'-CATGGACAATGCAACTCCACC	191
	Invertase	INV	5'-GCTCAAGGTGGGAGAACAAC 3'-GTATGGACGGATGAATGCAG	156
	Succinate semialdéhyde déshydrogénase	SSADH	5'-ATGACGTTGAGTGGAGTGGCA 3'-ATCTGGCGAGAGAAAGCAGGA	107
	Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase	P5CS	5'-ATGTGCGTGCTGCTATTGAC 3'-AGTCCAAATCGTGCTCCATC	166
Transport	Transporteur de citrate	CsCit1	5'-GCTGCTCTGGCCTTTCTAAT 3'-TGCCTGTTACGGAGACTTGA	125
Témoin	Actine	ACT	5'-CAGTGTTTGGATTGGAGGATCA 3'-TCGCCCTTTGAGATCCACAT	150

Ces amorces ont été définies à partir des alignements des séquences codantes de ces gènes qui ont été isolées à partir des fruits d'agrumes et qui sont disponibles dans les bases de données. Le logiciel BioEdit version 7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) a été utilisé pour les alignements de séquences tandis que le logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) a servi à la définition des amorces.

Dans un premier temps, la PCR en gradient de températures est utilisée afin de déterminer la température d'hybridation (T_m) optimale de chaque couple d'amorces.

La réaction d'amplification est effectuée dans un volume total de 25 μL contenant : 2,5 mM de MgCl_2 , 75 mM Tris-HCl à pH 8,8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% de Tween 20, 1,25 unités de Taq ADN polymérase, 2 mM de chaque dNTP, 1 μM de chaque amorce et 2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ d'ADNc. L'amplification est réalisée dans un thermocycleur Mastercycler gradient

(Eppendorf, Hambourg, Allemagne) programmé pour effectuer les cycles suivants : 2 min à 94°C, 40 cycles d'amplification (30 sec à 94°C, 1 min au T_m et 45 sec à 72°C) et 6 min à 72°C.

Après amplification, les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5% et d'urée à 7 M. Ce gel permet de séparer deux fragments d'ADN au nucléotide près. Le gel est placé dans une cuve contenant du tampon TBE (440 mM de Tris, 400 mM d'acide borique et 10 mM d'EDTA à pH 8). La révélation des fragments d'ADN se fait par coloration au nitrate d'argent comme décrit par Beidler *et al.* (1982).

VI.4.2. La PCR en temps réel

Le principe de la PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.

L'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000) (**Figure 21**).

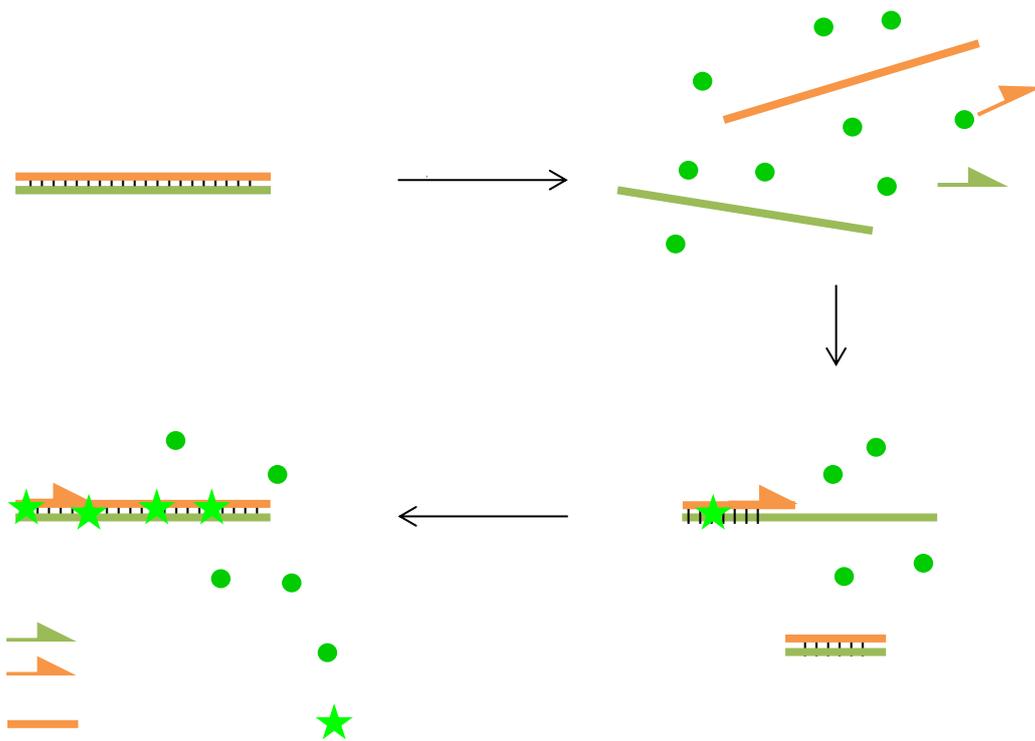


Figure 21: Principe d'action du SYBR® Green.

(a) Durant la dénaturation, le SYBR® Green libre émet peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN en synthèse entraînant une émission de fluorescence. (c) Durant la phase de polymérisation de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de fluorescence peut être suivi en temps réel.

L'enregistrement de la fluorescence en temps réel permet de visualiser l'amplification du gène d'intérêt. Les amplifications suivent une courbe sigmoïde (**Figure 22**).

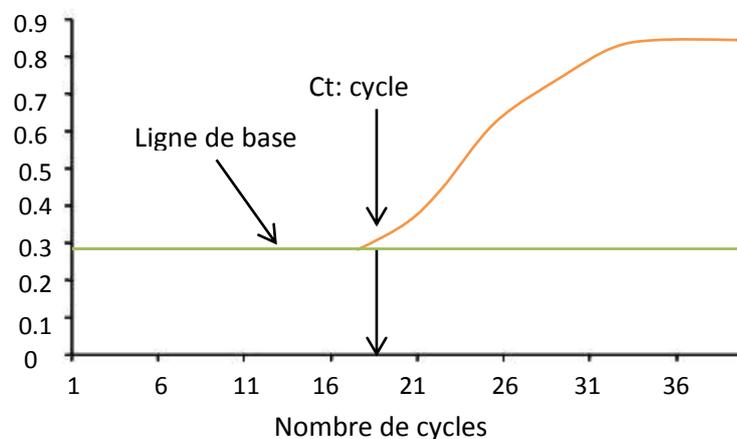


Figure 22 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

Deux phases peuvent être distinguées : la première où la fluorescence ne se distingue pas du bruit de fond et la seconde où la fluorescence passe par une phase exponentielle durant laquelle l'augmentation de la quantité d'ADN est proportionnelle à la quantité de matrice puis ralentit pour atteindre un plateau. Le cycle seuil (Ct) est le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera plus élevé que le bruit de fond (Gibson *et al.*, 1996).

L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems, Carlsbad, États-Unis). Le mélange réactionnel est composé de 10 μL de PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix ROX™ (Quanta biosciences, Gaithersburg, États-Unis), 0,4 μL de chaque amorce à 10 μM et 4,2 μL d'eau bi-distillée stérile et 2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de la solution d'ADNc. Les étapes de l'amplification sont les suivantes : un cycle de 5 min à 95°C, 40 cycles de 15 sec à 95°C, 40 sec à 60°C, puis pour la courbe de fusion 15 sec à 95°C, 1 min à 60°C et le passage de 60°C à 95°C se fait avec un pas de 0,3°C par cycle. Les courbes de fusion obtenues permettent de vérifier la spécificité de l'amplification (présence d'un seul pic) (**Figure 23**).

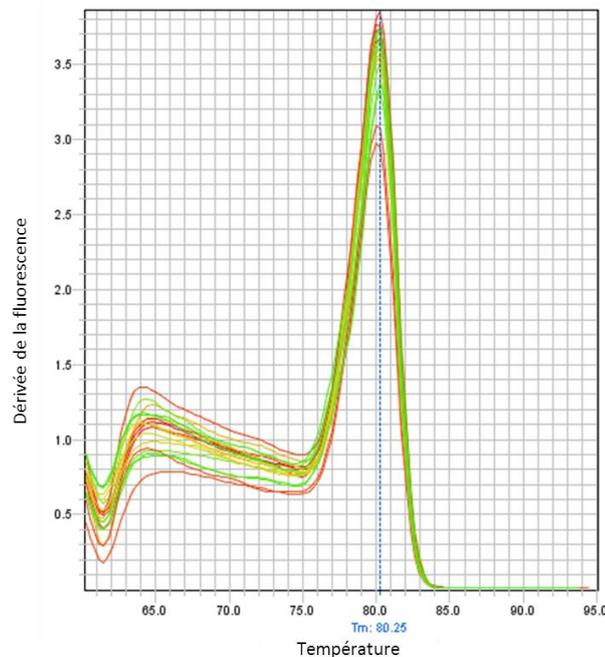


Figure 23: Courbe de fusion, dérivée de la fluorescence du SYBR® Green en fonction de la température.

Pour chaque couple d'amorces, une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une gamme de dilutions des solutions d'ADNc (1.10^{-3} à 1.10^{-12}) d'un des échantillons à analyser. A chaque analyse, trois points de la courbe d'étalonnage sont systématiquement analysés en même temps que les échantillons afin de contrôler l'efficacité de la PCR. L'efficacité de la PCR traduit le pourcentage de brins matrices dupliqués. La régression linéaire entre le nombre de cycles et la dilution doit aboutir à une droite dont la pente doit être supérieure ou égale à 3. Chaque réaction est triplée afin d'en vérifier la reproductibilité.

L'acquisition des données et l'analyse des résultats sont réalisées grâce au logiciel StepOne software v1.2 (Applied Biosystems, Carlsbad, Etats-Unis). Les résultats exprimés sont issus d'une quantification relative du nombre de transcrits. La quantification se fait par rapport à un gène dit normalisateur dont l'expression est constante, c'est-à-dire que quels que soient les traitements, le nombre de Ct pour ce gène ne varie pas, en l'occurrence l'actine et par rapport à un échantillon témoin. La méthode de calcul de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ est couramment utilisée pour analyser les différences d'expression (Livak et Schmittgen, 2001) : où $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{gi})_{\text{échantillon inconnu}} - (Ct_{gn})_{\text{échantillon inconnu}}] - [(Ct_{gi})_{\text{témoin}} - (Ct_{gn})_{\text{témoin}}]$, gi est le gène d'intérêt et gn le gène normalisateur. Le témoin est un échantillon choisi pour représenter un niveau d'expression de 1 pour le gène considéré (Winer *et al.*, 1999).

Résultats et discussion

Les expériences ont été réalisées sur la mandarine qui a été soumise ou pas à une réduction des apports carbonés. Le traitement SF est constitué de fruits dont la croissance se déroule sans limitation de carbone issu de la photosynthèse (témoins). Leur surface foliaire est fixée à 30 feuilles durant toute l'expérimentation (Souplet, 2002). Les fruits des traitements SFR1 et SFR2 ont subi une réduction du nombre de feuilles de 80% afin de limiter leurs apports carbonés lors du stade II qui est la phase de grossissement cellulaire. Pour les fruits SFR1, la réduction a eu lieu au début du stade II avant l'accumulation des acides organiques et les fruits SFR2 sont ceux pour lesquels la réduction foliaire a eu lieu au milieu du stade II pendant la phase d'accumulation des acides organiques. L'expérimentation a été réalisée pendant deux années consécutives.

I. L'effet des réductions foliaires sur la croissance du fruit

Afin de caractériser la croissance des fruits soumis ou non à une limitation en apports carbonés, nous avons suivi les deux paramètres suivants : le calibre du fruit par mesure du diamètre et le poids frais du fruit.

I.1. Mesure des diamètres

Pour les fruits n'ayant subi aucune limitation en apports carbonés (SF), le diamètre augmente de façon régulière au cours du développement de 25 à 60 mm (**Figure 24**).

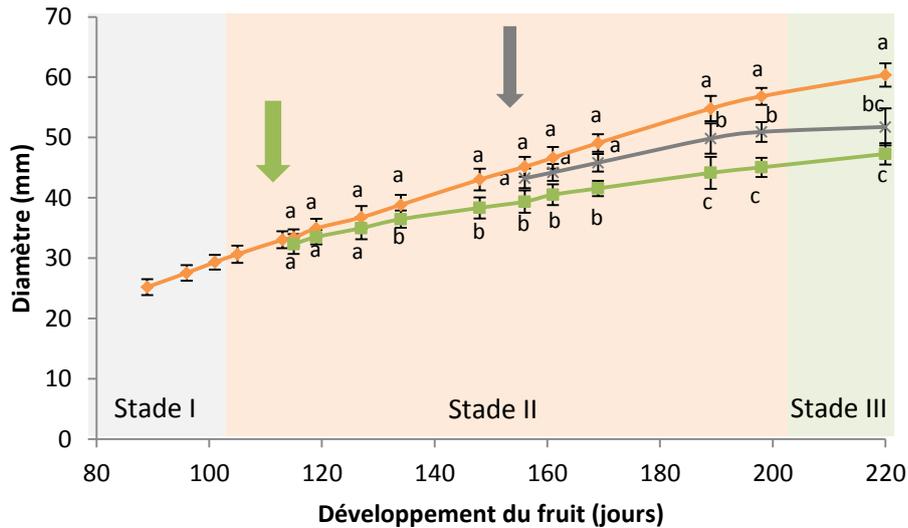


Figure 24: Diamètre des fruits au cours du développement, en fonction des différents traitements: SF (—◆—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—). Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits dont la réduction foliaire a eu lieu précocement (SFR1), nous observons un ralentissement de l'accroissement de leur diamètre après 134 jours de développement. A la fin de l'expérimentation, le calibre des fruits SFR1 est inférieur au calibre des fruits SF ($47,3\pm 1,8$ et $60,3\pm 1,9$ mm, respectivement) (**Figure 24**).

Pour les fruits dont la réduction foliaire est tardive (SFR2), une semaine après la réduction foliaire le diamètre des fruits n'est pas significativement différent de celui des témoins. En revanche, à la fin de l'expérimentation, les fruits issus du traitement SFR2 ont un calibre qui est inférieur à celui des fruits SF ($51,7\pm 2,1$ et $60,3\pm 1,9$ mm, respectivement).

Ces résultats montrent que la limitation des apports en sucres qu'elle soit effectuée précocement ou plus tardivement pendant la phase d'accumulation des acides organiques, a un impact sur le calibre de ces derniers. En revanche, le calibre des fruits est le même que la réduction foliaire ait lieu au début de stade II (SFR1) ou en fin de stade II (SFR2).

I.2. Mesure du poids frais

Pour les fruits SF, le poids frais des fruits augmente tout au long de l'expérimentation pour atteindre un poids de $90,2 \pm 5,2$ g à 220 jours de développement (**Figure 25**).

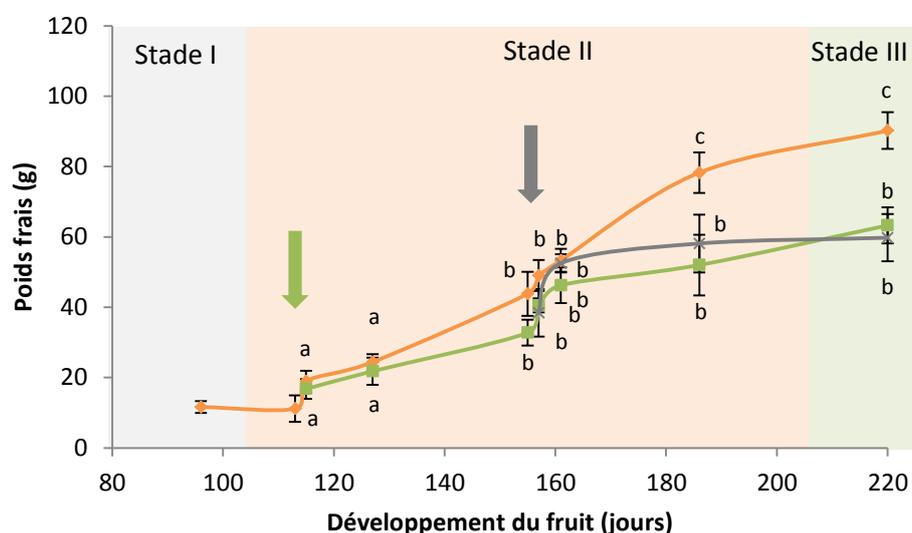


Figure 25: Poids frais des fruits au cours du développement, pour les différents traitements : SF (—◆—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—). Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Lorsque la réduction foliaire est précoce, le poids frais des fruits SFR1 est inférieur à celui des fruits témoins (SF) ($63,2 \pm 5,1$ et $90,2 \pm 5,2$ g, respectivement) après 220 jours de développement. Cette différence significative apparaît réellement en fin d'expérimentation à partir du 186^{ème} jour de développement. Mais nous pouvons également constater qu'à 155 jours de développement il y a une différence significative et que ce retard est ensuite rattrapé.

Lorsque la réduction foliaire est plus tardive, le poids frais des fruits SFR2 est réduit par rapport à celui des fruits témoins et cette diminution est également observable après 186 jours de développement ($59,7 \pm 6,7$ et $90,2 \pm 5,2$ g, respectivement). Nous constatons que les fruits ne sont pas capables de compenser la réduction des apports carbonés que la réduction foliaire soit précoce ou plus tardive au cours du stade II.

Ces observations confirment les résultats observés chez la tomate (Baldet *et al.*, 2002), la mangue (Léchaudel *et al.*, 2002; Léchaudel *et al.*, 2005) et la pêche (Génard *et al.*, 1998).

Chez la tomate, lorsque le fruit est dans la phase de division cellulaire, au moment de la limitation carbonée, le poids sec des fruits n'augmente plus au cours du développement et leur croissance est réduite de 10 fois par rapport aux fruits témoins. Lorsque le fruit est en phase d'expansion cellulaire, le poids sec du fruit augmente mais le poids observé est inférieur de 50% par rapport au poids du fruit témoin et la croissance est réduite de deux fois en comparaison aux fruits témoins (Baldet *et al.*, 2002). Léchaudel *et al.* (2005) ont montré chez le manguier qu'une diminution du nombre de feuilles par fruit entraîne une diminution de la croissance et du calibre final du fruit au moment de la récolte. A maturité, le poids sec des fruits est supérieur de 20% chez les fruits du traitement 100 feuilles par fruit par rapport au poids sec des fruits issus du traitement 10 feuilles par fruit.

Comme la limitation carbonée influence les valeurs du poids frais des fruits, les quantités de métabolites (sucres et acides organiques) seront exprimées en grammes par fruit plutôt qu'en matière fraîche.

II. L'impact de la réduction foliaire sur le métabolisme

II.1. Le métabolisme des sucres

II.1.1. Mesure des quantités de sucres

Afin de voir si la réduction foliaire a un impact sur le métabolisme des sucres, nous sommes dans un premier temps intéressés aux quantités de saccharose, glucose et fructose des fruits.

II.1.1.1. Le saccharose

Pour les fruits témoins (SF) n'ayant subi aucune carence en apports carbonés la quantité de saccharose est croissante au cours de leur développement ($150,1 \pm 9,2$ mg/fruit à 96 jours de développement et $4766,7 \pm 433,7$ mg/fruit à 220 jours) (**Figure 26A et B**).

