HAL
open science

Du gène au phénotype : contrôle génétique et modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche

Elsa Desnoues

To cite this version:

Elsa Desnoues. Du gène au phénotype : contrôle génétique et modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2015. Français. NNT : 2015AVIG0667 . tel-01366023

HAL Id: tel-01366023

https://theses.hal.science/tel-01366023v1

Submitted on 14 Sep 2016

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

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

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

THESE

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

Spécialité : **Sciences Agronomiques**

Du gène au phénotype : contrôle génétique et modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche

Par Elsa DESNOUES

Soutenue le 13 mars 2015 devant un jury composé de :

Evelyne COSTES	Directrice de recherche INRA, Montpellier	Rapporteur
Pierre MARTRE	Directeur de recherche INRA, Clermont Ferrand	Rapporteur
Catherine BELLINI	Directrice de recherche INRA, Versailles	Examinatrice
Eric GOMES	Professeur à l'Université de Bordeaux	Examinateur
Huguette SALLANON	Professeur à l'Université d'Avignon	Examinatrice
Michel GENARD	Directeur de recherche INRA, Avignon	Directeur de thèse
Bénédicte QUILOT-TURION	Chargée de recherche INRA, Avignon	Directrice de thèse

Encadrement de la thèse : Bénédicte QUILOT-TURION, Michel GENARD et Valentina BALDAZZI

Ecole Doctorale : Agrosciences et Sciences, Avignon
Laboratoires d'accueil :
INRA-UR1052 « Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes »
INRA-UR1115 « Plantes et Systèmes de culture Horticoles »

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier très sincèrement les nombreuses personnes qui m'ont aidée, soutenue et accompagnée au cours de ma thèse. Ce travail n'est pas seulement « ma » thèse mais bien le fruit d'un travail d'équipe auquel de nombreuses personnes ont participé et que je tiens de tout cœur à remercier. Ce fut une aventure incroyablement riche qui m'a énormément apporté aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je tiens à remercier tout d'abord les départements 'Biologie et Amélioration des Plantes' et 'Environnement Agronomie', ainsi que la région PACA pour leur financement. Je remercie également l'Académie d'Agriculture de France de m'avoir attribué une bourse Jean et Marie Louise Dufrenoy. Ce financement m'a permis de travailler 1 mois à l'université d'Oxford.

Je souhaite exprimer ma plus profonde gratitude envers mes trois encadrants de thèse: Bénédicte Quilot-Turion, Michel Génard et Valentina Baldazzi. Merci de m'avoir si bien encadrée, guidée et soutenue. Merci pour votre grande réactivité face à tous les documents que je vous ai envoyés à corriger. Je vous remercie d'avoir toujours pris le temps de participer à ces réunions à 4 qui s'avéraient très enrichissantes et desquelles je ressortais avec de nombreuses idées en tête.

Merci Bénédicte de m'avoir permis de réaliser cette thèse à tes côtés, je n'aurais vraiment pas pu trouver mieux ! Merci pour ta grande disponibilité, ta bonne humeur et ta bienveillance. Merci de toujours penser à tout.

Merci Michel pour toutes ces discussions toujours très intéressantes et enrichissantes et pour toutes ces idées auxquelles je n'aurais jamais pensé.

Merci Valentina pour ton aide sur la partie modélisation, merci pour ton soutien et ta gentillesse.

Merci à Mathilde Causse d'avoir été co-directrice de ma thèse pendant les premières années de ma thèse. Merci pour tes conseils et tes relectures.

Je souhaite remercier Evelyne Costes et Pierre Martre d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci également à Catherine Bellini, Eric Gomès et Huguette Sallanon d'avoir accepté de faire partie du jury. Je remercie Yves Gibon, Charles Romieu, David Pot et John Lunn d'avoir fait partie des comités de pilotage.

Merci à Yves Gibon de m'avoir accueillie sur la plateforme métabolome de Bordeaux, d'avoir pris le temps chaque fois de discuter de mes résultats et de me donner des petits cours de biochimie. Merci à toutes les personnes de l'UMR biologie du fruit et pathologie de Bordeaux pour leur accueil chaleureux, leurs discussions passionnantes et leur collaboration, je pense particulièrement à Catherine Cheniclet pour les aspects de cytologie, Martine Dieuaide pour son aide sur le fractionnement anhydre et Bertrand Beauvoit pour nos discussions de modélisation. Un grand merci à Patricia Ballias d'avoir facilité l'organisation de mes séjours sur Bordeaux et des dosages sur la plateforme. Merci à Duyen Prodhomme de m'avoir tout montré et tout appris sur les protocoles, les calculs, les robots… Je te dois énormément (et les personnes que j'ai formées par la suite également !) Merci à toutes les personnes que j'ai croisées sur la plateforme qui ont toujours fait en sorte que, malgré nos grandes quantités de dosages respectifs, tout ce passe pour le mieux et dans la bonne humeur. Merci Carole, Julie, Miki, Thomas, Sandrine, Sophie et tous les autres. Merci aussi à tous les colocataires venant des 4 coins du monde que j'ai eu à la Rouquette, pour tous ces échanges culturels et gastronomiques.

Je tenais également à remercier Lee Sweetlove de m'avoir accueillie dans son équipe à l'université d'Oxford. Merci à Bernadette et Chris de m'avoir guidée dans mes expérimentations. Merci Constantine, Gemma, Annette et les autres pour les « Happy hours ».

Un très grand merci à Véronique Signoret pour son aide dans la préparation des nombreux échantillons ainsi que pour le suivi attentif des plantes. Merci pour ton aide et pour tous ces bons moments partagés. Merci à Laure Heurtevin pour son travail sur toutes les expérimentations de biologie moléculaire de ma thèse. Merci pour ta bonne humeur. Merci à Carole Confolent pour le gros travail effectué pour le criblage des recombinants. Merci également d'avoir partagé tous tes bons plans et idées de sorties et m'avoir permis de me changer les idées. Merci à Esther Pelpoir pour son aide dans la préparation des échantillons, merci d'avoir pesé touuutes ces poudres ! Merci pour ta grande gentillesse. Merci pour ces petits bavardages du soir et d'avoir partagé avec moi la beauté des fleurs et la gourmandise du chocolat. Merci Alejandra et Raoul pour votre travail de qualité et votre grande curiosité, ça a été un plaisir de travailler avec vous.

Merci aux membres de l'installation expérimentale qui ont si bien pris soin des arbres. Merci également au personnel administratif pour leur grande aide sur les différents aspects logistiques, merci à Annick Noclin, Claudie Arliaud (profite bien de la retraite), Evelyne Jullian, Evelyne Joubert, Astrid Bourret et Sébastien Lepioufle, merci pour votre disponibilité.

Un grand merci à Fabien Chardon, Magalie Bedu et Anne Marmagne pour leur collaboration et toutes leurs idées.

Je remercie également Barbara Gouble et Patrice Reling de m'avoir aidée à mesurer la respiration des fruits. Merci à Thierry Pascal et Christophe Tuero de leur aide pour le greffage des bourgeons floraux. Merci Jean Luc Poëssel et Gilles Vercambre pour vos conseils.

Merci Pierre, Mohamed et Thomas de m'avoir laissée utiliser vos supers ordinateurs et plus récemment le serveur pour lancer toutes mes simulations. Merci Justine d'avoir toujours trouvé un peu de place pour mes échantillons urgents. Merci Mathieu pour ton aide et tes conseils en bio-info et bio-mol.

Merci à tous ceux qui ont partagé mon bureau pour la bonne ambiance qui y régnait, merci Jaxin, Ye, Laure et Léandro. De même merci à tous ceux qui ont partagé dans la bonne humeur mes pauses café, déjeuner et certaines soirées et qui ont également contribué de manière indirecte à cette thèse merci Carole, Elise, Laura, Anna, Nelly, Véronique, Marie-Noëlle, Julie, Pauline.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisées, merci pour tous ces bons moments partagés. Merci à tous !

Enfin je remercie mes parents de m'avoir permis de faire les études que j'ai choisies. Je sais que cela n'a pas toujours été facile pour vous, je vous en suis reconnaissante. Désolée de ne pas être venue vous rendre visite plus souvent au cours de ces dernières années.

Je remercie de tout mon cœur Julien qui malgré les 960km et les 5h45 de train (sauf retards « éventuels » de la SNCF) qui nous ont séparés a toujours été là pour moi. Merci pour ton aide, ton soutien et ton amour.

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction *2*

1.1. Importance des sucres dans les fruits **3**
1.1.1. La qualité des fruits 3
1.1.2. Impact des différents sucres sur la santé humaine 4

1.2. Le métabolisme des sucres dans les fruits **5**
1.2.1. Une composition hétérogène en fonction de l'espèce 5
1.2.2. Les enzymes du métabolisme des sucres 7
1.2.3. La compartimentation, importance des transporteurs 9

1.3. Les modèles métaboliques : une représentation mathématique d'un métabolisme **11**
1.3.1. Représentation mathématique d'une réaction enzymatique 11
1.3.2. Représentation d'un réseau métabolique 13
1.3.3. Conception d'un modèle métabolique dynamique 14
1.3.4. Intégration du contrôle génétique dans les modèles 15

1.4. Le métabolisme des sucres sous contrainte génétique complexe **16**
1.4.1. Identification de régions génomiques contrôlant la concentration en sucres 16
1.4.2. Approche fonctionnelle pour l'identification de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres 19

1.5. Présentation de la thèse **20**
1.5.1. Objectifs et démarche 20
1.5.2. Matériel végétal 21
1.5.3. Laboratoires d'accueil et collaborations 23
1.5.4. Organisation du manuscrit 24

Chapitre 2 : Caractérisation du métabolisme des sucres au cours du développement du fruit *26*

Introduction **29**

Results **31**
Temporal evolutions of metabolites and enzymatic capacities during fruit growth 33
Changes in the enzymatic capacities do not explain variations in their substrates or products 34
Fruit of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes has a significantly lower fresh mass than fruit of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes 34
Striking differences in the metabolite composition associated with the fructose type 38
Fruit of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes have higher fructokinase and lower neutral invertase capacities 39

Discussion **42**
Disruption of the parallel fructose and glucose profiles in the progeny 42
High sucrose concentration, another particularity of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype 43
High fructokinase: a candidate to explain the low fructose-to-glucose ratio 44
An alternative hypothesis to concurrently explain the different features of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype 45

Conclusions **47**

Methods **47**

Additional data **51**

Chapitre 3 : Modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche..... 56

Introduction 58

Model construction 59

Results 63

Model parameterization and validation 63
Origin of the genetic variability 66
Functional hypotheses for 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype..... 69
Flow distribution through the metabolic network 70
Sugar compartmentation 72

Discussion 73

Sorbitol: the driver of sugar metabolism in peach 73
Vacuolar transport and sugar repartition within cell compartments..... 74
Differences in FK affinity as a candidate mechanism for 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype 75

Materials and methods..... 76

Additional data..... 81

Chapitre 4 : Analyse du contrôle génétique du métabolisme des sucres 87

Introduction 90

Materials and methods..... 92

Results 97

Contribution of the different maps analyzed 97
Different subsets of genotypes according to the fructose 97
Division of fruit growth duration in stages 99
QTL stability during the fruit development 99
QTL location..... 101
Functional co-location between QTL and between QTL and candidates genes..... 101

Discussion 109

Identification of loci governing fruit sugar metabolism 109
Identification of functional and positional candidate genes 111
Changing effect of alleles along fruit development revealed by dynamic QTL 112
Prunus davidiana alleles display changing effects along growth that might impair their use in breeding 113

Conclusion.....114

Supplemental data 114

Chapitre 5 : SWEET17, transporteur tonoplastique de fructose : un gène candidat pour le phénotype 'peu de fructose' chez la pêche.....122

Introduction 124

Résultats et discussion.....125

Le phénotype 'peu de fructose' est lié à un mécanisme interne du fruit..... 125
Cartographie fine du QTL contrôlant le phénotype 'peu de fructose' 127
Le gène ppa010394m homologue à SWEET17, un transporteur tonoplastique de fructose 128
Incertitude autour de la séquence codante du gène ppa010394m 129

Une différence d'expression de ppa010394m à l'origine du phénotype 'peu de fructose' 132
Validation fonctionnelle de ppa010394m 133

Conclusion et perspectives.....135

Matériel et méthodes 136

Annexe.....143

Chapitre 6 : Discussion générale.....150

Caractérisation du métabolisme des sucres à différents niveaux d'échelle 152
Liens Métabolites – Enzymes – Gènes..... 153
Liens Métabolites – Compartimentation – Gènes..... 155

Démarche du gène au phénotype avec le cas particulier 'peu de fructose'.....157

Perspectives 159
Prédiction du phénotype en fonction du génotype 159
Prédiction du phénotype en fonction du génotype et de l'environnement..... 160

Annexe 1 : informations complémentaires sur l'espèce P. persica 162

Présentation de l'espèce.....162

Diversité phénotypique des fruits 164

Sélection chez le pêcher.....165

Génome du pêcher 165

Références bibliographiques 168

Chapitre 1 : Introduction

Chapitre 1 : Introduction

Les fruits représentent une source importante de nutriments essentiels à la santé humaine, tels que les minéraux, oligo-éléments, fibres, vitamines et antioxydants. De ce fait l'organisation mondiale pour la santé (OMS) recommande de consommer au moins 5 fruits et légumes par jour. Les bienfaits d'une consommation accrue de fruits et légumes ont été démontrés à partir d'études épidémiologiques. En effet, He *et al.* (2006) montrent un lien entre l'accroissement de la consommation de fruits et légumes et une moindre incidence de pathologies comme les maladies cardiovasculaires. De plus, d'après le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) entre 5 et 30% des cancers, en fonction de leur localisation, pourraient être évités par une consommation plus importante de fruits et légumes (Communiqué du *11 novembre 2003, Genève)*. L'augmentation de la consommation de fruits et légumes est donc devenue aujourd'hui un enjeu public majeur. Deux objectifs complémentaires peuvent être envisagés pour répondre à cet enjeu: i) la réduction des coûts liés à la production, au transport et aux intermédiaires, ii) l'amélioration de la qualité des fruits afin de les rendre plus attractifs.

La qualité des fruits est un concept multicritère fortement influencé par les conditions environnementales, avec des relations antagonistes fréquentes. Outre l'adaptation des systèmes de culture, la création variétale apparait comme un moyen efficace pour améliorer la qualité des fruits. Parmi les différents attributs des fruits participant à la perception de la qualité par le consommateur, la qualité organoleptique joue un rôle majeur et en particulier les teneurs en sucres.

Les sucres sont produits au niveau des feuilles par la photosynthèse puis transloqués via le phloème jusqu'aux fruits où ils sont stockés. Il existe une grande variabilité naturelle des concentrations en sucres dans les fruits dépendant des conditions environnementales mais aussi du génotype de la plante.

Parmi les différentes espèces d'arbres fruitiers, le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch) est, par bien des aspects, une espèce modèle intéressante. Tout d'abord son importance économique le place au 2ème rang européen et au 3ème rang mondial en termes de production parmi les Rosacées fruitières, derrière la pomme et la poire. De plus, il présente une période juvénile relativement courte (2 à 3 ans) en comparaison aux autres arbres fruitiers (entre 5 et 10 ans pour le pommier, poirier et cerisier), avec des fleurs fortement auto compatibles. D'un point de vue génomique, des ressources importantes sont disponibles avec le séquençage et l'annotation du génome du pêcher (The International Peach Genome Initiative 2013). Il s'agit d'une espèce diploïde ($2n=2x=16$) avec un génome de petite taille (265 Mb) soit environ 2 fois le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Le pêcher présente également une forte variabilité phénotypique ouvrant la voie à des travaux de sélection

importants qui ont conduit à la création de nombreuses variétés. Au niveau des fruits, le sucre majoritaire est le saccharose suivi des hexoses (fructose et glucose) puis du sorbitol. Il existe une grande variabilité du niveau des concentrations en sucres en fonction du génotype, principalement entre les fruits issus de pêchers sauvages ou de pêchers commerciaux. Une des particularités notables est la présence d'une très faible concentration en fructose chez certains génotypes dont les fruits ne sont pas sélectionnés pour leur consommation (pêchers sauvages ou ornementaux). Cette particularité est d'autant plus importante que le fructose possède un pouvoir sucrant supérieur aux autres sucres. Une bonne connaissance des mécanismes impliqués dans l'accumulation des sucres au niveau du fruit, principalement des mécanismes entrainant une variabilité des concentrations en sucres, ainsi que leur déterminisme génétique est essentiel pour guider la création variétale.

Le travail de thèse présenté ici contribue à une meilleure compréhension du métabolisme des sucres dans la pêche. En effet, l'objectif est de comprendre les bases génétiques et moléculaires d'un phénotype particulier caractérisé principalement par une très faible concentration de fructose dans les fruits. Pour cela, des approches complémentaires de biochimie, de génétique et de modélisation ont été suivies.

1.1.Importance des sucres dans les fruits

1.1.1. La qualité des fruits

La qualité des fruits est un concept complexe, pour le consommateur, l'aspect, l'odeur et la fermeté du fruit sont les premiers critères de choix lors de l'achat. Au moment de la dégustation, la texture qui englobe la fermeté, le croquant et la quantité de jus revêt une grande importance. Les attentes d'une texture acceptable seront différentes en fonction de l'espèce, en effet la texture attendue diffère pour une banane, une pomme ou une pêche (Harker *et al.* 1997) mais aussi selon les consommateur qui ont des préférences pour des fruits plus ou moins fermes ou juteux.

Ces dernières années on assiste à un regain d'intérêt de la part des consommateurs pour les aspects gustatifs et nutritionnels des fruits. Cela vient principalement du fait que la sélection a été conduite pour de nombreuses espèces dans le but d'augmenter le rendement, le calibre des fruits et d'améliorer leur conservation ce qui a eu des répercussions négatives sur les autres critères de qualité tel que le rapport entre les sucres et les acides qui détermine la douceur, l'acidité et l'intensité des saveurs des fruits (Stevens *et al.* 1977). Dans les fruits, il existe différents sucres dont les principaux sont le saccharose, le glucose et le fructose. Ces sucres présentent des caractéristiques et des pouvoirs sucrants différents. C'est le fructose qui possède le pouvoir sucrant le plus important (près du double de celui du glucose) (Biester *et al.* 1925), c'est donc naturellement la teneur en fructose qui influence le plus la douceur du fruit (Stevens *et al.* 1977). Outre ses effets différents sur

la qualité des fruits, la composition en sucres a un effet non négligeable sur la santé humaine car les différents sucres ne suivent pas les mêmes voies métaboliques lors de la digestion.

1.1.2. Impact des différents sucres sur la santé humaine

Dans le corps humain, c'est sous forme de glucose que l'énergie est assimilée et rendue disponible pour le fonctionnement des muscles. Lors de sa consommation, le glucose passe dans la circulation sanguine, ce qui lui permet d'être distribué dans l'ensemble de l'organisme. Les molécules de saccharose consommées sont quant à elles hydrolysées en une molécule de glucose et une molécule de fructose. Le fructose provenant de l'alimentation ou du saccharose passe dans la circulation sanguine et est métabolisé au niveau de foie.

Les impacts sur la santé de produits riches en fructose sont très controversés. En effet le fructose possède un pouvoir sucrant supérieur aux autres sucres, ce qui lui permet d'être consommé en quantité moins importante pour une perception gustative identique. De plus, il a un index glycémique plus faible que le glucose et le saccharose, la production d'insuline est de ce fait plus lente ce qui permet de mieux contrôler la glycémie chez les personnes atteintes de diabète. Cependant ceci a également pour conséquence d'agir moins rapidement sur l'effet de satiété (Basciano *et al.* 2005; Rémésy 2008) ce qui pourrait conduire à une augmentation de la prise alimentaire avec des risques d'obésité (Rizkalla 2010). De plus, dans le foie le fructose stimule la lipogenèse et l'accumulation de triglycérides ce qui favoriserait l'intolérance au glucose et la résistance hépatique à l'insuline (Basciano *et al.* 2005; Rémésy 2008).

Il existe également des pathologies spécifiques liées au fructose comme l'intolérance ou la malabsorption du fructose. Dans les deux cas il est recommandé de supprimer totalement le fructose de l'alimentation. Or les fruits constituent la source ancestrale de fructose, et à la différence des produits industriels, contiennent également de nombreux éléments indispensables à la santé humaine. Supprimer entièrement les fruits de l'alimentation peut entrainer des carences importantes. Le développement de variétés de fruits sans fructose est une solution très intéressante pour les patients atteints de ces pathologies.

Améliorer la qualité des fruits afin d'augmenter leur attractivité face au consommateur ou développer des variétés répondant à des attentes précises est un enjeu important de la sélection actuelle. Cela nécessite une bonne compréhension du mécanisme d'accumulation des sucres dans les fruits.

1.2.Le métabolisme des sucres dans les fruits

1.2.1. Une composition hétérogène en fonction de l'espèce

Le saccharose, principal produit de la photosynthèse au niveau des feuilles, est transloqué via le phloème des organes sources vers les organes puits que sont les fruits. Chez les Rosacées, le sorbitol est également synthétisé au niveau des feuilles et suit le même cheminement que le saccharose. L'entrée de ces sucres dans les cellules de fruit peut se faire via 2 voies : la voie symplasmique et la voie apoplasmique (Figure 1.1). La voie symplasmique correspond au passage des solutés via les plasmodesmes (canaux permettant la continuité entre les cytosols des cellules). Alors que la voie apoplasmique correspond au passage à travers la membrane plasmique. La majeure partie du métabolisme des sucres se déroule dans le cytosol mais les sucres sont principalement stockés dans la vacuole. Ce métabolisme est dit central car il est précurseur de la respiration via la glycolyse et le cycle de Krebs, ainsi que de la synthèse de composés structuraux (parois cellulaires) via l'UDP-glucose.

Différents sucres sont présents dans les fruits: le saccharose, les hexoses (fructose et glucose) et dans certains cas le sorbitol. Ces sucres sont dit majoritaires car ils sont présents en quantité importante chez la plupart des espèces. Cependant il existe une grande variabilité dans leurs concentrations mais aussi dans leur proportion respective. Par exemple, chez la tomate et les nèfles, le fructose et le glucose présents en quantité équivalentes sont les sucres majoritaires (Cao *et al.* 2013; Biais *et al.* 2014) ; chez la fraise seul le glucose est majoritaire (Basson et al, 2010) tandis que chez la pomme il s'agit du fructose (Li *et al.* 2012a; Ma *et al.* 2014). En ce qui concerne le litchi, la mandarine et la pêche, le sucre majoritaire est le saccharose (Moriguchi *et al.* 1990b; Robertson *et al.* 1990; Yakushiji *et al.* 1996; Yang *et al.* 2013). En revanche le saccharose n'est pas détectable chez la cerise (Ma *et al.* 2014) et certaines variétés pauvres en saccharose ont été décrites chez la fraise et la pastèque (Zhang and Li 2005; Gündüz and Ozdemir 2014). Le sorbitol est présent dans quelques espèces, principalement au sein des Rosacées, avec des teneurs variables. Il peut être comparable au fructose et au glucose pour la cerise (Gao *et al.* 2003) ou présent en très faible quantité dans la nèfle et la pêche. Les concentrations en sucres et leur teneur relative peuvent également varier au sein d'une même espèce. Cantin *et al.* (2009) reportent une variation du rapport fructose/glucose entre 0.4 et 2.5 en fonction des génotypes, avec un ratio plus élevé pour les pêches de bonne qualité. Un déficit naturel en fructose est également observé chez des pêchers sauvages (Kanayama *et al.* 2005) ou utilisés pour l'ornement (Moriguchi *et al.* 1990a). On retrouve cette caractéristique chez l'abricot (Ledbetter *et al.* 2006) et chez la tomate un locus majeur permettant un rapport fructose/glucose élevé a été mis en évidence (Levin *et al.* 2000).