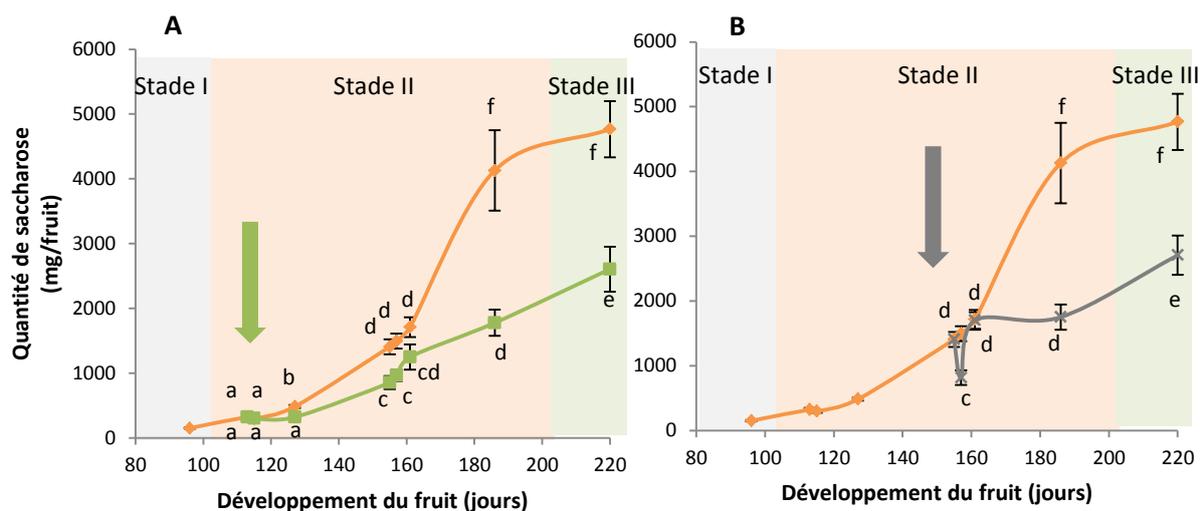


Figure 26: Quantité de saccharose des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit pour les différents traitements : SF (—◆—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b, c, d, e et f) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Chez les fruits SFR1, la réduction du nombre de feuilles n'influence pas significativement la quantité de saccharose par rapport aux fruits SF 48h après la réduction foliaire (**Tableau 9**) puisque le témoin n'augmente pas non plus. Après 127 jours de développement, les fruits soumis au traitement SFR1 accumulent moins de saccharose que les fruits SF ($319,4 \pm 31,5$ et $482,8 \pm 21,7$ mg/fruit, respectivement). Cette tendance s'amplifie au cours du développement du fruit puisque la quantité de saccharose à 220 jours de développement n'est que de $2604,9 \pm 347,8$ mg/fruit pour les fruits SFR1 alors qu'elle est de $4766,7 \pm 433,7$ mg/fruit chez les fruits témoins (**Figure 26A**).

Tableau 9: Quantités de saccharose (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions SFR1 et SFR2.

		Quantité de saccharose (mg/fruit)	
		48h	1 Semaine
Réduction précoce	Sans	295,73±19,74 ^a	482,77±21,69 ^b
	Avec	299,61±30,36 ^a	319,43±31,51 ^a
Réduction tardive	Sans	1495,24±115,50 ^d	1709,85±153,47 ^d
	Avec	816,26±11,21 ^c	1699,28±126,82 ^d

Les différentes lettres (a, b, c et d) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Chez les fruits SFR2, une diminution de la quantité de saccharose en comparaison aux fruits SF (de l'ordre de 50%) est observable 48 heures après la réduction foliaire. La diminution des quantités de saccharose est très brutale mais brève puisque les quantités de saccharose des fruits SFR2 reviennent à des valeurs similaires à celles observées chez les fruits témoins (SF) une semaine après la réduction foliaire (1699,3±126,8 et 1709,8±153,5 mg/fruit, respectivement) (**Tableau 9** et **Figure 26B**). En revanche, à partir du 186^{ème} jour de développement, où se fait l'importante accumulation de saccharose chez les fruits témoins, chez les fruits SFR2 nous observons une stabilisation de l'accumulation au niveau de 1751,2±621,7 mg/fruit. A la fin de l'expérimentation, les quantités de saccharose sont de 4766,73±433,75 mg/fruit chez les fruits témoins et de 2705,6±302,9 mg/fruit chez les fruits SFR2 (**Figure 26B**).

En conclusion, pour les fruits dont la réduction foliaire a lieu précocement (SFR1), l'impact de la réduction foliaire sur les quantités de saccharose est peu marqué par rapport aux témoins pendant les 40 premiers jours puis s'accroît nettement au cours de la maturation du fruit. Les fruits issus du traitement SFR2, dont la réduction foliaire est plus tardive, réagissent différemment des fruits soumis au traitement SFR1. La diminution de la quantité de saccharose est brutale (48 heures après la réduction) puis il y a de nouveau une augmentation pour atteindre une valeur inférieure à celle accumulée par les fruits SF en fin d'expérimentation. Les fruits SFR1 et SFR2 ont accumulé les mêmes quantités de saccharose à la fin de l'expérimentation de l'ordre de 2600 mg/fruit alors qu'elle est de 4766,7±433,7

mg/fruit chez le témoin. La réduction foliaire a donc bien eu un impact sur la quantité totale de saccharose.

II.1.1.2. Le glucose et le fructose

Chez les fruits témoins (SF), les quantités de glucose et de fructose évoluent de la même manière au cours du développement du fruit (**Figure 27**). En effet, les quantités de glucose et de fructose augmentent jusqu'au 189^{ème} jour puis se stabilisent au cours du temps.

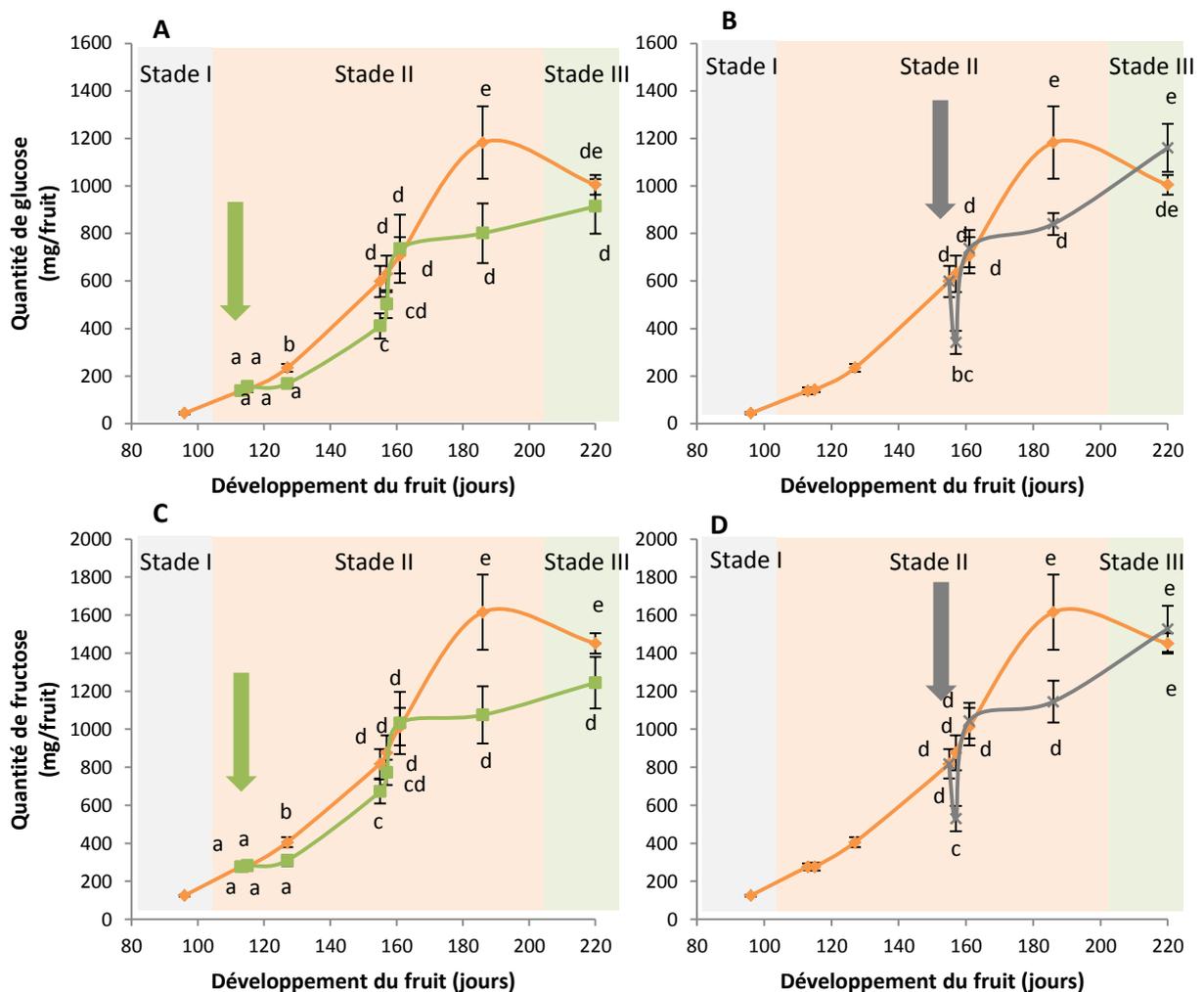


Figure 27: Quantités de glucose et de fructose des fruits lorsque la réduction est foliaire précoce (A) et (C) et plus tardive (B) et (D) au cours du développement du fruit pour les différents traitements : SF (—◆—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b, c, d et e) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR1 à partir du 127^{ème} jour, les quantités de glucose sont inférieures par rapport aux fruits témoins (SF) jusqu'à 157 jours. Les différences ne sont ensuite plus significatives jusqu'à 186 jours de développement. A la fin de l'expérimentation (220 jours) les quantités de glucose sont similaires à celles observées chez les fruits SF.

La réduction foliaire pour les fruits SFR1 a également peu d'incidence sur l'accumulation du fructose, 48h après la réduction foliaire (**Tableau 10** et **Figure 27C**). De 127 et 157 jours de développement, les quantités de fructose sont inférieures chez les fruits SFR1 par rapport aux fruits témoins. Puis nous observons les mêmes valeurs jusqu'à 164 jours de développement. Cependant, à partir de 189 jours de développement et jusqu'à la fin de l'expérimentation les quantités de fructose accumulées sont inférieures à celles observées chez les fruits SF.

Tableau 10: Quantités de glucose et de fructose (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions SFR1 et SFR2.

		Quantités de glucose (mg/fruit)		Quantités de fructose (mg/fruit)	
		48h	1 semaine	48h	1 semaine
Réduction	Sans	142,81±10,14 ^a	234,49±16,80 ^b	276,57±20,11 ^a	405,57±25,94 ^b
précoce	Avec	155,99±21,07 ^a	167,97±2,34 ^a	283,41±25,51 ^a	309,31±27,59 ^a
Réduction	Sans	629,92±76,59 ^d	708,32±76,79 ^d	876,05±92,05 ^d	1013,6±93,37 ^d
tardive	Avec	341,64±48,35 ^{bc}	736,48±78,39 ^d	530,03±66,10 ^c	1044,78±92,94 ^d

Les différentes lettres (a, b, c et d) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR2, 48 heures après la réduction foliaire, les quantités de glucose et de fructose des fruits chutent de 629,9±76,6 à 341,64±48,3 mg/fruit et de 876,0±92,0 à 530,0±66,1 mg/fruit, respectivement. Puis, ces quantités reviennent au même niveau que celles des fruits SF une semaine après la réduction foliaire. A partir du 164^{ème} jour de développement, les quantités de glucose et de fructose augmentent de manière progressive pour revenir aux mêmes quantités que les fruits SF (**Figure 27B** et **27D**).

En conclusion, les fruits dont les apports en saccharose ont été limités tardivement au cours de leur croissance (SFR2), ont des quantités de fructose et de glucose qui chutent très

rapidement après cette limitation, puis les fruits « s'adaptent » et les quantités de glucose et de fructose reviennent à des quantités similaires à celles observées chez les fruits témoins.

Lors des deux réductions foliaires, les quantités de saccharose, en fin d'expérimentation, sont significativement plus faibles (SFR1 et SFR2) que celles des fruits témoins (SF). Puisque les quantités de glucose et de fructose ne sont pas affectées en fin d'expérimentation, nous pouvons imaginer que le saccharose présent a suffi pour maintenir les quantités de glucose et de fructose ou bien que le glucose et le fructose seraient déstockés depuis la vacuole ce qui sera à confirmer par la mesure de l'activité enzymatique de l'invertase acide, ou qu'ils aient pu être re-synthétisés par dégradation cytoplasmique du citrate qui emprunterait la voie du GABA « shunt ».

Nos résultats montrent que le métabolisme des sucres est affecté par la limitation des apports carbonés au cours du développement du fruit. Lorsque la réduction foliaire est tardive (SFR2), il y a une réaction forte et de courte durée qui n'est pas observée lorsque la réduction est plus précoce (SFR1). En effet, quand la réduction est tardive le fruit est en phase d'accumulation des sucres ce qui est observé chez le témoin (SF). Cette diminution de quantité fortement significative se traduirait par une situation d'« urgence » dans le fruit qui doit être compensée d'un point de vue métabolique. Elle nécessite une adaptation aux nouvelles conditions environnementales très limitantes et elle ne s'observe pas quand la réduction se fait en début de stade II (SFR1) car (i) l'accumulation est faible chez le témoin également, (ii) la taille du fruit est plus faible et donc la demande respiratoire est également plus faible.

Ces observations sont en accord avec les travaux réalisés chez la mandarine 'Satsuma' (Mehouachi *et al.*, 1995) et chez la tomate (Baldet *et al.*, 2002). Chez la mandarine 'Satsuma', la défoliation effectuée au moment de l'anthèse affecte l'accumulation du saccharose, du glucose et du fructose dans les fruits limités 42 jours après l'anthèse (Mehouachi *et al.*, 1995). Chez la tomate, Baldet *et al.* (2002) observent lorsque la limitation des apports carbonés a lieu durant la phase de division cellulaire, une forte diminution des quantités de sucres durant les quatre jours suivant la limitation. Lorsque la limitation des apports carbonés a lieu lors de la phase d'expansion cellulaire, les quantités de sucres solubles diminuent progressivement au cours des trente jours suivant la réduction des apports carbonés.

Nous allons maintenant nous intéresser au devenir du glucose et du fructose dans les fruits.

II.1.2. Mesure de l'activité de la phosphofructokinase

La phosphofructokinase (PFK) est une enzyme-clé de la glycolyse, qui régule le flux métabolique. Nous avons étudié son activité enzymatique chez les fruits témoins (SF) et au cours des deux réductions foliaires.

L'activité enzymatique de la PFK des fruits témoins (SF) diminue faiblement au cours du temps ($7,7 \pm 7,5$ à $4,1 \pm 1,1$ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$) (**Figure 28**).

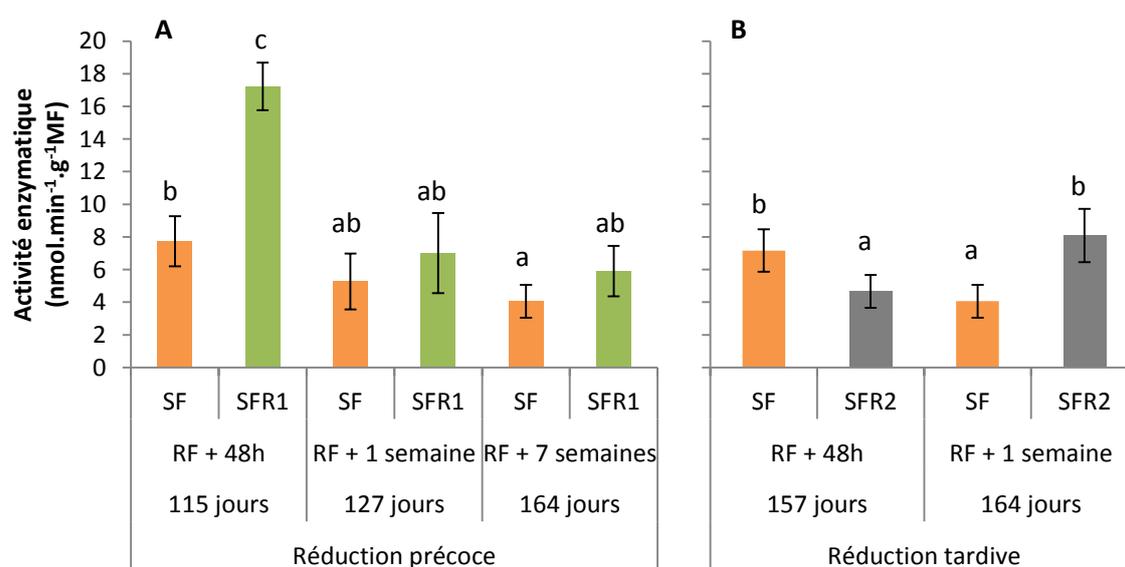


Figure 28: Activité enzymatique de la phosphofructokinase (PFK) pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Une augmentation significative de l'activité enzymatique de la PFK est observée 48h après la réduction foliaire SFR1 (**Figure 28A**) qui pourrait s'expliquer, puisque les quantités de saccharose sont stables (**Figure 26A**), par un déstockage provoqué par l'invertase ce qui devra être vérifié ultérieurement. L'activité enzymatique de la PFK à une semaine et à sept

semaines après la réduction foliaire n'est plus significativement différente des témoins (**Figure 28A**).

Pour les fruits SFR2, 48h après la réduction foliaire l'activité enzymatique de la PFK semble différente de celle observée chez les fruits SFR1. En effet, pour les fruits SFR1, nous avons observé une augmentation significative de l'activité enzymatique de la PFK par rapport au témoin à 115 jours de développement ($17,2 \pm 1,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$). En revanche, cette activité enzymatique diminue 48h après la réduction foliaire ($4,6 \pm 1,0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$) chez les fruits SFR2 et est même inférieure à celle des fruits témoins ($7,1 \pm 1,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$). Cette diminution pourrait être expliquée par la diminution brutale et transitoire de la quantité de saccharose de l'ordre de 50% chez ces fruits ce qui pourrait s'expliquer par une réduction du flux glycolytique. Cette observation devrait être confirmée par le dosage de l'activité enzymatique de l'invertase qui ne devrait pas varier par rapport aux témoins. L'activité enzymatique de la PFK augmente au bout d'une semaine ce qui est en accord avec la ré-augmentation de la quantité de saccharose.

Une augmentation de l'activité de la PFK implique une augmentation de la disponibilité du fructose 6-phosphate (**Figure 29**) qui provient soit du saccharose (photosynthétique) soit d'un déstockage depuis la vacuole. Comme nous avons imposé une réduction d'apport carboné aux fruits, l'hypothèse la plus probable serait un déstockage depuis la vacuole. Il faut néanmoins préciser que l'impact de la réduction carbonée sur les quantités de saccharose n'est visible qu'à 186 jours de développement que ce soit pour SFR1 ou SFR2.

Nous allons nous intéresser à l'éventuelle implication de l'invertase vacuolaire que nous avons schématisée dans la **Figure 29**.

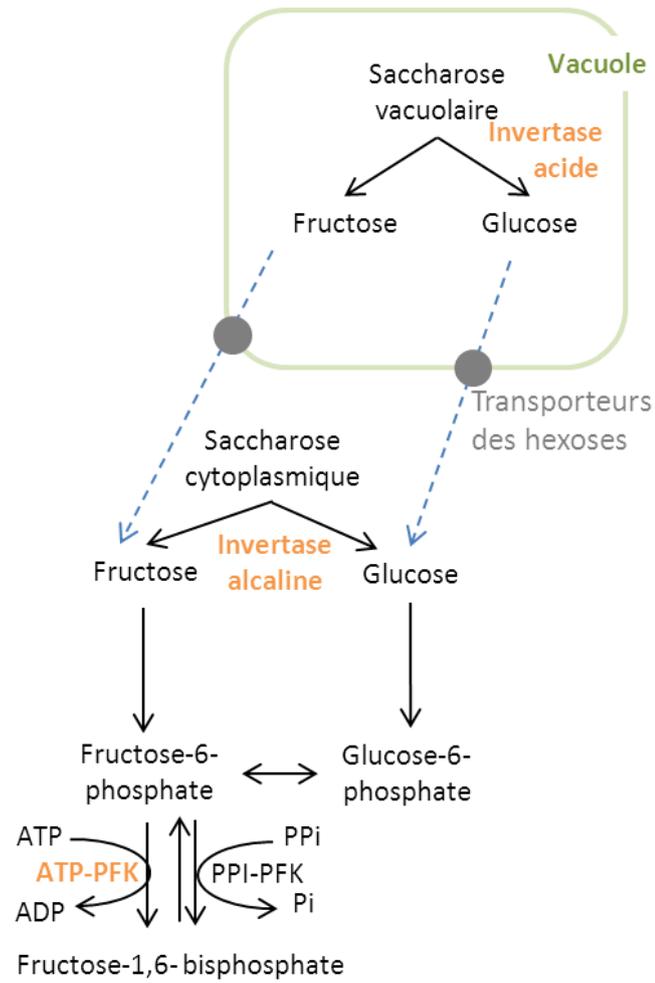


Figure 29: Relation entre la phosphofructokinase et l'invertase.

L'enzyme responsable du clivage du saccharose dans la vacuole en glucose et fructose est l'invertase acide. Nous avons étudié la variation des transcrits de l'invertase ainsi que l'activité enzymatique.

II.1.3. L'invertase vacuolaire

II.1.3.1. Mesure des transcrits

Le niveau d'expression des gènes considérés pour les fruits témoins (SF) a été normalisé à 1.

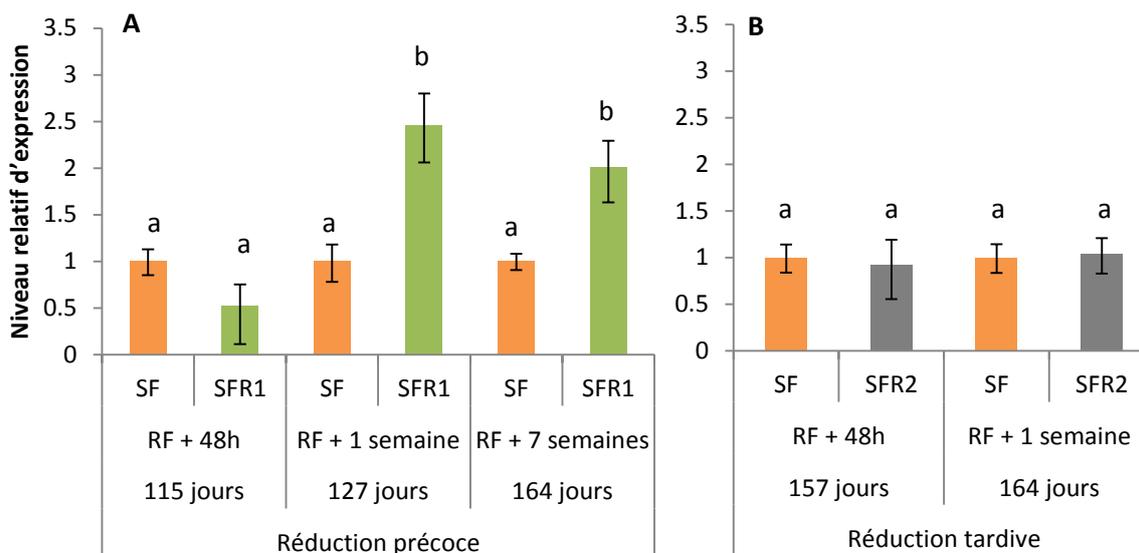


Figure 30: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de l'invertase vacuolaire pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Une semaine après la réduction foliaire, les niveaux de transcrits chez les fruits SFR1 sont plus élevés que chez les fruits témoins (SF). Cette variation se maintient jusqu'à 7 semaines après la réduction foliaire (**Figure 30A**)

Cependant, pour les fruits SFR2 le niveau relatif des transcrits du gène codant pour l'invertase vacuolaire reste constant quel que soit le traitement (**Figure 30B**), ce qui supposerait que le rôle de cette enzyme soit moins important dans la situation de réduction foliaire tardive. Il est difficile de conclure en se basant sur ces résultats, nous nous sommes donc intéressés à l'activité enzymatique de l'invertase vacuolaire.

II.1.3.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'invertase, chez les fruits témoins, est stable au cours du développement du fruit (de l'ordre de $50 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$).

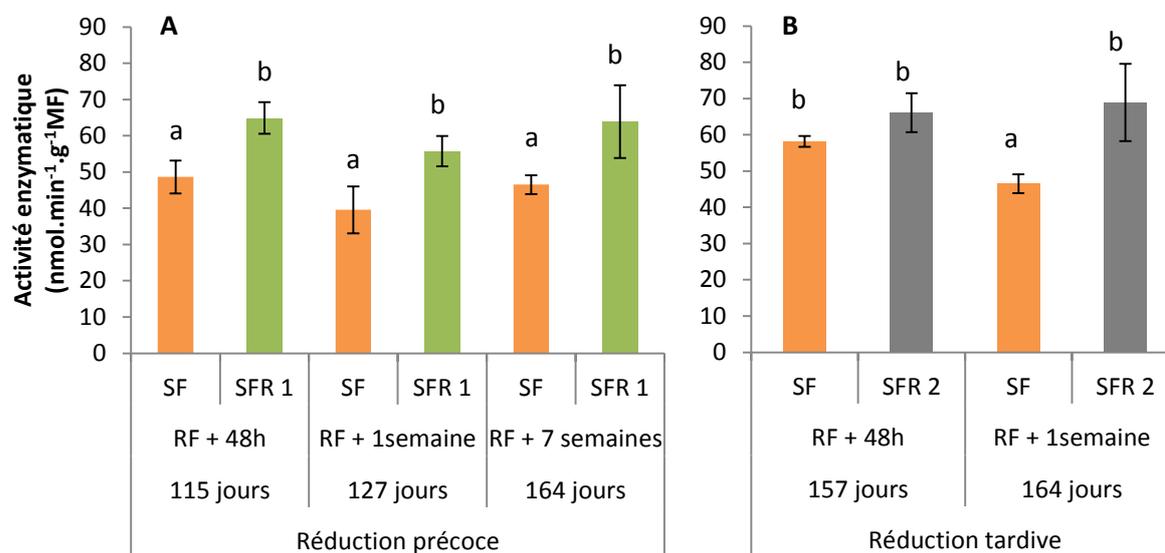


Figure 31 : Activité enzymatique de l'invertase vacuolaire (INV) pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce (A) et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive (B).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a et b) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Chez les fruits SFR1, une augmentation significative de l'activité enzymatique de l'invertase est observée 48h après la réduction foliaire et se maintient jusqu'à 7 semaines après la réduction foliaire. La réduction des apports carbonés se traduit par une diminution de la quantité de saccharose à partir du 155^{ème} jour de développement (**Figure 26A**), alors que les quantités de glucose et de fructose ne sont pas affectées (**Figure 27B et D**). Ces quantités de glucose et de fructose pourraient être maintenues par un déstockage de saccharose depuis la vacuole par l'invertase acide. Nous avons également observé une augmentation de l'activité enzymatique de la PFK 48h après la réduction ce qui est le signe d'un flux augmenté. L'activité de la PFK se normaliserait par la suite par rapport au témoin ce qui pourrait signifier une régularisation du flux de la glycolyse.

En ce qui concerne les fruits SFR2, l'activité enzymatique de l'invertase n'est pas significativement différente du témoin 48h après la réduction foliaire et ne chute pas une

semaine après la réduction foliaire alors que c'est le cas pour le témoin. Par contre, les quantités de saccharose ont été fortement affectées à 157 jours de développement par rapport au témoin ce qui est également le cas du glucose et du fructose. L'invertase, à 157 jours, n'est pas significativement augmentée et la PFK est diminuée ce qui est en accord avec une réduction du flux glycolytique. La situation s'est normalisée une semaine après probablement par un déstockage depuis la vacuole.

En conclusion, nous pouvons schématiser l'impact du traitement carboné SFR1 au cours du temps sur le métabolisme des sucres par rapport au témoin.

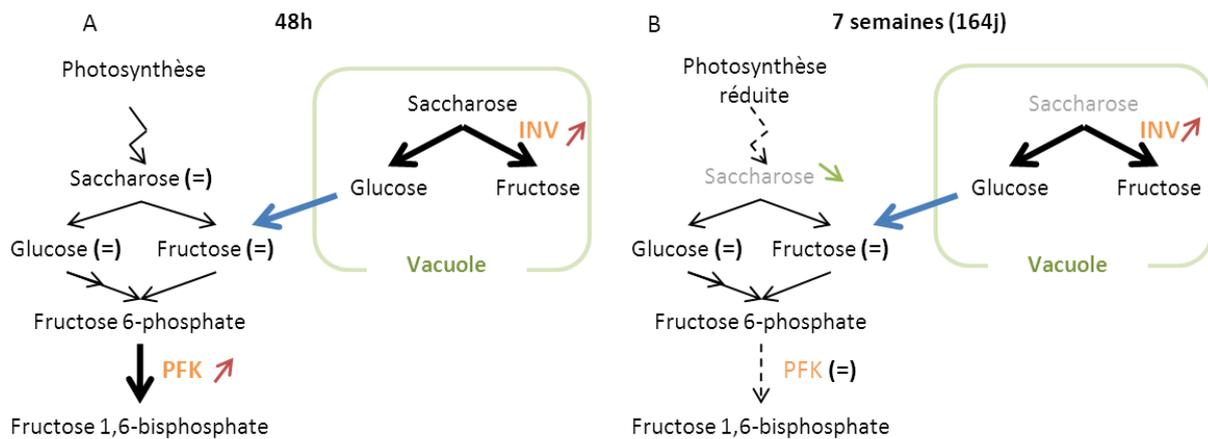


Figure 32: Synthèse des résultats liés au métabolisme des sucres après la défoliation précoce (SFR1).

48h après la réduction foliaire précoce (**Figure 32A**), l'activité de la phosphofructokinase est augmentée par rapport à l'activité des fruits témoins (SF). Cette augmentation d'activité, suggère une augmentation du flux par la voie de la glycolyse. La quantité de saccharose n'est pas affectée 48h après la réduction foliaire mais à 164 jours. L'augmentation rapide de l'activité enzymatique de la PFK serait due à une augmentation du flux par déstockage des sucres depuis la vacuole par clivage enzymatique du saccharose par l'invertase acide.

Sept semaines après la réduction foliaire (**Figure 32B**), les quantités de saccharose sont plus faibles chez les fruits issus du traitement SFR1 que chez les fruits témoins (**Figure 26**). L'activité enzymatique de la PFK est similaire à celle des témoins, l'activité enzymatique de l'invertase est supérieure à celle observée chez les témoins. Le saccharose est probablement

déstocké depuis la vacuole pour compenser la diminution de glucose et de fructose cytosolique et le flux glycolytique est le même (activité enzymatique de la PFK stable).

Nous allons maintenant examiner ce qui se passe si la réduction foliaire est tardive par rapport au témoin.

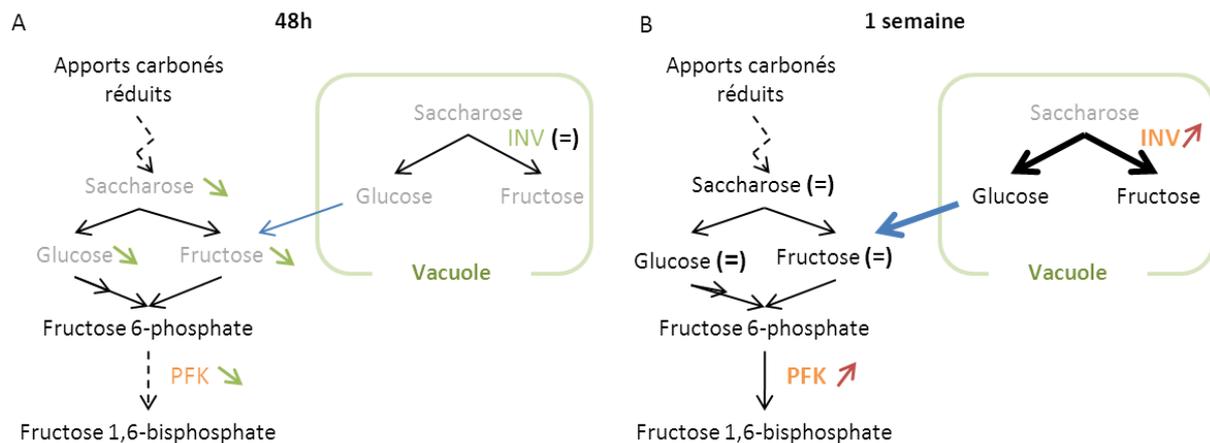


Figure 33: Synthèse des résultats liés au métabolisme des sucres après la défoliation tardive.

48h après la réduction foliaire tardive (SFR2) (**Figure 33A**), l'activité enzymatique de la PFK diminue car le flux de fructose 6-phosphate à cataboliser est probablement plus faible. L'activité de la PFK est même significativement diminuée par rapport au témoin (**Figure 28B**). L'activité glycolytique pourrait être temporairement ralentie car il y a moins de saccharose produit par la photosynthèse, une diminution rapide et brutale du glucose et du fructose et moins de déstockage par l'invertase vacuolaire.

La situation se stabiliserait ensuite, une semaine après la réduction foliaire où l'activité enzymatique de la PFK se retrouve à des valeurs similaires à celles des fruits témoins alors que l'invertase vacuolaire a déstocké les sucres depuis la vacuole (**Figure 33B**), ce qui se traduit par une stabilisation des quantités de glucose et de fructose.

Nous allons maintenant étudier l'impact des réductions foliaires sur le métabolisme des acides organiques.

II.2. Le métabolisme des acides organiques

Nous avons choisi de nous intéresser aux deux acides organiques majoritaires chez les agrumes (Albertini, 2007; Echeverria et Valich, 1988) : l'acide malique et l'acide citrique. La proportion, dans le fruit au stade II, de l'acide malique et de l'acide citrique par rapport aux acides organiques totaux est de l'ordre de 10 et 70%, respectivement (Albertini, 2007). Il faut toutefois préciser que dans le cas de la mandarine, l'acide succinique est plus représenté que l'acide malique (8% et 4%, respectivement). Mais comme d'un point de vue métabolique, le succinique est produit à partir de l'acide citrique lors du cycle de Krebs et qu'il n'est ni un point de régulation du cycle ni un point de sortie, nous avons choisi de ne pas présenter les résultats.

II.2.1. Le métabolisme de l'acide malique

II.2.1.1. L'acide malique

L'accumulation de l'acide malique chez les fruits témoins se fait en deux temps. De 96 à 155 jours de développement, l'augmentation de la quantité d'acide malique est régulière de $107,5 \pm 6,9$ à $291,9 \pm 7,6$ mg/fruit, puis, à partir du 157^{ème} jour de développement et jusqu'au 164^{ème} l'augmentation est plus rapide de $309,3 \pm 5,9$ à $350,6 \pm 7,3$ mg/fruit. De 164 à 186 jours de développement, l'augmentation de la quantité d'acide malique ralentit et à partir du 186^{ème} jour, la quantité d'acide malique atteint un plateau à 420 mg/fruit (**Figure 34**).

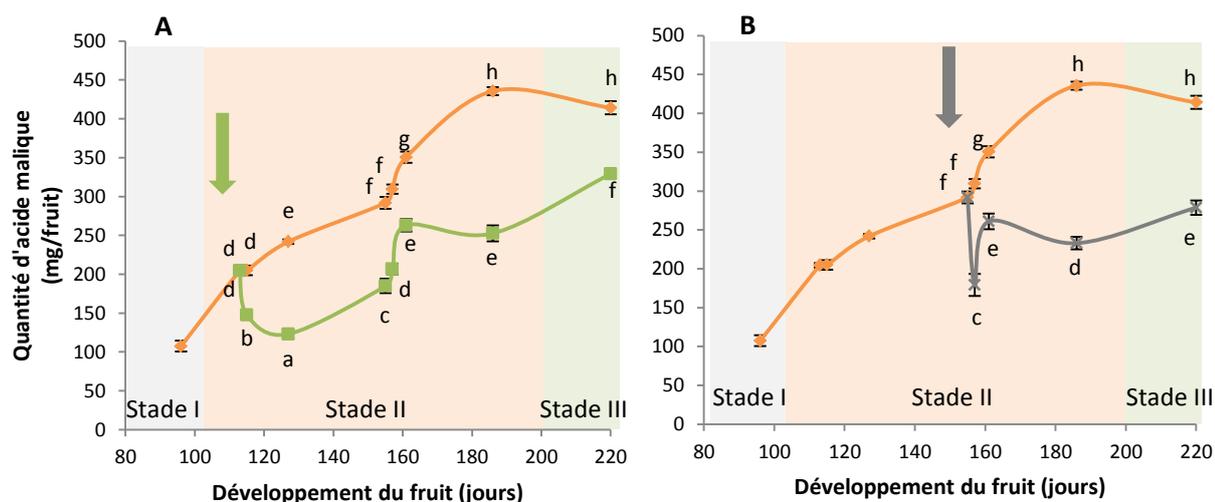


Figure 34: Quantités d'acide malique des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit pour les différents traitements : SF (—♦—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b, c, d, e, f, g et h) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

La réduction foliaire précoce entraîne une chute rapide et significative des quantités d'acide malique dès 48h par rapport aux fruits témoins ($147,4\pm 3,9$ et $204,9\pm 6,1$ mg/fruit, respectivement) (**Tableau 11**). Après cette diminution brutale, le fruit (SFR1) recommence à accumuler de l'acide malique (après 127 jours de développement), un plateau est observé de 164 à 186 jours de développement durant la période où le témoin accumule fortement de l'acide malique. Puis l'augmentation reprend au début du stade III (**Figure 34A**).

Tableau 11 : Quantités d'acide malique (mg/fruit) 48h et une semaine après les deux réductions foliaires.

		Quantités d'acide malique (mg/fruit)	
		48h	1 semaine
Réduction précoce	Sans	$204,95\pm 6,07^d$	$241,94\pm 2,93^e$
	Avec	$147,44\pm 3,83^b$	$122,98\pm 5,89^a$
Réduction tardive	Sans	$309,32\pm 5,94^f$	$350,65\pm 7,28^g$
	Avec	$179,31\pm 14,31^c$	$260,93\pm 10,09^e$

Les différentes lettres (a, b, c, d, e, f et g) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR2, les quantités d'acide malique chutent également de façon rapide et brutale 48h après la réduction foliaire ($309,3 \pm 5,9$ mg/fruit pour les fruits SF et $179,3 \pm 14,3$ mg/fruit pour les fruits SFR1) (**Tableau 11**). Puis les quantités d'acide malique ré-augmentent jusqu'à 260 mg/fruit et restent constantes jusqu'à la fin de l'expérience (220 jours) (**Figure 34B**) et sont significativement inférieures au témoin.

La réduction des apports carbonés influence négativement l'accumulation de l'acide malique. Les quantités d'acide malique dans les fruits ayant subi la réduction foliaire, quelle que soit l'époque, sont inférieures à celles des fruits témoins jusqu'à la fin de l'expérimentation. En effet, la baisse de quantité observée au début de l'expérimentation (SFR1 ou SFR2) n'est jamais compensée. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez la vigne (Ollat et Gaudillere, 1998). En effet, chez la vigne, une défoliation partielle de 70% entraîne une diminution dans les baies des quantités d'acide malique, acide organique majoritaire avec l'acide tartrique (Hardy, 1968). Toutefois, la comparaison des résultats obtenus sur la vigne avec nos résultats sur agrumes sont à nuancer puisque chez la vigne l'acide malique est l'acide organique majoritaire (40 à 60% des acides organiques totaux (Andersen et Brodbeck, 1989)) alors que chez les agrumes c'est l'acide citrique qui est majoritaire.