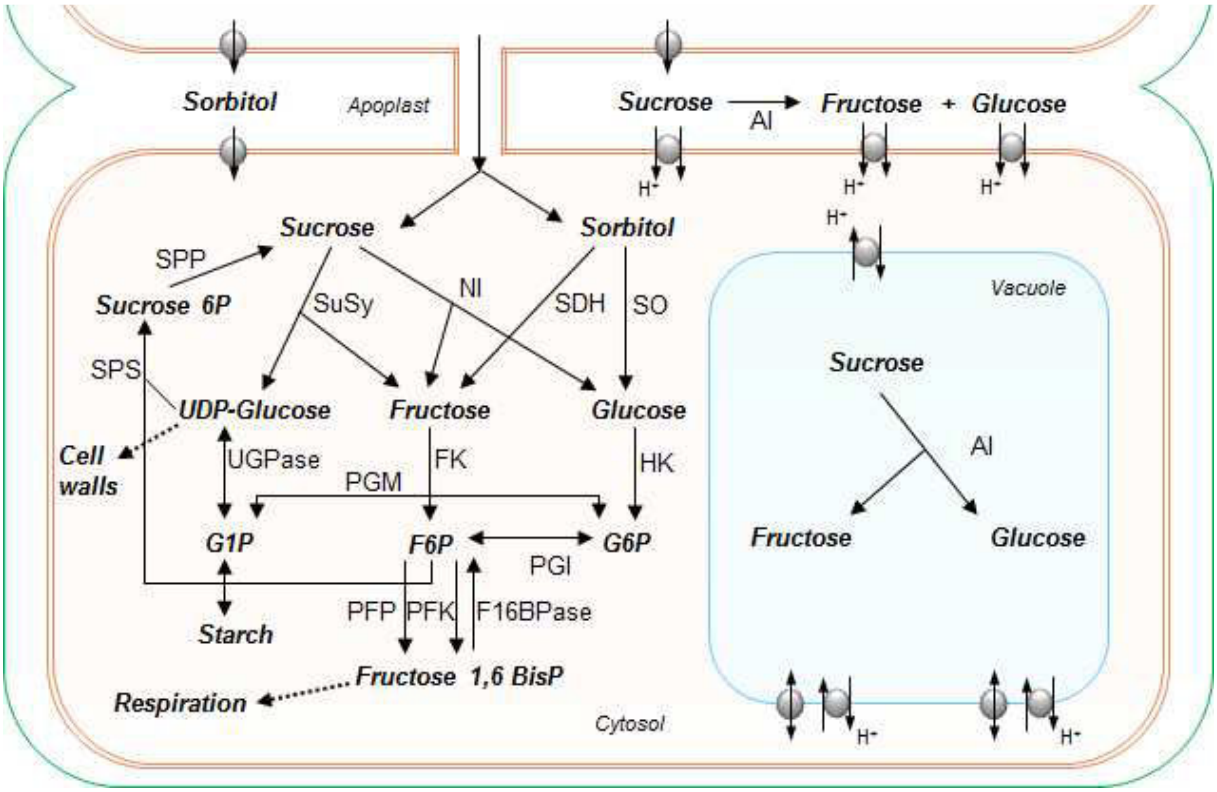


Figure 1.1 Représentation du métabolisme des sucres dans une cellule de pêche avec l'entrée des sucres par la voie symplasmique via les symports ou par la voie apoplasmique via l'apoplasme. Abréviations: acid invertase (AI), fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase), fructose-6-phosphate (F6P), fructokinase (FK), glucose-1-phosphate (G1P), glucose-6-phosphate (G6P), hexokinase (HK), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), phosphoglucose isomerase (PGI), phosphoglucomutase (PGM), sorbitol dehydrogenase (SDH), PPi-phosphofructokinase (PFP), sorbitol oxidase (SO), sucrose-phosphate phosphatase (SPP), sucrose phosphate synthase (SPS), sorbitol (Sor), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase).

Cette grande diversité dans les concentrations en sucres suggère des différences inter et intra spécifiques du fonctionnement du métabolisme. Les principaux facteurs au niveau cellulaire pouvant entrainer une modification importante des concentrations et des proportions relatives en différents sucres sont (1) les activités enzymatiques qui peuvent moduler la transformation d'un sucre en un autre et (2) la compartimentation cellulaire avec un stockage plus ou moins efficace dans la vacuole en fonction des espèces. Pour cette raison, les enzymes intervenant dans le métabolisme des sucres ainsi que la compartimentation avec les différents transporteurs de sucres sont présentés en détail dans les paragraphes suivants.

1.2.2. Les enzymes du métabolisme des sucres

Les réactions chimiques sont essentielles au fonctionnement des êtres vivants. Lors d'une réaction chimique, une (ou plusieurs) molécule appelée substrat est modifiée en une (ou plusieurs) autre molécule appelée produit. La vitesse d'une réaction chimique dépend de plusieurs paramètres comme la température ou la concentration en substrat. Cependant, il s'avère qu'au sein des êtres vivants, les réactions chimiques doivent avoir une vitesse importante pour assurer certaines fonctions ce qui est permis par la catalyse enzymatique. Pour qu'une réaction enzymatique ait lieu, le substrat doit se fixer à l'enzyme et former un complexe enzyme-substrat. La fixation se fait dans une région de l'enzyme appelée site actif. Il s'agit d'une zone spécifique du substrat de par sa forme ce qui correspond à un modèle de type clé-serrure comme définit pour la première fois par Emil Fisher en 1894. Il existe de nombreuses enzymes, chacune permettant de catalyser une réaction précise avec un substrat donné afin de satisfaire tous les besoins de la cellule. La nomenclature préconisée pour les enzymes par le NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) permet de les regrouper en fonction de différents critères. Chaque enzyme est définie par les lettres EC suivies de 4 chiffres séparés par un point. Le premier chiffre fait référence au type de réaction catalysé par l'enzyme, le second au type de substrat métabolisé, le troisième chiffre correspond au type de l'accepteur et enfin le quatrième au numéro d'ordre. Par exemple l'invertase, qui catalyse l'hydrolyse d'une molécule de saccharose en une molécule de glucose et une molécule de fructose est identifiée par le code suivant : EC 3.2.1.26. Il s'agit d'une réaction d'hydrolyse (hydrolase : EC 3.x.x.x) d'une molécule de sucre (glycosylases : EC 3.2.x.x) sur le groupement 0- et S- glycosyl (EC3.2.1.x).

Une cellule de fruit est composée de plusieurs compartiments dont l'apoplasme, le cytosol et la vacuole (Figure 1.1). L'invertase (EC 3.2.1.26) est la seule enzyme que l'on retrouve dans ces trois compartiments. Elle catalyse la réaction d'hydrolyse d'une molécule de saccharose en une molécule de glucose et une molécule de fructose. Il existe des isoenzymes d'invertase spécifiques de chaque

compartiment. L'invertase neutre (NI) localisée dans le cytosol montre une activité maximale à pH neutre (pH du cytosol). A l'inverse l'invertase acide (AI) est plus active à pH acide. L'AI est soit soluble (localisée dans la vacuole) soit liée à la membrane plasmique (insoluble). Elle peut alors prendre le nom d'invertase pariétale. Les autres enzymes du métabolisme des sucres sont localisées dans le cytosol. De la même manière que l'invertase, la sucrose synthase (SuSy) (EC 2.4.1.13), la sorbitol déshydrogénase (SDH) (EC 1.1.1.14) et la sorbitol oxydase (SO) (EC 1.1.3.40) permettent la transformation des sucres transloqués (saccharose et sorbitol) en fructose, glucose et UDP-glucose. Le fructose et le glucose ainsi formés seront hydrolysés via les hexokinases, la fructokinase (FK) (EC 2.7.1.4) et l'hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1) respectivement en fructose-6-phosphate (F6P) et glucose-6-phosphate (G6P). Les hexoses phosphates que sont le F6P, le G6P, le glucose-1-phosphate (G1P) et l'UDP-glucose sont des sucres transitoires présents en faible quantité dans la cellule et rapidement métabolisés. La phosphoglucoisomérase (PGI) (EC 5.3.1.9), la phosphoglucomutase (PGM) (EC 5.4.2.2) et l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (EC 2.7.7.9) participent à l'interconversion entre les hexoses phosphates. A partir de ce pool d'hexoses phosphates, trois directions sont possibles ; soit la re-synthèse de saccharose via le saccharose-6-phosphate avec comme enzymes la sucrose phosphate synthase (SPS) (EC 2.4.1.14) et la sucrose phosphate phosphatase (SPP) (EC 3.1.3.24). Cette re-synthèse est aussi appelée cycle futile du saccharose. Soit la synthèse de composés structuraux via l'UDP-glucose, ou encore la sortie vers la glycolyse à partir du fructose-1,6-bis-phosphate (F16BP). Trois enzymes sont impliquées dans la conversion entre F6P et F16BP : la PPi-phosphofructokinase (PFP) (EC 2.7.1.90), l'ATP-phosphofructokinase (PFK) (EC 2.7.1.11) et la fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BPase) (EC 3.1.3.11). A partir de la glycolyse, le métabolisme des sucres est lié à celui des acides, qui, principalement par le malate et le citrate a un effet important sur la qualité des fruits et sur la perception de la douceur.

La structure du réseau est similaire chez les différentes espèces végétales hormis pour le sorbitol que l'on retrouve uniquement chez les Rosacées. Il existe également une divergence au niveau du sorbitol avec la présence d'une boucle de re-synthèse ou boucle futile décrite chez la poire et la nèfle (Yamaki and Moriguchi 1989; Abnasan *et al.* 1999) alors qu'elle ne semble pas être présente chez la pêche (Sun *et al.* 2011). Les dissemblances au niveau des teneurs en sucres ne sont pas dues à un effet structurel du réseau mais plutôt à l'activité des enzymes (i.e. la concentration en protéine active permettant la catalyse de la réaction) dont la valeur et l'évolution au cours du développement du fruit varient en fonction de l'espèce. La variation dans le stockage vacuolaire des différents sucres peut également expliquer ces divergences.

1.2.3. La compartimentation, importance des transporteurs

Comme énoncé précédemment, les cellules végétales sont divisées en plusieurs compartiments dont les plus importants sont l'apoplasme, le cytosol et la vacuole. Ces compartiments sont séparés par une membrane et le passage d'un soluté d'un compartiment à l'autre dépend de la perméabilité de cette membrane pour le soluté. Les petites molécules comme le dioxygène (O_2) ou le dioxyde de carbone (CO_2) peuvent franchir librement la membrane par diffusion simple. Pour des molécules plus grosses ou qui se dissolvent mal dans la membrane, il existe des canaux constitués de protéines transmembranaires qui permettent le passage des composés en fonction du gradient de concentration entre les deux compartiments. Ces transports sont appelés 'transport passif' car ils s'effectuent sans apport d'énergie en opposition au 'transport actif' qui nécessite d'être couplé à une réaction exergonique.

Un transporteur actif est une protéine transmembranaire qui lors de la fixation d'un composé va changer de conformation tridimensionnelle en entrainant celui-ci d'un coté à l'autre de la membrane. Le changement de conformation nécessite l'apport d'énergie par exemple avec l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ces transporteurs sont également appelés pompes à protons car ils permettent de transporter une molécule par couplage avec un transport de protons. Il existe un gradient électrochimique entre le cytosol et la vacuole (~30mV) produit par les pompes à protons (Gaxiola *et al.* 2007; Martinoia *et al.* 2007; Martinoia *et al.* 2012). Ce gradient permet l'accumulation des composés dans la vacuole : les ions se déplacent en fonction du gradient électrochimique, permettant à d'autres molécules d'aller à l'encontre de leur gradient de concentration.

On distingue deux types de transporteurs actifs : les symports dont le transport de protons et d'une autre molécule s'effectuent dans la même direction et les antiports dont le transport de molécules s'effectue en sens inverse du transport de protons. Dans les deux cas la direction du flux dépend du gradient de protons. Les gradients de protons entre l'apoplasme, le cytosol et la vacuole sont représentés en Figure 1.2.

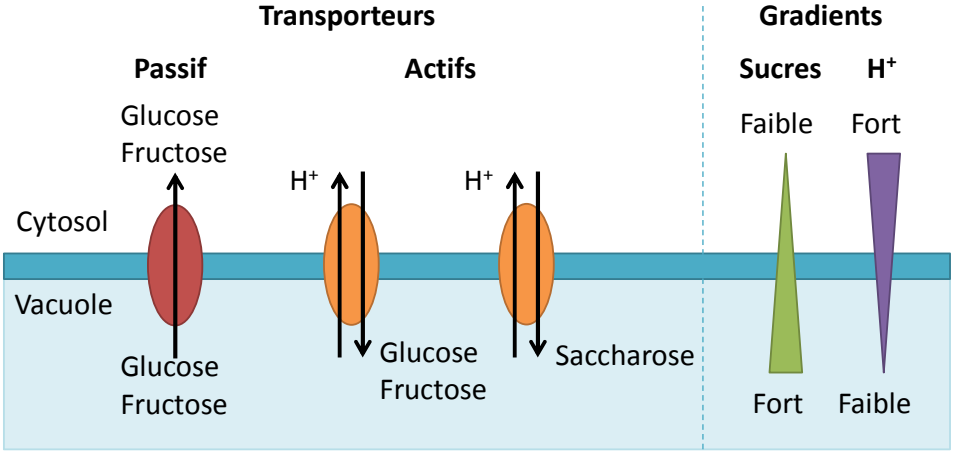


Figure 1.2 Illustration des différents transporteurs de sucres présents sur la membrane tonoplastique des cellules de fruits ainsi que des gradients de concentration des sucres et des protons. Les transporteurs passifs d'hexoses permettent le transport du glucose et du fructose au travers de la membrane par diffusion facilitée dans le sens de leur gradient de concentration. Des transporteurs actifs de type antiport, spécifiques des hexoses ou du saccharose sont présents au niveau du tonoplaste des fruits. Ils permettent le transport des sucres contre leur gradient de concentration grâce au transport d'un proton dans le sens de son gradient. Le gradient de protons est maintenu grâce à des pompes à protons.

Les symports spécifiques des sucres localisés au niveau de la membrane plasmique permettent le passage des sucres de l'apoplasme vers le cytosol. Au niveau du tonoplasme (membrane vacuolaire), les symports créent un flux sortant de la vacuole vers le cytosol. Aucun symport tonoplastique spécifique des sucres n'a été rapporté dans les organes puits où on observe une accumulation de ces composés. En revanche la présence d'antiports permettant le stockage des hexoses et du saccharose dans la vacuole a été décrite dans plusieurs études (Shiratake *et al.* 1997; Wormit *et al.* 2006; Aluri and Büttner 2007; Büttner 2007; Schulz *et al.* 2011). La figure 1.2 fait la synthèse des transporteurs spécifiques des sucres décrits à ce jour dans une cellule d'organe puits. La compartimentation et les transports des métabolistes entre les compartiments sont des facteurs primordiaux de la régulation du métabolisme. Cela permet soit de stocker les composés soit de les rendre disponibles comme substrat pour les enzymes et ainsi de les métaboliser en fonction des besoins.

Le métabolisme des sucres est complexe avec l'intervention de nombreux enzymes et transporteurs dont toutes les caractéristiques ne sont pas encore pleinement connues. De plus de nombreux facteurs ont un impact sur le fonctionnement de ce métabolisme. De ce fait l'étude de ce réseau ainsi que des facteurs génétiques ou environnementaux permettant de modifier les teneurs en sucres n'est pas immédiat. Une représentation simplifiée du réseau métabolique compilant les informations disponibles doit permettre de mettre en évidence les mécanismes clés et ainsi mieux comprendre le métabolisme des sucres.

1.3. Les modèles métaboliques : une représentation mathématique d'un métabolisme

1.3.1. Représentation mathématique d'une réaction enzymatique

Au cours du XXème siècle, de nombreuses études ont porté sur la compréhension des mécanismes liés aux réactions enzymatiques et plus particulièrement à la vitesse de ces réactions. En 1903, Victor Henri a décrit un modèle de cinétique enzymatique dans lequel l'enzyme se lie au substrat de manière réversible et la rupture de ce complexe donne le produit. Il énonce l'équation de vitesse de la réaction (vitesse de synthèse du produit) comme suit sous l'hypothèse de stationnarité, c'est-à-dire d'une rapide dissociation du complexe enzyme-substrat :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_s m[E][S]}{1 + m[S] + n[P]} \qquad [1]$$

Avec [P]=concentration en produit, [E]=concentration en enzyme, [S]=concentration en substrat, m= [ES]/[E][S] , n=[EP]/[E][P], m et n étant des constantes d'affinité respectivement pour le substrat et le produit. Pour une concentration en substrat élevée, la vitesse est indépendante de la concentration en substrat alors que la vitesse est proportionnelle à la concentration en substrat lorsque celle-ci est faible. Michaelis et Menten ont par la suite validé les résultats d'Henri et proposé l'équation suivante :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad [2]$$

Vmax correspond à la vitesse limite de la réaction c'est-à-dire la vitesse de synthèse du produit pour une concentration du substrat saturante. Le Km représente la concentration de substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de la vitesse limite (Vmax) (Figure 1.3). Il est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

A partir de l'équation [2], trois simplifications sont possibles en fonction de la concentration en substrat :

[S] <<Km $v = \frac{V_{max}}{K_m}[S]$ (Dans ce cas, la concentration en substrat devient limitante)

[S] = Km $v = \frac{1}{2}V_{max}$

[S] >> Km $v = V_{max}$

Il est possible mais fastidieux de déterminer expérimentalement la valeur de Vmax et du Km. En effet, pour cela il est nécessaire de purifier l'enzyme et de tester une large gamme de concentrations de substrat afin que la vitesse varie suffisamment. Dans tous les cas, l'expérimentation ne permet d'obtenir qu'une approximation de la vitesse limite (Vmax).

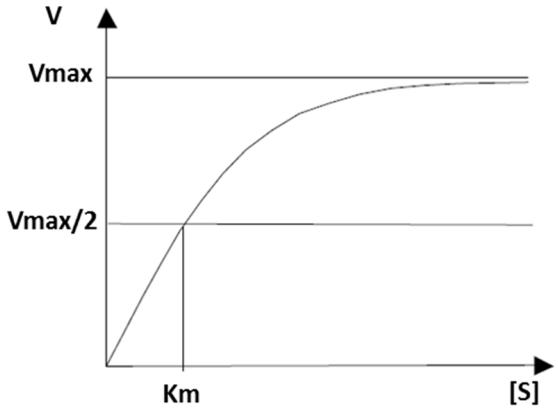


Figure 1.3 Variation de la vitesse d'une réaction enzymatique (V) en fonction de la concentration en substrat ([S]). La vitesse d'une réaction correspond à la vitesse de synthèse du produit (V=d[P]/dt). Ce graphique permet de définir les caractéristiques cinétiques d'une enzyme purifiée: le Vmax représente la vitesse maximale de la réaction quelle que soit la concentration en substrat; le Km correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre Vmax/2.

1.3.2. Représentation d'un réseau métabolique

Dans une représentation d'un réseau métabolique, les nœuds correspondent à des composés ou métabolites et les arrêtes aux flux de matière d'un composé à l'autre. Un flux représente une réaction transformant un composé A en un composé B à l'état stationnaire. On parle d'état stationnaire (steady state) quand les flux s'équilibrent et que la concentration des composés est stable.

Différentes approches ont été développées afin d'étudier les réseaux métaboliques en fonction des questions et objectifs précis. Plusieurs revues bibliographiques font le point sur ces approches (Rios-Estepa and Lange 2007; Allen *et al.* 2009; Rohwer 2012). L'objectif ici n'est pas de reprendre en détail chaque modèle mais de donner un aperçu des principales méthodes utilisées.

Tout d'abord certains modèles permettent l'étude du réseau en lui-même avec des méthodes structurales telles que l'EMA (Elementary Mode Analysis) ou EPA (Extreme Pathway Analysis) qui permettent d'explorer le réseau en le divisant en éléments plus simples. Cela donne la possibilité de définir l'ordre de grandeur des flux. Ces méthodes ont l'avantage de ne nécessiter que peu de données : la structure du réseau et les éléments de stœchiométrie. Cependant il est possible

de complexifier les modèles et d'utiliser diverses données comme par exemple des données de cinétique enzymatique (Km, Vmax). Un des exemples de l'utilisation de modèle EMA est donné par Rohwer et Botha (2001) qui étudient l'accumulation du saccharose dans la canne à sucre. Grâce à cette approche, ils ont pu définir les voix réalistes pour le cycle futile du saccharose ainsi que celles permettant d'augmenter les teneurs en saccharose. Une des principales limites de ces modèles est le fait que le nombre d'éléments étudiés augmente de manière exponentielle avec la taille du réseau. Si l'objectif est d'étudier plus précisément les flux, il est possible d'introduire des contraintes thermodynamiques en plus de la connaissance topographique du réseau. C'est le cas pour les modèles FBA (flux balance analysis) dont le but est de prédire la distribution des flux qui maximisent une fonction objectif comme par exemple la maximisation de la production de biomasse (Orth *et al.* 2010; Sweetlove and Ratcliffe 2011). Cependant cette méthode est limitée par la compartimentation sub-cellulaire qui peut modifier la distribution des flux si elle n'est pas prise en compte dans le réseau de manière explicite. Pour pallier cette difficulté, il est possible d'ajuster les sorties du modèle à des données isotopiques (Baldazzi *et al.* in prep), on parle alors de « labeling based metabolic flux analysis ».

Toutes les méthodes présentées jusque-là se basent sur l'étude du métabolisme à l'état stationnaire or dans de nombreux cas, le métabolisme présente des oscillations diurnes ou saisonnières et peut être soumis à des fluctuations environnementales. Les modèles dynamiques prennent en compte de manière explicite les données de cinétiques enzymatiques permettant de décrire les changements des concentrations des métabolites d'après les interactions moléculaires. Cependant la construction de ces modèles nécessite un grand jeu de données y compris la caractérisation des paramètres cinétiques des enzymes. En cas d'absence de données, les paramètres peuvent être estimés si l'on dispose de données sur la distribution des flux ou sur les concentrations des métabolites attendus (Baldazzi *et al.* in prep).

1.3.3. Conception d'un modèle métabolique dynamique

Pour la conception d'un modèle métabolique dynamique, il est essentiel de commencer par définir l'objectif du modèle qui conditionnera l'échelle ainsi que les différents éléments à représenter. Le plus souvent il s'agit de prédire les effets d'une perturbation sur un ou plusieurs métabolites. Les connaissances de la structure du réseau et de la stœchiométrie sont nécessaires dans la construction de modèle. Les réactions enzymatiques sont généralement représentées par des équations de Michaélis-Menten ce qui implique la nécessité de connaitre les paramètres cinétiques de chaque enzyme représentée (Km, Vmax). Le Vmax ou capacité enzymatique dépend de la concentration de l'enzyme et ne correspond pas à la vitesse limite mesurée avec une enzyme

purifiée. Le Vmax varie en fonction de l'espèce, de l'organe, de la période du cycle (diurne ou saisonnier) ou d'autres facteurs. Il est donc nécessaire de mesurer les capacités enzymatiques dans des échantillons biologiques correspondants à la simulation du modèle. En revanche, l'affinité (représenté par le Km) est définit par la structure 3D de l'enzyme et ne dépend pas de sa concentration. De ce fait les Km publiés dans la littérature sont souvent utilisés même sur des espèces différentes (Rohwer 2012). L'évolution des concentrations en métabolites est exprimée par des équations différentielles comme étant la somme des flux synthétisant le composé moins la somme des flux le dégradant. La résolution de ce système d'équation différentielle permet de simuler leur concentration en fonction du temps. L'un des principaux points limitant réside dans le nombre de données nécessaires. Cependant en cas d'absence de données sur les paramètres cinétiques des enzymes, il est possible d'ajuster ces paramètres manquant par optimisation en comparant les sorties du modèle avec des données mesurées (généralement des concentrations de métabolites).

Plusieurs modèles ont été développés sur cette base. Par exemple l'extension du modèle d'accumulation du saccharose sur la canne à sucre publié par Uys *et al.* (2007) ou récemment un modèle développé sur tomate par Beauvoit *et al.* (2014) sont des modèles dynamiques constitués d'états stationnaires à différents stades. Ils montrent ainsi l'évolution des flux au cours du développement. Cependant, aucun modèle n'a été publié à ce jour permettant de simuler le métabolisme des sucres de manière continue tout au long du développement d'un fruit avec la représentation explicite des paramètres enzymatiques ainsi que la prise en compte de la compartimentation cellulaire.

1.3.4. Intégration du contrôle génétique dans les modèles

La modélisation du réseau de régulation des gènes n'est applicable que pour des processus bien connus sur des espèces modèles. Dans les autres cas la représentation du contrôle génétique ne peut se faire que de manière moins détaillée en fonction des effets sur le phénotype. Les premières approches d'intégration du contrôle génétique dans un modèle ont été développées par Withe and Hoogenboom (1996) et Yin *et al.* (2000) dans des modèles écophysiologiques de culture de plantes. L'intégration consiste à définir les génotypes par un jeu de valeur de paramètres du modèle. Pour représenter l'effet de gènes candidats, White and Hoogenboom (1996) ont introduit une fonction prenant en compte les effets additifs des gènes intervenant sur un ou plusieurs paramètres. Cependant cette méthode nécessite une bonne connaissance des gènes impliqués ainsi que de leurs

effets sur le phénotype. Une autre méthode consiste à introduire des paramètres génotype-dépendants à partir desquels le modèle peut simuler les différents génotypes.