Dans la cellule, l'acide malique peut être formé dans le cytosol à partir du phosphoénolpyruvate par l'action de la PEPC et de la MDH (malate déshydrogénase). Nous avons préférentiellement étudié l'activité de la PEPC. Chez la pêche, espèce pour laquelle l'acide malique représente entre 50 et 60% des acides organiques totaux alors que le citrique ne représente que 20 à 25% (Dirlewanger *et al.*, 1999). Cette enzyme semble être celle qui a une action de régulation la plus importante (Chollet *et al.*, 1996; Moing *et al.*, 2000). La PEPC est également l'enzyme qui catalyse la réaction anaplérotique qui va permettre la réalimentation du cycle de Krebs en oxaloacétate lorsque la cellule doit synthétiser de l'acide citrique.

II.2.1.2. Mesure de l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase

L'activité de la PEPC diminue au cours du développement des fruits témoins. Les valeurs d'activité enzymatique sont de 30 nmol.min⁻¹.g⁻¹MF au début de l'expérimentation et de l'ordre de 5 nmol.min⁻¹.g⁻¹MF à la fin de l'expérimentation (**Figure 35**). Nos résultats sont en accord avec Tang *et al.* (2010) qui ont montré que l'activité enzymatique de la PEPC chez le melon diminue au cours de la maturation. Nous rappelons que parallèlement les quantités d'acide malique augmentent au cours de la même période semblerait indiquer, qu'à partir de 157 jours de développement (à partir du stade II), ce n'est pas la PEPC qui serait impliquée mais plutôt l'enzyme malique. Cette hypothèse semble confortée par les travaux de Hirai *et al.* (1978) qui ont montré, que chez l'orange, l'activité enzymatique de l'enzyme malique est croissante tout au long de la maturation du fruit.

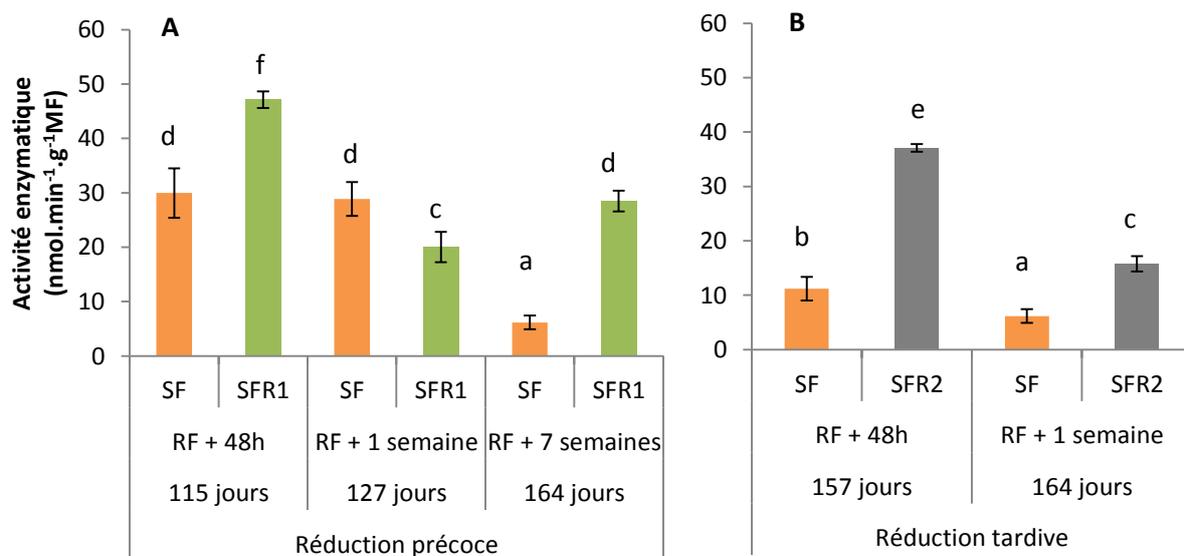


Figure 35: Activité enzymatique de la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC) pour les traitements SF (■), SFR 1 (■) et SFR 2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b, c, d et e) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR1, 48h après la limitation des apports carbonés, l'activité enzymatique de la PEPC est significativement supérieure à celle des fruits témoins (SF)

($47,1 \pm 1,5$ et $29,9 \pm 4,5$ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, respectivement) (**Figure 35A**). L'enzyme pourrait être activée pour compenser la diminution de la quantité d'acide malique de l'ordre de 27% (**Figure 34A**) et d'acide citrique de l'ordre de 16% (**Figure 36A**) observée lors de la réduction foliaire. 48h après la réduction foliaire SFR1, les quantités de saccharose sont comparables à celles du témoin, mais nous savons qu'il y a eu déstockage depuis la vacuole (**Figure 31A**) et augmentation du flux glycolytique puisque l'activité enzymatique de la PFK est augmentée (**Figure 28A**). Comme les quantités d'acides citrique et malique ont diminué, nous pouvons supposer que l'activité enzymatique de la PEPC augmente pour alimenter le cycle de Krebs en oxaloacétate qui compenserait la perte d'acide citrique. En revanche, une semaine après la réduction foliaire, l'activité de la PEPC est moins importante chez les fruits SFR1 que chez les fruits SF malgré le fait que les quantités d'acides malique et citrique réaugmentent. Nous pouvons alors supposer une contribution différente de la PEPC et de l'enzyme malique chez les fruits témoins et les fruits SFR1. En effet, sept semaines après la réduction foliaire, l'enzyme malique pourrait être fortement impliquée pour produire l'acide malique chez les fruits témoins et non la PEPC ce qui semble être le contraire chez les fruits SFR1, 48h après la réduction foliaire. Il serait important de connaître la contribution de l'enzyme malique pour mieux expliquer la réduction foliaire SFR1 au cours du temps. Sur ce point, les travaux d'Albertini (2007) ont montré que l'activité de l'enzyme malique cytoplasmique augmente au cours du développement de l'orange acide (jusqu'à 220 jours).

En ce qui concerne l'activité de la PEPC pour les fruits ayant subi la restriction des apports carbonés tardivement (SFR2), nous observons, 48h après cette restriction, que l'activité de la PEPC est supérieure à celle des fruits témoins ($11,2 \pm 2,2$ et $37,1 \pm 0,7$ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, respectivement) (**Figure 35**) alors que la quantité d'acide malique diminue fortement (43%) et celle de l'acide citrique de 19% (**Figure 34B** et **Figure 35B**). La PEPC jouerait le même rôle que lors de la réduction foliaire précoce pour compenser cette diminution brutale, sachant que dans ce cas, les quantités de saccharose, en glucose et en fructose ont fortement diminué. Il n'y a pas eu de déstockage depuis la vacuole et le flux glycolytique présent servirait donc, par le biais de la PEPC, à alimenter le cycle de Krebs en oxaloacétate pour synthétiser de l'acide citrique pendant la phase où l'acide citrique s'accumule fortement.

Une semaine après la réduction foliaire, l'activité enzymatique de la PEPC pour les fruits ayant subi la réduction foliaire tardive (SFR2) est plus importante que celle des fruits non limités. La quantité d'acide malique ayant réaugmenté, la PEPC devrait avoir produit de l'acide malique.

Le métabolisme de l'acide malique étant corrélé à celui de l'acide citrique, nous nous sommes ensuite intéressés à la quantité d'acide citrique des fruits.

II.2.2. Le métabolisme de l'acide citrique

II.2.2.1. Mesure des quantités d'acide citrique

Les quantités d'acide citrique pour les fruits SF augmentent entre 80 et 164 jours de développement de $656,6 \pm 91,6$ à $2881,6 \pm 85,2$ mg/fruit. A partir du 164^{ème} jour de développement jusqu'au 189^{ème} jour les quantités d'acide citrique restent constantes puis elles diminuent jusqu'à $2022,2 \pm 93,3$ mg/fruit au 220^{ème} jour (**Figure 36**), ce qui est compatible avec les données de la littérature au stade III (Iglesias *et al.*, 2007).

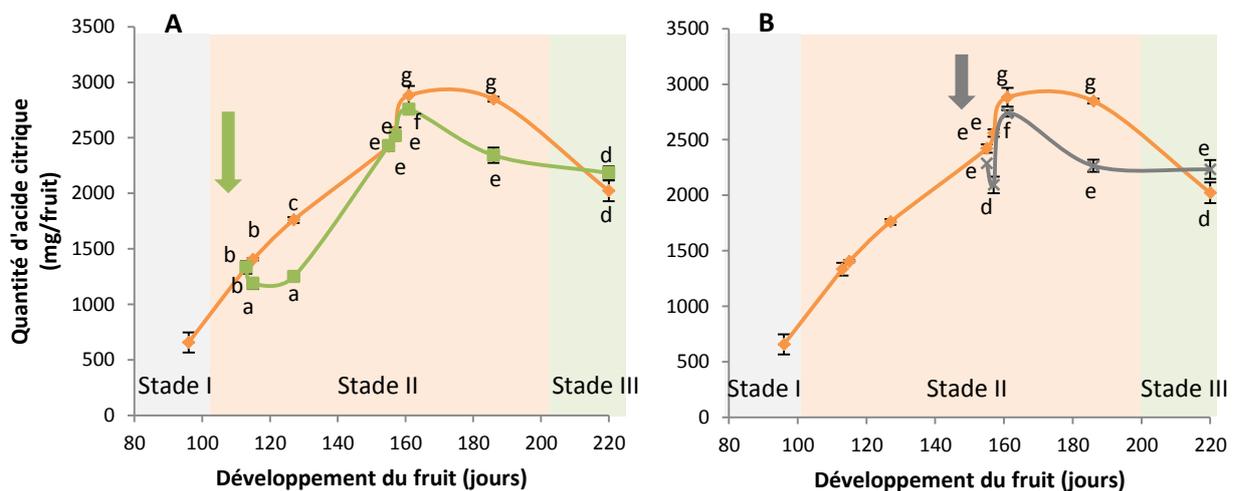


Figure 36: Quantités d'acide citrique des fruits lorsque la réduction foliaire est précoce (A) et plus tardive (B) au cours du développement du fruit pour les différents traitements : SF (—◆—), SFR1 (—■—), SFR2 (—×—).

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b, c, d, e, f et g) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR1 les quantités d'acide citrique diminuent dès 48h après la réduction foliaire (**Tableau 12**) et restent à ce niveau ($1187,3 \pm 47,7$ mg/fruit) la semaine suivant la réduction foliaire. Les quantités d'acide citrique réaugmentent et sont égales au témoin à 220 jours de développement puisque les quantités d'acide citrique du témoin diminuent lors du stade III (**Figure 36A**).

Tableau 12: Quantités d'acide citrique (mg/fruit) 48h et une semaine après les réductions foliaires SFR1 et SFR2.

		Quantités d'acide citrique (mg/fruit)	
		48h	1 semaine
Réduction précoce	Sans	$1405,70 \pm 9,25^b$	$1760,37 \pm 26,03^c$
	Avec	$1187,28 \pm 47,72^a$	$1248,33 \pm 32,41^a$
Réduction tardive	Sans	$2561,65 \pm 85,24^e$	$2881,65 \pm 85,24^g$
	Avec	$2093,10 \pm 75,58^d$	$2737,28 \pm 29,66^f$

Les différentes lettres (a, b, c, d, e, f et g) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR2, la diminution est brutale 48h après la réduction foliaire (**Tableau 12**). Puis la quantité d'acide citrique, une semaine après la réduction, est identique à celle des témoins jusqu'à 164 jours. La quantité d'acide citrique accumulée en fin d'expérimentation est même légèrement supérieure à celle accumulée dans les fruits non limités (SF).

La production d'acide citrique est affectée immédiatement après la réduction foliaire et pendant une semaine pour les fruits SFR1 et 48h pour les fruits SFR2. Cependant, il faut préciser que pour les fruits SFR1 en fin de stade II (187 jours), les quantités d'acide citrique sont à nouveau inférieures à celles des témoins. Par contre, en début de stade III, il y a une diminution des quantités d'acide citrique chez les témoins que nous n'observons pas chez les fruits SFR1 puisque les quantités semblent avoir atteint un plateau. Les quantités d'acide citrique des fruits témoins et des fruits SFR1 sont similaires en fin d'expérimentation. Nous observons le même phénomène pour les fruits ayant subi la réduction foliaire tardive. De plus, la production d'acide malique est fortement diminuée pendant la même période par rapport aux fruits témoins (SF) (**Figure 35**). Il est probable que la cellule favorise la production d'acide citrique par rapport à l'acide malique ce qui est compatible avec

l'augmentation significative de l'activité enzymatique de la PEPC, à la même période, Cette dernière servant à alimenter le cycle de Krebs en oxaloacétate qui est indispensable pour la synthèse de l'acide citrique. L'acide citrique est moins produit chez les fruits SFR1 et SFR2 par rapport au témoin et nous n'observons pas de diminution significative de sa quantité en début de stade III. Ces résultats devront être confirmés par une étude du devenir de l'acide citrique lors du stade III.

Nous allons maintenant nous intéresser au devenir de l'acide citrique. Il peut suivre deux voies métaboliques principales (1) la voie de dégradation cytoplasmique : la formation de glutamate (**Figure 37**). Le glutamate pourra ensuite emprunter la voie du GABA « shunt » (Bouche et Fromm, 2004; Bown et Shelp, 1997) ou permettre la synthèse de proline (Lehmann *et al.*, 2010). (2) le stockage dans la vacuole et son déstockage éventuel. Nous examinerons donc s'il y a présence ou non d'une remobilisation depuis la vacuole par l'étude du transporteur vacuolaire CsCit1 (Shimada *et al.*, 2006).

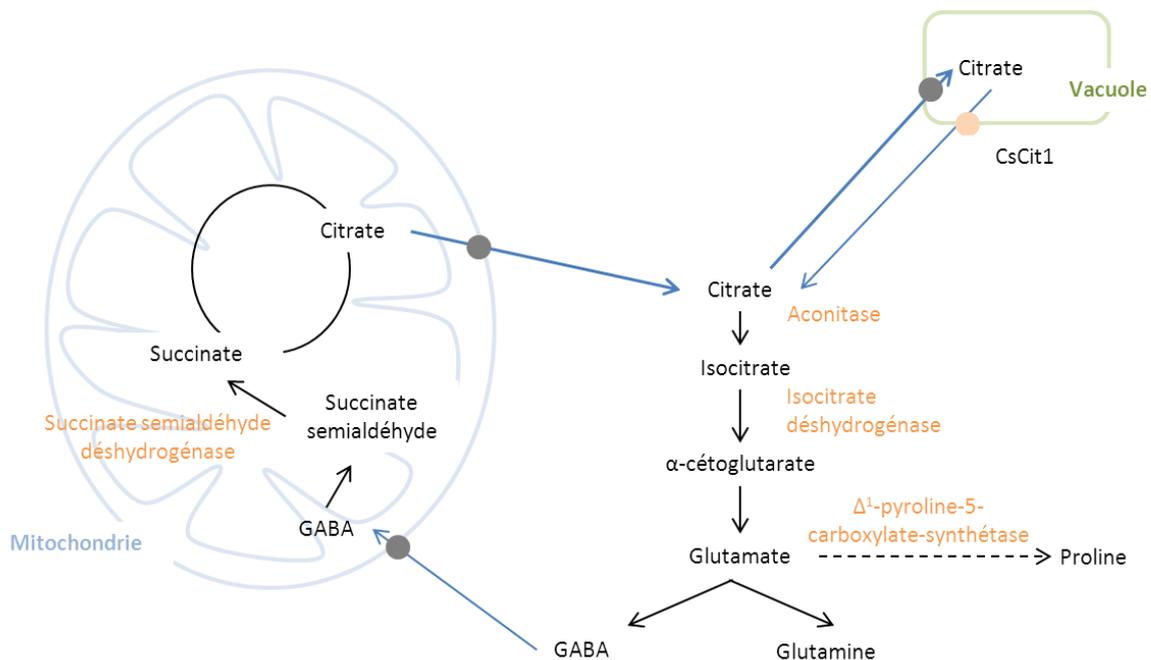


Figure 37: Devenir cytoplasmique de l'acide citrique chez la mandarine.

Nous allons d'abord nous intéresser à la transformation du citrate en α-cétoglutarate qui se fait en deux étapes. Le citrate est transformé en isocitrate par l'aconitase cytoplasmique puis en α-cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique.

II.2.2.2. L'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique

Nous avons dans un premier temps étudié les transcrits du gène codant pour cette enzyme. Aucune variation n'est observée chez les fruits SFR1 et SFR2 par rapport aux témoins (données non montrées). Nous avons néanmoins analysé l'activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique NADP dépendante.

L'activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase diminue au cours du temps chez les témoins de 7,33 à 3,8 nmol.min⁻¹.g⁻¹MF (**Figure 38**).

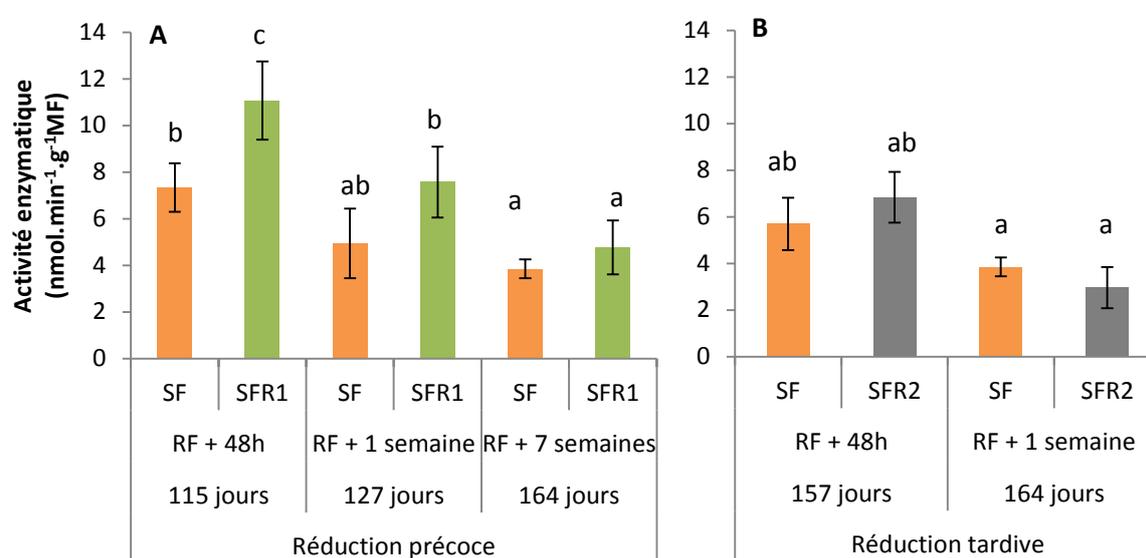


Figure 38: Activité enzymatique de l'isocitrate déshydrogénase cytoplasmique (NADP-IDH) pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive. Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements (α=5%).

Une augmentation significative de l'activité enzymatique de la NADP-IDH est observée pour les fruits SFR1, 48h après la réduction foliaire (**Figure 38A**). Cette augmentation peut être reliée à une diminution des quantités d'acide citrique observée à la même période (**Figure 36A**). Puis l'activité enzymatique de la NADP-IDH se « normalise » progressivement et devient similaire à celle observée chez les fruits témoins (SF).

Aucune variation significative de l'activité enzymatique de la NADP-IDH par rapport aux témoins n'est observée chez les fruits SFR2 (**Figure 38B**) malgré le fait qu'une diminution significative des quantités d'acide citrique soit observée 48h après la réduction foliaire tardive (**Figure 36B**).

II.2.2.3. Mesure des transcrits du gène codant pour le transporteur CsCit 1

Nous constatons que le niveau des transcrits est significativement augmenté de 2,4 fois à 48h et de 2,8 fois une semaine après la réduction foliaire précoce SFR1 (**Figure 39A**), ce qui indiquerait bien un déstockage de citrate depuis la vacuole.