En combinant un modèle écophysiologique et une analyse de QTL (Quantitative Trait Locus), sur les paramètres du modèle il est possible de simuler la variabilité génétique de la réponse des plantes aux conditions environnementales (Tardieu 2003). Cette approche a été menée dans différents modèles permettant de simuler l'élongation des feuilles chez le maïs (Reymond *et al.* 2003), de prédire le rendement de lignées recombinantes d'orge (Yin *et al.* 2000) ou encore de simuler la qualité des fruits (Quilot *et al.* 2005).

1.4. Le métabolisme des sucres sous contrainte génétique complexe

1.4.1. Identification de régions génomiques contrôlant la concentration en sucres

La concentration en sucres et acides, ainsi que la taille des fruits sont autant de caractères quantitatifs (i.e. mesurable) liés à la qualité du fruit. Les caractères quantitatifs sont sous contrainte génétique complexe avec plusieurs régions génomiques (loci) impliquées dans leurs variations. De tels loci sont appelés QTL. L'objectif d'une cartographie de QTL est d'identifier un certain nombre de loci influençant la valeur du caractère, leur localisation sur le génome, leur effet ainsi que l'origine parentale de l'allèle favorable ou défavorable. La connaissance de ces régions ainsi que la création de marqueurs associés permet le développement de la sélection assistée par marqueur (SAM). La recherche de QTL se base sur le principe de liaison statistique entre le phénotype et le génotype afin de déterminer les régions du génome vraisemblablement responsables de la variation phénotypique. La recherche de QTL permet ainsi de comprendre l'architecture des gènes impliqués dans les paramètres de la qualité des fruits. De nombreux gènes majeurs et QTL ont été décrits sur différentes cartes génétiques de pêcher. Cependant il est parfois difficile de s'assurer du caractère mono-génique d'un trait contrôlé par un gène unique, MTL (Mendelian trait locus) (Lionneton *et al.* 2004). Aussi dans les articles publiés la plupart des MTL sont appelés QTL (Salazar *et al.,* 2014). Le Tableau 1.1 indique le nombre de QTL et MTL publiés sur le pêcher et recensés sur le site GDR (Genome Database for Rosaceae : www.rosaceae.org; 2014).

La détection de QTL dépend grandement du polymorphisme génotypique et phénotypique au sein de la population étudiée. C'est pourquoi les populations en ségrégation utilisées pour cette analyse doivent être créées de manière à maximiser cette variabilité. C'est une des limitations rencontrées avec le pêcher qui possède un faible niveau de variabilité génétique (Arús *et al.* 2012). Il est donc nécessaire de choisir des parents très éloignés génétiquement ou d'avoir recours à des croisements interspécifiques afin de constituer la population d'étude. Cette dernière peut être issue

d'un simple croisement (F1) ou suivi d'un croisement entre individus de la population (F2) ou d'un parent (BC1) ou encore d'une suite d'autofécondations (RIL : recombinant inbred lines). D'autres types de descendances sont possibles, le choix dépend essentiellement des contraintes biologiques de l'espèce. Par exemple les RILs permettent une meilleure résolution en augmentant le taux de recombinaison, de ce fait elles sont souvent utilisées chez la tomate (Causse *et al.* 2004; Lecomte *et al.* 2004). En revanche ce type de lignées est extrêmement long et couteux à mettre en place pour des espèces pérennes comme le pêcher, c'est pourquoi ce sont plutôt des populations F2 ou issues d'un rétrocroisement (backcross, BC) qui sont généralement utilisées (Salazar *et al.* 2014).

Les études réalisées sur différentes espèces mettent en évidence un déterminisme complexe des sucres avec de nombreux loci impliqués. Par exemple, chez la tomate 95 QTL liés aux sucres ont été identifiés d'après la revue de Labate *et al.* (2007). Chez le pêcher plusieurs QTL de sucres ont été identifiés sur chacun des 8 groupes chromosomes (Tableau 1.2). Lerceteau-Köhler *et al.* (2012) ont quant à eux mis en évidence chez la fraise 12 QTL liés aux sucres et 21 aux acides. Les auteurs suggèrent que de nombreux loci ayant une action faible sur les sucres n'ont pas été détectés dans leur étude. Le déterminisme hautement polygénique du métabolisme des sucres suggère de nombreuses voies de régulation. Seulement quelques études ont recherché des QTL d'activités enzymatiques. Pourtant dans le cas d'une co-localisation entre un QTL et un gène codant pour une fonction apparentée, ce dernier peut être considéré comme un gène candidat (Thévenot *et al.* 2005). De même, chez le maïs plusieurs loci ont été identifiés comme étant associés à la fois à des variations d'activités enzymatiques et des concentrations en carbohydrates ce qui permet d'éclaircir les voies métaboliques impliquées dans la variation d'un composé (Causse *et al.* 1994; Thévenot *et al.* 2005). Le manque de données sur les QTL d'enzyme peut venir de la difficulté de caractérisation des activités enzymatiques d'un grand nombre de génotype, difficulté minimisé aujourd'hui par le développement de plateformes de phénotypage haut débit (Gibon *et al.* 2004a). Ceci peut également s'expliquer par la grande stabilité des activités enzymatiques ne permettant pas une détection de QTL (Biais *et al.* 2014).

Tableau 1.1 Nombre de MTL et QTL décrits sur *P.persica* d'après le site GDR (Genome Database for Rosaceae : www.rosaceae.org; 2014)

Trait category	**MTL**	**QTL**
Anatomy and morphology traits	10	10
Growth and development traits	2	194
Quality and Biochemical traits	**8**	**166**
Stature or vigor traits	1	1
Sterility or fertility traits	1	0
Stress traits	4	167
Yield traits	0	2
Total	26	540

Tableau 1.2 Localisation sur les groupes de liaisons des QTLs directement liés au métabolisme des sucres et acides chez le pêcher.

Trait	Groupes de liaisons	références
Fructose	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	(Sosinski *et al.* 1998; Dirlewanger *et al.* 1999; Etienne *et al.* 2002; Quilot *et al.* 2004)
Glucose	1, 2, 4, 5, 7, 8	(Sosinski *et al.* 1998; Dirlewanger *et al.* 1999; Etienne *et al.* 2002; Quilot *et al.* 2004)
Sorbitol	2, 4, 5, 6	(Dirlewanger *et al.* 1999; Quilot *et al.* 2004)
Saccharose	3, 5, 6, 7	(Dirlewanger *et al.* 1999; Etienne *et al.* 2002; Quilot *et al.* 2004)

1.4.2. Approche fonctionnelle pour l'identification de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres

La mise en évidence des régions génomiques contrôlant la concentration des sucres permet de comprendre les mécanismes à l'origine de cette variation phénotypique. L'annotation du génome offre la possibilité de rechercher des gènes candidats à la fois positionnels (localisé dans un QTL) et fonctionnels (codant pour une protéine intervenant dans le métabolisme). La réduction de la zone d'un QTL à l'aide d'individus recombinants dans cette zone permet de diminuer du même coup le nombre de gènes potentiels. Cette méthode a été réalisée avec succès chez la tomate et a permis de cloner et séquencer un QTL contrôlant les concentrations en fructose et glucose (Fridman *et al.* 2000). Cette étude révèle un polymorphisme au niveau d'un gène codant pour une invertase pariétale.

Afin de valider la fonction d'un gène codant pour une enzyme, certaines études ont réalisé la synthèse de la protéine d'intérêt dans un système hétérologue (généralement une levure) puis, après purification de la protéine, ont mesuré son activité enzymatique. Ainsi des gènes codants pour des isoenzymes de FK ont été validés chez la tomate (Kanayama *et al.* 1997; Petreikov *et al.* 2001) ou d'invertase chez la tomate (Tauzin *et al.* 2014) et chez une fabacée (Zhang *et al.* 2014b). Le système hétérologue principalement utilisé pour valider la fonction d'un gène codant pour un transporteur est l'œuf de xénope. Le transporteur est synthétisé et intégré à la membrane où il est possible de mesurer ses caractéristiques. Ainsi des transporteurs spécifiques des sucres ont été identifiés chez arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*, Chardon *et al.,* 2013), le riz (*Oryza sativa*, Zhou *et al.,* 2014 ; Eom *et al.,* 2011) et la poire (*Pyrus bretschneideri*, Zhang et *al.,* 2013).

1.5. Présentation de la thèse

1.5.1. Objectifs et démarche

Ce projet de thèse s'inscrit dans un cadre de recherches innovantes en biologie intégrative. **L'objectif de cette thèse est d'étudier le métabolisme des sucres d'un point de vue métabolique, enzymatique et génétique ainsi que de concevoir un modèle métabolique décrivant l'accumulation des sucres dans le fruit au cours de son développement.** Ce travail porte plus particulièrement sur la mise en évidence de l'effet d'une perturbation de la teneur en fructose sur l'ensemble du métabolisme des sucres ainsi que sur la compréhension des mécanismes à l'origine de ce phénotype appelé 'peu de fructose'.

La démarche intégrative passe par une première phase d'acquisition de données. À ce jour, plusieurs études portant sur les sucres dans les fruits ont été réalisées, cependant, elles se concentrent principalement sur un sucre ou une enzyme spécifique et ne portent souvent que sur une seule variété. Dans le cas présent le métabolisme des sucres a été caractérisé par la mesure des teneurs en sucres et des activités enzymatiques des principales enzymes sur l'ensemble d'une population en ségrégation. Ceci permet d'avoir une vision d'ensemble du métabolisme des sucres au cours de la croissance des pêches ainsi que de la variabilité présente dans la population.

Les données obtenues ont permis de développer un modèle métabolique permettant de simuler le métabolisme des sucres au cours de la croissance des fruits. Ce modèle prend en compte de manière explicite les caractéristiques cinétiques des enzymes (i.e. Vmax et Km), la compartimentation intracellulaire entre le cytosol et la vacuole ainsi que les transports entre ces deux compartiments. Les activités enzymatiques mesurées ont ainsi pu être intégrées dans le modèle métabolique. Des modèles comparables ont été développés sur la canne à sucre et la tomate (Uys *et al.* 2007; Beauvoit *et al.* 2014), cependant le modèle développé au cours de cette thèse est le premier permettant de simuler le métabolisme des sucres de sur l'ensemble du développement du fruit.

Afin de disséquer l'architecture des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres, les données recueillies sur les métabolites et activités enzymatiques ont fait l'objet d'une recherche de QTL. Ce qui a permis l'identification de QTL différents en fonction du stade de développement du fruit ainsi que des QTLs d'activités enzymatiques, jamais détectés jusque-là chez la pêche. En parallèle, nous avons identifié un excellent gène candidat pour le phénotype particulier 'peu de fructose' observé chez un quart des individus de la population. La validation fonctionnelle de ce gène a été entreprise par le biais de collaborations.

1.5.2. Matériel végétal

La population utilisée dans cette thèse a été créée à l'INRA d'Avignon dans le cadre d'un programme d'amélioration de la résistance à plusieurs ravageurs du pêcher (sharka, oïdium, puceron vert et cloque). Cette population est issue d'un croisement interspécifique entre un pêcher sauvage, *P. davidiana* (clone P1908), source de résistance face aux ravageurs mais possédant une très faible valeur agronomique et une variété commerciale de nectarine à chair jaune Summergrand® (*P. persica*). Suite à ce croisement, un hybride SD40 présentant un bon niveau de résistance à l'oïdium a été sélectionné pour effectuer un rétrocroisement avec la variété Summergrand donnant lieu à la famille BC1. Un mélange des pollens de cette famille a servi à féconder la variété commerciale Zéphyr® (*P. persica*), une nectarine à chair blanche. C'est la population appelée BC2 (pour Back Cross 2) issue de ce dernier croisement qui a fait l'objet de cette étude. Cette population s'apparente à un double back cross si l'on considère que les allèles proviennent soit de *P. persica*, soit de *P. davidiana*. Cependant ce n'est pas un double back cross au sens strict car les deux parents *P. persica* utilisés sont différents, bien que très proches comparés à *P. davidiana*. Les génotypes que l'on peut rencontrer à un locus donné sont décrits dans le Tableau 1.3. Dans la population BC2, tous les génotypes portent un des deux allèles de la variété Zéphyr alors que l'allèle de *P. davidiana* est présent chez environ ¼ des individus.

La population BC2 a été caractérisée pour différents critères liés à la qualité du fruit à maturité pour l'ensemble de la population et en cinétique au cours du développement du fruit pour une partie des génotypes (Wu *et al.* 2003; Quilot *et al.* 2004b; Wu *et al.* 2005). En particulier, les différents sucres et acides présents chez la pêche ont été mesurés. Les génotypes de la population BC2 ont des concentrations en sucres plus importantes que *P. davidiana* et certains génotypes présentent même des concentrations supérieures à celles des variétés Summergrand et Zéphyr. Pour la majorité des génotypes la concentration en glucose est équivalente à la concentration en fructose à maturité. De manière intéressante, environ un quart des génotypes présentent une concentration en fructose très faible et une concentration en glucose variable, parfois importante avec un rapport fructose sur glucose faible. Nous qualifierons ces génotypes 'peu de fructose' (ou 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes) en contradiction avec les génotypes au ratio équilibré appelés génotypes 'standards' (ou 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes) dans le reste du manuscrit. Cette particularité fait de cette population un matériel privilégié pour l'étude du métabolisme des sucres et plus particulièrement l'effet d'une modification ponctuelle du taux de fructose sur l'ensemble du métabolisme des sucres.

Tableau 1.3 Génotypes possibles à un locus pour les individus des descendances BC1 et BC2. D'après (Quilot 2003).

P. davidiana X Summergrand

SD40	S_1D_1

SD40 X Summergrand

BC1	D_1	S_1
S_1	D_1S_1	S_1S_1
S_2	D_1S_2	S_2S_1

Différents types de gamètes issus de la descendance BC1

D_1 (1/4)	S_1 (1/2)	S_2 (1/4)

BC1 X Zéphir

BC2	D_1	S_1	S_2
Z_1	Z_1D_1 (1/8)	Z_1S_1 (1/4)	Z_1S_2 (1/8)
Z_2	Z_2D_1 (1/8)	Z_2S_1 (1/4)	Z_2S_2 (1/8)

1.5.3. Laboratoires d'accueil et collaborations

J'ai réalisé cette thèse conjointement au sein des unités GAFL (INRA UR1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Avignon) et PSH (INRA UR1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Avignon). J'ai réalisé la partie phénotypage et caractérisation du métabolisme des sucres sur la plateforme phénotypage métabolique de Bordeaux (UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, Bordeaux) en collaboration avec Yves Gibon. J'ai effectué une expérimentation à l'Université d'Oxford (du 16/04/2013 au 17/05/2013) visant à quantifier les flux de fructose au travers du tonoplaste par marquage radioactif au sein de l'équipe dirigée par Lee Sweetlove (Departement of Plant Science) grâce à l'obtention d'une bourse de recherche Jean et Marie Louise Dufrenoy (Académie d'Agriculture de France). Lors de cette thèse, deux collaborations ont été mises en place dans le but de valider la fonction du gène candidat pour expliquer le phénotype 'peu de fructose'. La première avec Fabien Chardon (UMR1318 IJPB Institut Jean Pierre Bourgin, Versailles-Grignon), dans le but de réaliser une complémentation dans *Arabidopsis thaliana* (insertion du gène candidat pêcher dans des mutants d'Arabidopsis). La seconde collaboration concerne Benoit Lacombe (UMR 5004 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier) et a pour but de montrer que le gène candidat code pour un transporteur de fructose en le faisant s'exprimer dans un système hétérologue (oeufs de Xenope).

1.5.4. Organisation du manuscrit

Ce manuscrit est organisé en 6 chapitres, outre le présent chapitre d'introduction :

Le chapitre 2 présente la **caractérisation du métabolisme des sucres**, par le dosage de métabolites et d'activités enzymatiques au cours du développement du fruit chez 106 génotypes d'une population en ségrégation. Cette partie fait l'objet d'une publication parue au journal *BMC Plant Biology*.

Le chapitre 3 décrit le **modèle métabolique** développé au cours de cette thèse ainsi que l'exploration des hypothèses fonctionnelles relatives au phénotype 'peu de fructose' sous forme d'un article à soumettre.

Le chapitre 4 présente sous la forme d'un article (à soumettre) la **détection de QTL** relatifs aux sucres, acides et activités enzymatiques à différents stades de développement du fruit ainsi que leur co-localisation avec des gènes candidats sur le génome du pêcher.

Le chapitre 5 reprend les différentes analyses réalisées dans le but de **valider la fonction d'un gène** candidat responsable du phénotype 'peu de fructose'.

Le chapitre 6 regroupe la **conclusion** et les **perspectives** de ce travail.

Chapitre 2 : Caractérisation du métabolisme des sucres au cours du développement du fruit

Chapitre 2 : Caractérisation du métabolisme des sucres au cours du développement du fruit

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article paru dans BMC plant biology. Il porte sur la caractérisation du métabolisme des sucres au cours du développement du fruit. Cette étude a été réalisée au sein de la population BC2 présentée ci-dessus. Il s'agit d'une descendance interspécifique présentant des rapports fructose sur glucose contrastés. Les données acquises lors de cette étude ont ensuite servi de base pour la construction du modèle métabolique ainsi que pour la recherche des QTL liés au métabolisme des sucres. La caractérisation des concentrations en sucres et des capacités enzymatiques présentée ici a permis d'une part une meilleure compréhension du métabolisme des sucres au niveau des mécanismes moléculaires et d'autre part l'étude de son déterminisme génétique.

Profiling sugar metabolism during fruit develop ent in a peach progeny with different fructose-to-glucose ratios

Authors : Elsa Desnoues[1,2], Yves Gibon[3], Valentina Baldazzi[2], Véronique Signoret[1], Michel Génard[2], Bénédicte Quilot-Turion[1]

[1] INRA, UR1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, F-84000 Avignon, France, [2] INRA, UR1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, F-84000 Avignon, France, [3] INRA, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, F33883 Villenave d'Ornon, France - Univ. Bordeaux 146 rue Léo-Saignat, F 33076 Bordeaux Cedex, France – Metabolome Facility of Bordeaux Functional Genomics Center, IBVM, Centre INRA de Bordeaux, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Résumé :

Le goût des fruits dépend grandement des concentrations en sucres et en acides et de manière non négligeable de la concentration en fructose qui est le sucre possédant le pouvoir sucrant le plus important. À ce jour, de nombreuses études sur les sucres dans les fruits n'ont porté que sur quelques sucres ou enzymes spécifiques et souvent sur une seule variété. Peu d'études détaillées ont caractérisé le métabolisme des sucres dans sa globalité ainsi que son évolution au cours du développement du fruit. Dans les fruits de pêches commerciales, le saccharose est le sucre majoritaire, suivi par le fructose et le glucose, qui ont des niveaux similaires et enfin le sorbitol. De manière intéressante, un faible rapport de fructose sur glucose a été observé chez des accessions de pêchers sauvages. Le croisement étudié, entre un pêcher sauvage et des variétés commerciales, offre une possibilité exceptionnelle pour étudier le métabolisme des sucres des fruits ainsi que sa diversité.

Ce travail fournit un jeu de données conséquent sur la diversité génétique de la composition en sucres et des capacités des enzymes impliqués dans le métabolisme des sucres au cours du développement du fruit. Une grande partie des métabolites et des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres ont été mesurés dans une descendance de 106 génotypes, dont un quart présente un faible rapport de fructose sur glucose. Cette caractérisation a été effectuée à six stades de croissance en utilisant des procédés à haut débit. Les résultats obtenus permettent de représenter de manière quasi-exhaustive le métabolisme des sucres dans la pêche. La caractérisation d'un grand nombre de génotypes a révélé une robustesse remarquable des capacités enzymatiques entre les génotypes et les années. Et ce malgré de fortes variations dans les concentrations en

sucres, en particulier le rapport fructose sur glucose. Une faible corrélation a également été montrée entre les capacités enzymatiques et les vitesses d'accumulation des métabolites.

Ces résultats infirment l'hypothèse d'un contrôle enzymatique direct de la concentration des sucres dans les fruits de pêche. Des hypothèses alternatives concernant la régulation de la concentration en fructose sont discutées sur la base des données expérimentales. Ce travail pose les bases d'une étude approfondie des mécanismes impliqués dans le métabolisme des sucres dans les fruits en développement.

Abstract :

Fruit taste is largely affected by the concentration of soluble sugars and organic acids and non-negligibly by fructose concentration, which is the sweetest-tasting sugar. To date, many studies investigating the sugars in fruit have focused on a specific sugar or enzyme and often on a single variety, but only a few detailed studies addressing sugar metabolism both as a whole and dynamic system are available. In commercial peach fruit, sucrose is the main sugar, followed by fructose and glucose, which have similar levels. Interestingly, low fructose-to-glucose ratios have been observed in wild peach accessions. A cross between wild peach and commercial varieties offers an outstanding possibility to study fruit sugar metabolism.

This work provides a large dataset of sugar composition and the capacities of enzymes that are involved in sugar metabolism during peach fruit development and its genetic diversity. A large fraction of the metabolites and enzymes involved in peach sugar metabolism were assayed within a peach progeny of 106 genotypes, of which one quarter displayed a low fructose-to-glucose ratio. This profiling was performed at six stages of growth using high throughput methods. Our results permit drawing a quasi-exhaustive scheme of sugar metabolism in peach. The use of a large number of genotypes revealed a remarkable robustness of enzymatic capacities across genotypes and years, despite strong variations in sugar composition, in particular the fructose-to-glucose ratio, within the progeny. A poor correlation was also found between the enzymatic capacities and the accumulation rates of metabolites.

These results invalidate the hypothesis of the straightforward enzymatic control of sugar concentration in peach fruit. Alternative hypotheses concerning the regulation of fructose concentration are discussed based on experimental data. This work lays the foundation for a comprehensive study of the mechanisms involved in sugar metabolism in developing fruit.

Introduction

Peach (*Prunus persica*) has a high economic value, and with the publication of its genome (The International Peach Genome Initiative 2013), has become the reference species for *Prunus*. The organoleptic properties of peach, as fruit in general, largely depend on the accumulated sugars and acids, and sweetness is positively correlated with the ratio of sugars and acids (Colaric *et al.* 2005). The ratios between the different sugars also affect the fruit taste (Schaffer 1999; Kanayama *et al.* 2005), with fructose being the sweetest (almost twice as sweet as glucose) (Biester *et al.* 1925). Knowledge of the mechanisms that are involved in sugar metabolism is therefore essential for the creation of fruit varieties that meet consumers' expectations.

Sugar accumulation during fruit development has been studied in different species. The amount of total soluble sugars usually changes with fruit growth, peaking at maturity or ripening (Carrari and Fernie 2006; Basson *et al.* 2010; Yativ *et al.* 2010; Li *et al.* 2012a; Cao *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013). However, sugar accumulation patterns and concentrations differ between species. In most fruits, glucose and fructose form the major proportion of soluble sugars, whereas in peach, mandarin and litchi, sucrose is the predominant sugar (Moriguchi *et al.* 1990a; Robertson *et al.* 1990; Yakushiji *et al.* 1996; Yang *et al.* 2013). Sorbitol, a sugar alcohol, is present in some species, especially in Rosaceae, but its concentration varies strongly between species. For example, the level of sorbitol is very high in cherry (Gao *et al.* 2003), exhibiting comparable levels to those of glucose and fructose. In contrast, sorbitol is only the third–most-abundant sugar before sucrose in loquat (Cao *et al.* 2013) and the fourth in apple (Li *et al.* 2012a) and peach (Moriguchi *et al.* 1990a). Generally, fructose and glucose are present in equal amounts, such as in tomato (Carrari and Fernie 2006), melon (Zhang and Li 2005), grape berry (Dai *et al.* 2013), cherry (Gao *et al.* 2003) and peach (Moriguchi *et al.* 1990a). However, in apple, fructose is by far the major sugar (Li *et al.* 2012a). Interestingly, natural fructose-to-glucose ratio deficits are often observed in fruit of wild (Kanayama *et al.* 2005) and ornamental (Moriguchi *et al.* 1990a) peaches. This feature is also encountered in apricots (Ledbetter *et al.* 2006) and tomato, for which a major locus that controls the fructose-to-glucose ratio has been found (Levin *et al.* 2000).

Extensive studies of enzymatic capacity of fruit sugar pathways are needed to improve our understanding of mechanisms involved in sugar metabolism and in the fructose-to-glucose ratio. Peach is a good candidate for such study given its highly variable fructose-to-glucose ratio (from 0.4 to 2.5 depending on the genotype (Cantín *et al.* 2009)), which is as variable as the range found between the main commercial fruit species.

Many studies investigating sugars in peach fruit have focused on a specific sugar or enzyme and have been performed on a single variety (Additional Table 2.1). With recent technological developments, it is now possible to perform metabolic and enzymatic profiles using large numbers of samples. However, only a few detailed studies addressing sugar metabolism both as a whole and as a dynamic system are available in the literature: Nardozza et *al.* (2013) carried out a multilevel analysis of kiwifruit metabolism; Steinhauser et *al.* (2010) and Biais et *al.* (2014) performed metabolic and enzymatic profiling during tomato fruit development; and Lombardo et *al.* (2011) reported a large metabolic profiling of peach throughout development, but these latter authors studied only a few enzymes of carbon and nitrogen metabolism. To date, very few attempts have been made to link metabolites and enzymatic capacities to understand the mechanistic relationships that regulate sugar metabolism in fruit. A recent study using a modeling approach quantified the control that is exerted by enzymes within the sucrose metabolism throughout tomato fruit development (Beauvoit *et al.* 2014).

In this context, the present study intends to provide a unique, extensive picture of the developmental dynamics and genetic diversity of sugar metabolism in peach fruit. For this purpose, a large fraction of the metabolites and enzymes involved in peach sugar metabolism were assayed within a peach progeny of 106 genotypes at different times of fruit development and using high-throughput methods (Gibon *et al.* 2002; Kopka *et al.* 2004).

Natural diversity provides a powerful resource for uncovering key components in the regulation of metabolic networks (Cross *et al.* 2006; Sulpice *et al.* 2013). Although profiling the entire progeny erases accession particularities and highlights general trends of the species, the presence within our progeny of genotypes displaying contrasting fructose-to-glucose ratios offers a useful system for exploring sugar metabolism in the case of a major perturbation in the fructose amount. Indeed, our results revealed the remarkable robustness of enzymatic capacities across genotypes and years despite strong variations in the sugar composition as well as in the fructose-to-glucose ratio within the population. A poor correlation was found between the enzymatic capacities and metabolite concentrations, discarding the hypothesis of a straightforward enzymatic control of sugar concentration in fruit. The data obtained allow the formulation of alternative hypotheses concerning the regulation of fructose concentration.

Results

From the sparse information available in the literature, we built a comprehensive scheme of sugar metabolism in peach fruit (Figure 2.1) that includes all of the known enzymatic reactions as well as connections to the main pathways of carbon metabolism. Accordingly, the metabolic profiling of the 106 genotypes of an interspecific progeny was performed by assaying four metabolites and twelve enzymatic capacities (maximal activities) at different times of fruit development. In addition, the three major hexose phosphates were assayed in ten genotypes of the progeny throughout fruit development.

The large number of studied genotypes permits the blanking out of individual variations to extract the general characteristics of peach sugar metabolism. Within the large phenotypic diversity displayed by our progeny, 77 out of the 106 individuals under study exhibited a 'standard' fructose-to-glucose ratio. We first focused on these individuals to identify general trends of temporal variations during growth in peach fruit. In the second step of the analysis, we focused on the fructose type, comparing the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes to the 'standard' ones. The results from this new point of view may indicate the key regulatory steps of sugar metabolism.

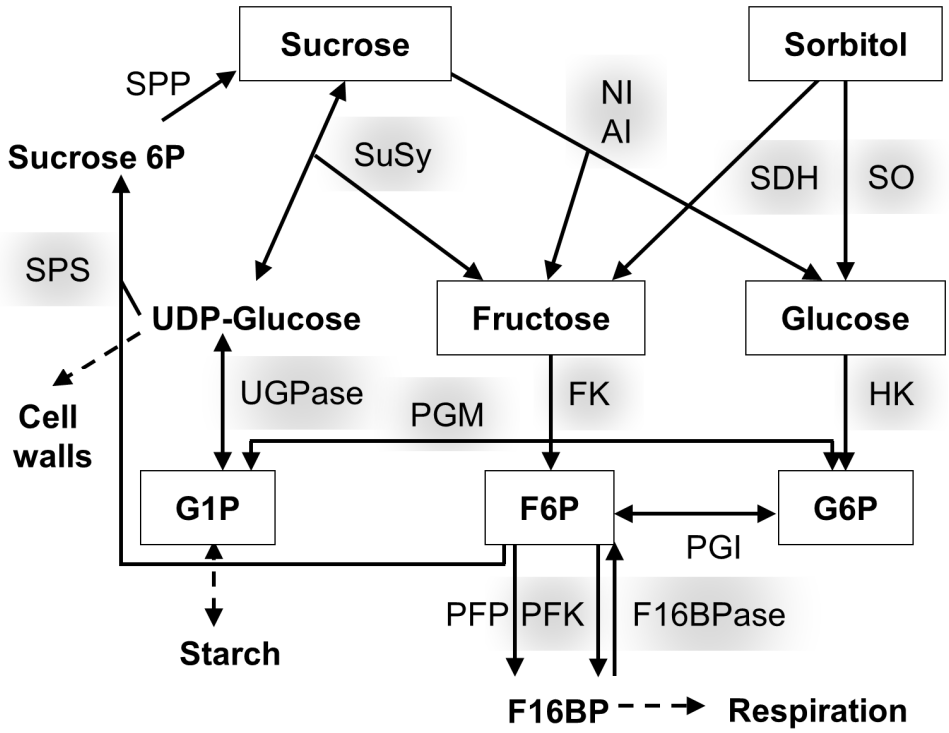


Figure 2.1 Peach sugar metabolism (Moriguchi *et al.* 1990; Etienne *et al.* 2002; Kanayama *et al.* 2005). Proposed sugar metabolism pathway in peach fruit as built from partial literature data. The metabolites and enzymatic capacities that were assayed in the present study are framed and highlighted. In peach, carbon enters the fruit in the form of sucrose and sorbitol, the two main end products of photosynthesis in source organs (Moriguchi *et al.* 1990). Sucrose, which is the major sugar in peach fruit, is hydrolysed into fructose and UDP-glucose by sucrose synthase (SuSy, EC 2.4.1.13) in the cytosol and into fructose and glucose by invertases, in the cell wall, the cytosol (NI, neutral invertase EC 3.2.1.26) or the vacuole (AI, acid invertase EC 3.2.1.26). Cytosolic sorbitol is converted to fructose via sorbitol dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.14) and to glucose via sorbitol oxidase (SO) (Moriguchi *et al.* 1990). Fructose and glucose can be stored in the vacuole or phosphorylated in the cytosol via reactions catalyzed by fructokinase (FK, EC 2.7.1.4) and hexokinase (HK, EC 2.7.1.1), respectively, to form fructose-6-phosphate (F6P) and glucose-6-phosphate (G6P) (Kanayama *et al.* 2005). F6P is then converted into fructose 1,6-bisphosphate (F16BP) by PPi-phosphofructokinase (PFP, EC 2.7.1.90), ATP-phosphofructokinase (PFK, EC 2.7.1.11) and the inverse reaction is catalyze by fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase, EC 3.1.3.11) (Etienne *et al.* 2002). Phosphoglucose isomerase (PGI, EC 5.3.1.9), phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9) catalyze the inter-conversion between the hexose phosphates.Sucrose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14) and sucrose-phosphate phosphatase (SPP EC 3.1.3.24), involve in the sucrose re synthesis via a futile cycle.

Temporal evolutions of metabolites and enzymatic capacities during fruit growth

The sucrose concentration rapidly increased with time to become the main sugar in peach fruit (Figure 2.2 c). In contrast, the glucose concentration remained relatively constant (Figure 2.2 a), and the fructose concentration decreased during the first part of the development and then increased (Figure 2.2 b). The fructose and glucose amounts were comparable at the end of the time courses. Sorbitol, which was always lower than the three other sugars analyzed, displayed a slight increase during growth and then decreased during the latest developmental stages (Figure 2.2 d). As expected, the hexose phosphates were present at considerably lower concentrations than the previous sugars. Their time courses were similar, with glucose-6-phosphate (G6P) being higher than fructose-6-phosphate (F6P) or glucose-1-phosphate (G1P) (Figure 2.3). The results obtained for the metabolites were in general in accordance with those from the literature (Additional Table 2.1) in terms of magnitude and time courses. The high variability in the sugar concentration between the genotypes in our population is coherent with the ranges observed by Cantin *et al.* (2009). Concerning hexose phosphates, the literature on peach is poor. Kanayama *et al.* (2005) reported F6P and G6P concentrations that were tenfold less than those that we obtained. However, our results for F6P are consistent with the results from Lombardo *et al.* (2011).

The enzymatic capacities were highly contrasted, with levels ranging on average from 4 to 290 nmol g FW^{-1} min^{-1} depending on the enzyme (Figure 2.4). The enzymes that were directly linked to hexose phosphates metabolism, especially phosphoglucomutase (PGM) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase), displayed the highest capacities (Figure 2.4 a, e) as reported in tomato (Schaffer and Petreikov 1997a; Kortstee *et al.* 2007; Biais *et al.* 2014). However, unlike in tomato, our study revealed that the PGM and ATP-phosphofructokinase (PFK) capacities increased during fruit growth (Figure 2.4 a, j). The capacities of sucrose synthase (SuSy), sucrose phosphate synthase (SPS), sorbitol dehydrogenase (SDH), sorbitol oxidase (SO), neutral invertase (NI), and acid invertase (AI) (Figure 2.4 c, g, h, i, k, l) were comparable to the data from the literature on peach (Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Vizzotto *et al.* 1996; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Morandi *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2013), with the exception of Sun *et al.* (2011), who reported higher and lower capacities for SPS and AI, respectively. Finally, we observed very low capacities of fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase) and PFK, both of which are linked to fructose-1,6-bisphosphate (F16BP) (Figure 2.4 b, j). The temporal variations in the enzymatic capacities were also fairly small compared to those observed for the metabolite concentrations. The SuSy capacity slightly increased, fructokinase (FK) and hexokinase (HK) decreased and then increased during the second half of fruit development. F16BPase and UGPase followed the same trends to a lesser extent. SPS increased and rapidly became constant, and

SO decreased at the end of growth. The capacities of the three other enzymes, SDH, NI and AI, were rather stable throughout fruit development (Figure 2.4 h, k, l). Different studies conducted in fruits reported a rapid decrease in the capacities of the majority of the enzymes during cell division (before 50 or 60 days after bloom in peach fruit) (Moriguchi *et al.* 1991; Vizzotto *et al.* 1996; Lo Bianco *et al.* 1999). However, in the present study, we began monitoring approximately 50-60 DAB (day after bloom) once the cell division phase was completed.

Changes in the enzymatic capacities do not explain variations in their substrates or products

To search for possible links between enzymatic capacities and metabolite composition, a correlation analysis was performed based on the following hypothesis: variations in the enzymatic capacities during a given period would affect the flux toward a metabolite as accumulated during this period. Therefore, the accumulation rates of metabolites were computed between two successive time points (see the Methods section) and compared using Spearman's correlations to the average enzymatic capacities at these two time points (Figure 2.5). This analysis revealed a positive correlation between the enzymes involved in the metabolism of hexose phosphates (FK, HK, F16BPase, UGPase, PFK and PGM).

Considering the 15 enzyme-metabolite pairs for which the metabolite was either the direct substrate or the direct product of the enzyme, few significant correlations were found. Four positive correlations were observed between the enzymes and their direct substrate: sorbitol and SDH (0.2, *P* value <0.001), sorbitol and SO (0.17, *P* value <0.001), glucose and HK (0.15, *P* value =0.001), and fructose and FK (0.23, *P* value <0.001). The fructose accumulation rate was positively correlated to the SuSy capacity (0.25, *P* value <0.001). A single correlation was found between an enzyme and its direct product. Therefore, SuSy and FK seemed to have a greater effect on the fructose levels than AI, NI and SDH do.

Fruit of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes has a significantly lower fresh mass than fruit of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes

For every genotype, the fruit fresh mass was monitored during fruit development (Figure 2.6). The 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes had a significantly lower fresh mass than that of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (Table 2.1). The difference was more pronounced during the latest developmental stage.

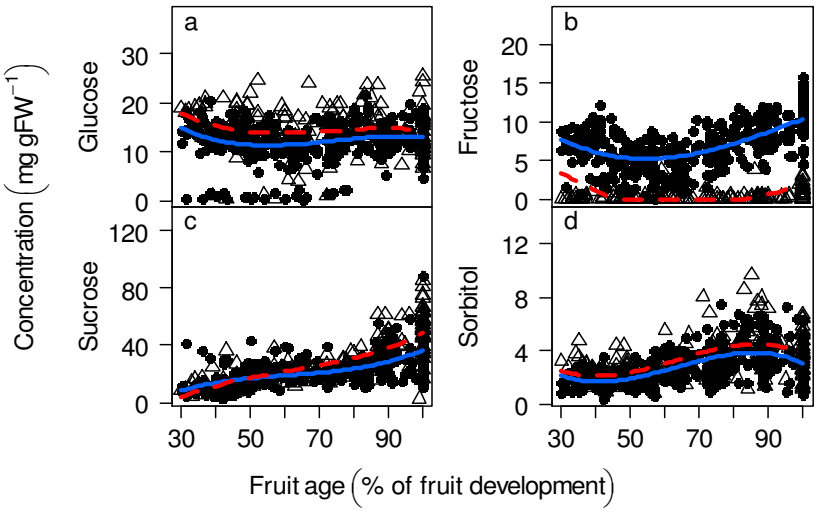


Figure 2.2 Metabolite profiles. Changes in the metabolite concentrations (mg g FW $^{-1}$) during fruit development for 106 genotypes. The symbols represent the mean of the two technical replicates, open triangles represent the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, and closed circles represent the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The lines are fitted linear models by GLMM for all of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (red dashed line) and for all of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (blue solid line).

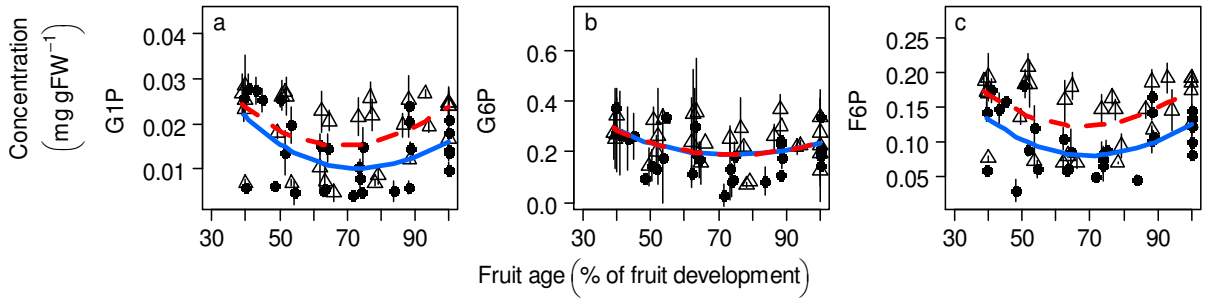


Figure 2.3 Hexose phosphate profiles. Changes in the hexose phosphates concentration (mg g FW $^{-1}$) during fruit development for ten genotypes. The symbols represent the mean of the three biological and the two technical replicates, open triangles represent the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes and closed circles the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The segments represent the standard error on biological replicates. The lines are fitted linear models by GLMM for all of the five 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (red dashed line) and for all of the five 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (blue solid line). Abbreviations: G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate.

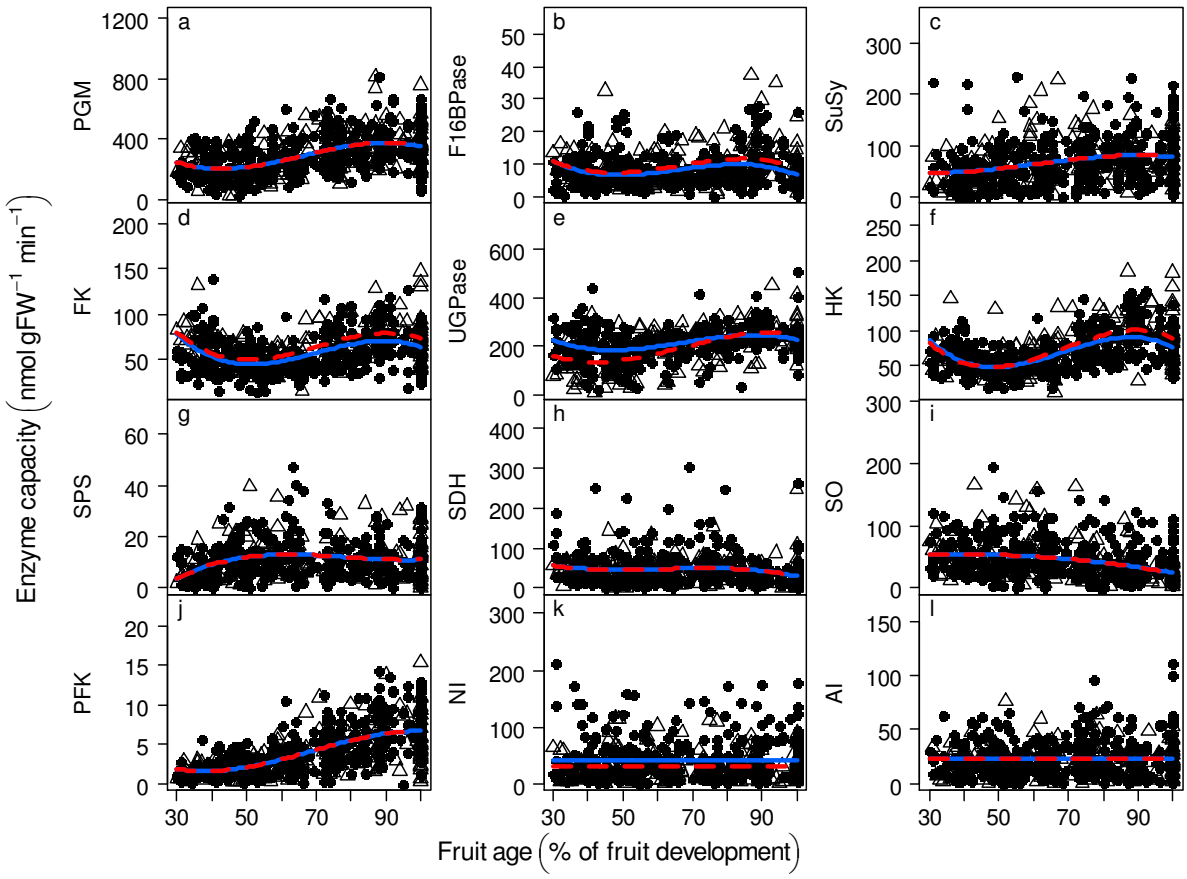


Figure 2.4 Enzyme profiles. Changes in the enzymatic activities (nmol g FW $^{-1}$ min^{-1}) during fruit development for 106 genotypes. The symbols represent the mean of the two technical replicates, open triangles represent the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes and closed circles the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The lines are fitted linear models by GLMM for all of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (red dashed line) and for all of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (blue solid line). Abbreviations: PGM, phosphoglucomutase; F16BPase, fructose-1,6-bisphosphatase; SuSy, sucrose synthase; FK, fructokinase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; HK, hexokinase; SPS, sucrose phosphate synthase; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxidase; PFK, ATP-phosphofructokinase; NI, neutral invertase; AI, acid invertase.

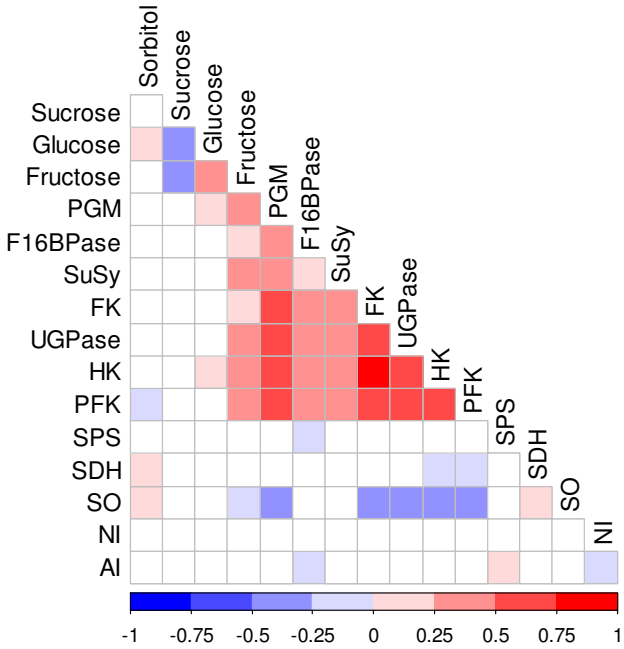


Figure 2.5 Metabolite and enzyme correlations. Visualization of Spearman's correlations between the rate of metabolite production (nmol g FW^{-1} min^{-1}) and the enzymatic capacities during peach fruit development for the 77 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The square color corresponds to the correlation value as shown in the legend: blue represents a negative correlation, and red represents a positive correlation. The white squares correspond to non-significant correlations (*P* value >0.01). Abbreviations: PGM, phosphoglucomutase; F16BPase, fructose-1,6-bisphosphatase; SuSy, sucrose synthase; FK, fructokinase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; HK, hexokinase; SPS, sucrose phosphate synthase; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxidase; PFK, ATP-phosphofructokinase; NI, neutral invertase; AI, acid invertase.

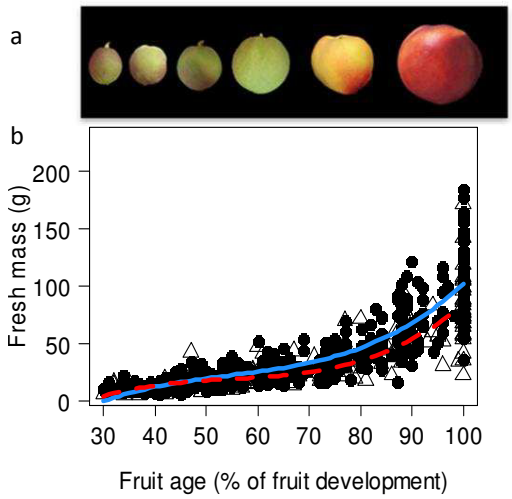


Figure 2.6 Fruit growth. a) Fruit harvested at different time points during development. b) Peach fruit growth curve in fresh mass (g) during fruit development for 106 genotypes. The symbols represent the mean of six fruits, open triangles represent the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, and closed circles represent the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The lines are fitted linear models by GLMM for all of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (red dashed line) and for all of the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (blue solid line).

Striking differences in the metabolite composition associated with the fructose type

The fructose-to-glucose ratio was significantly different between the two groups of genotypes (Chisq 94, *P* value <0.001) throughout fruit growth. At maturity, there was no overlapping of the fructose-to-glucose ratios of the two fructose types. The mean, minimal and maximal values of the fructose-to-glucose ratios for the two fructose types are presented in Table 2.2. The fructose-to-glucose ratio was also stable between years for the two genotypes as monitored over two years (Additional Figure 2.1).

The two fructose types showed similar time courses for metabolite accumulation, except for sucrose, which accumulated faster in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (Figure 2.2 c). In addition, the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes had significantly higher concentration of glucose, sucrose (during the second half of fruit development), sorbitol, G1P and F6P, whereas G6P was not significantly different between the two fructose types (Figures 2.2, 2.3, Table 2.1). The higher sucrose and glucose concentration for the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes resulted in a similar sweetness score between the two fructose types at maturity.

Fruit of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes have higher fructokinase and lower neutral invertase capacities

The enzymatic capacities were highly conserved between the two fructose types. Indeed, out of the twelve assayed enzymes, only five showed slight but significant differences between the two fructose types. Among these enzymes, it is interesting to note that the capacity of FK, which catalyzes the phosphorylation of fructose, was higher in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (Figure 2.4, Table 2.1). A further interesting point concerns neutral invertase (NI), which catalyzes the hydrolysis of sucrose into fructose and glucose and was lower in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes (Figure 2.4, Table 2.1).

Could these subtle differences observed in the enzymatic capacities explain the difference in the fructose concentrations between the two fructose types? To answer this question, a multiple co-inertia analysis (MCOA) was performed. This method accurately highlights trends or co-relationships in multiple datasets (Figure 2.7). The information that is displayed by the first common component (CC1) essentially corresponded to changes over time in the metabolite composition and enzymatic capacities (Figure 2.7 a). The temporal trend was largely explained by sucrose and sorbitol (Figure 2.7 b). The second common component did not allow the drawing of a pertinent feature (data not shown), whereas the third common component (CC3) was able to separate the two groups of genotypes (Figure 2.7 a). However, the major part of the variance of this component was explained by fructose and, to a lesser extent, by sorbitol and sucrose, which emphasizes the fact that enzymatic capacities did not participate in the fructose type separation in this MCOA plan. Again, there was no obvious link between the capacities of enzymes and their direct substrates or products.