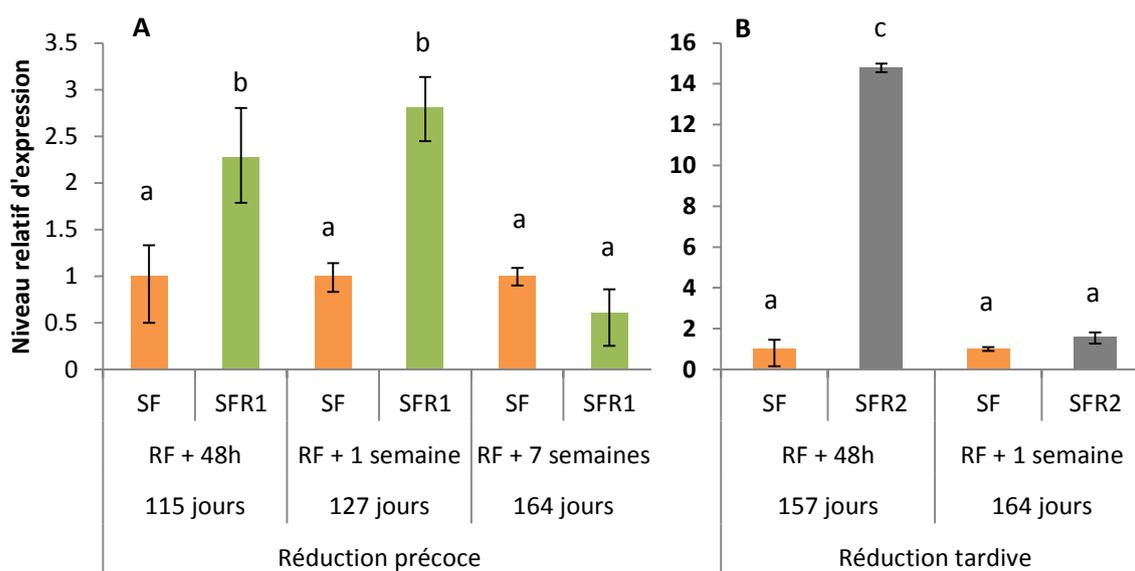


Figure 39: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène du transporteur vacuolaire CsCit 1 pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Le niveau des transcrits est fortement augmenté (14,8 fois), de manière transitoire, 48h après la réduction foliaire tardive (SFR2) (**Figure 39B**), ce qui est corrélé avec la diminution brutale des quantités d'acide citrique (**Figure 36B**). Un signal de stress est

probablement déclenché puisque nous avons observé une chute brutale de saccharose, glucose, acide malique et acide citrique. Nous pouvons imaginer un déstockage massif depuis la vacuole pour pouvoir permettre une resynthèse de sucres comme suggéré par Chen *et al.* (2012) ou pour compenser la diminution de l'acide citrique.

Pour essayer de préciser la réponse de la cellule lors des deux réductions foliaires, nous nous sommes donc intéressés au devenir de l' α -cétoglutarate cytoplasmique. Deux possibilités sont alors envisageables : la voie du GABA « shunt » et la voie de la proline. Nous avons d'abord étudié la voie du GABA « shunt » en nous intéressant à la succinate semialdéhyde déshydrogénase.

II.2.2.4. Mesure des transcrits du gène codant pour la succinate semialdéhyde déshydrogénase

L'étude des transcrits du gène codant pour la succinate semialdéhyde déshydrogénase montre une forte augmentation 48h après la réduction foliaire précoce (SFR1) (**Figure 40**). Ces valeurs sont en accord avec l'augmentation de l'activité enzymatique de la NADP-IDH (**Figure 38A**) et avec l'augmentation des transcrits du transporteur vacuolaire CsCit1 (**Figure 39A**).

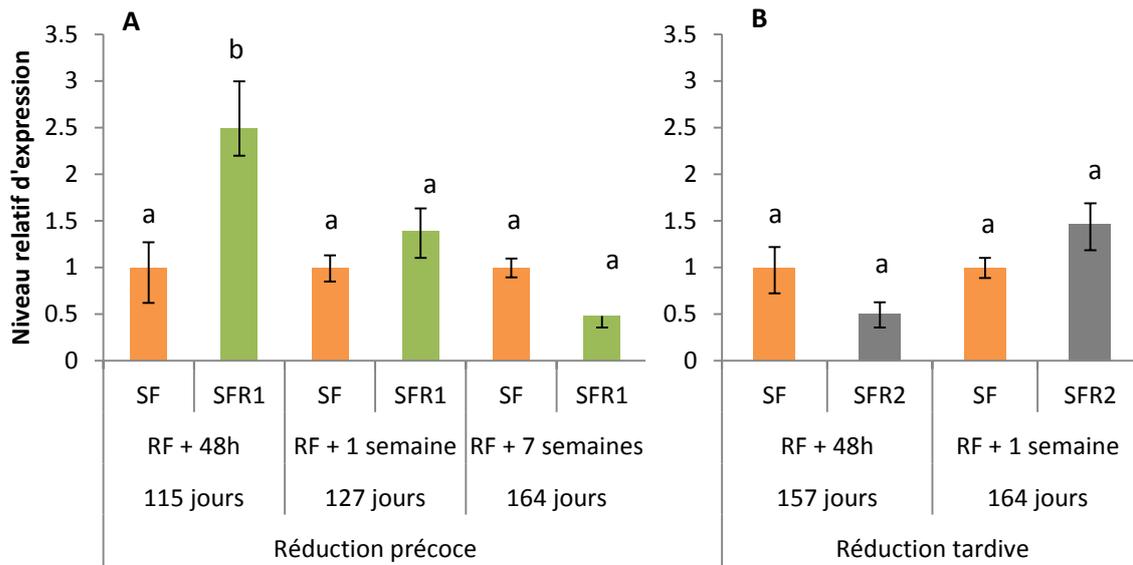


Figure 40: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de la succinate semialdéhyde déshydrogénase (SSADH) pour les traitements SF (■), SFR 1 (■) et SFR 2 (■) 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a et b) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

L'acide citrique déstocké serait transformé en α -cétoglutarate puis en glutamate qui serait ensuite décarboxylé en GABA. Le GABA serait ensuite transformé en acide succinique par la SSADH et pourrait ainsi permettre une synthèse de glucose et de fructose par la voie de la gluconéogenèse (Chen *et al.*, 2012).

Par contre, aucune variation des transcrits du gène codant pour la SSADH n'est observée pour la réduction foliaire tardive (SFR2) (**Figure 40B**). Cette voie ne serait probablement pas impliquée lorsque la réduction foliaire est tardive.

Comme le glutamate formé peut également être un précurseur de la proline, nous sommes intéressés à la formation de proline. Cet acide aminé serait impliqué dans l'adaptation des plantes aux conditions environnementales défavorables (Delauney et Verma, 2002).

II.2.2.5. La voie de la proline

II.2.2.5.1. Mesure des quantités de proline

Nous nous sommes intéressés aux quantités de proline chez les fruits ayant subi ou non les réductions foliaires.

Chez les fruits témoins (SF), les quantités de proline diminuent du 115^{ème} au 127^{ème} jour de développement (de 52,8 à 36,7 $\mu\text{mol}/\text{fruit}$) puis elles sont constantes au cours de l'expérimentation de l'ordre de 40 $\mu\text{mol}/\text{fruit}$ (**Figure 41**).

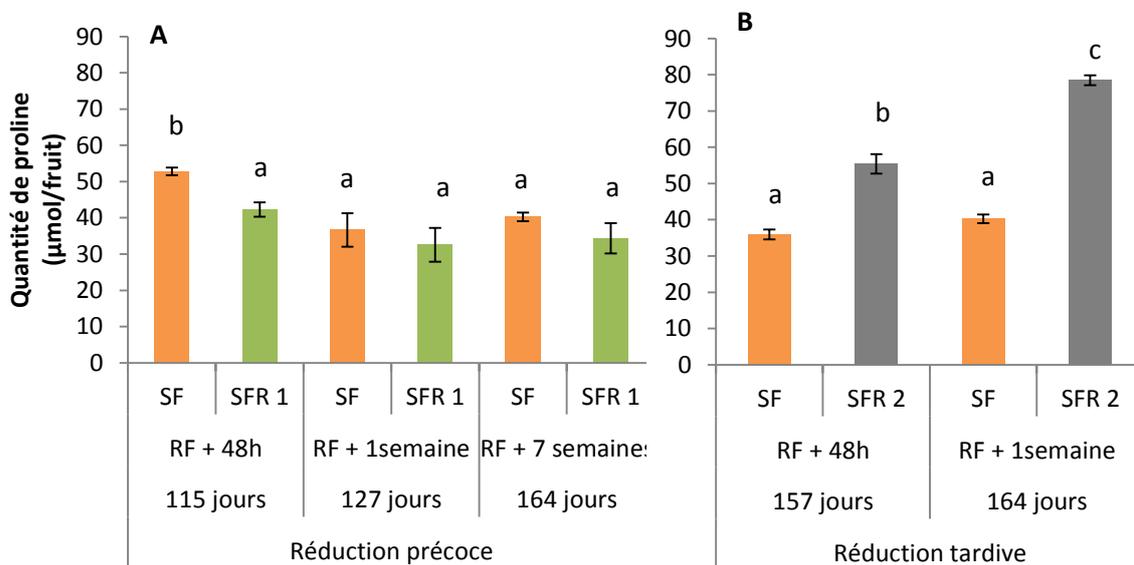


Figure 41: Quantités de proline pour les traitements SF (■), SFR1 (■) et SFR2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a, b et c) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Nous observons une légère diminution des quantités de proline pour les fruits SFR1 48h après la réduction foliaire. Puis, aucune variation significative des quantités de proline n'est observée pour le traitement SFR1 par rapport aux témoins (**Figure 41A**) jusqu'à 164 jours de développement du fruit. Ce résultat confirme les hypothèses précédentes indiquant que, pour les fruits SFR1, la voie du GABA « shunt » serait privilégiée.

Par contre une augmentation significative est observée 48h et une semaine après la réduction foliaire tardive (SFR2) (**Figure 41B**) ce qui semblerait nous orienter vers la voie de la proline.

Deux voies de biosynthèse de la proline ont été mises en évidence chez les plantes : la voie du glutamate et la voie de l'ornithine (Hu *et al.*, 1992; Roosens *et al.*, 1998). Il est communément admis que la biosynthèse de la proline se fait majoritairement *via* la voie du glutamate en condition de stress alors que la voie de l'ornithine serait impliquée dans le développement des jeunes plants (Armengaud *et al.*, 2004). Nous avons donc décidé d'étudier les transcrits de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase, enzyme qui permet la synthèse de proline.

II.2.2.5.2. Mesure de la quantité de transcrits de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase

Lorsque la réduction foliaire est précoce, aucune variation des transcrits n'est observée (**Figure 42A**). L'acide citrique déstocké depuis la vacuole par le transporteur vacuolaire CsCit1 serait bien dégradé par la voie du GABA « shunt » comme nous l'avons déjà suggéré précédemment.

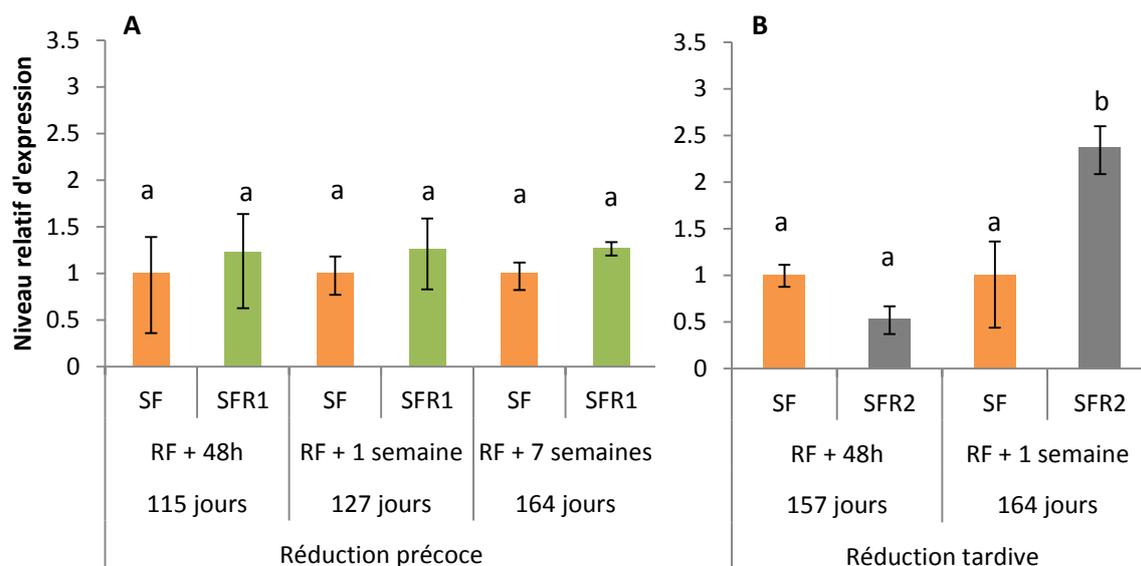


Figure 42: Niveau relatif des quantités de transcrits correspondant au gène de la Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS) pour les traitements SF (■), SFR 1 (■) et SFR 2 (■), 48h, 1 et 7 semaines après la réduction foliaire précoce et 48h et 1 semaine après la réduction foliaire tardive.

Les points correspondent aux moyennes et les barres verticales aux écarts types. Les flèches matérialisent la réduction foliaire. Les différentes lettres (a et b) indiquent les différences significatives entre les traitements et entre les dates pour chacun des traitements ($\alpha=5\%$).

Pour les fruits SFR2, les quantités de proline sont de 54,43 $\mu\text{mol}/\text{fruit}$ 48h après la réduction foliaire alors que les transcrits de P5CS ne sont pas significativement différents du témoin. Nous pouvons envisager que la biosynthèse de la proline se fasse à partir de l'ornithine. Par contre, la P5CS serait impliquée une semaine après la réduction foliaire puisque les niveaux de transcrits sont significativement supérieurs à ceux des témoins et que la quantité de proline a augmenté (78,45 $\mu\text{mol}/\text{fruit}$).

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous permet de proposer deux modèles métaboliques pour chacune des réductions foliaires, puisque les mécanismes mis en place par la cellule pour faire face à la réduction des apports carbonés ne sont pas les mêmes.

II.3. Impact des réductions foliaires sur le métabolisme des sucres et des acides

La mandarine est un fruit de type « intermédiaire » en termes d'acidité. En effet, les quantités d'acide citrique sont de 28% et celles de fructose sont de 16%.

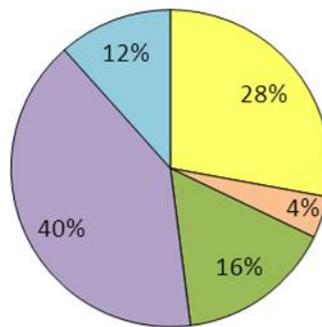


Figure 43: Quantités d'acides organiques et en sucres des fruits de mandarine en fin de stade II.

Les acides représentés sont l'acide citrique (■) et l'acide malique (■) et les sucres représentés sont le fructose (■), le saccharose (■) et le glucose (■).

Le saccharose augmente de manière importante au cours du stade II, 150 mg/fruit au début et jusqu'à 4126 mg/fruit à la fin du stade II. Par contre, les quantités de glucose et de fructose se stabilisent à partir de 186 jours de développement et l'acidité a chuté en début de stade III (diminution des quantités d'acide citrique (**Figure 36A**)) ce qui est en accord avec les données de la littérature pour les mandarines. D'après le modèle proposé par Albertini (2007) modèle établi sur l'orange acide, nous pouvons proposer un modèle similaire pour la mandarine.

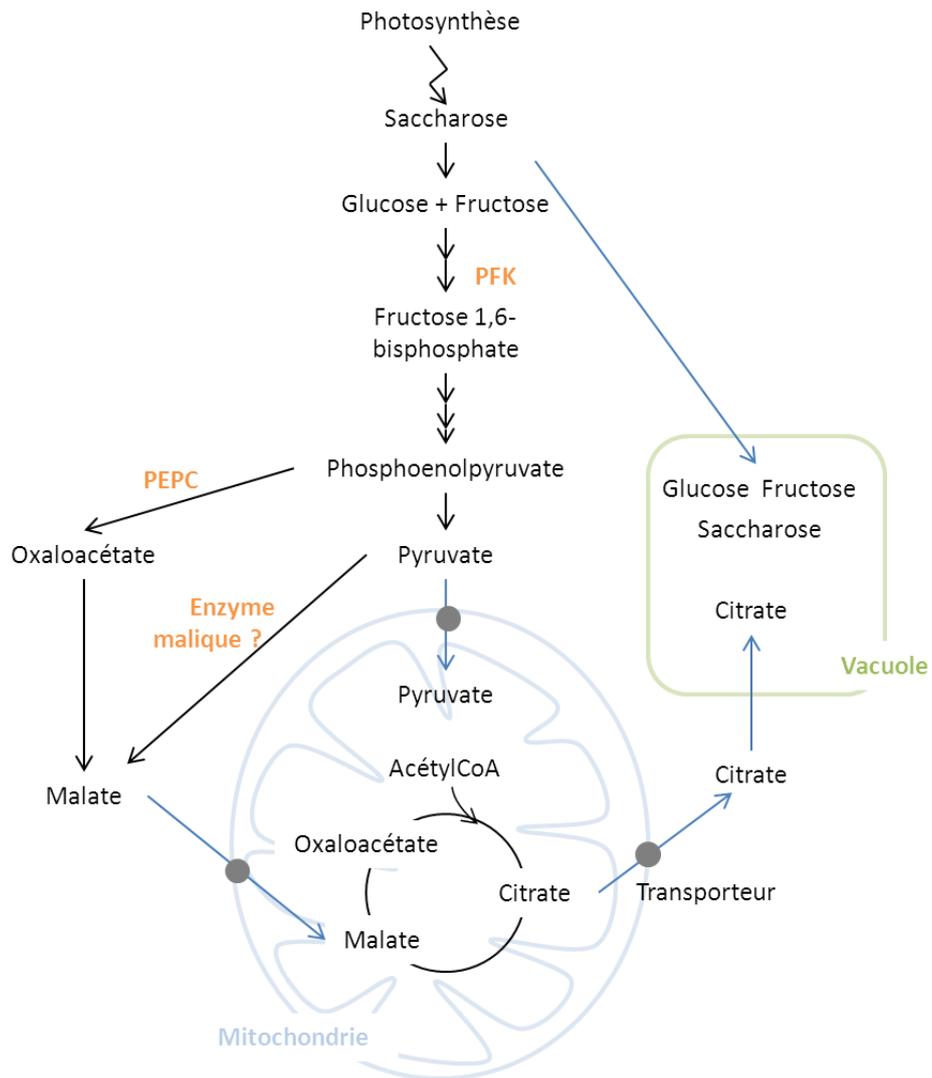


Figure 44 : Modèle métabolique de la mandarine en fin de stade II.

La mandarine, en fin de stade II, présente les caractéristiques d'un fruit de la gamme des intermédiaires puisque les quantités de sucres et d'acides organiques sont équilibrées. Les quantités d'acides accumulées sont de l'ordre de 40% (30% acide citrique, 4% acide malique et 8% acide succinique) et de 60% pour les sucres (14% fructose, 33% saccharose, 11% glucose).

Nous allons schématiser les modifications métaboliques qui se sont produites lors de la première réduction foliaire.

entrer dans la mitochondrie pour permettre la synthèse d'oxaloacétate et ainsi maintenir la production d'acide citrique. De plus, l'acide citrique stocké semble également être remobilisé depuis la vacuole, du fait de la surexpression du gène codant pour CsCit 1. L'acide citrique ainsi déstocké peut être métabolisé par la NADP-IDH dont l'activité enzymatique est augmentée. L' α -cétoglutarate formé par l'action de la NADP-IDH est ensuite transformé en glutamate puis en GABA. La voie du GABA « shunt » semble favorisée puisque l'expression du gène codant pour la SSADH est augmentée. Nous rappelons que la voie du GABA « shunt » permet une réalimentation du cycle de Krebs au niveau du succinate (Narayan et Nair, 1990) pour conduire à une resynthèse de sucres (Chen *et al.*, 2012) et est la voie de dégradation de l'acide citrique privilégiée chez les agrumes (Cercos *et al.*, 2006). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de doser la PEPCK qui permet la resynthèse du glucose par néoglucogenèse. De plus, Contento *et al.* (2004) ont montré qu'en cas de limitation d'apports en sucres, il y a une augmentation de production de ROS. La voie du GABA « shunt » pourrait être activée pour permettre de rétablir le potentiel redox (Bouche *et al.*, 2003) puisque la dégradation du GABA permet de limiter l'accumulation des ROS (Bouche et Fromm, 2004) grâce à la SSADH qui fournit du NADH à la chaîne respiratoire et du succinate. Nous allons regarder les modifications métaboliques qui se sont produites sept semaines après la réduction foliaire précoce pour voir comment le fruit s'est « adapté » aux contraintes induites pour la défoliation.

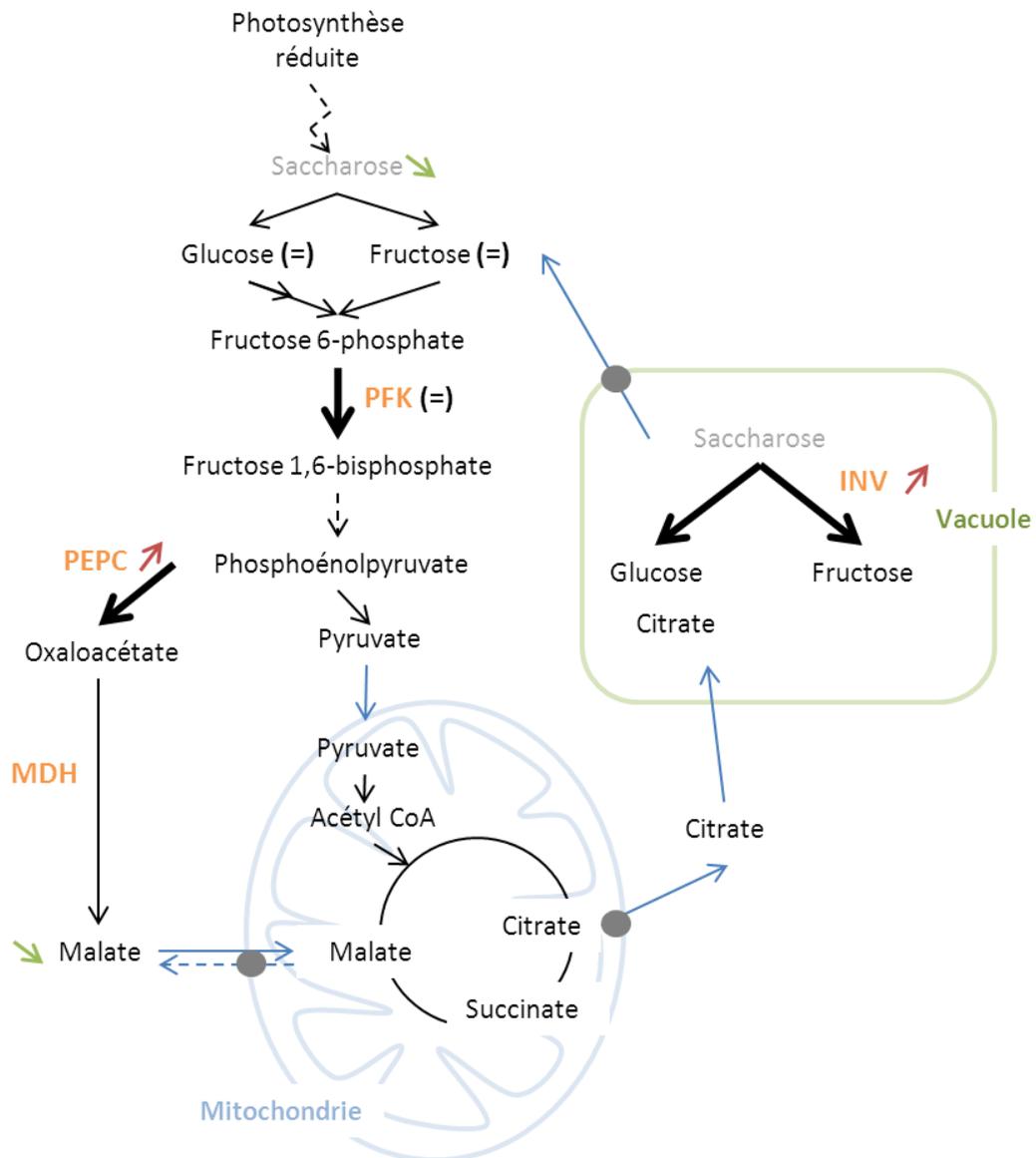


Figure 46: Modèle métabolique sept semaines après la réduction foliaire précoce.

Sept semaines après la réduction foliaire, l'apport carboné est clairement affecté puisque les quantités de saccharose ont fortement diminué. Les quantités de glucose et de fructose ne sont pas significativement différentes du témoin ce qui pourrait s'expliquer par un déstockage depuis la vacuole car l'activité enzymatique de l'invertase est augmentée. L'activité de la PEPC est augmentée pour permettre la production d'acide malique. En revanche, les quantités d'acide citrique ne sont pas significativement différentes du témoin. L'activité de l'IDH cytoplasmique n'est pas significativement différente du témoin et il n'y a pas de déstockage de l'acide citrique depuis la vacuole par CsCit1., il n'y a donc pas consommation de l'acide citrique.

d'accumulation des sucres. Cette chute des quantités de sucres entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la PFK, ce qui diminue le flux glycolytique. L'activité enzymatique de l'invertase acide n'est pas significativement différente du témoin, il n'y a probablement pas de déstockage depuis la vacuole. Les quantités d'acide malique ont diminué de 43% par rapport au témoin et l'activité de la PEPC est fortement augmentée pour favoriser la synthèse d'acide citrique qui n'est diminué que de 19% par rapport au témoin. Ces quantités d'acide citrique pourraient également être obtenues par un déstockage depuis la vacuole vu la très forte augmentation des niveaux de transcrits du gène codant pour CsCit1. Nous avons observé une formation importante de proline qui provient du glutamate. Le glutamate est un acide aminé clé dans le métabolisme des acides aminés et peut être synthétisé par différentes voies. La voie la plus importante implique la glutamine synthétase (EC. 6.3.1.2) et la glutamate synthase (EC. 1.4.7.1) qui est largement répandue dans tous les tissus végétaux (Lea et Azevedo, 2006). Il a également été signalé que chez les plantes stressées le glutamate serait synthétisé par la glutamate déshydrogénase (EC. 1.4.1.2) dans la mitochondrie (Lutts *et al.*, 1999). La voie mitochondriale de synthèse du glutamate devrait être impliquée lors de la réduction foliaire tardive puisque nous avons observé une production de proline sans activation de l'IDH cytoplasmique. Comme nous n'avons pas observé 48h après la réduction foliaire une augmentation des niveaux de transcrits de la P5CS la voie de l'ornithine serait impliquée dans l'accumulation de proline, ce qui devra être vérifié. En revanche, une semaine après la réduction foliaire la formation de proline proviendrait totalement ou en partie de la voie du glutamate puisque les niveaux des transcrits de la P5CS sont augmentés. Lors de la réduction tardive, il n'y a pas d'activation de la voie du GABA « shunt » mais de la voie de la proline. Ou bien la dégradation des protéines pourrait entraîner une libération de proline.

Dans la cellule, les sucres peuvent agir comme des osmolytes et permettre le maintien de la turgescence (Sharp *et al.*, 2004). La limitation des apports carbonés effectuée tardivement entraînerait un stress osmotique, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des quantités de proline puisque la proline est connue pour permettre l'ajustement osmotique du cytoplasme (Hare et Cress, 1997). De plus, la proline jouerait un rôle dans l'élimination des ROS (Arbona *et al.*, 2003) qui pourraient être produites suite à la limitation des apports carbonés (Contento *et al.*, 2004).

Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans la compréhension des mécanismes d'acidification et d'accumulation de sucres chez les agrumes. Nous nous sommes intéressés au groupe d'acidité intermédiaire (orange, clémentine et mandarine) qui perdent leur acidité au cours de la maturation (stade III). Cependant, depuis plusieurs années, une accélération de ce phénomène est observée pouvant, dans le cas de l'IGP « Clémentine de Corse », entraîner une impossibilité de conserver l'IGP, une acidité minimum devant être respectée dans le cahier des charges. Notre hypothèse est que ce phénomène est dû aux automnes de plus en plus doux induisant une augmentation de la respiration des fruits, à une période au cours de laquelle la photopériode est assez courte. Ceci se traduirait par un déséquilibre carboné et une utilisation accrue et prématurée des acides organiques stockés dans la vacuole. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons provoqué un déséquilibre carboné par une défoliation partielle soit en début soit en milieu de stade II qui est la phase de grossissement cellulaire durant laquelle les sucres et les acides organiques s'accumulent dans la vacuole des cellules des sacs à jus. Notre modèle d'étude est la mandarine car c'est l'un des parents du clémentinier et elle possède une variabilité sur le caractère acide plus importante que le clémentinier.

Nous avons réalisé une première réduction foliaire (SFR1), au début du stade II, et nous avons étudié son impact à court terme (48h et une semaine) mais également à long terme (7 semaines) pour savoir si le fruit réagirait au déséquilibre carboné. L'impact de la réduction foliaire sur les quantités de saccharose est peu marqué par rapport au témoin à 48h et une semaine, mais également pendant les 40 premiers jours. Puis, il s'accroît nettement au cours de la maturation du fruit. A court terme, les quantités de glucose et fructose sont similaires à celles du témoin alors que nous observons une augmentation de l'activité de la PFK dont le substrat est le glucose et le fructose. Ceci permet de supposer que l'alimentation en glucose et en fructose du flux de la glycolyse proviendrait d'une remobilisation depuis la vacuole, à partir du saccharose stocké, l'invertase acide étant effectivement plus sollicitée comme l'indique son activité enzymatique accrue. L'activation de la glycolyse va permettre la production de l'acide citrique *via* le cycle de Krebs pour sauvegarder la pression osmotique. La réaction anaplérotique catalysée par la PEPC semble donc privilégiée et l'acide malique ainsi formé va entrer dans la mitochondrie pour permettre la synthèse d'oxaloacétate et ainsi maintenir la production d'acide citrique. De plus, l'acide citrique stocké semble également être remobilisé depuis la vacuole, du fait de la

surexpression du gène codant pour CsCit 1. L'acide citrique ainsi déstocké est vraisemblablement métabolisé par la NADP-IDH puisque l'activité enzymatique est augmentée. L' α -cétoglutarate formé par l'action de la NADP-IDH est ensuite transformé en glutamate puis en GABA. La voie du GABA « shunt » semble favorisée puisque l'expression du gène codant pour la SSADH est augmentée. Du fait que la limitation en apports carbonés est susceptible d'entraîner la formation de ROS, la mobilisation de la voie du GABA « shunt » permettrait de limiter l'accumulation de ROS par l'action de la SSADH qui fournit du NADH à la chaîne respiratoire et du succinate.

Nous avons ensuite regardé ce qui s'est passé 7 semaines après la réduction foliaire précoce puisque le fruit subit un déséquilibre carboné pendant tout le stade II et au début du stade III. L'apport carboné a été affecté puisque les quantités de saccharose ont fortement diminué par rapport au témoin. Par contre, comme les quantités de glucose et de fructose ne sont pas significativement différentes du témoin, il aurait pu y avoir un déstockage depuis la vacuole, l'activité enzymatique de l'invertase étant augmentée. L'activité de la PEPC est augmentée pour permettre la production d'acide malique. Les quantités d'acide citrique ne sont plus significativement différentes du témoin. Il y a un déstockage de l'acide citrique depuis la vacuole par CsCit1 mais pas d'activation de la voie du GABA shunt ce qui est compatible avec l'hypothèse que cette voie ne serait activée que par un stress, ce qui est le cas 48h après la réduction foliaire, mais pas à long terme. Lorsque la cellule est en phase d'accumulation des acides organiques (7 semaines), elle a privilégié la synthèse d'acide citrique. Par contre, même si le fruit a pu s'adapter au déséquilibre carboné en mobilisant les pools vacuolaires de glucose, de fructose et d'acide citrique, il y a eu un impact important sur le calibre et le poids des fruits. Il faut également rappeler que les quantités d'acide citrique en début de stade III sont similaires à celles du témoin. Il serait intéressant de continuer les expérimentations plus longtemps au cours du stade III pour savoir si nous avons pu limiter la diminution d'acide citrique. Dans cette situation de déséquilibre carboné précoce, s'il y a bien un impact fort, à court terme, sur l'acidité par une diminution marquée, un nouvel équilibre semble pouvoir s'installer avec une limitation de la croissance pour s'adapter aux nouvelles conditions d'assimilation du carbone.

Nous avons également effectué une réduction foliaire tardive lors de la phase d'accumulation du saccharose et de l'acide citrique. Nous n'avons étudié l'impact de la réduction foliaire qu'à court terme (48h et une semaine).

Les quantités de saccharose, glucose et fructose sont très fortement affectées 48h après la réduction foliaire tardive. Cette chute des quantités de sucres entraîne une diminution de l'activité enzymatique de la PFK, ce qui diminue le flux glycolytique. L'activité enzymatique de l'invertase n'est pas significativement différente du témoin, il n'y a donc probablement pas de déstockage depuis la vacuole. Parallèlement, l'activité de la PEPC est fortement augmentée pour favoriser la synthèse d'acide malique qui fournira l'oxaloacétate nécessaire à la synthèse d'acide citrique. De plus, les quantités d'acide malique et citrique chutent également très brutalement. Par ailleurs, il semble y avoir un déstockage d'acide citrique depuis la vacuole au vu de la très forte augmentation des niveaux de transcrits du gène codant pour CsCit1. Nous avons également observé une formation importante de proline qui provient du glutamate. Comme nous n'avons pas observé d'augmentation des niveaux de transcrits de la P5CS, la voie de l'ornithine serait impliquée, ceci mériterait d'être vérifié par la mesure de l'activité enzymatique de l'ornithine- δ -aminotransférase (Roosens *et al.*, 1998).

En revanche, une semaine après la réduction foliaire les quantités d'acide malique sont toujours inférieures à celle du témoin alors que les quantités d'acide citrique sont proches de celles observées chez le témoin. Les niveaux des transcrits de la P5CS sont augmentés, la formation de proline proviendrait donc totalement ou en partie de la voie du glutamate. Lors de la réduction tardive, il n'y a pas d'activation de la voie du GABA « shunt » mais de la voie de la proline. Lorsque la réduction foliaire est tardive, le calibre et le poids frais des fruits est réduit également par rapport à celui des fruits témoins. Comme ce qui a été observé lors de la réduction foliaire précoce, nous constatons donc que les fruits ne sont pas capables de compenser la réduction des apports carbonés (poids et calibre) que la réduction foliaire soit précoce ou plus tardive au cours du stade II. En début de stade III, les quantités d'acide citrique sont supérieures à celle du témoin. Il serait donc important d'évaluer l'impact à long terme de la réduction foliaire tardive et réaliser les mêmes mesures à au-delà de 220 jours de développement pour vérifier l'effet à plus long terme.

Nous avons remarqué que la réduction foliaire tardive semble entraîner une stabilisation de la quantité d'acide citrique alors que chez les témoins les quantités d'acide citrique diminuent, mais les quantités de saccharose dans le fruit ont chuté de moitié. Cette modification pourrait avoir une incidence sur la qualité organoleptique du fruit. Nos résultats ne semblent que partiellement répondre à l'hypothèse que nous avons formulée

d'une diminution accrue de l'acidité dans les fruits due à un déséquilibre carboné. Nous pouvons donc nous demander si les périodes pour les défoliations, notamment la seconde défoliation, n'était pas trop précoce en saison. Il pourrait être nécessaire de retarder encore plus la défoliation. Et donc étudier l'effet d'une défoliation juste avant la maturation, moment où la croissance du fruit est faible. Ou bien, étudier l'effet de plusieurs petits déséquilibres carbonés successifs par un système d'ombrage et de désombrage afin de limiter la diminution de la taille des fruits.

Nos modèles devront être confortés par la mesure d'autres activités enzymatiques ou le dosage d'autres métabolites. Il est important de mesurer l'activité enzymatique de l'enzyme malique pour évaluer son implication chez le témoin et lors des deux réductions foliaires. Lors de la réduction foliaire précoce, il sera utile de doser le GABA, la succinate semialdéhyde déshydrogénase, et la phosphoenolpyruvate carboxykinase pour évaluer si une resynthèse de sucres s'est produite ou non.

Lors de la réduction tardive, il est important de s'intéresser à la voie de l'ornithine et d'observer l'impact à long terme de cette réduction sur les différentes voies métaboliques puisque nos résultats ne montrent que l'effet à court terme de la réduction foliaire tardive.

Nous pourrions également réaliser le même type de travail sur des clones du groupe des mandariniers contrastés en termes d'acidité (très acides, acides et doux). Nous pourrions envisager d'étudier des cybrides (mandarine x citron) qui sont caractérisés par la coexistence de mitochondries qui proviennent du parent mandarine avec des chloroplastes/chromoplastes et de noyaux en provenance du parent citron.

Il serait également intéressant de confirmer ou non l'hypothèse de la formation de ROS lors des deux réductions foliaires ce qui nous permettrait de savoir si la voie du GABA « shunt », lors de la réduction foliaire précoce, ou bien la formation de proline, lors de la réduction foliaire tardive, sont fortement sollicitées afin de lutter contre le stress oxydatif provenant de la réduction des apports carbonés. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'un stress photooxydatif chez le mandarinier se traduit par une accumulation importante d' H_2O_2 et de MDA, dans les feuilles. Les augmentations d'activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, ascorbate peroxydase...) sont insuffisantes pour pallier à la quantité de ROS produites. Il serait intéressant de savoir si les mêmes mécanismes ont été mis en place dans le fruit dans des conditions expérimentales similaires à celles que nous avons créées.

De plus, pour répondre à l'hypothèse du changement climatique comme facteur principal responsable de la diminution de l'acidité de la pulpe des fruits d'agrumes à maturité, il serait nécessaire d'étudier l'impact des autres facteurs mis en cause dans le changement climatique tels que l'élévation des teneurs en CO₂, l'élévation des températures et de la diminution de la disponibilité en eau. L'étude de ces différents facteurs, nécessiteraient d'être en conditions contrôlées, sur plantes en pots et de combiner ces différents facteurs.

Références bibliographiques

- Aharoni Y.** 1968. Respiration of oranges and grapefruits harvested at different stages of development. *Plant Physiology* **43**, 99-102.
- Albertini MV.** 2007. Caractérisation biochimique et moléculaire des fruits d'agrumes (*Citrus* Sp.). Modèle métabolique d'utilisation des acides organiques et des sucres, Université de Corse, 138p.
- Andersen P, Brodbeck B.** 1989. Chemical composition of xylem exudate from bleeding spurs of *Vitis rotundifolia* Noble and *Vitis* hybrid Suwannee in relation to pruning date. *American journal of enology and viticulture* **40**, 155-160.
- Aprile A, Federici C, Close T, J., De Bellis L, Cattivelli L, Roose M, L.** 2011. Expression of the H⁺-ATPase AHA10 proton pump is associated with citric acid accumulation in lemon juice sac cells. *Functional & Integrative Genomics* **11**, 551-563.
- Arbona V, Flors V, Jacas J, García-Agustín P, Gómez-Cadenas A.** 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant and Cell Physiology* **44**, 388-394.
- Aristoy MC, Orlando L, Navarro JL, Sendra JM, Izquierdo L.** 1989. Characterization of Spanish orange juice for variables used in purity control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**, 596-600.
- Armengaud P, Thierry L, Buhot N, Grenier-de March G, Savouré A.** 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum* **120**, 442-450.
- Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R.** 1996. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *The Journal of cell biology* **133**, 1251-1263.
- Bain JM.** 1958. Morphological, anatomical, and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, *Citrus sinensis* (L) Osbeck. *Australian Journal of Botany* **6**, 1-23.
- Baldet P, Devaux C, Chevalier C, Brouquise R, Just D, Raymond P.** 2002. Contrasted responses to carbohydrate limitation in tomato fruit at two stages of development. *Plant, Cell & Environment* **25**, 1639-1649.
- Barkley N, Roose M, Krueger R, Federici C.** 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* **112**, 1519-1531.
- Barrett H, Rhodes A.** 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Systematic Botany* **1**, 105-136.
- Bayer RJ, Mabberley DJ, Morton C, Miller CH, Sharma IK, Pfeil BE, Rich S, Hitchcock R, Sykes S.** 2009. A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany* **96**, 668-685.