Table 2.1 Variable effects on metabolites and enzymes. Chi square test for the fructose types and temporal effect through the 106 genotypes as obtained by a likelihood ratio test of GLMM models. **** Significant differences at *P* value <0.0001, *** Significant differences at *P* value <0.001, ** Significant differences at *P* value <0.01, * Significant differences at *P* value <0.05. Abbreviations: G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; PGM, phosphoglucomutase; F16BPase, fructose-1,6-bisphosphatase; SuSy, sucrose synthase; FK, fructokinase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; HK, hexokinase; SPS, sucrose phosphate synthase; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxidase; PFK, ATP-phosphofructokinase; NI, neutral invertase; AI, acid invertase;

	Fructose type effect			Temporal effect		
	Chisq	*P* value		Chisq	*P* value	
FW	42.5	6.0E-10	****	1044.4	8.3E-225	****
Glucose	17.3	1.7E-04	***	32.8	1.0E-06	****
Fructose	274.2	8.7E-60	****	383.4	1.3E-82	****
Sucrose	68.6	1.2E-15	****	457.0	1.3E-97	****
Sorbitol	11.7	3.2E-03	**	273.5	3.3E-58	****
G1P	9.7	7.6E-03	**	73.5	4.1E-15	****
G6P	3.9	1.4E-01		12.4	1.4E-02	*
F6P	6.5	3.7E-02	*	56.3	1.6E-11	****
PGM	2.7	2.5E-01		212.5	7.8E-45	****
F16BPase	6.7	3.5E-02	*	42.4	1.3E-08	****
SuSy	0.3	8.7E-01		42.7	1.2E-08	****
FK	8.9	1.1E-02	*	168.6	2.1E-35	****
UGPase	37.7	6.3E-09	****	176.2	4.7E-37	****
HK	11.0	4.1E-03	**	277.1	9.3E-59	****
SPS	1.3	5.2E-01		36.3	2.4E-07	****
SDH	2.5	2.8E-01		21.3	2.7E-04	***
SO	1.5	4.6E-01		92.3	4.2E-19	****
PFK	4.4	1.1E-01		399.8	3.1E-85	****
NI	8.5	1.4E-02	*	3.8	4.2E-01	
AI	1.1	5.6E-01		6.0	1.9E-01	

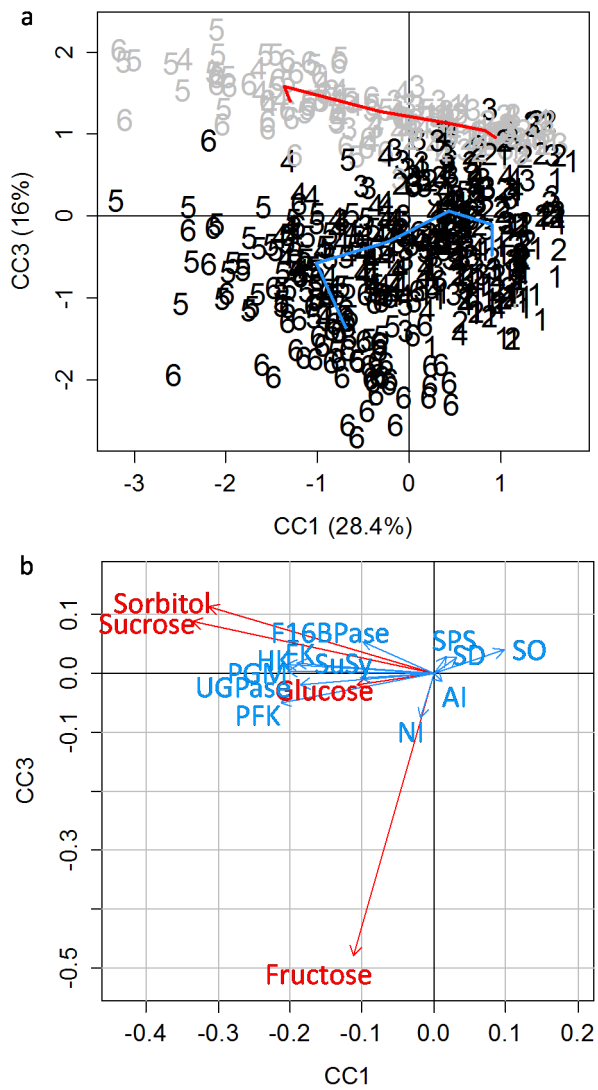


Figure 2.7. MCOA analysis. A multiple co-inertia analysis (MCOA) of metabolites and enzymatic capacities both expressed in nmol g FW $^{-1}$ min^{-1} for 106 genotypes. “a” represents the trajectory plots during fruit development for the first common component (CC1) and the third common component (CC3) plans. Numbers one to six correspond to values that were extrapolated from GLMM for all of the genotypes, at 40, 52, 64, 76, 88 and 100% of fruit development respectively. The grey numbers correspond to the 29 ‘low-fructose-to-glucose-ratio’ genotypes, and the black numbers correspond to the 77 ‘standard-fructose-to-glucose-ratio’ genotypes. Mean values of the fructose types at each point are linked by a line in red for the ‘low-fructose-to-glucose-ratio’ genotypes and in blue for the ‘standard-fructose-to-glucose-ratio’ genotypes. “b” represents the variable correlation plots that are associated with a, with metabolite variables in red and enzyme variables in blue. Abbreviations: PGM, phosphoglucomutase; F16BPase, fructose-1,6-bisphosphatase; SuSy, sucrose synthase; FK, fructokinase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; HK, hexokinase; SPS, sucrose phosphate synthase; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxidase; PFK, ATP-phosphofructokinase; NI, neutral invertase; AI, acid invertase.

Discussion

This study investigates sugar metabolism during peach fruit development and across significant genetic diversity, thus extending recent studies of carbon metabolism in fruit of different species (Basson *et al.* 2010; Steinhauser *et al.* 2010; Lombardo *et al.* 2011; Nardozza *et al.* 2013) toward a full description of both the metabolites and enzymatic capacities in the progeny. The use of a large number of genotypes removes the complex effect of the genetic background, highlighting the common trends and revealing the effects of a contrasted fructose-to-glucose ratio.

Disruption of the parallel fructose and glucose profiles in the progeny

The progeny studied here comes from an interspecific cross between a wild species (*P. davidiana*) and two commercial varieties ('Summergrand' and 'Zephyr') with contrasting phenotypic characteristics. In contrast to the varieties that bear fruit of high quality, *P. davidiana*, is characterized by small fruit with very low sugar concentrations (Moing *et al.* 2003). In particular, both glucose and fructose concentrations are very low at maturity. In 'Summergrand' and 'Zephyr' fruit, glucose and fructose concentrations are similar, as usually observed in commercial fruit. In contrast, in the resulting progeny, concentrations of glucose and fructose were dissociated. Although the glucose concentration significantly increased in every genotype compared to that of *P. davidiana*, many individuals showed a very low concentration of fructose and an unbalanced fructose-to-glucose ratio. This ratio varied in a very large range (0 to 2 at maturity, Table 2.2), indicating that the glucose and fructose controls may be uncoupled in the progeny. This observation is consistent with the results from a QTL (quantitative trait loci) study that was previously performed on this population (Quilot *et al.* 2004c). Accordingly, some regions of the genome control the concentrations of both glucose and fructose (linkage groups 4 and 7), whereas other regions control only glucose (linkage group 5) or fructose (linkage group 1). Interestingly, a major locus specific to the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotype (locus FRU) has also been mapped to linkage group 1 (Quilot *et al.* 2004c).

In agreement with such complex genotypic control, the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes do not only differ from the other genotypes at the locus controlling this character, making it difficult to grasp the mechanisms behind the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotype. The comparison between the two groups of individuals shows that the genotypes with a low fructose-to-glucose ratio have a higher concentration of other sugars (sucrose, glucose and sorbitol) and of two of the three assayed hexose phosphates (G1P and F6P). Among the studied enzymes, FK, HK and

F16BPase had slightly higher capacities in these genotypes, especially during the final developmental phases. In contrast, UGPase and NI displayed a slightly lower capacity.

These particularities may have several origins. Differences between the two fructose types could arise from the systemic structure of the network controlling sugar metabolism. Changes in one or few components may indeed affect the concentration of many metabolites due to the shared control that is typical of metabolic networks. In addition, these particularities could be the result of a physical link between the genes that control these traits on the genome, indicating that these genes would participate in the observed phenotype without having any obvious link to fructose concentration. Our results show that the genotypes with a low fructose-to-glucose ratio have significantly smaller fruits than do the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. Interestingly, a fresh weight QTL was identified near locus FRU (Quilot *et al.* 2004c). Thus, the difference in fruit weight that was observed between the two fructose types may arise from a physical connection between the two adjacent loci. Unfortunately, the low density of the genetic map and the high number of genes with unknown function preclude drawing conclusions on this point.

Table 2.2 Summary of the fructose-to-glucose ratio. The fructose-to-glucose ratio average with standard deviation and minimal (min) and maximal (max) values for the two fructose types on the final sampling date.

100% development	mean ± sd	min	max
'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes	0.062 ± 0.058	0.000	0.088
'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes	0.871 ± 0.205	0.456	1.990

High sucrose concentration, another particularity of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype

The sucrose concentration was significantly higher in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes during the second half of fruit development (approximately 35% higher than 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes at maturity). This higher sucrose concentration may explain that no difference in sweetness was found between the two fructose types.

NI was shown to have an important role on sucrose regulation in Arabidopsis (Barratt *et al.* 2009). The slightly lower NI capacity observed in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes could lead to higher sucrose and lower hexose concentrations.

Although the lower NI capacity can account for part of the phenotype, it is not enough to explain the large increase in the sucrose concentration in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. The capacity of the other cytoplasmic and vacuolar sucrose-cleaving enzymes, SuSy and AI, appeared to be unaffected; the capacity of SPS, which is involved in sucrose re-synthesis, was also unaffected. The differences that were observed in F6P concentration could lead to a change in the re-synthesis rate of sucrose via SPS, thereby contributing to the increased sucrose concentration in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. However, the SPS flux also depends on the concentration of UDP glucose, which was not assayed in this study.

Another possibility includes cell wall invertase, another sucrose-cleaving enzyme that is localized on the apoplasm and whose capacity was not assayed in this study. Indeed a switch in the phloem-unloading mechanism has been reported to be driven by cell wall invertase during fruit development in apple and grape (Zhang *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006). We cannot exclude that an alteration in the cell wall invertase capacity would be partly responsible for the increased sucrose concentration in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes.

High fructokinase: a candidate to explain the low fructose-to-glucose ratio

Due to the recent annotation of the peach genome (The International Peach Genome Initiative 2013), an exploration of the genes that are present in the locus FRU region, associated with the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype, was carried out. In this region, two genes encoding SuSy, which catalyzes a reaction leading to fructose (see above), have been annotated (The International Peach Genome Initiative 2013).

Unlike invertase, SuSy and SDH have the potential to modify the fructose-to-glucose ratio, and SDH has previously been proposed to be responsible for the regulation of the fructose concentration in peach fruit (Kanayama *et al.* 2005). However, the data presented here do not reveal any difference in the SDH or SuSy capacities between the two fructose types, although a difference in the affinity of these two enzymes could also explain the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype, an option that was not investigated in this study.

It must be noted that the density of the genetic map used to detect QTLs was relatively low and that despite the quality of the annotation, many predicted genes are still unknown. Thus, in the region of the locus FRU, 39 proteins have an unknown function, allowing for many other possibilities (The International Peach Genome Initiative 2013).

Interestingly, a difference in the FK capacity was highlighted between the two fructose types in our study. The higher FK capacity in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes would indicate a

higher fructose phosphorylation flux, thus resulting in a lower fructose and a higher hexose phosphate concentration, as supported by the present data. The re-synthesis of sucrose from the hexose phosphates (via UGPase, SPS and sucrose phosphatase) would eventually result in an increase in the fructose-to-glucose ratio. The difference in the FK capacity could partially explain the excess sucrose and glucose.

Kanayama *et al.* (1997) demonstrated the presence of two isoforms of FK with different affinities for fructose. The presence of a larger amount of the isoform with a high affinity for fructose may also explain the phenotype. FK seems to be a good candidate to explain the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype; however, no gene has been annotated as coding for FK in the locus FRU, and the closest gene encoding a probable fructokinase is 7 Mb away (The International Peach Genome Initiative 2013).

An alternative hypothesis to concurrently explain the different features of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype

Sugar metabolism is controlled by a complex network and is highly dependent on cell compartmentalization. Indeed, sucrose, glucose and fructose are stored in vacuoles; therefore, the major part of the pool of these compounds is not available as substrate for enzymes of the cytosol. This compartmentalization indeed appears to be a major regulator of sugar metabolism (Lunn 2007; Neuhaus 2007; Wingenter *et al.* 2010).

Low fructose storage could be the origin of a 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. In Arabidopsis leaves, the fructose concentration depends on a specific tonoplastic transporter that exports fructose out of the vacuole with a higher affinity for fructose than for glucose (Chardon *et al.* 2013). In this case, the glucose concentration would eventually increase within the vacuole by the hydrolysis of sucrose via AI, whereas the fructose that is concurrently produced would be exported and then rapidly metabolized in the cytoplasm. A high cytosolic fructose concentration may also have a negative feedback on the NI capacity (Pressey 1969), as observed in the present study.

In agreement with this hypothesis, low fructose genotypes have a significantly higher concentration in F6P (Figure 3 c, Table 1), suggesting that higher fructose phosphorylation took place due to the difference in FK capacity. Higher rates of F6P synthesis could lead to higher fluxes toward glycolysis and the TCA cycle. We also found a slightly higher F16BPase capacity in these genotypes (Figure 4 b, Table 1). F16BPase converts F16BP back into F6P, which potentially counteracts the flux into glycolysis and respiration. This system is highly regulated by fructose-2,6-bisphosphate, which is a strong inhibitor of F16BPase in leaves (Stitt 1990) and fruit (Del Mar Sola *et al.* 1994). A decrease in

fructose-2,6-bisphosphate results in the activation of F16BPase and in higher F6P concentration (Gerhardt *et al.* 1987). This mechanism is in line with the fact that no significant difference in respiration has been found between the genotypes of the two groups (Additional Figure 2.2). This hypothesis has the merit of concurrently explaining the different features associated with the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. However, although appealing, this hypothesis remains purely speculative as there is no evidence for a tonoplast transporter that is specific to fructose as expressed in peach fruit. Further work is required to confirm the existence of such a mechanism.

Conclusions

This study, which provides a large dataset for sugars and related enzymatic capacities during peach fruit development, reveals a highly regulated system in which a major perturbation in a central compound had only slight repercussions on enzymatic capacities.

We suggest that none of the measured enzymes is able to explain the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype by itself. The slight variations in the observed enzymatic capacities may rather refer to an adjustment of the whole network to an external constraint imposed on the system. Following a switch in fructose metabolism that may have appeared during peach evolution, our results suggest that sugar metabolism is adjusted through slight changes in enzymatic capacities in a way that minimizes perturbations in the outputs of the pathway.

Further studies are required to explore the functional hypotheses (i.e., enzyme affinity, transporter). A modeling approach could contribute to a better understanding of the key mechanisms involved in sugar accumulation during peach fruit growth.

This study offers an overview of sugar metabolism with natural variation on peach fruit. This is the starting point for the comprehension of the mechanisms involved in sugar metabolism in fruit, providing new ways to improve fruit quality.

Methods

Plant material

The peach genotypes were previously studied by Quilot *et al.* (2004a) and come from a progeny obtained by two subsequent backcrosses between *Prunus davidiana* (Carr.) P1908 and *Prunus persica* (L.) Batsch 'Summergrand' and then 'Zephyr.' These plants were planted in a completely randomized design in the orchard of the INRA Research Centre of Avignon (southern France). The trees were three years old when planted in the orchard in 2001. All of the genotypes were grafted onto GF305 seedling rootstocks and were grown under normal irrigation, fertilization and pest-control conditions. All of the trees were homogeneously pruned and thinned. This study was performed on 106 different genotypes that were harvested in 2012. In addition, two of these genotypes were also studied in 2010 and 2011 (Additional Figure 2.1).

The genotypes were selected to have sufficient fruits for this experiment. Seventy-seven genotypes were considered 'standard fructose-to-glucose ratio' because of the balanced fructose-to-glucose ratio at maturity, which corresponds to the ratio that is found in commercial varieties, and twenty-nine genotypes were called 'low fructose-to-glucose ratio' due to the lower proportion of

fructose compared to glucose based on their sugar composition at maturity from previous years. The fruit development period varied from 112 to 186 days after bloom depending on the genotype.

Sample preparation

For each genotype, the maturity date was extrapolated from previous data. Maturity was reached when the fruits were no longer growing, softened and easily picked. The expected interval between the bloom and maturity dates was divided into six equal periods. The sampling points were different between the genotypes because of the different durations of fruit development. For the metabolite and enzyme assays, six fruits were collected on each sampling date. These fruits were weighed and pooled to consider the variability present on a tree. For the hexose phosphates, nine fruits were harvested at each sampling date from ten genotypes. The fruit was separated into three pools of three fruits (three biological replicates). The fruits were peeled, and the mesocarp was cut into small pieces, immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The samples were then ground in liquid nitrogen to a fine powder and stored at -80°C for future analyses. Two technical replicates were performed for each sample. The technical replicates correspond to two distinct extractions and assays.

Extraction and measurements of metabolites

For the metabolite assays, 20-mg aliquots of powdered mesocarp were extracted as described in Gibon *et al.* (2009). The supernatant was used for the assay of hexoses, sorbitol, hexose phosphates. The glucose, fructose and sucrose concentrations were measured as described in Gibon *et al.* (2009). The sorbitol concentration was determined using 20-µl aliquots of extract, which were pipetted into microplate wells containing 0.01 mmol Tricine/KOH pH 9.5 and 0.1 nmol NAD^+ in a final volume of 100 µl. After reading the absorbance at 340 nm until stability, 0.1 U of sorbitol dehydrogenase was added to each well, and the absorbance was read until stability. G1P, G6P and F6P were analyzed as described in Gibon *et al.* (2002).

Extraction and measurements of enzymatic capacities

For the enzymatic capacity assays, 20-mg aliquots of powdered mesocarp were extracted as described in Gibon *et al.* (2009). The extracts used for the determination of SPS, AI, NI, SDH, SuSy were desalted with a PD MultiTrap G25 column (GE Healthcare Life Sciences). PFK, F16BPase, HK, FK and AI were analyzed as described in Gibon *et al.* (2009). The PGM was determined as described in Manjunath *et al.* (1998). UGPase was measured as described in Biais *et al.* (2014). SPS and SuSy were assessed as in Lunn *et al.* (1997). NI was determined using 5-µl aliquots of extract that were pipetted directly into a microplate, followed by 95 µl of assay mix containing 1.25 µmol HEPES/KOH pH 7.5,

200 nmol $MgCl_2$, 200 nmol ATP, 200 nmol $NADP^+$, 0.0175 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.525 U of phosphoglucose isomerase, 0.9 U of hexokinase, and 0 (blank) or 2 µmol (maximal activity) sucrose. The absorbance was read at 340 nm and 25°C until the rates were close to 0 in the blanks or stabilized in the wells in which sucrose was added. SDH and SO were assessed using 10-µl aliquots of extract, which were pipetted into a microplate containing, in each well, 10 µmol Tris pH 9.5, 300 nmol NAD^+ (only for SDH), 100 nmol thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), 0 (blank) or 45 µmol (maximal activity) sorbitol and 20 nmol phenazine ethosulfate. The absorbance was read at 340 nm until the rates were stabilized.

Statistical analysis

Statistical analyses of the mean of technical replicates were performed using R software (R Development Core Team 2006). The time courses (fruit age) are represented according to the percentage of fruit development, where 0% corresponds to the bloom date and 100% to fruit maturity.

To detect significant differences between the two fructose types and the effect of the time course profile, a generalized linear mixed-effects model (GLMM) was used as described in Bugaud *et al.* (2012). The lmer function in the 'lmer4' library was used. A complete model including the fructose type effect, the percentage of fruit development effect and their interactions, as well as quadratic and cubic terms for the percentage of fruit development (df: 8), was compared to a model including the percentage of fruit development, quadratic and cubic terms for the percentage of fruit development (df: 6) and to another model including only the fructose type (df: 4). For these three models, a random effect was added depending on the genotype. A comparison of the three models was performed with a likelihood ratio test using the ANOVA function in the R software.

A multiple co-inertia analysis (MCOA) (R software, 'ade4' library) was performed for both the metabolite and enzyme data as described in Mazerolles *et al.* (2011). For every genotype, a GLMM was used to predict the data at 40, 52, 64, 76, 88 and 100% of fruit development to compare all of the genotypes at an equivalent percentage of fruit development.

To investigate the links between the metabolite concentrations and the enzymatic capacities, the accumulation rates of the metabolites were compared to the enzymatic capacities. The accumulation rates of the metabolites were computed between two successive time points: the difference in the metabolite concentration between the two sampling points was divided by the number of minutes that had passed.

The normality of the data was tested with the Shapiro-Wilk normality test. Given that the data did not follow a normal distribution, the Spearman method was used for the correlation

analyses. Spearman's correlations were calculated and plotted using the 'corrplot' library (R software). Only significant correlations (*P* value <0.01) were plotted.

The sweetness was calculated for all genotypes at maturity according to the perceived sweetness scores cited by Cantin *et al.* (2009) for fructose (1.75), glucose (0.75) and sucrose (1).

List of abbreviations

AI, acid invertase; DAB, day after bloom; F16BPase, fructose-1,6-bisphosphatase; F16BP, fructose 1,6 bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FK, fructokinase; FW, fresh weight; G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; GLMM, generalized linear mixed-effects model; HK, hexokinase; MCOA, multiple co-inertia analysis; NI, neutral invertase; PFK, ATP-phosphofructokinase; PFP, PPi-phosphofructokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; PGM, phosphoglucomutase; QTL, quantitative trait loci; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxidase; SPP, sucrose-phosphate phosphatase; SPS, sucrose phosphate synthase; SuSy, sucrose synthase; UGPase, UDP-glucose pyrophosphorylase;

Acknowledgments

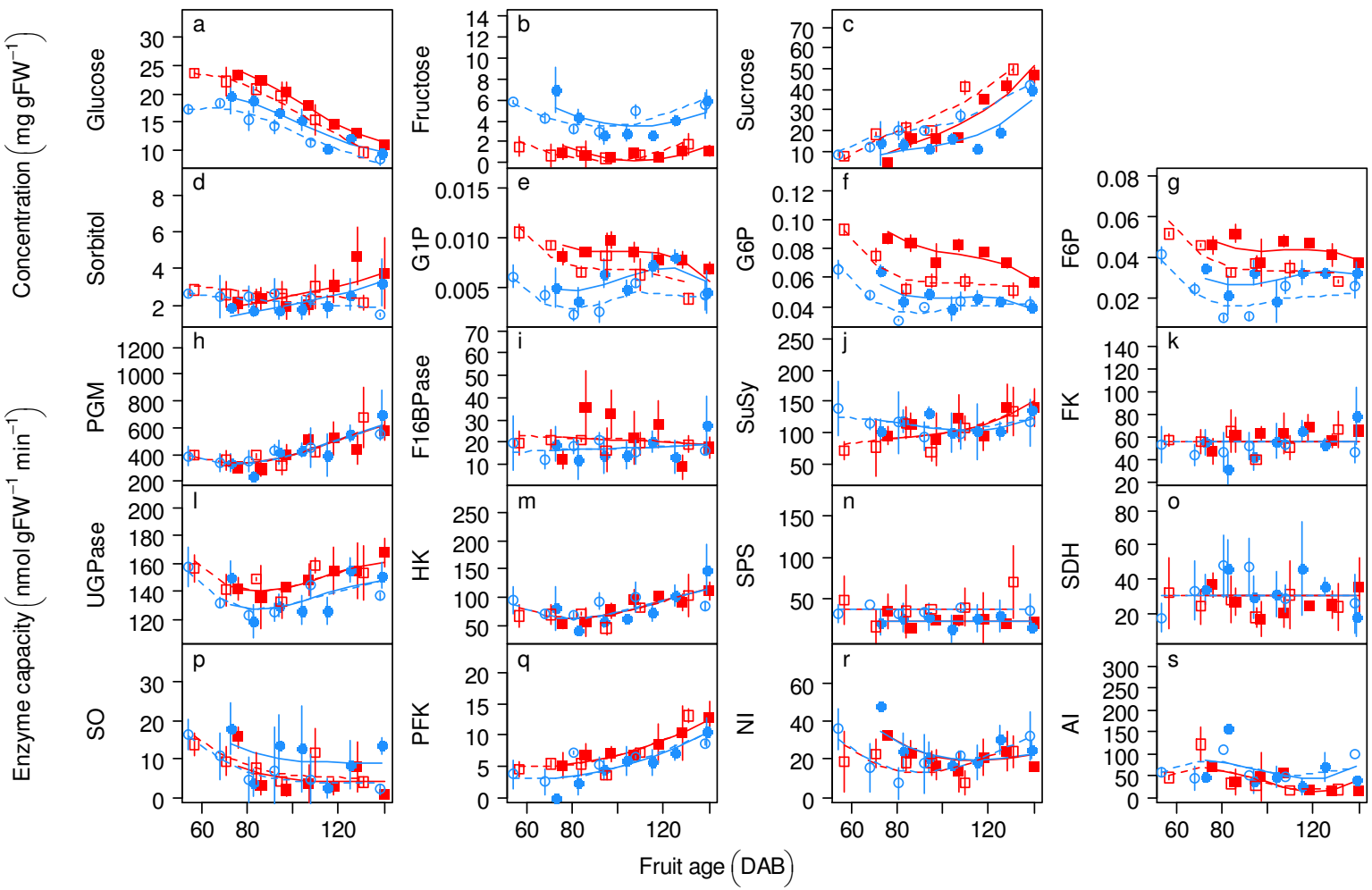
We thank E. Pelpoir for her help in fruit sampling, P. Ballias and D. Prodhomme for their technical assistance at the high throughput metabolic phenotyping facility of the Bordeaux Metabolome Platform at INRA Bordeaux, France. We are grateful to the IE-EMMAH UMR1114 team for taking care of the experimental orchard. This research was funded by grants from the 'Plant Biology and Breeding' division of the Institut National de la Recherche Agronomique, France (FructoPech and PhenoPech).