Beidler J, Hilliard P, Rill R. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemistry* **126**, 374-380.

Bogin E, Wallace A. 1966. Organic acid synthesis and accumulation in sweet and sour lemon fruits. *American society for horticultural science* **89**, 182-194.

Botha FC, Cawood MC, Small JGC. 1988. Kinetic properties of the ATP-dependent phosphofructokinase isoenzymes from cucumber seeds. *Plant and Cell Physiology* **29**, 415-421.

Bouche N, Fait A, Bouchez D, Moller SG, Fromm H. 2003. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gamma-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6843-6848.

Bouche N, Fromm H. 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* **9**, 110-115.

Bown AW, Shelp BJ. 1997. The metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Plant Physiology* **115**, 1-5.

Brouquisse R, James F, Pradet A, Raymond P. 1992. Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* **188**, 384-395.

Brune A, Gonzalez P, Goren R, Zehavi U, Echeverria E. 1998. Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. *Journal of Membrane Biology* **166**, 197-203.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*: American Society of Plant Physiologists Rockville.

Bustin S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* **25**, 169-193.

Calabrese F. 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 35-38.

Canel C, Baileyserres JN, Roose ML. 1995. In vitro [C-14] citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless Citrus juice cells. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**, 510-514.

Carroll AD, Fox GG, Laurie S, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR. 1994. Ammonium assimilation and the role of γ -aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiology* **106**, 513.

Castel J, Buj A. 1990. Response of Salustiana oranges to high frequency deficit irrigation. *Irrigation Science* **11**, 121-127.

- Castle W, Tucker D, Krezdorn A, Youtsey C.** 1993. Rootstocks for Florida citrus. *Gainesville: University of Florida.*
- Cawood ME, Botha FC, Chris JGS.** 1988. Molecular properties of the ATP: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase isoenzymes from *Cucumis sativus*. *Plant and Cell Physiology* **29**, 195-199.
- Cercos M, Soler G, Iglesias DJ, Gadea J, Forment J, Talon M.** 2006. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. *Plant Molecular Biology* **62**, 513-527.
- Chen M, Jiang Q, Yin X-R, Lin Q, Chen J-Y, Allan AC, Xu C-J, Chen K-S.** 2012. Effect of hot air treatment on organic acid-and sugar-metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit. *Scientia Horticulturae* **147**, 118-125.
- Chen MH, Liu LF, Chen YR, Wu HK, Yu SM.** 1994. Expression of amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *The Plant Journal* **6**, 625-636.
- Chen R, Gadal P.** 1990. Do the mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? *Plant Physiology and Biochemistry* **28**, 141-145.
- Chisholm MG, Jell JA, Cass DM.** 2003. Characterization of the major odorants found in the peel oil of *Citrus reticulata* Blanco cv. Clementine using gas chromatography–olfactometry. *Flavour and fragrance journal* **18**, 275-281.
- Chollet R, Vidal J, Oleary MH.** 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 273-298.
- Coletta Filho H, Machado M, Targon M, Moreira M, Pompeu J.** 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* **102**, 133-139.
- Contento AL, Kim S-J, Bassham DC.** 2004. Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiology* **135**, 2330-2347.
- Coombe BG.** 1987. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Horticulturae* **206**, 23-35.
- Cottin R.** 2002. Citrus of the World, A Citrus Directory Version 2. *SRA INRA-CIRAD, France.*
- de Moraes AP, dos Santos Soares Filho W, Guerra M.** 2007. Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Research* **15**, 115-121.
- Delauney AJ, Verma DPS.** 2002. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**, 215-223.
- Delauney AJ, Verma DPS.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* **4**, 215-223.

- Deng Z, Gentile A, Nicolosi E, Continella G, Tribulato E.** 1996. Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. *Proceeding International Society of Citriculture* **2**, 849-854.
- Dennis DT, Greyson MF.** 2006. Fructose 6-phosphate metabolism in plants. *Physiologia Plantarum* **69**, 395-404.
- Dickson RE.** 1990. *Assimilate distribution and storage.*
- Dieuaide-Noubhani M, Canioni P, Raymond P.** 1997. Sugar-starvation-induced changes of carbon metabolism in excised maize root tips. *Plant Physiology* **115**, 1505-1513.
- Dieuaide M, Brouquisse R, Pradet A, Raymond P.** 1992. Increased fatty acid β -oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiology* **99**, 595-600.
- Dirlewanger E, Moing A, Rothan C, Svanella L, Pronier V, Guye A, Plomion C, Monet R.** 1999. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 18-31.
- Eaks IL.** 1970. Respiratory response, ethylene production, and response to ethylene of citrus fruit during ontogeny. *Plant Physiology* **45**, 334-338.
- Echeverria E.** 1990. Developmental transition from enzymatic to acid-hydrolysis of sucrose in acid limes (*Citrus aurantifolia*). *Plant Physiology* **92**, 168-171.
- Echeverria E, Burns JK.** 1989. Vacuolar acid-hydrolysis as a physiological mechanism for sucrose breakdown. *Plant Physiology* **90**, 530-533.
- Echeverria E, Valich J.** 1988. Carbohydrate and enzyme distribution in protoplasts from Valencia orange juice sacs. *Phytochemistry* **27**, 73-76.
- Erickson L.** 1968. The general physiology of citrus. *The citrus industry* **2**, 86-126.
- Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR.** 2008. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* **13**, 14-19.
- Fanciullino AL, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P.** 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4397-4406.
- Fishler M, Goldschmidt EE, Monselise SP.** 1983. Leaf area and fruit size in girdled grapefruit branches. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**, 218-221.
- Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene J-B, Costantino G, Kamiri M, Luro F, Morillon R, Ollitrault P.** 2011. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes* **7**, 49-61.
- García-Lor A, Luro F, Navarro L, Ollitrault P.** 2012. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 77-94.

- García-Tejero I, Jiménez-Bocanegra J, Martínez G, Romero R, Durán-Zuazo V, Muriel-Fernández J.** 2010. Positive impact of regulated deficit irrigation on yield and fruit quality in a commercial citrus orchard [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck, cv. salustiano]. *Agricultural Water Management* **97**, 614-622.
- Génard M, Lescourret F, Ben Mimoun M, Besset J, Bussi C.** 1998. A simulation model of growth at the shoot-bearing fruit level. II. Test and effect of source and sink factors in the case of peach. *European Journal of Agronomy* **9**, 189-202.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M.** 2004. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *The Plant Cell Online* **16**, 3304-3325.
- Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M.** 2002. Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *The Plant Journal* **30**, 221-235.
- Gibson U, Heid C, Williams P.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research* **6**, 995-1001.
- Gmitter FG, Ollitrault P, Machado MA, Reforgiato Recupero G, Talon M, Roose ML, Navarro JL, Wu G, Jaillon O, Morgante M, Rokhsar DS.** 2012. Genome sequence analysis and comparisons reveal ancestral hybridization and admixture events in the origins of some citrus cultivars. *XII international citrus congress Valencia, Spain*, 61.
- Goldschmidt E.** 1988. Regulatory aspects of chloro-chromoplast interconversions in senescing Citrus fruit peel. *Israel journal of botany* **37**, 123-130.
- Goldschmidt E, Huberman M, Goren R.** 1993. Probing the role of endogenous ethylene in the degreening of citrus fruit with ethylene antagonists. *Plant growth regulation* **12**, 325-329.
- Goldschmidt EE.** 1999. Carbohydrate supply as a critical factor for citrus fruit development and productivity. *Hortscience* **34**, 1020-1024.
- Goldschmidt EE.** 1997. Effect of climate on fruit development and maturation. *Citrus Flowering & Fruiting Short Course, April*, 93-97.
- Goldschmidt EE, Koch K, Zamski E, Schaffer A.** 1996. Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-sink relationships. *Marcel Dekker: New York*, 797-823.
- 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.

- González-Altozano P, Castel J.** 1999. Regulated deficit irrigation in 'Clementina de Nules' citrus trees. I. Yield and fruit quality effects. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **74**, 706-713.
- Goren R, Huberman M, Zehavi U, Chen-Zion M, Echeverria E.** 2000. Sugar utilization by citrus juice cells as determined by [14C]-sucrose and [14C]-fructose feeding analyses. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 507-515.
- Grosser JW, An HJ, Calovic M, Lee DH, Chen C, Vasconcellos M, Gmitter FG.** 2010. Production of new allotetraploid and autotetraploid citrus breeding parents: focus on zipperskin mandarins. *Hortscience* **45**, 1160-1163.
- Hanning I, Heldt HW.** 1993. On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves (partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products). *Plant Physiology* **103**, 1147-1154.
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, Hendriks MMWB, Smeekens S.** 2008. The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of asparagine synthase1 and proline dehydrogenase2. *The Plant Journal* **53**, 935-949.
- Hardy P.** 1968. Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant Physiology* **43**, 224-228.
- Hare P, Cress W.** 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation* **21**, 79-102.
- Hirai M.** 1978. Development of Citrus-fruits.2. NAD malic enzyme from Citrus-fruit. *Phytochemistry* **17**, 1507-1510.
- Hodgson RW.** 1967. *Horticultural varieties of citrus*: University of California, Division of Agricultural Sciences.
- Hopkins WG.** 2003. *Physiologie végétale*, 1re éd. Bruxelles: De Boeck, xvii, 215-216.
- Hu C, Delauney AJ, Verma D.** 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 9354-9358.
- Hutton R, Landsberg J, Sutton B.** 2007. Timing irrigation to suit citrus phenology: a means of reducing water use without compromising fruit yield and quality? *Australian Journal of Experimental Agriculture* **47**, 71-80.
- Hutton RJ, Landsberg JJ.** 2000. Temperature sums experienced before harvest partially determine the post-maturation juicing quality of oranges grown in the Murrumbidgee Irrigation Areas (MIA) of New South Wales. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 275-283.

- Iglesias D, Lliso I, Tadeo F, Talon M.** 2002. Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves. *Physiologia Plantarum* **116**, 563-572.
- Iglesias D, Tadeo F, Primo-Millo E, Talon M.** 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *Tree physiology* **23**, 199-204.
- Iglesias DJ, Cercos M, Colmenero-Flores JM, Naranjo MA, Rios G, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lliso I, Morillon R, Tadeo FR, Talon M.** 2007. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**, 333-362.
- Imbert E.** 2005. Les agrumes de Méditerranées. *Fruitrop* **122**, 4-6.
- Journet EP, Bligny R, Douce R.** 1986. Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 3193-3199.
- Karadeniz F.** 2004. Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry* **28**, 267-271.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M.** 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* **134**, 824-837.
- Kim Y, Lounds-Singleton AJ, Talcott ST.** 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* **115**, 989-993.
- Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **8**, 1323-1335.
- Knowles VL, Greyson MF, Dennis DT.** 1990. Characterization of ATP-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase isozymes from leaf and endosperm tissues of *Ricinus communis*. *Plant Physiology* **92**, 155-159.
- Kruger NJ.** 1990. Carbohydrate synthesis and degradation. *Plant physiology, biochemistry and molecular biology* **1**, 59-76.
- Kubo T, Kihara T, Hirabayashi T.** 2002. The effects of spraying lead arsenate on citrate accumulation and the related enzyme activities in the juice sacs of citrus natsudaidai. *Journal Japanese Society for Horticultural Science* **71**, 305-310.
- Lai R, Woolley D, Lawes G.** 1989. Effect of leaf to fruit ratio on fruit growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Scientia Horticulturae* **39**, 247-255.
- Larher F, Leport L, Petrivalsky M, Chappart M.** 1993. Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**, 911-922.

- Lea PJ, Azevedo RA.** 2006. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. *Annals of Applied Biology* **149**, 243-247.
- Léchaudel M, Genard M, Lescourret F, Urban L, Jannoyer M.** 2002. Leaf-to-fruit ratio affects water and dry-matter content of mango fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **77**, 773-777.
- Léchaudel M, Joas J, Caro Y, Génard M, Jannoyer M.** 2005. Leaf: fruit ratio and irrigation supply affect seasonal changes in minerals, organic acids and sugars of mango fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 251-260.
- Lee CP, Eubel H, Millar AH.** 2010. Diurnal changes in mitochondrial function reveal daily optimization of light and dark respiratory metabolism in Arabidopsis. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 2125-2139.
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D.** 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* **39**, 949-962.
- Leigh R.** 1997. Solute composition of vacuoles. *Advances in Botanical Research* **25**, 171-194.
- Lemaitre T, Urbanczyk-Wochniak E, Flesch V, Bismuth E, Fernie AR, Hodges M.** 2007. NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of Arabidopsis suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiology* **144**, 1546.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402-408.
- Luro F, Gatto J, Costantino G, Pailly O.** 2011. Analysis of genetic diversity in Citrus. *Plant Genetic Resources* **9**, 218-221.
- Luro F, Rist D, Ollitrault P.** 2000. Evaluation of genetic relationships in Citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. International Society for Horticultural Science, 237-242.
- Lutts S, Majerus V, Kinet JM.** 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **105**, 450-458.
- Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA.** 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* **31**, 699-712.
- Marsh K, Erner Y, Gonzalez P, Echeverría E.** 2003. The H⁺ translocating vacuolar pyrophosphatase in acidless citrus cultivars. *Proceedings of the International Society of Citriculture, 9th Congress 2000, Orlando, Florida*, 672-673.
- Mataa M, Tominaga S, Kozaki I.** 1998. The effect of time of girdling on carbohydrate contents and fruiting in Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). *Scientia Horticulturae* **73**, 203-211.

- Mehouachi J, Serna D, Zaragoza S, Agusti M, Talon M, Primo-Millo E.** 1995. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Science* **107**, 189-197.
- Milind SL.** 2008. Citrus fruit: biology, technology and evaluation. *Elsevier USA* **1**, 103-121.
- Mohanty P, Matysik J.** 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* **21**, 195-200.
- Moing A, Rothan C, Svanella L, Just D, Diakou P, Raymond P, Gaudillère J, Monet R.** 2000. Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in organic acid accumulation during peach fruit development. *Physiologia Plantarum* **108**, 1-10.
- Monselise S, Halevy A.** 1985. Citrus and related species. *Handbook of fruit set and flowering* **2**, 275-294.
- Moretti C, Mattos L, Calbo A, Sargent S.** 2010. Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: a review. *Food Research International* **43**, 1824-1832.
- Mougheith M, El-Ashram M, Amerhom G, Madbouly M.** 1977. Effect of different rates of irrigation on Navel orange trees. 2. Yield and fruit quality. *Annals of Agricultural Science Moshtohor* **8**, 119-128.
- Muller ML, IrkensKiesecker U, Kramer D, Taiz L.** 1997. Purification and reconstitution of the vacuolar H⁺-ATPases from lemon fruits and epicotyls. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 12762-12770.
- Nakashima K, Satoh R, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 1998. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of Arabidopsis. *Plant Physiology* **118**, 1233-1241.
- Narayan VS, Nair PM.** 1990. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* **29**, 367-375.
- Navarro JM, Pérez-Pérez JG, Romero P, Botía P.** 2010. Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry* **119**, 1591-1596.
- Nicolosi E.** 2007. 3 Origin and Taxonomy. *Citrus genetics, breeding and biotechnology*, 19-43.
- Nicolosi E, Deng Z, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E.** 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 1155-1166.
- Nicotra A.** 2001. Mandarin-like hybrids of recent interest for fresh consumption. Problems and ways of control. *Citrus symposium, China*, 14-17.
- Nowak RS, Caldwell MM.** 1984. A test of compensatory photosynthesis in the field: implications for herbivore tolerance. *Oecologia* **61**, 311-318.

- Ollat N, Gaudillere J.** 1998. The effect of limiting leaf area during stage I of berry growth on development and composition of berries of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *American journal of enology and viticulture* **49**, 251-258.
- Ollitrault P, Jacquemond C, Dubois C, Luro F.** 2003. Citrus. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. *Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C (Eds.). Science Publishers Inc*, 193-217.
- Ollitrault P, Terol J, Garcia-Lor A, Bérard A, Chauveau A, Froelicher Y, Belzile C, Morillon R, Navarro L, Brunel D.** 2012. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *Bmc Genomics* **13**, 13-32.
- Pailly O, Tison G, Amouroux A.** 2004. Harvest time and storage conditions of 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) for short distance summer consumption. *Postharvest biology and technology* **34**, 65-73.
- Papavinasundaram K, Chan B, Chung JH, Colston MJ, Davis EO, Av-Gay Y.** 2005. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* pknH gene confers a higher bacillary load during the chronic phase of infection in BALB/c mice. *Journal of Bacteriology* **187**, 5751-5760.
- Peng Y, Rabe E.** 1998. Effect of differing irrigation regimes on fruit quality, yield, fruit size and net CO₂ assimilation of Mihowase satsuma. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**, 229-234.
- Peng Y, Rabe E.** 1996. Effect of summer trunk girdling on fruit quality, maturation, yield, fruit size and tree performance in 'Mihowase' satsumas. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **71**, 581-590.
- Pesci P.** 1993. Glucose mimics the enhancing effect of light on ABA-induced proline accumulation in hydrated barley and wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* **142**, 355-359.
- Pierre J, Queiroz O.** 1979. Regulation of glycolysis and level of the Crassulacean acid metabolism. *Planta* **144**, 143-151.
- Praloran J.** 1971. Les Agrumes. *Techniques Agricoles et Productions Tropicales, France*.
- Rahman MM, Nito N.** 1994. Phylogenetic relationships in the kumquat (*Fortunella*) as revealed by isozyme analysis. *Scientia Horticulturae* **57**, 17-28.
- Ratajczak R, Luttge U, Gonzalez P, Etxeberria E.** 2003. Malate and malate-channel antibodies inhibit electrogenic and ATP-dependent citrate transport across the tonoplast of citrus juice cells. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1313-1317.
- Rea PA, Sanders D.** 1987. Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* **71**, 131-141.
- Recupero GR, Russo G, Recupero S.** 2005. New promising Citrus triploid hybrids selected from crosses between monoembryonic diploid female and tetraploid male parents. *Hortscience* **40**, 516-520.