Additional data

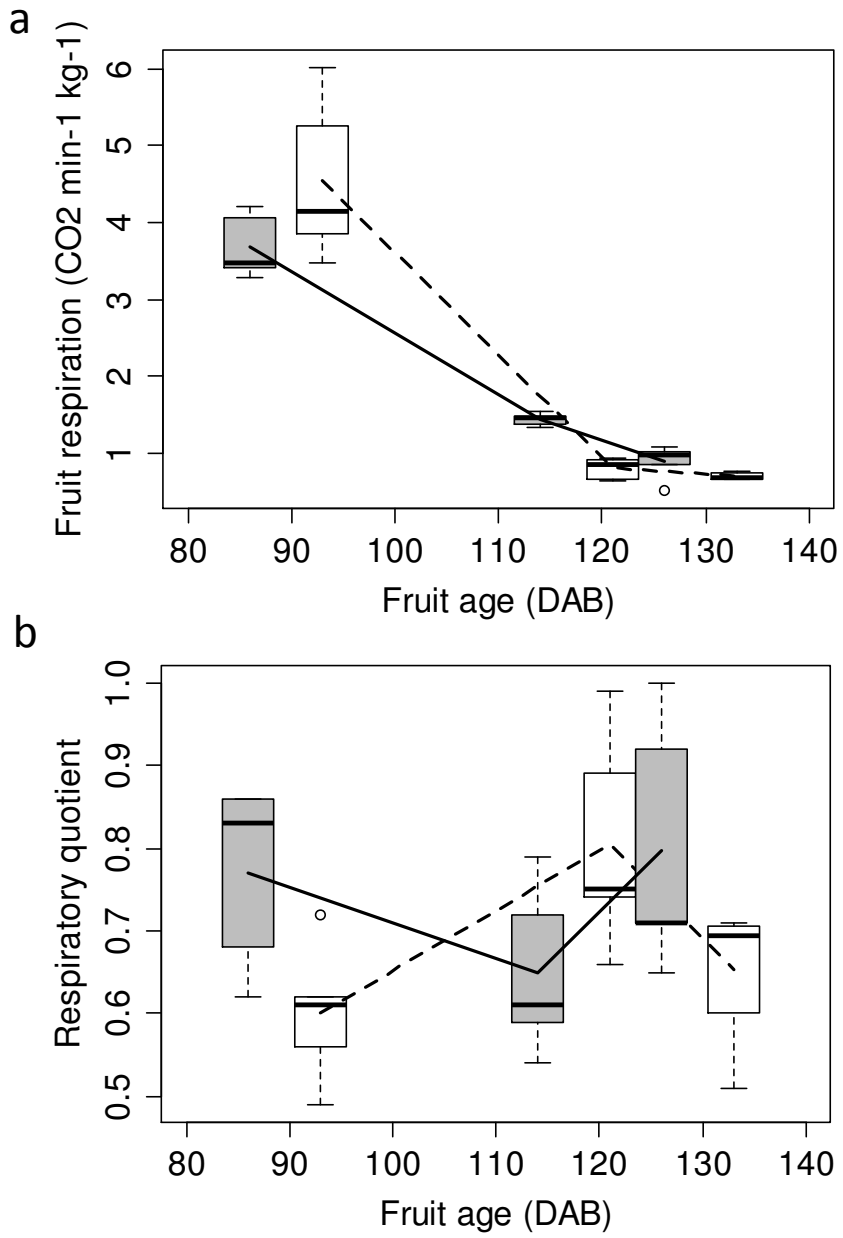
Additional Table 2.1 A summary of the published studies. Review of the studies that have been performed on peach fruit at maturity or during fruit development and that described the sugar concentrations and enzymatic capacities.

	Maturity	Fruit development
Sucrose	(Byrne *et al.* 1991; Brooks *et al.* 1993; Esti *et al.* 1997; Dirlewanger *et al.* 1999; Moing *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003; Colaric *et al.* 2005; Borsani *et al.* 2009; Cantín *et al.* 2009; Orazem *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011; Alcobendas *et al.* 2013; Font i Forcada *et al.* 2013)	(Moriguchi *et al.* 1990a; Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Pavel and Dejong 1993; Vizzotto *et al.* 1996; Moing *et al.* 1998; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Etienne *et al.* 2002a; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Kanayama *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005; Nonis *et al.* 2007; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
Fructose	(Byrne *et al.* 1991; Brooks *et al.* 1993; Esti *et al.* 1997; Dirlewanger *et al.* 1999; Moing *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003; Borsani *et al.* 2009; Cantín *et al.* 2009; Orazem *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011; Alcobendas *et al.* 2013; Font i Forcada *et al.* 2013)	(Moriguchi *et al.* 1990a; Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Pavel and Dejong 1993; Vizzotto *et al.* 1996; Moing *et al.* 1998; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Etienne *et al.* 2002a; Lo Bianco and Rieger 2002a; Kanayama *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005; Nonis *et al.* 2007; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
Glucose	(Byrne *et al.* 1991; Brooks *et al.* 1993; Esti *et al.* 1997; Dirlewanger *et al.* 1999; Moing *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003; Borsani *et al.* 2009; Cantín *et al.* 2009; Orazem *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011; Alcobendas *et al.* 2013; Font i Forcada *et al.* 2013)	(Moriguchi *et al.* 1990a; Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Pavel and Dejong 1993; Vizzotto *et al.* 1996; Moing *et al.* 1998; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Etienne *et al.* 2002a; Lo Bianco and Rieger 2002a; Kanayama *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005; Nonis *et al.* 2007; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
Sorbitol	(Byrne *et al.* 1991; Brooks *et al.* 1993; Dirlewanger *et al.* 1999; Moing *et al.* 2003; Wu *et al.* 2003; Colaric *et al.* 2005; Borsani *et al.* 2009; Cantín *et al.* 2009; Orazem *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011; Alcobendas *et al.* 2013; Font i Forcada *et al.* 2013)	(Moriguchi *et al.* 1990a; Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Pavel and Dejong 1993; Vizzotto *et al.* 1996; Moing *et al.* 1998; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Kanayama *et al.* 2005; Wu *et al.* 2005; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
F6P		(Kanayama *et al.* 2005; Lombardo *et al.* 2011)

G6P		(Kanayama *et al.* 2005)
G1P		
UDP glucose		
Sucrose 6P		
AI	(Borsani *et al.* 2009; Sun *et al.* 2011)	(Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Vizzotto *et al.* 1996; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
NI	(Borsani *et al.* 2009; Sun *et al.* 2011)	(Vizzotto *et al.* 1996; Lo Bianco *et al.* 1999; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Morandi *et al.* 2008; Lombardo *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013)
SuSy	(Sun *et al.* 2011)	(Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Vizzotto *et al.* 1996; Kobashi *et al.* 1999; Lo Bianco *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Morandi *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2013)
SDH	(Sun *et al.* 2011)	(Lo Bianco *et al.* 1999; Yamada *et al.* 2001; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Kanayama *et al.* 2005; Morandi *et al.* 2008)
SO	(Sun *et al.* 2011)	(Moriguchi *et al.* 1990b; Kobashi *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Lo Bianco and Rieger 2002b; Lo Bianco and Rieger 2002a; Morandi *et al.* 2008)
SPS	(Sun *et al.* 2011)	(Moriguchi *et al.* 1990b; Moriguchi *et al.* 1991; Vizzotto *et al.* 1996; Kobashi *et al.* 1999; Kobashi *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2013)
FK	(Borsani *et al.* 2009)	(Kanayama *et al.* 2005)
UGPase	(Borsani *et al.* 2009)	(Moriguchi *et al.* 1991)
HK	(Borsani *et al.* 2009)	
PFK	(Borsani *et al.* 2009)	
PFP	(Borsani *et al.* 2009)	
PGI		(Kanayama *et al.* 2005)
F16BPase		(Kanayama *et al.* 2005)
PGM		
SPP		



Additional Figure 2.1 Developmental profiles of metabolites and enzymes in two genotypes during two years. Changes in metabolite concentrations in mg g FW $^{-1}$ and enzymatic capacities (nmol g FW $^{-1}$ min^{-1}) during fruit development (DAB, day after bloom) for two genotypes (one 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotype in blue and one 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotype in red) and two years (2010: solid line, 2011 dashed line). Symbols represent the mean and standard deviation of three biological replicates of three fruits each and lines are fitted linear models by GLMM.



Additional Figure 2.2 CO_2 and respiratory quotient. Changes in the amount of CO_2 that was produced per minute per kilogram of fruit (a) and respiratory quotient (b) represented by the ratio of CO_2 that was produced to O_2 that was consumed during growth (DAB, day after bloom). The measurements were performed during three stages of fruit development and for one 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotype in white boxes as connected by a dashed line and for one 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotype in gray boxes and connected by a solid black line. The genotypes that were used here were the same as those represented in Additional File 2. The measurements were carried out on fruits that were attached to the tree and enclosed in hermetic boxes. The same fruits were monitored on the three dates. Five fruits were measured on each date and for each genotype.

Chapitre 3 : Modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche

Chapitre 3 : Modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche

Ce chapitre décrit, sous la forme d'un article en préparation, le modèle métabolique développé au cours de cette thèse. Ce modèle permet de simuler les concentrations en sucres au cours du développement du fruit. Les capacités enzymatiques mesurées dans le chapitre 1 ont été utilisées pour paramétrer le modèle. De même les concentrations en sucres mesurées ont servi de références pour estimer certains paramètres du modèle par minimisation des écarts entre les simulations et ces données expérimentales.

Ce modèle permet d'explorer les mécanismes responsables du phénotype 'peu de fructose' au niveau moléculaire avec la simulation de dix génotypes de la population BC2 dont la moitié présente ce phénotype.

A kinetic model of sugar metabolism in peach fruit reveals functional hypothesis for a particular low fructose-to-glucose-ratio phenotype

Authors : Elsa Desnoues, Michel Génard, Bénédicte Quilot-Turion, Valentina Baldazzi

Résumé :

Les concentrations en sucres dans les fruits varient en fonction du développement du fruit, de l'environnement et du génotype. De manière générale, de faibles corrélations ont été mises en évidence entre les variations de concentrations en sucres et les capacités des enzymes directement liées à la synthèse ou la dégradation des sucres. Ceci suggère que les liens de cause à effet ne sont pas directs et difficilement appréciables avec des statistiques classiques. Ainsi un modèle cinétique du métabolisme des sucres a été développé de manière à simuler les concentrations en sucres (saccharose, glucose, fructose et sorbitol) au cours du développement du fruit chez la pêche. Ce modèle prend en compte de manière explicite la compartimentation cellulaire (cytosol et vacuole). Les capacités des enzymes provenant de données expérimentales ont été utilisées pour paramétrer les équations. Le modèle représente correctement la variabilité phénotypique observée dans dix génotypes dérivés d'un croisement interspécifique et ainsi des informations importantes sur les mécanismes sous-jacents à la spécification des différences phénotypiques. Le modèle, en effet, révèle que les deux mécanismes possibles, une différence d'affinité de la fructokinase et une capacité de stockage vacuolaire réduite, peuvent être responsables d'un phénotype particulier caractérisé par un faible rapport fructose sur glucose observé dans la population étudiée, ainsi que dans les pêches sauvages et ornementales.

Abstract:

Concentrations of sugars in fruit vary according to fruit development, environment and genotype. In general, weak correlations were found between the variations of sugar concentrations and the capacities of enzymes directly related to the synthesis or degradation of sugars. This suggests that the relations between enzyme capacities and metabolites are not direct and difficult to assess with conventional statistics. Thus a kinetic model of sugar metabolism has been developed to simulate the concentrations of sugars (sucrose, glucose, fructose and sorbitol) during fruit development in peach, taking advantage of recent profiling data. Cellular compartmentation (cytosol and vacuole) is explicitly described and data-driven enzyme capacities are used to parameterize the equations. The model correctly accounts for the phenotypic variability observed in ten genotypes derived from an interspecific cross, providing important information on the mechanisms underlying the specification of phenotypic differences. The model, indeed, reveals that two possible

mechanisms, a difference in fructokinase affinity and a reduced vacuolar storage capacity, can be responsible for a particular low fructose-to-glucose ratio phenotype observed in the studied population, as well as in wild and ornamental peaches.

Introduction

The concentrations of sugars in fruit differ depending on the developmental stage, the environment and the genotype. In peach fruit (*Prunus persica* (L.) Batsch) at maturity, sucrose is the main sugar followed by glucose and fructose, in equal amounts, and then sorbitol (a sugar alcohol) (Moriguchi *et al.* 1990a). Though, there is a large natural variability in sugar concentrations between peach accessions (Cantín *et al.* 2009). One of the most notable changes is the presence of very low fructose concentration observed in wild or ornamental peaches (Moriguchi *et al.* 1990a; Kanayama *et al.* 2005), which leads to a low fructose-to-glucose ratio.

Since sugars differ in their relative sweetness (Pangborn 1963), knowledge of the mechanisms that control the sugar metabolism may be important to create varieties that meet consumer's expectations. Recent studies characterizing a large number of metabolites and enzyme capacities (maximal activity) related to sugar metabolism during fruit development showed that there is no clear link between the concentration of a given sugar and a linked enzymatic capacity (Biais *et al.* 2014; Desnoues *et al.* 2014). This suggests that the regulation of sugar metabolism is system-driven rather than reaction-driven. An integrative approach as offered by modeling, is thus needed to elucidate the network functioning and to identify the control mechanisms responsible for the observed phenotypic changes.

Several approaches have been undertaken to model metabolic networks in plants with different levels of complexity (Rios-Estepa and Lange 2007). Among all possible approaches, kinetic models are especially useful to investigate functional hypotheses or perform *in silico* experiments, due to the mechanistic description of metabolic functions. Kinetic modeling, indeed, has been successfully applied to a number of metabolic networks in plants (Uys *et al.* 2007; Curien *et al.* 2009; Nägele *et al.* 2010; Nägele and Weckwerth 2014). Concerning fleshy fruit, a kinetic model has been recently developed by Beauvoit *et al.* (2014). It simulates the sugar metabolism of the tomato fruit and its reprogramming according to the developmental stage.

A model simulating sugar accumulation during peach fruit development had been developed previously by Génard and Souty (1996). This model was used to explore the natural phenotypic diversity with particular attention to the observed differences in the fructose-to-glucose ratio (Wu *et al.* 2012). However, in spite of a satisfactory agreement with experimental data, the structure of the

model was too simple and gave little evidence to support one hypothesis more than others to explain the low fructose concentration.

One of the main limitations of the model was that it did not account for cellular compartmentation. Though, the subcellular compartmentation is essential for sugar accumulation (Patrick *et al.* 2013; Génard *et al.* 2014) and can have a significant effect on sugar concentrations, as demonstrated in Arabidopsis leaves where the expression of a vacuolar fructose-specific transporter was related to a low concentration of fructose without modification of glucose (Chardon *et al.* 2013).

The objective of the present study is to decipher the mechanisms of sugar accumulation during peach fruit development, taking advantage of recent profiling data and explore hypotheses to explain a radical change in fructose concentration. To this aim, we have developed a new kinetic model of sugar metabolism with an explicit representation of cellular compartmentation (cytosol and vacuole) and data-driven enzymatic activities. The model is able to simulate the accumulation of sugars (sucrose, glucose, fructose and sorbitol) on the timescale of peach fruit development from stone hardening to maturity. It correctly accounts for both genetic and annual variability observed in experimental data of ten genotypes. The implementation of the enzyme kinetic parameters in the equations allow for an explicit representation of developmental changes and a direct identification of the molecular mechanisms involved in the specification of phenotypic differences.

Model construction

A dynamical model of sugar metabolism in peach fruit mesocarp was built according to Figure 3.1. The model describes the carbon flow through the different metabolites and cellular compartments during fruit growth as a set of ordinary differential equations (Additional data 3.1).

Carbon from the plant sap enters the fruit under the form of sucrose and sorbitol and it is then transformed by a complex network of chemical reactions. We assumed the carbon transport through the cell wall non limiting and used the measured sap composition to set the relative proportion λ of sucrose and sorbitol supply (65% sucrose, 35% sorbitol). The metabolic network represented by the model corresponds to the one partially described by Moriguchi *et al.* (1990a), Etienne *et al.* (2002b) and Kanayama *et al.* (2005). None of them describe the presence of sorbitol-6-P dehydrogenase, whereas it was observed in pear (Yamaki and Moriguchi 1989) and loquat fruit (Abnasan *et al.* 1999) suggesting a futile cycle of sorbitol synthesis in fruit. However Sun et al. (2011) showed that sorbitol decreased in peach on post-harvest and thus stated the absence of sorbitol synthesis in peach fruit. So we didn't represent the sorbitol re-synthesis. The hexose phosphate (glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate and UDP-glucose) are represented as a single pool.

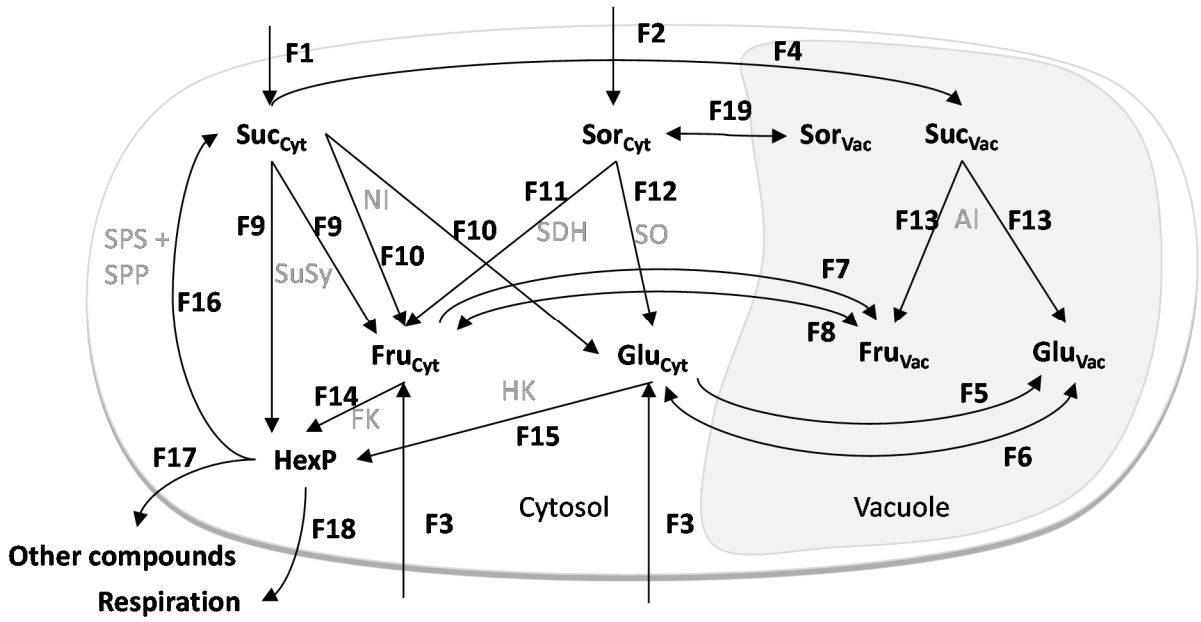


Figure 3.1 Schematic network of peach fruit sugar accumulation model. Arrows represent flows. The equations corresponding to the flow numbers are presented in Additional data 1. Abbreviations used: Suc, sucrose; Sor, sorbitol; Fru, fructose; Glu, glucose; HexP, hexose-phosphate; cyt, cytosol; Vac, vacuole; SuSy, sucrose synthase; NI, neutral invertase; SDH, sorbitol dehydrogenase; SO, sorbitol oxydase; AI, acid invertase; SPS, sucrose phosphate synthase; SPP, sucrose-phosphate phosphatase; FK, fructokinase; HK, hexokinase.

Enzymatic reactions were represented by an irreversible Michaelis Menten (MM) equation: $Vmax_e*[S]/(Km_{es}+[S])$, where $Vmax_e$ is the maximal enzyme activity under optimal conditions (i.e. enzymatic capacity), Km_{es} the affinity of the enzyme for the substrate and [S] the concentration of the substrate. Some enzymatic reactions are known to be reversible but they usually occur only in a single direction in physiological conditions. Notably SuSy is reversible but the reaction occurs in sucrose hydrolysis direction in peach fruit (Vizzotto *et al.* 1996). We represented only the physiological direction, which allows reducing the non-linearity of the system.

For the parameterization of enzyme kinetics, a polynomial curve fitted to the Vmax measured in Desnoues *et al.* (2014) was used. Accordingly, some Vmax varied depending on the developmental stage and/or the fructose phenotype whereas others remained constant (Additional data 3.2). Km values came from various sources though preferably from studies in peach or from other plants (Additional data 3.2). However, in specific cases explained hereafter, we numerically estimated the parameter values by calibration of the model. Because of the lack of literature data concerning hexokinase (HK) affinity and the presence of different isoforms in potato (Schaffer and

Petreikov 1997b) we decided to estimate this parameter from the model. In the same way, two fructokinase (FK) isoforms with different affinity for fructose have been reported in tomato and peach fruit (Kanayama *et al.* 1998; Kanayama *et al.* 2005) and different isoforms of sucrose synthase (SuSy) were found in pear (Tanase and Yamaki 2000). We could not have access to the proportion of each isoform and because of the importance of FK and SuSy for fructose metabolism we estimated the FK and SuSy affinities for fructose and sucrose, respectively.

The enzyme activities can be inhibited by their product, their substrate or another molecule. Because of the lack of literature data on peach or close species, we firstly defined a model without enzyme inhibition. However, in order to improve the sucrose fitting, we added the inhibition of acid invertase (AI) by the fructose as shown on sugar cane leaf-sheaths (Sampietro *et al.* 1980). The inhibition parameter (Ki_{AI}) was numerically estimated.

Compartmentation between the cytosol and the vacuole was taken into account explicitly, according to the results of the cytological analyses (see Materials and Methods). Figure 3.2 shows the experimental data and fitted curves for the evolution of vacuole to cell ratio and cytosol to cell ratio along peach fruit development. These cytological data are consistent with data from Nadwonik and Lohaus (2008) on peach leaves. These proportions were used in the model to split the fresh weight into vacuole and cytosol fresh weights, in order to calculate the appropriate metabolite concentrations available for the enzymatic reactions.

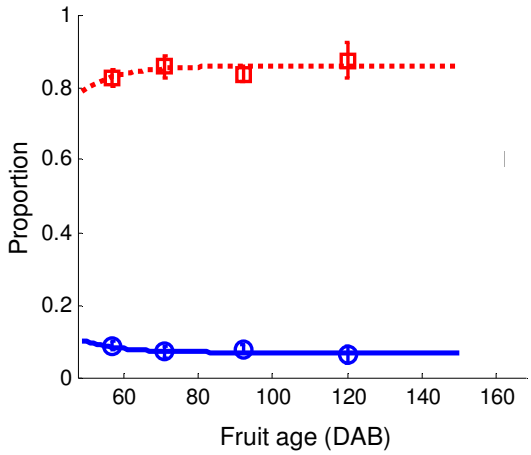


Figure 3.2 Time course evolution of vacuole and cytosol volume proportions during peach fruit development. Symbols represent experimental measurements (Mean and standard error) and lines the fitted curves. Squares and the dotted line correspond to the proportion of vacuole to cell volume and circles and the continuous line to the proportion of cytosol to cell volume.

In contrast to the cytosol and the vacuole, the apoplastic compartment was not explicitly represented in the model but the effect of cell wall invertase was taken into account as a further partition of the sucrose supply, coming from the plant, into an hexose supply, according to a time-dependent fraction $\lambda_{Suc}(t)$. Cell wall invertase capacity has been reported to decreases during fruit development tomato and Rosacee (Ranwala *et al.* 1992; Kortstee *et al.* 2007; Li *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014a). Accordingly, we assumed λ_{Suc} (t), i.e. the sucrose fraction that is not hydrolyzed by cell wall invertase, as a linearly-increasing function of the time (day):

$$\lambda_{\mathrm{Suc}}(\mathrm{t}) = \lambda_{\mathrm{Suc}} * \frac{\mathrm{t}}{\mathrm{tmax}}$$

tmax corresponds to maturity time, that was directly deduced from data, whereas the parameter λ_{Suc} was estimated.

All along fruit development, exchanges between cytosol and vacuole are possible, for specific metabolites and according to different mechanisms. Several active and passive transporters specific to sugars have been described at the tonoplast surface of plant cells (Doidy *et al.* 2012; Martinoia *et al.* 2012; Ludewig and Flügge 2013). Active transports (antiporters) allow the sugar storage into the vacuole against their concentration gradient and can be represented by an irreversible MM equation (Boorer *et al.* 1996; Rohwer and Botha 2001; Borstlap and Schuurmans 2004). Passive transports facilitate the efflux of molecules following their concentration gradient and can be represented by linear functions of the gradient concentration. No sucrose symporter (active sucrose transport from vacuole to the cytosol) has been shown in sink organ. Thus we represented only the import flow of sucrose in the vacuole. This flow was represented as a linear function of the cytosolic sucrose concentration as Preisser and Kronor (1991) showed the absence of transporter saturation at physiological concentrations in sugarcane. Concerning the hexoses, both active and passive transports occur on the vacuolar membrane in fruit (Martinoia *et al.* 2012). We represented separately the active and passive transporters. Very little information is available on sorbitol transporters and none to date has been located at the tonoplaste level (Wei *et al.* 2014). However, the presence of sorbitol in the vacuole in peach (Jiang *et al.* 2013a) requires at least the presence of a tonoplastic transport mechanism: we decided to represent the sorbitol transporter as a passive transport. There is a general lack of data concerning the kinetic parameters in physiological conditions of transporters, their number, lifetime and evolution during cell expansion. In absence of further information, the six parameters linked to vacuolar transport kinetics were assumed constant and numerically estimated (Additional Table 3.2). In agreement with the results of Beauvoit *et al.* (2014), who showed that the capacity of transporters increases with maturity in tomato, we assumed

that the density of transporters per unit surface was constant for both active and passive transports, so that all flows related to transport increased proportionally to the tonoplast surface during fruit development.

Finally a total of 14 parameters were estimated for each genotype by minimizing the deviation between the simulations and the datasets (see material and methods).

Results

Model parameterization and validation

The model developed here allows simulating the genetic diversity observed in ten genotypes studied (Figures 3.3a) and this despite the presence of a particular phenotype with low fructose-to-glucose ratio encountered in five genotypes. In addition, two among the ten genotypes (one of each fructose type) were studied over two years. In this case, the model has been able to predict the evolution of sugar concentration in both years with the estimation of a single set of parameters per genotype (Figure 3.3b). This implies that the main effects of the environment on sugar metabolism consist in the modification of the fresh and dry masses i.e. in the carbon and water available for fruit sugar metabolism.

As input of the model, we measured the proportion of sorbitol and sucrose in the sap of several genotypes (Additional data 3.3). No difference between genotypes were found and the proportions observed (0.65 of sucrose and 0.35 of sorbitol), were in agreement with the sucrose proportion of 0.54 found by (Moing *et al.* 1992) from sap collected with aphid stylets. However, Nadwodnik and Lohaus (2008) found a lower sucrose proportion (0.26) even though they used same methodology as Moing *et al.* (1992). Many factors (i.e. growth conditions, genotypes) may influence this proportion. Further experimentations are needed to take them into account. Consequently, in the model this proportion was assumed constant during fruit development and for all genotypes. Implementing a genotype and time variation of the sugar sap composition in the model may improve the model fitting, in particular for those genotypes for which the sucrose prediction is underestimated at maturity. The influence of sugar sap composition on model outputs could be first tested by a sensitivity analysis.

A total of 14 parameters have been estimated to fully calibrate the model. Among them three enzyme affinities (Km values) were estimated, the Km of FK, SuSy and HK, due to the presence of different isoforms in fruit (Schaffer and Petreikov 1997b; Kanayama *et al.* 1998; Tanase and Yamaki 2000; Kanayama *et al.* 2005). The estimated values were found to be higher than expected. Indeed, for FK, Kanayama *et al.* (1998; 2005) reported the presence of two isoforms with an affinity for

fructose equal to 1.3 mM and 0,054mM, respectively. In the present model, it was estimated at 100 and 5.5 mM depending on the fructose type (18 and 1 mg GFW^{-1}). Likewise for the SuSy the estimated affinity for sucrose was of the order of 300 mM (100-150 mg GFW^{-1}) while a Km of only 4.8mM was measured in peach (Moriguchi and Yamaki 1988). The overestimation of these Km may come from the fact that we did not represent mechanisms of enzyme inhibition. Indeed, the SuSy is known to be inhibited by fructose, glucose and / or sucrose in several species (Morell and Copeland 1985; Doehlert 1987; Ross and Davies 1992; Schaffer and Petreikov 1997b), whereas FK can be inhibited by fructose and fructose-6-phosphate (Schaffer and Petreikov 1997b) and HK by glucose-6-phosphate (Schaffer and Petreikov 1997b), in tomato. In absence of an explicit description of enzyme inhibition, the estimated Km values have to be interpreted as an effective average enzyme affinity that may therefore depend on the specific physiological conditions or genotypes under study.

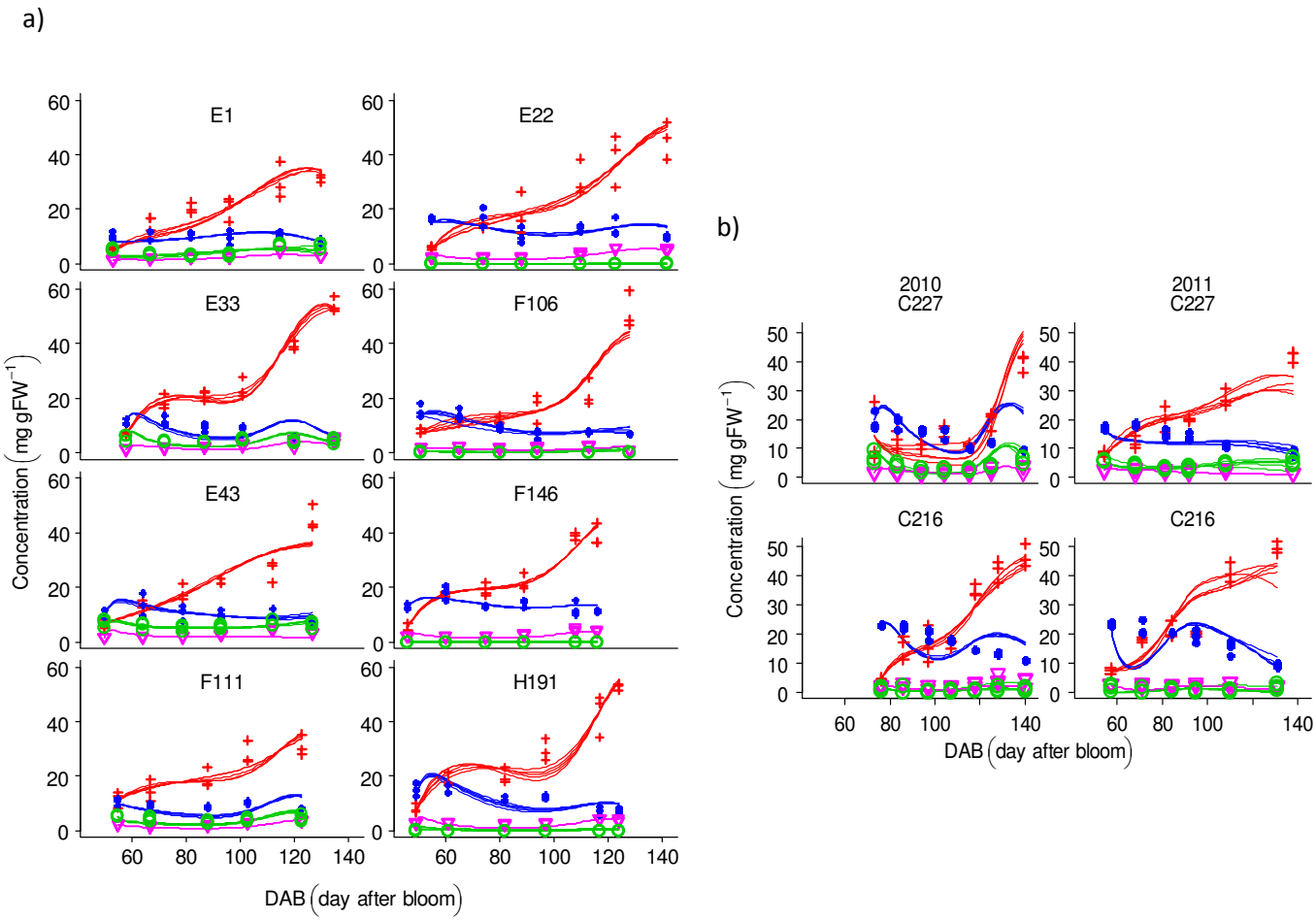


Figure 3.3 Evolution of the concentrations (mg gFW^{-1}) of sugars within fruit along its development (DAB, day after bloom). Comparison of model simulations (lines) with experimental data (symbols): sucrose (red, +), glucose (blue, solid circle), fructose (green, empty circle) and sorbitol (magenta, triangle). Eight genotypes were presented on panel a), four of them have a 'standard-fructose-to-glucose-ratio' phenotype (left) and four have a 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype (right). Panel b) presents two different genotypes in two years, 2010 (left) and 2011 (right). The genotype above (C227) had a 'standard-fructose-to-glucose-ratio' phenotype and the one below (C216) had a 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype.

Origin of the genetic variability

Figure 3.4 shows a principal component analysis (PCA) performed on the parameter values obtained from five independent estimations for each of the 10 genotypes. On the three plans made from the principal components 1, 2 and 3, which represent 30.8%, 15.2% and 15% of the parameter variability respectively, the five estimations of each genotype were clustered while genotypes were dispersed. Given this stability and to avoid redundancy, a unique estimation per genotype was kept for further analyses, chosen according to the flow minimization criteria. Parameters acting in transport were mostly represented by PC1 (Figure 3.4). Two different strategies can be distinguished among the ten genotypes. For those in the left of PC1, the sucrose degradation into hexose takes place preferentially in the vacuole with higher sucrose storage (TactifSuc) and higher hexose efflux outside of the vacuole (TpassifFru and TpassifGlu) than for the genotypes located in the right of PC1. In contrast, the latter present higher hexose transporter activities (VmTactifFru and VmTactifGlu) that lead to higher hexose storage from the cytosol to the vacuole. PC3 allow the separation of the genotypes according to their fructose type (Figure 3.4). This separation was driven mainly by the values of fructokinase affinity (Kfk) which is lower for the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes.

Figure 3.5 shows the values of the parameters estimated for each genotype according to the fructose type. Some of these parameters were greatly different depending on the fructose type and are likely to provide interesting insights into the origin of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. For instance, the lower Km value of the FK estimated for the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes may result in increased fructose degradation by the FK. In the same way, the lower Km of SuSy (KSuSy) may lead to a reduction in fructose synthesis. TpassiFru parameter enables the exchange of fructose between the vacuole and the cytosol according to the concentration gradient. In our model, it acts as an exporter only due to the presence of an active transporter that stores the fructose into the vacuole. In the particular case of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, high values of fructose passive transport (TpassifFru) and low values of fructose active transport (VmTactifFru) both contributed to reduce fructose storage in the vacuole. This could allow higher fructose degradation in the cytosol and explain the phenotype. Other parameters, such as Khk and TpassifSor, have different estimations depending on the fructose type. They may be distant drivers of fructose that act through a cascade of reactions. However, their differential values may also only be consequences of the 'low fructose' phenotype that probably arise from a rebalancing of the whole network.

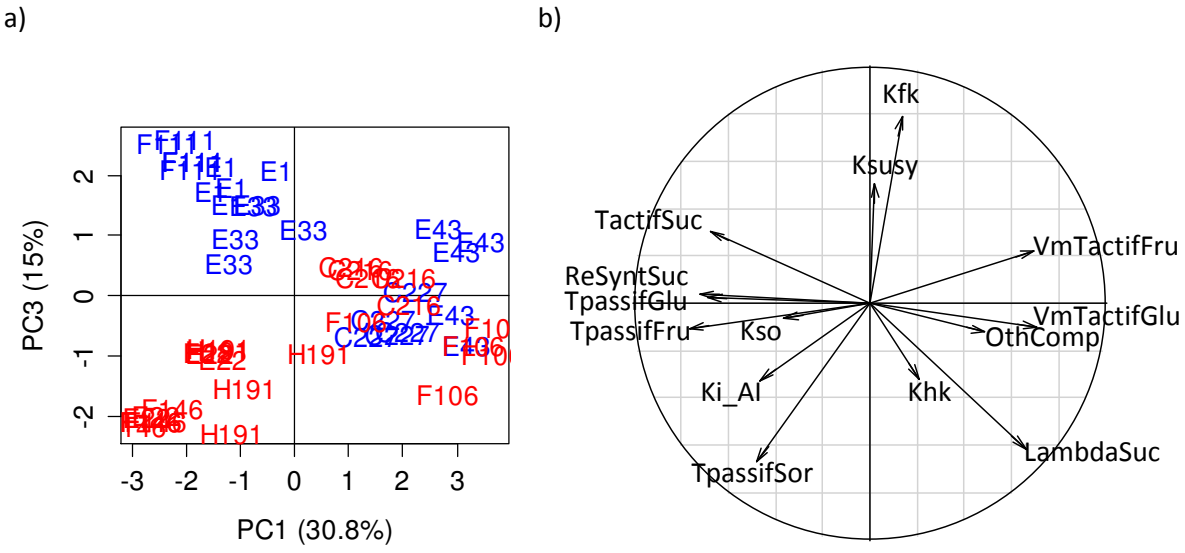


Figure 3.4 Dispersion of the 14 estimated model parameters for each of the 10 genotypes on the principal components 1 and 3 of a PCA analysis. a) Five estimations for the ten genotypes are represented on the factorial plan. b) Correlation plot of the 14 parameters associated to PC1 and PC3.

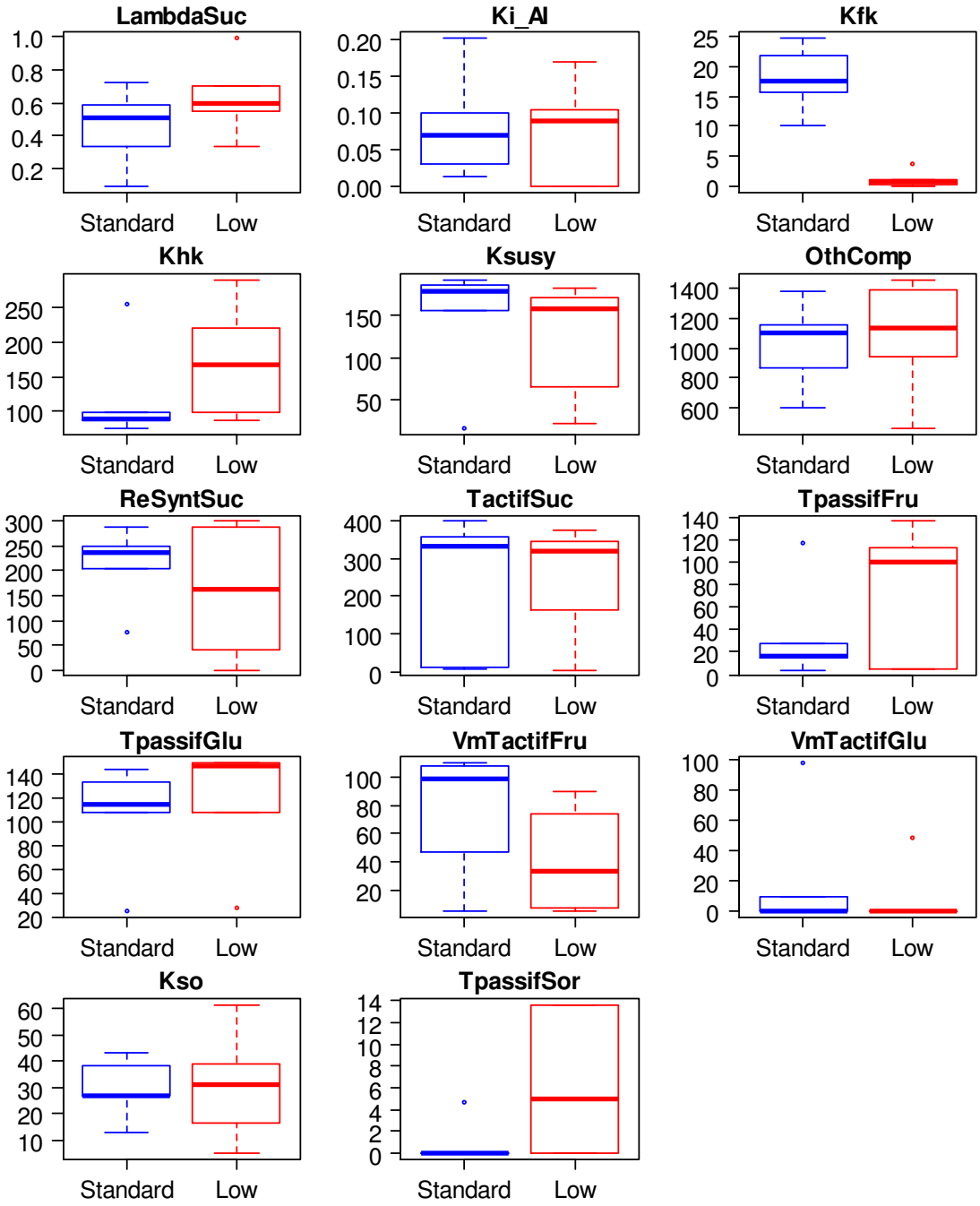


Figure 3.5 Boxplot of the 14 parameter values estimated on five 'standard-fructose-to-glucose' genotypes (standard) and five 'low-fructose-to-glucose' genotypes (low).

Functional hypotheses for 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype

In order, to explore the functional hypotheses for 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype stated above, we simulated concentrations of sugars by changing one by one the parameter value estimated with the average value corresponding to the opposite fructose type. We showed that for 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, the modification of the KSuSy parameter to the average value estimated using the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes had no effect on fructose concentration (Figure 3.6a). On the other hand, the change of the parameter Tpassifru induced a partial decrease of the fructose concentration but only the modification of the Kfk parameter was able to reduce the fructose concentration near to zero, as observed in the low fructose genotypes (Figure 3.6a). The same approach was applied to the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes with the parameter values estimated from 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. Once more, only simulations with a modification of the Kfk parameter resulted to higher fructose concentrations (Figure 3.6b). Note that in all cases, the modification of the three candidate parameters did not alter the concentrations of the other sugars. As expected, the modification of other parameters such as Khk and TpassifSor did not lead to fructose concentration change. Based on these simulations, the affinity of FK appeared as a good candidate to explain the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype.

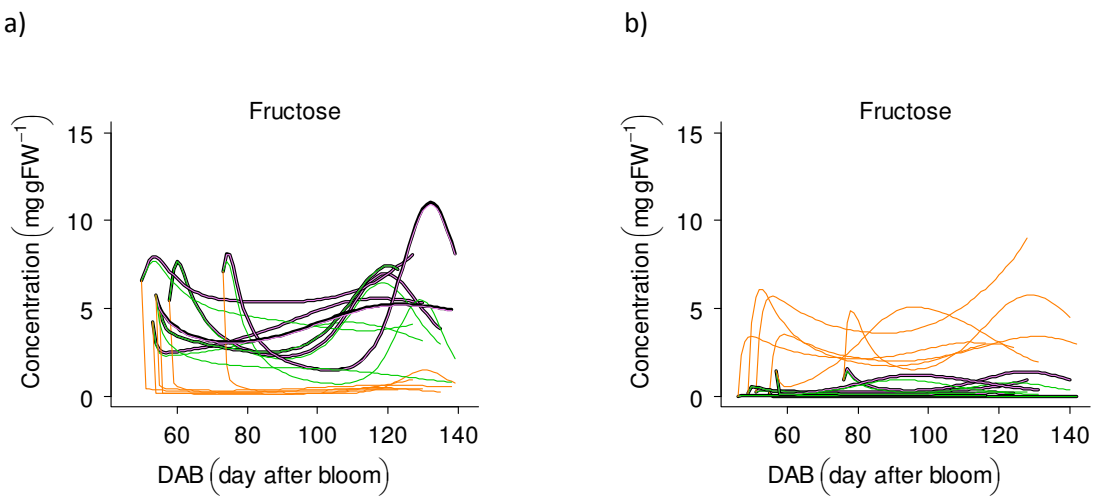


Figure 3.6 Fructose concentration (mg gFW^{-1}) along fruit development (DAB, day after bloom) corresponding to : a) simulation of the 5 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes with KfK (orange), TpassifFru (green) and KSuSy (violet) parameters respectively estimated from 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes; b) simulation of the 5 'low -fructose-to-glucose-ratio' genotypes with KfK (orange), TpassifFru (green) and KSuSy (violet) parameters respectively estimated from 'standard -fructose-to-glucose-ratio' genotypes. Black lines correspond to original fructose concentration.

Flow distribution through the metabolic network

In spite of large differences in parameter values, the ten genotypes studied had a similar flow distribution through the metabolic network (no significant differences). Thus Figure 3.7 displays the average over the ten genotypes of the predicted flow distribution at 45 and 100% of the fruit development, expressed as a percentage of the total carbon flow. At the beginning of fruit development, hexose (fructose and glucose) supply (F3) represented the main source of carbon for the fruit, accounting for almost half of the total C flow, due to an important activity of the cell wall invertase. As the fruit grew, the activity of cell wall invertase decreased and more sucrose (F1) entered the fruit (up to 38% at maturity). Most of the sucrose was stored in the vacuole as the flux F4 increased proportionally to the sucrose supply into the cell, whereas only a minor fraction was used for cell metabolism and hexose synthesis in the cytosol. In the vacuole, however, the flow catalyzed by the acid invertase (F13) increased at maturity due to the increase of the concentration of vacuolar sucrose.

Cell metabolism in the cytosol was mostly fuelled by sorbitol. Although sorbitol represented 35% of the sap sugar (Additional data 3.3), it shows a low concentration in the fruit. This indubitably results from its high degradation rate in the cytosol, which provides carbon for the respiration and the synthesis of structural compounds and other molecules. The net flows of hexoses transport (F5-F6 and F7-F8) were in line with light storage of fructose and glucose produced in the vacuole and thus contributing to the synthesis of structural components and respiration.