- Rentsch D, Martinoia E.** 1991. Citrate transport into barley mesophyll vacuoles—comparison with malate-uptake activity. *Planta* **184**, 532-537.
- Richardson AC, Marsh K, Macrae E.** 1997. Temperature effects on satsuma mandarin fruit development. *Journal of Horticultural Science* **72**, 919-929.
- Rivas F, Erner Y, Alós E, Juan M, Almela V, Agustí M.** 2006. Girdling increases carbohydrate availability and fruit-set in citrus cultivars irrespective of parthenocarpic ability. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **81**, 289-295.
- Rook F, Gerrits N, Kortstee A.** 1998. Sucrose specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *The Plant Journal* **15**, 253-263.
- Roosens NH, Thu TT, Iskandar HM, Jacobs M.** 1998. Isolation of the ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **117**, 263-271.
- Rothan C, Duret S, Chevalier C, Raymond P.** 1997. Suppression of ripening-associated gene expression in tomato fruits subjected to a high CO₂ concentration. *Plant Physiology* **114**, 255-263.
- Ruiz R, García-Luis A, Monerri C, Guardiola J.** 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in Citrus. *Annals of Botany* **87**, 805-812.
- Sadka A, Artzi B, Cohen L, Dahan E, Hasdai D, Tagari E, Erner Y.** 2000a. Arsenite reduces acid content in citrus fruit, inhibits activity of citrate synthase but induces its gene expression. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**, 288-293.
- Sadka A, Dahan E, Cohen L, Marsh KB.** 2000b. Aconitase activity and expression during the development of lemon fruit. *Physiologia Plantarum* **108**, 255-262.
- Sadka A, Dahan E, Or E, Cohen L.** 2000c. NADP(+)-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Science* **158**, 173-181.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 1. *Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor*
- Sanz ML, Villamiel M, Martinez-Castro I.** 2004. Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry* **87**, 325-328.
- Scheible WR, Krapp A, Stitt M.** 2008. Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell & Environment* **23**, 1155-1167.
- Schindler U, Sans N, Schröder J.** 1989. Ornithine cyclodeaminase from octopine Ti plasmid Ach5: identification, DNA sequence, enzyme properties, and comparison with gene and enzyme from nopaline Ti plasmid C58. *Journal of Bacteriology* **171**, 847-854.

- Schirra M, D'Aquino S, Palma A, Angioni A, Cabras P.** 2008. Factors affecting the synergy of thiabendazole, sodium bicarbonate, and heat to control postharvest green mold of citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 10793-10798.
- Schneider H.** 1954. Effect of trunk girdling on phloem of trunk of sweet orange trees on sour orange rootstock. *Hilgardia* **22**, 593-601.
- Scora R, Kumamoto J, Soost R, Nauer E.** 1982. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). *Systematic Botany*, 170-177.
- Scora RW.** 1975. On the history and origin of citrus. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **102**, 369-375.
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT.** 2004. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2343-2351.
- Shimada T, Nakano R, Shulaev V, Sadka A, Blumwald E.** 2006. Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells. *Planta* **224**, 472-480.
- Simões Júnior AR, Mourão Filho FAA, Araújo PSR, Piedade SMS, Jacomino ÂP.** 1999. Fruit quality of 'Pera' sweet orange affected by different girdling methods. *Scientia Agricola* **56**, 529-535.
- Sinclair WB.** 1984. The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits. *The Regents of the University of California (Ed.). Oakland, California: University of California*, 946 p.
- Souplet P.** 2002. Estimation du rapport feuilles/fruit nécessaire à la croissance potentielle chez la clémentine et ses conséquences sur l'accumulation des sucres et des acides.
- Spiegel-Roy P, Goldschmidt EE.** 1996. *Biology of citrus*: Cambridge Univ Pr.
- Stewart CR, Morris CJ, Thompson JF.** 1966. Changes in Amino Acid Content of Excised Leaves During Incubation. III. Role of Sugar in the Accumulation of Proline in Wilted Leaves. *Plant Physiology* **41**, 1585-1590.
- Stone BC.** 1985. New and noteworthy paleotropical species of Rutaceae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 213-228.
- Swingle WT.** 1915. A new genus, Fortunella, comprising four species of kumquat oranges. Washington Academy of Sciences.
- Swingle WT, Reece PC.** 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. *The citrus industry, Reuther W., Batchlor L.D., Webber H.J. (Eds). Berkeley, Etats-unis: University of California Press I*, 190-430.
- Syvertsen J, Goñi C, Otero A.** 2003. Fruit load and canopy shading affect leaf characteristics and net gas exchange of 'Spring' navel orange trees. *Tree physiology* **23**, 899-906.

- Tadeo FR, Cercos M, Colmenero-Flores JM, Iglesias DJ, Naranjo MA, Rios G, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Lliso I, Morillon R, Ollitrault P, Talon M.** 2008. Molecular physiology of development and quality of citrus. *Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology* **47**, 147-223.
- Taiz L, Zeiger E.** 2006. Plant physiology (2006). *Sunderland, MA: Sinaur Associates Inc*, 764p.
- Tanaka T.** 1977. Fundamental discussion of Citrus classification. *Studia Citrologica* **14**, 1-6.
- Tanaka T.** 1954. Species problem in Citrus. *Tokyo: Japanese Society for the Promotion of Science* **7**.
- Tang M, Bie Z-l, Wu M-z, Yi H-p, Feng J-x.** 2010. Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. *Scientia Horticulturae* **123**, 360-365.
- Ting S, Attaway J.** 1971. Citrus fruits. *The biochemistry of fruits and their products* **2**, 107-169.
- Troll W, Lindsley J.** 1955. A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry* **215**, 655-660.
- Turk R, Peter't Hoen ES, de Menezes R, de Meijer E, Boer J, van Ommen GJ, den Dunnen J.** 2004. Gene expression variation between mouse inbred strains. *Bmc Genomics* **5**, 57-65.
- Tzur A, Goren R, Zehavi U.** 1992. Carbohydrate metabolism in developing citrus fruits. . *Proceedings of the International Society of Citriculture, 7th Congress, Acireale, Italy*, 405-411.
- Uedan K, Sugiyama T.** 1976. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiology* **57**, 906-910.
- Ulrich J.** 1970. Organic acids. In: *The biochemistry of fruits and their products. Hulme A.C. (Ed.). London and New York: Academic Press* **1**, 89-117.
- Vandercook C.** 1977. Organic acids. *Citrus Fruit Technology. Avi Publishing, Westport, CT*, 209-227.
- Webber H.** 1943. Cultivated varieties of citrus. *The citrus industry* **1**, 475-668.
- Webber H.** 1967. History and developpement of citrus industry. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The citrus industry, vol. 1. University of California Press, Berkeley*, 1-39.
- Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM.** 1999. Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes *Vitro** **1. Analytical Biochemistry** **270**, 41-49.
- Winters HF.** 1976. *Microcitrus papuana*, a new species from Papua New Guinea (Rutaceae). *Baileya* **20**, 19-24.

Wutscher H. 1977. The influence of rootstocks on yield and quality of red grapefruit in Texas. Vol. 2, 526-529.

Wutscher H. 1988. Rootstock effects on fruit quality. *Short course Proceedings at Agricultural research & Education Center Ft. Pierce. Citrus research and Education Center. Lake Alfred. FL.*

Yamanishi OK, Nakajima Y, Hasegawa K. 1995. Effect of trunk strangulation degrees in late season on return bloom, fruit quality and yield of pummelo trees grown in a plastic house. *Journal Japanese Society for Horticultural Science* **64**, 31-31.

Yu S. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiology* **121**, 687-693.

Ziena H. 2000. Quality attributes of Bearss Seedless lime (*Citrus latifolia* Tan) juice during storage. *Food Chemistry* **71**, 167-172.

Annexes

Étude et modélisation des mécanismes physiologiques de l'acidification de la pulpe des agrumes en conditions de température et de disponibilité en assimilats contrastées

ANTOINE S.¹, PAILLY O.¹, LURO F.¹ et BERTI L.²

¹ INRA, Unité GEQA, 20230 San Giuliano, France

² UMR 6134, Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire du végétal, campus grimaldi BP 52 20250 Corte, France

Cadre de l'étude :

Chez les fruits d'agrumes, les teneurs en acides sont très élevées. On observe une chute de cette acidité, qui est essentiellement due à la teneur en acide citrique. Une meilleure compréhension **des mécanismes et des gènes impliqués dans l'accumulation et l'utilisation de l'acide citrique** dans les fruits d'agrumes permettrait de mieux contrôler ce paramètre et de développer des schémas d'amélioration de la qualité des fruits plus performants. L'acide citrique est issu des produits de la photosynthèse via la glycolyse et le cycle de Krebs. Pour évaluer les effets des relations entre ces voies métaboliques et déterminer les gènes clés de leur régulation nous projetons d'étudier les effets de la limitation des ressources carbonées sur la physiologie des fruits d'agrumes. Cette diminution en apports carbonés induirait-elle une consommation accrue d'acides ?

Matériel végétal :



Clémentine



Mandarine



Lime de Tahiti



Lime du Brésil



Orange Salustiana

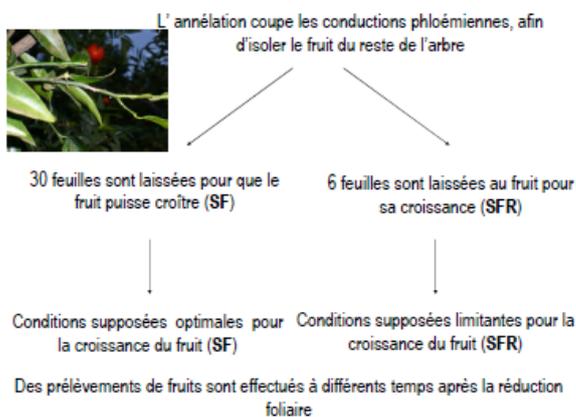


Orange Valencia late



Pomelo Star Ruby

Méthodes envisagées :

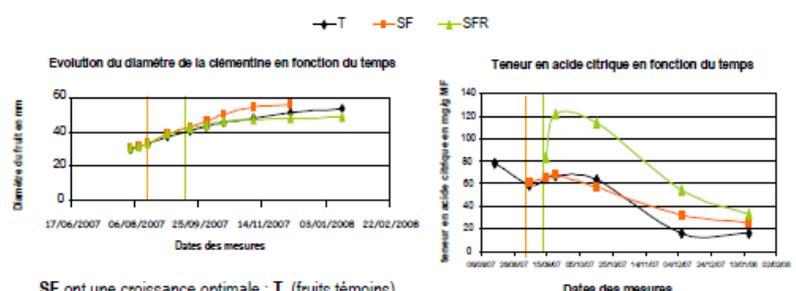


Analyse des sucres et des acides organiques par HPLC

Mesure de l'activité enzymatique de la Phosphofructokinase et des enzymes du « GABA shunt »

Analyse d'expression différentielle de gènes par Northern blot, qPCR et microarrays

Premiers résultats :



SF ont une croissance optimale ; T (fruits témoins) sont en compétition pour les ressources carbonées ; SFR ont une croissance limitée

Après la réduction foliaire chez les SFR, il y a une augmentation rapide de la quantité d'acide citrique. Puis la teneur en acide citrique tend à revenir à la normale par rapport au T.

La réduction foliaire entraîne un ralentissement de la croissance du fruit de la clémentine, de la mandarine, du pomelo, de la lime de Tahiti et de l'orange Salustiana.

Il semblerait que la réduction foliaire ait un impact sur le métabolisme primaire du fruit, à confirmer et préciser avec d'autres expérimentations.

Rôle de l'acide citrique en cas de carence en saccharose



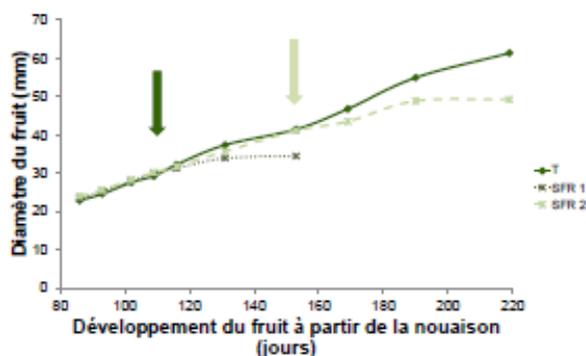
ANTOINE S.¹, LURO F.¹, BERTI L.² et PAILLY O.¹

¹ INRA, Unité GEQA, 20230 San Giuliano, France

² UMR 6134, Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire du végétal, campus Grimaldi BP 52 20250 Corte, France

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de la limitation des ressources carbonées (saccharose) sur la teneur en acide citrique des fruits d'agrumes. L'acide citrique étant l'acide organique majoritaire chez les fruits d'agrumes.

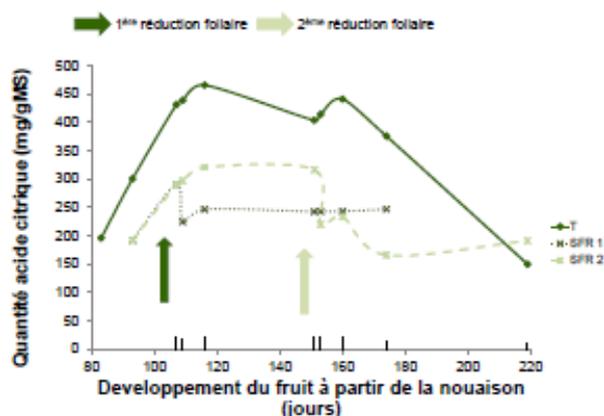
Nous avons choisi de diminuer l'apport en saccharose du fruit en réalisant une réduction du nombre de feuilles qui alimentent le fruit durant la phase d'accumulation des acides (SFR 1) et une autre durant la phase de diminution des acides (SFR 2). Les fruits témoins (T) n'ont subi aucun traitement.



Les réductions foliaires SFR 1 et SFR 2 entraînent un ralentissement de la croissance du fruit de la Mandarine.

Qu'en est-il de l'acide citrique?

Une chute importante de la concentration en acide citrique est observée 48h après les réductions foliaires SFR1 et SFR 2.



Diminution de l'accumulation de l'acide citrique lorsque la réduction foliaire est réalisée 107 jours après la nouaison chez les fruits SFR 1.

Une moindre diminution de la concentration en acide citrique lorsque la réduction a lieu 151 jours après la nouaison et l'accumulation au final est plus importante chez les fruits SFR 2 que chez les fruits témoins T.



En situation de bilan carboné déficitaire, l'hypothèse d'une remobilisation de l'acide citrique, préalablement accumulé dans la vacuole semble donc se confirmer. Cette remobilisation s'effectuerait très rapidement, puis une adaptation aux nouvelles conditions de disponibilité en assimilats s'opèrerait.

RESUME

Le groupe des agrumes d'acidité intermédiaire (orange, clémentine et mandarine) perd l'acidité au cours de la maturation (stade III), mais cette chute semble plus forte depuis quelques années dans la zone méditerranéenne. Il a été suggéré que cette perte d'acidité serait liée au climat (automne plus doux) ce qui entraînerait une augmentation de la respiration des fruits avec une photopériode plus courte à cette période et se traduirait par un déséquilibre carboné. Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un déséquilibre carboné, induit par une défoliation partielle, soit en début soit en fin de stade II, qui est la phase de grossissement cellulaire où les sucres et les acides organiques s'accumulent dans la vacuole des cellules des sacs à jus. Nous avons établi un bilan sucres-acides des fruits soumis aux différentes réductions d'apport carboné et identifié la ou les périodes où la réduction de l'apport carboné a le plus d'impact sur les quantités de sucres et en acides organique. Puis, nous avons regardé l'impact de ce déséquilibre sur le métabolisme du fruit en étudiant l'activité spécifique d'enzyme spécifiques (phosphofructokinase, invertase acide, phosphoénolpyruvate carboxylase, isocitrate déshydrogénase cytoplasmique) et l'expression de gènes d'intérêts (CsCit1, succinate semialdéhyde déshydrogénase, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) et identifié les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à la limitation des apports carbonés.

Les résultats obtenus montrent que les fruits ne sont pas capables de compenser la réduction des apports carbonés (poids et calibre) que la réduction foliaire soit précoce ou plus tardive au cours du stade II. Lorsque la réduction foliaire est précoce et à court terme (48h et une semaine), l'apport carboné n'est pas affecté puisque les quantités de saccharose sont similaires à celles du témoin. Nous avons observé une augmentation de l'activité enzymatique de la PFK qui est envisageable grâce au déstockage de la vacuole par l'action de l'invertase acide. La PEPC permet la synthèse d'oxaloacétate et maintient la production d'acide citrique, qui sera dégradé dans le cytoplasme par la NADP-IDH en α -cétoglutarate qui va donner du glutamate et du GABA. La voie du GABA « shunt » semble favorisée puisque l'expression du gène codant pour la SSADH est augmentée. A long terme (7 semaines), l'apport carboné a été affecté puisque les quantités de saccharose ont fortement diminué par rapport au témoin. Il y a un déstockage de l'acide citrique de la vacuole par CsCit1 mais pas d'activation de la voie du GABA shunt ce qui est compatible avec l'hypothèse que cette voie serait activée par un stress. Lorsque la cellule est en phase d'accumulation des acides organiques, elle privilégie la synthèse d'acide citrique. En revanche, lorsque la réduction foliaire est tardive, les quantités de sucres sont fortement affectées 48h après la réduction, le flux glycolytique est ralenti et il ne semble pas y avoir un déstockage de la vacuole. Les quantités d'acide malique et en acide malique chutent également mais l'activité de la PEPC est augmentée pour favoriser la synthèse d'acide citrique. Nous avons observé une formation importante de proline qui provient du glutamate. Comme nous n'avons pas observé, 48h après la réduction foliaire, une augmentation des niveaux de transcrits de la P5CS, la voie de l'ornithine serait impliquée. Il serait intéressant de confirmer ou non l'hypothèse de la formation de ROS lors des deux réductions foliaires ce qui nous permettrait de savoir si la voie du GABA « shunt » lors de la réduction foliaire précoce ou bien la formation de proline lors de la réduction foliaire tardive sont fortement sollicitées afin de lutter contre le stress oxydatif provenant de la réduction des apports carbonés.

ABSTRACT

The intermediate acidity group of citrus (orange, clementine and mandarin) loses acidity during maturation (stage III). But this decrease seems to steepen since several years in the mediterranean basin. It has been suggested that the wider loss of this acidity could be linked to climate (warmer autumns) which would increase fruit respiration, at the time when photoperiod is short, inducing a carbon imbalance. To check this hypothesis, we chose to study the effect of a carbon imbalance induced by partial defoliation, either at the beginning or at the end of stage II, which is the phase of cell enlargement where sugars and organic acids accumulate in the vacuole juice cells bags. We have established a sugar-acid balance of fruit submitted to different carbon reductions and identified the period or periods for which the reduction of the carbon input had the greatest impact on sugars and organic acids contents. Then, we watched the impact of this imbalance on fruit metabolism studying specific enzyme activity (phosphofructokinase, acid invertase, phosphoenolpyruvate carboxylase, cytoplasmic isocitrate dehydrogenase) and genes of interest expression (CsCit1, succinate semialdehyde dehydrogenase genes Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase). We also identified the biochemical mechanisms involved in the response to the carbon inputs limitation.

The obtained results showed that fruits are not able to offset the limitation of carbon inputs (weight and size) whether the leaf reduction is early or late during stage II. When the leaf reduction is early, for a short-term (48 hours and one week), the carbon contribution is not affected since sucrose contents are similar to those of the control. We observed an increase in PFK enzymatic activity which is suitable through the output from the vacuole due to the action of acid invertase. PEPC allows oxaloacetate synthesis and maintains citric acid production, which will be catabolized in the cytoplasm by the NADP-HDI in α -ketoglutarate which will give glutamate and GABA. The GABA "shunt" pathway seems to be promoted since the expression of the gene encoding the SSADH is increasing. In long-term (7 weeks), the carbon contribution was affected since sucrose contents decreased significantly compared to control fruit. Citric acid is remobilized from the vacuole by CsCit1 but no activation of the GABA shunt occurs which is consistent with the hypothesis that this pathway would be activated by stress. Thus, when the cell is in the process of organic acids accumulation, it seems it promotes the synthesis of citric acid. In return, when the leaf reduction is late, the sugar contents are strongly affected 48h after reduction, the glycolytic flux is slow and it does not seem that remobilization of sugars from vacuole occurs. The contents of malic acid and citric acid also fall deeply but PEPC activity is increased to promote the synthesis of citric acid. A significant formation of proline from glutamate is observed. Since we did not observe, 48 hours after foliar reduction, an increase in P5CS transcript levels, ornithine pathway could be involved. It would be interesting to confirm or not the hypothesis of ROS inducing in both foliar reductions in order to verify if the GABA "shunt", for early leaf reduction, or the proline formation, for late, leaf reduction are involved in oxidative stress response that might be induced by carbon inputs limitation.