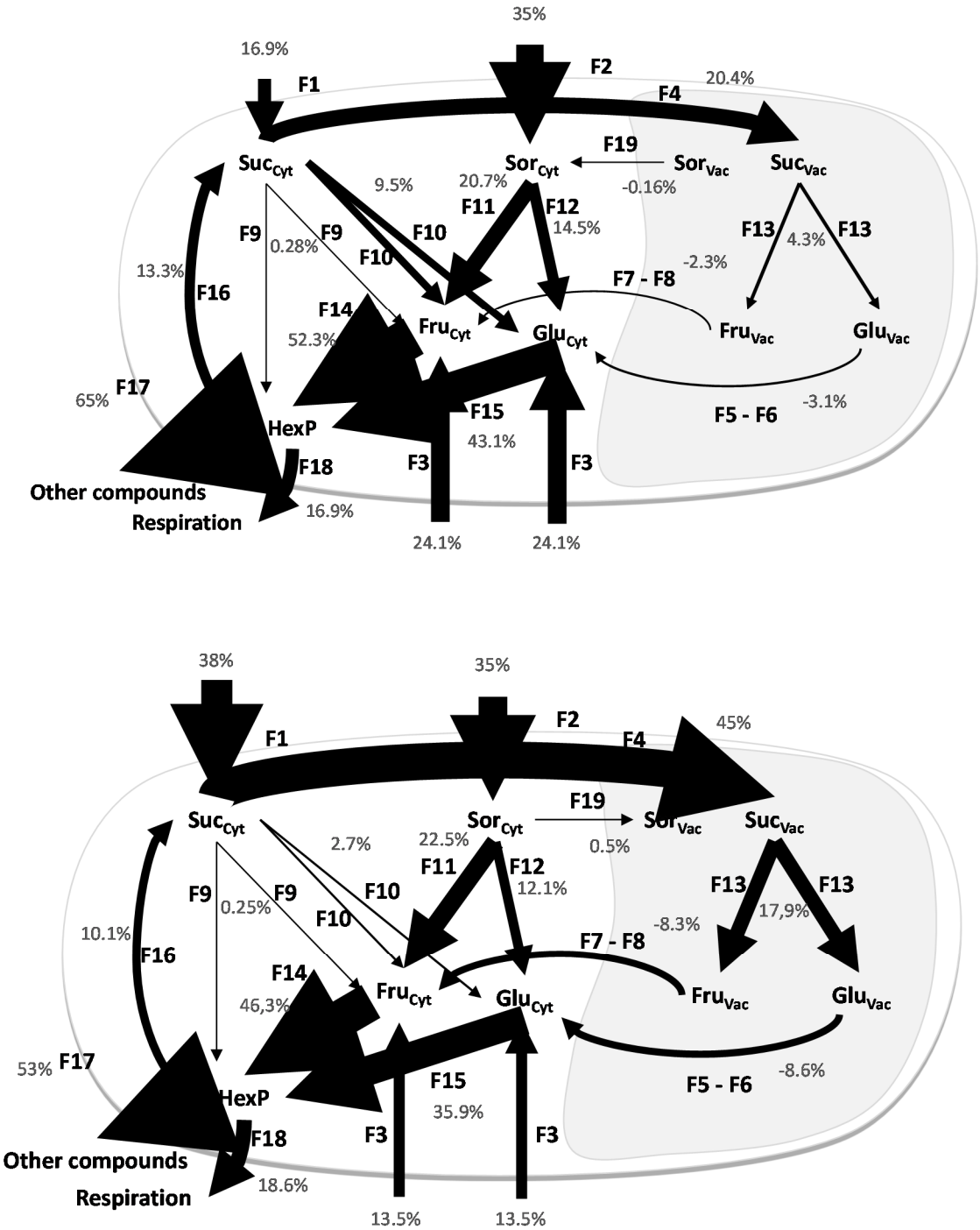


Figure 3.7 Representation of flow importance expressed as percentage of carbon supply (F1+F2+F3+F3) at 45% (top) and 100% of fruit development. Mean flows of the ten genotypes were represented.

Sugar compartmentation

The model compartmentation allowed us to explore the distribution of sugars within the vacuole and the cytosol. The model predicted a very low sucrose concentration in the cytosol (Figure 8), which suggests that all sucrose entering the fruit or synthesized via the hexose phosphate was transported into the vacuole or directly metabolized. In contrast, the concentrations of the other three sugars were similar in both compartments (Figure 3.8). The action of the passive transport (which depends on the concentration gradient) may be at the origin of this feature.

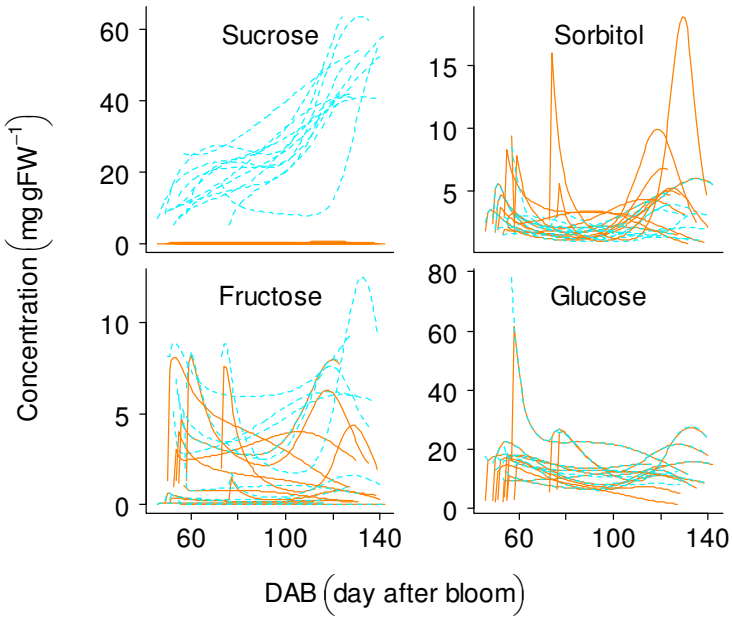


Figure 3.8 Predicted concentration of sugars (mg gFW^{-1}) in cytosol (orange solid line) and vacuole compartments (blue dashed line) along fruit development (DAB, day after bloom) for the ten genotypes studied.

Discussion

We developed a dynamical kinetic model of sugar metabolism that is able to simulate the accumulation of sugars (sucrose, glucose, fructose and sorbitol) along peach fruit development. The model combines enzyme activities with an explicit description of subcellular compartmentation (cytosol and vacuole) and their evolution during time. Applied to ten genotypes, with contrasted fructose phenotypes, the model was able to correctly account for both genetic and annual variability observed in experimental data. Because of its mechanistic nature, it offers a valuable tool to investigate the mechanisms involved in the accumulation of sugars in peach fruit.

Sorbitol: the driver of sugar metabolism in peach

The sugar metabolic network is well known in model species, like tomato or *Arabidopsis thaliana*, because of its importance in plant metabolism but it may differ between species. Indeed peach, as most of the Rosaceae, differs from model species in that an alcohol sugar, the sorbitol, is translocated from source to sink organs, providing an additional, but not well described, metabolic pathway.

Interestingly, the model points to a different utilization of sucrose and sorbitol loaded from the sap, providing clues to the role of sorbitol metabolism in peach. Whereas almost the totality of sucrose which is not hydrolyzed into the apoplasm, is stored into the vacuole, sorbitol is highly degraded in the cytosol and constitutes the main driver for the synthesis of structural compounds and respiration. The high sorbitol degradation results in the low concentration observed in peach fruit. It may be an adaptation for the reduction of cytosolic sorbitol which can be toxic and causes tissue necrosis (Sheveleva *et al.* 1998).

A second outcome of the model regards the possible presence of a sorbitol re-synthesis mechanism in the cytosol. Indeed, the existence of a sorbitol-6-P-dehydrogenase has been shown in the pear (Yamaki and Moriguchi 1989) and loquat (Abnasan *et al.* 1999) fruits but called into question for peach (Sun *et al.* 2011). Consequently, we did not include sorbitol re-synthesis in the model. Results from the model strongly support this option, showing that sorbitol re-synthesis was not essential for a good fit of sorbitol concentration in all studied genotypes.

Vacuolar transport and sugar repartition within cell compartments

The kinetic model developed here accounts for cellular compartmentation with the explicit representation of the vacuole and cytosol. Cellular compartmentation indeed is essential for high-level sugar accumulation (Patrick *et al.* 2013) and for unbiased metabolomic analysis. Indeed, activities or concentration patterns can change impressively whether expressed in terms of total cell mass or in terms of individual subcellular compartment (Génard *et al.* 2014). Beauvoit *et al.* (2014) have shown this effect on the concentrations of ATP and ADP that diminish over time when expressed in a global manner while they remain constant when expressed with respect to cytosol volume.

The model thus provides access to the distribution of sugars between the vacuole and cytosol, information difficult to obtain experimentally. The model predicts an equivalent concentration of fructose, glucose and sorbitol in both compartments and, in contrast, a very superior sucrose concentration in vacuole than in cytosol. Few data are available regarding sugar concentration within cellular compartment. Farré *et al.* (2001) have determined experimentally concentrations of sugars in cytosol and vacuole in potato tuber and Beauvoit *et al.* (2014) explored this feature via a metabolic model in tomato fruit. Interestingly, these two studies revealed, in agreement with the present model, that the main sugar of a given fruit displays high concentration in vacuole and almost null in cytosol, whereas the other sugars present an equivalent concentration between the two compartments.

This feature is harder to assess when comparing sugar repartition in quantity because of the variability in the volumes of the compartments. Considering relative compartment volumes of vacuole and cytosol in potato tuber cells, Farré *et al.* (2001) reported that in order to have an equal concentration in both compartments, 85% of sugar quantity had to be into the vacuole. Our model predicted a higher ratio of 90 to 95% that can be explained by the difference in cytosol and vacuole volume in peach fruit with respect to potato tuber (Farré *et al.* 2001). These repartitions of sugars are also in agreement with those reported on apple fruit by Yamaki and Ino (1992) who estimated a proportion of vacuolar sugar between 81 and 88% depending on the sugar, with a lower proportion for sorbitol. Surprisingly, data from Jiang *et al.* (2013a) are fairly different although coming from peach fruit at maturity. They reported that only 50 to 60% of sucrose, glucose, fructose and sorbitol were present in the vacuole. However, they did not give any indication on the volumes of the compartments in their study, impeding a comparison and further prediction of the repercussion of this low vacuolar sugar content in terms of difference between cytosolic and vacuolar concentration.

Differences in FK affinity as a candidate mechanism for 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype

The application of our model to a panel of genotypes with contrasted phenotypic traits opens the way to an in-depth investigation of the molecular mechanisms underlying trait variations.

Following the inspection of the sugar network in Figure 3.1, three possible mechanisms were hypothesized as potentially involved in the modification of fructose content, namely fructose synthesis, degradation and/or storage. Consistently with these hypotheses, the estimated values of the parameters pointed out different values of FK affinity, SuSy affinity and fructose passive transport capacity, depending on the fructose phenotype.

In addition to these parameters directly related to fructose, the HK affinity and sorbitol transport also showed a great difference between the two fructose types. These two parameters can play more or less directly on the amount of sorbitol available as substrate to produce fructose and thus they might have a role in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. However, changing these parameters did not cause any disturbance to fructose concentrations.

In silico experiments revealed instead that a decreased Km for FK was able to reduce the fructose content regardless the initial fructose concentration and independently from other parameter values. Similarly, a greater Km of FK successfully increases the fructose concentration of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, a result that could not be achieved by the modification of any other parameter. FK thus seems to be a good candidate controlling the 'low fructose' phenotype. In addition, two isoforms of FK with a different affinity for fructose have been revealed in peach (Kanayama *et al.* 1998; Kanayama *et al.* 2005). The presence of these isoforms in different proportions in the two fructose types may result in a differential degradation of fructose and lead to the emergence of two contrasted phenotypes.

Interestingly, a similar phenotype in Arabidopsis leaves has been attributed to the action of the tonoplastic transporter AtSWEET17, a fructose exporter from vacuole to cytosol (Chardon *et al.* 2013). On the same line, Wei et al (2014) showed in apple higher expression of MdSWEET4.1 transporter (phylogenetically close to AtSWEET17) in the leaves where the fructose concentration is lower than in the fruit. The AtSWEET17 transporter is a bidirectional passive transporter (Guo *et al.* 2014) and its capacity corresponds to the TpassifFru parameter of the model. Model simulations indeed showed that an increased fructose export from the vacuole led to a reduction of fructose concentration in the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. However, the predicted diminution was lower than the one observed when reducing the FK affinity parameter. So, altered fructose storage was not identified as the preferred mechanism driving 'low-fructose-to-glucose-

ratio' phenotype in peach fruit but a role in the maintenance of the low fructose concentration cannot be excluded.

The model presented here proved to be a helpful tool for the investigation of sugar metabolism in peach and the identification of the mechanisms underlying phenotypic variability. Moreover, the estimation of genetic parameters (parameters depending on genotypes) opens the way to further studies. Indeed, an estimation of the parameter values for a large number of genotypes could offer the possibility to look for the genomic region linked to the parameter variation (QTL, quantitative trait loci). The strength of the mechanistic models in which the equations are represented in a biological relevant way, lies in facilitating functional genetic studies and the discovery of new genes of interest. In perspective, the integration of the QTL effect to determine the model parameters will allow the simulation of sugar composition in fruit for genotypes with new allelic combination (Reymond *et al.* 2004; Quilot *et al.* 2005).

Materials and methods

Plant material

The peach genotypes considered in this work have already been characterized by Quilot *et al.* (2004a). They come from a progeny obtained by two subsequent back crosses between *Prunus davidiana* (Carr.) P1908 and *Prunus persica* (L.) Batsch 'Summergrand' and then 'Zephyr'. Trees were three years old in 2001, when they were planted in a completely randomized design in the orchard of the INRA Research Centre of Avignon (southern France). All genotypes were grafted on GF305 seedling rootstocks and were grown under normal irrigation, fertilization and pest control conditions. All the trees were homogeneously pruned and thinned. This study was performed on 8 different genotypes harvested in 2012 and two others harvested in 2010 and 2011. The genotypes were selected in order to have sufficient fruits for this experiment and to encompass the population variability based on data from previous years at maturity. Five genotypes were called 'standard fructose-to-glucose ratio' because of the balanced fructose-to-glucose ratio at maturity, which corresponds to the ratio found in commercial varieties, and five were called 'low fructose-to-glucose ratio' due to the lower proportion of fructose compared to glucose based on their sugar composition at maturity from previous years.

Sugar concentration and enzyme capacity assay

For each genotype, the maturity date was extrapolated from previous data. Maturity was reached when fruits were no longer growing, softened and easily picked. The expected interval between bloom and maturity dates was divided into six equal's periods. Nine fruits were collected at each sampling date and organized in three pools of three fruits, in order to have three biological replicates. All fruits were weighted, peeled, and the mesocarp was cut into small pieces, which were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The samples were then ground in liquid nitrogen to a fine powder and stored at -80°C for future analyses. Sucrose, glucose, fructose, sorbitol, glucose-1-phosphate (G1P), glucose-6-phosphate (G6P) and fructose-6-phosphate (F6P) concentrations were assayed as described by Desnoues et al. (2014). The capacities of sucrose synthase (SuSy), neutral invertase (NI), acid invertase (AI), sorbitol dehydrogenase (SDH), sorbitol oxydase (SO), fructokinase (FK) and hexokinase (HK) were assayed as described in Desnoues et al. (2014). Two technical replicates (distinct extractions and assays) were performed for each sample.

Fresh and dry weights of flesh

Fruit fresh weight was measured at each sampling date for all genotypes. An estimation of stone fresh weight was performed in order to access flesh fresh weight. Based on data collected from 2001 to 2008 on several genotypes of the population, an empirical relation was found between stone fresh weight (StoneFW) and fruit fresh weight (FruitFW):

$$StoneFM = a * (1 - \exp(-k * FruitFM))$$

Stone fresh weights of genotypes C216 and C227 were measured between 2001 and 2008 so the parameters *a* and *k* were estimated individually (C216: a=6.05, k=0.11; C227: a=12.13, k=0.07). For the other genotypes, stone fresh weights were not measured so the parameters *a* and *k* were estimated from the data across all genotypes measured within the progeny (a=8.6, k=0.06). The estimation was performed using least squares method with nls function on R software (R Development Core Team 2006).

The flesh dry matter content was measured independently for all genotypes and for all developmental stages from 1g of flesh fresh weight powder dried one week in an incubator at 37°C and then weighted. Flesh dry weight was calculated from correspondent flesh fresh weight and flesh dry matter content. Flesh fresh and dry weights were then fitted with the following curve from Génard et al. (1991) independently for all genotypes:

$$D = D0 + p1 * \left(1 - \exp\left(-p2 * (t)\right)\right) + \frac{p3}{1 + \exp\left(-p4 * (t - p5)\right)}$$

Time courses of flesh fresh weight, dry weight and dry weight variation are represented in Figure 3.9.

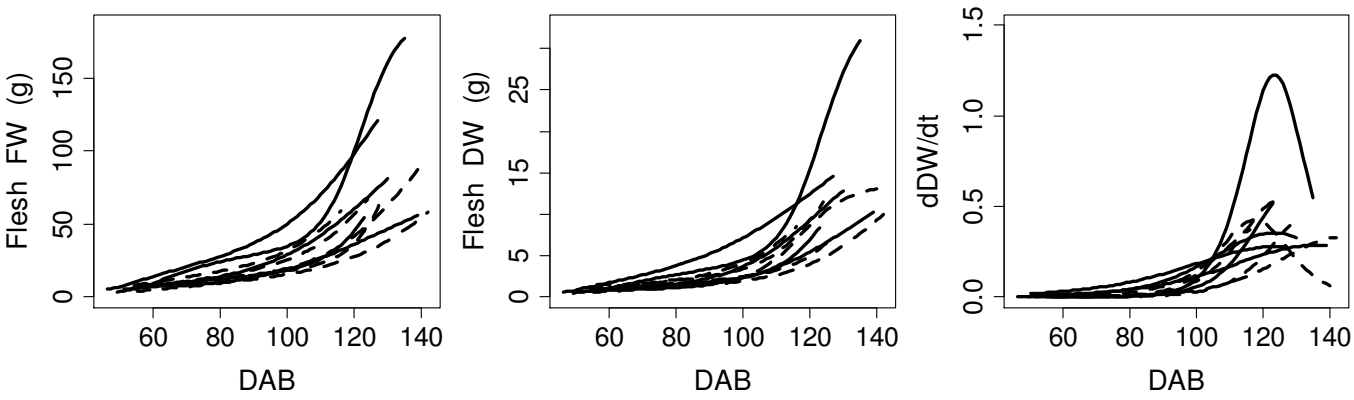


Figure 3.9 Time courses of flesh fresh weight (FW), dry weight (DW) and dry weight variation (dDW/dt, g per day) along fruit growth (DAB, days after bloom) for ten genotypes. Five 'Standard fructose-to-glucose ratio' genotypes are represented with continuous line and five 'low fructose-to-glucose ratio' genotypes with dashed line.

Cytological analysis

In order to determine the evolution of cytosol-to-cell and vacuole-to-cell ratio during peach fruit development, a cytological analysis was performed on cells from fruit flesh. Three fruits of C227 (a 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotype) were collected at 57, 71, 92 and 120 days after bloom (DAB). Little flesh fragments were sampled on the equatorial and perpendicular plans. Flesh fragments were fixed in glutaraldehyde and embedded in Epon 812 as described in Beauvoit *et al.* (2014). Sections (1 mm) obtained with glass or diamond knives were stained with 0.04% (w/v) toluidine blue and photographed using a Zeiss Axiophot microscope coupled with a Spot RTKE digital camera. Fifteen cells were measured for each orientation (equatorial and perpendicular plans), fruit and sample date. Width and height of vacuole and cell were measured using the image-J software. Cell and vacuole were assumed to be spherical because there was no significant difference between width and height for each orientation and between the two orientations. The surface of the cell that was not occupied by the vacuole was equally distributed between the cell wall and the cytosol (measured on 10 cells at 57 and 120 DAB). Thus the radius corresponding to cytosol plus vacuole was determined. The volumes corresponding to the vacuole, the cytosol plus vacuole and the cell were calculated from their respective radius.

In this way, the proportions of vacuole and cytosol volumes within the cell were determined at four different development stages for one genotype, on three fruits per date. A Fermi's function (1) was fitted to experimental data and the resulting parameters are presented in Table 3.1. These parameters were applied to all genotypes.

$$f = (k_0 - k_1) * \left(1 + exp\left(\frac{t-\mu}{a}\right)\right)^{(-1+k_1)} \qquad (1)$$

Table 3.1: Fermi's function parameters for the proportions of vacuole and cytosol volumes within the cell

	Vacuole/cell	Cytosol/cell
k0	-7.2932	4.4926
k1	0.8586	0.0688
µ	3.1978	2.4928
a	9.6428	9.5316

Respiration and sugar supply

Given that respiration exhibited no significant differences between genotypes (Desnoues et al. 2014), we used the same set of parameters as in Génard *et al.* (2010) to simulate all genotypes.

Total sugar supply (gC per day) were represented as described by Génard *et al.* (2003). Phloem sap has been collected from cut apex exudation from 21 young plants obtained from self-fecundation of a C216 genotype ('low-fructose-to-glucose-ratio'). Plants were genotyped on the marker surrounding the QTL responsible of 'low fructose-to-glucose-ratio' (Quilot *et al.* 2004). Seven plants displaying homozygous *P. davidiana* allele at this locus, seven plants with homozygous *P. persica* allele and seven plants heterozygous at this specific locus were used.

Protocol was adapted from King and Zeevaart (1974), apex was cut on EDTA solution 20mM pH7 and place on 1ml EDTA solution 20mM pH7 for 4 hours on a dark box humidity saturated. Two of each genotype were used as negative control. There were placed on $CaCl_2$ 40mM solution which prevent the phloem exudation. Exudation solution was frozen on liquid nitrogen and keep at -20°C. Sucrose and sorbitol was assayed by high performance liquid chromatography (HPLC). The sap sugar composition was fairly constant among all assayed genotypes (Additional data 3). The measured sucrose to total sap sugar (sucrose + sorbitol) ratio was thus used as value of the model parameter λ (sucrose sap proportion, λ=0.65), for all genotypes. We assumed that this value was constant along the fruit development.

Numerical integration and Parameter estimation

The model integration and calibration was performed using the Matlab software. The ODE solver ode23s based on a modified Rosenbrock formula of order 2 (Shampine and Reichelt 1997) was used. Parameter estimation was performed using the genetic algorithm (ga function, global optimization toolbox). The cost function (to be minimized) was defined as the sum of squares of the differences between the simulated and measured fruit sugar concentrations over the whole period of fruit development. 'CrossoverFraction' was set to 0.7, the number of generation was 80 and the population size 300. Five estimations were performed for each genotype in order to assure a good exploration of the parameter space. One of them was kept for the analysis based on flow minimization criteria (ie. estimation with lower sum of flow).

Additional data

Additional data 3.1: Model equations

$$F1 = \lambda * \lambda_{Suc}(t) * \frac{dCsup}{dt} * 1000$$
$$F2 = (1 - \lambda) * \frac{dCsup}{dt} * 1000$$
$$F3 = \lambda * \frac{1 - \lambda_{Suc}(t)}{2} * \frac{dCsup}{dt} * 1000$$
$$F4 = TactifSuc * C_{suc}^{cyt} * Tsurf$$
$$F5 = \frac{VmTactifGlu}{KmTactifGlu + [fru_{cyt}] + [glu_{cyt}]} * C_{glu}^{cyt} * Tsurf$$
$$F6 = TpassifGlu * ([glu_{vac}] - [glu_{cyt}]) * Tsurf$$
$$F7 = \frac{VmTactifFru}{KmTactifFru + [fru_{cyt}] + [glu_{cyt}]} * C_{fru}^{cyt} * Tsurf$$
$$F8 = TpassifFru * ([fru_{vac}] - [fru_{cyt}]) * Tsurf$$
$$F9 = \frac{Vsusy}{Ksusy + [suc_{cyt}]} * C_{suc}^{cyt}$$
$$F10 = \frac{Vni}{Kni + [suc_{cyt}]} * C_{suc}^{cyt}$$
$$F11 = \frac{Vsdh}{Ksdh + [sor_{cyt}]} * C_{sor}^{cyt}$$
$$F12 = \frac{Vso}{Kso + [sor_{cyt}]} * C_{sor}^{cyt}$$
$$F13 = \frac{Vai}{Kai * \left(1 + \frac{[fru_{vac}] + [glu_{vac}]}{Ki_AI}\right) + [suc_{vac}]} * C_{suc}^{vac}$$
$$F14 = \frac{Vfk}{Kfk + [fru_{cyt}]} * C_{fru}^{cyt}$$
$$F15 = \frac{Vhk}{Khk + [glu_{cyt}]} * C_{glu}^{cyt}$$
$$F16 = ReSyntSuc * C_{hexP}^{cyt}$$
$$F17 = OthComp * C_{hexP}^{cyt}$$
$$F18 = \frac{dCresp}{dt} * 1000$$
$$F19 = TpassifSor * ([sor_{cyt}] - [sor_{vac}]) * Tsurf$$

$$Tsurf = (4 * pi)^{1/3} * (3 * gVac)^{2/3}$$

ODE set

$$\frac{dC_{suc}^{cyt}}{dt} = F1 + F16 - F4 - F9 - F10$$

$$\frac{dC_{sor}^{cyt}}{dt} = F2 - F11 - F12 - F19$$

$$\frac{dC_{fru}^{cyt}}{dt} = F3 + F8 + \frac{F9}{2} + \frac{F10}{2} + F11 - F7 - F14$$

$$\frac{dC_{glu}^{cyt}}{dt} = F3 + F6 + \frac{F10}{2} + F12 - F5 - F15$$

$$\frac{dC_{hexP}^{cyt}}{dt} = \frac{F9}{2} + F14 + F15 - F17 - F18 - F16$$

$$\frac{dC_{suc}^{vac}}{dt} = F4 - F13$$

$$\frac{dC_{fru}^{vac}}{dt} = F7 + \frac{F13}{2} - F8$$

$$\frac{dC_{glu}^{vac}}{dt} = F5 + \frac{F13}{2} - F6$$

$$\frac{dC_{sor}^{vac}}{dt} = F19$$

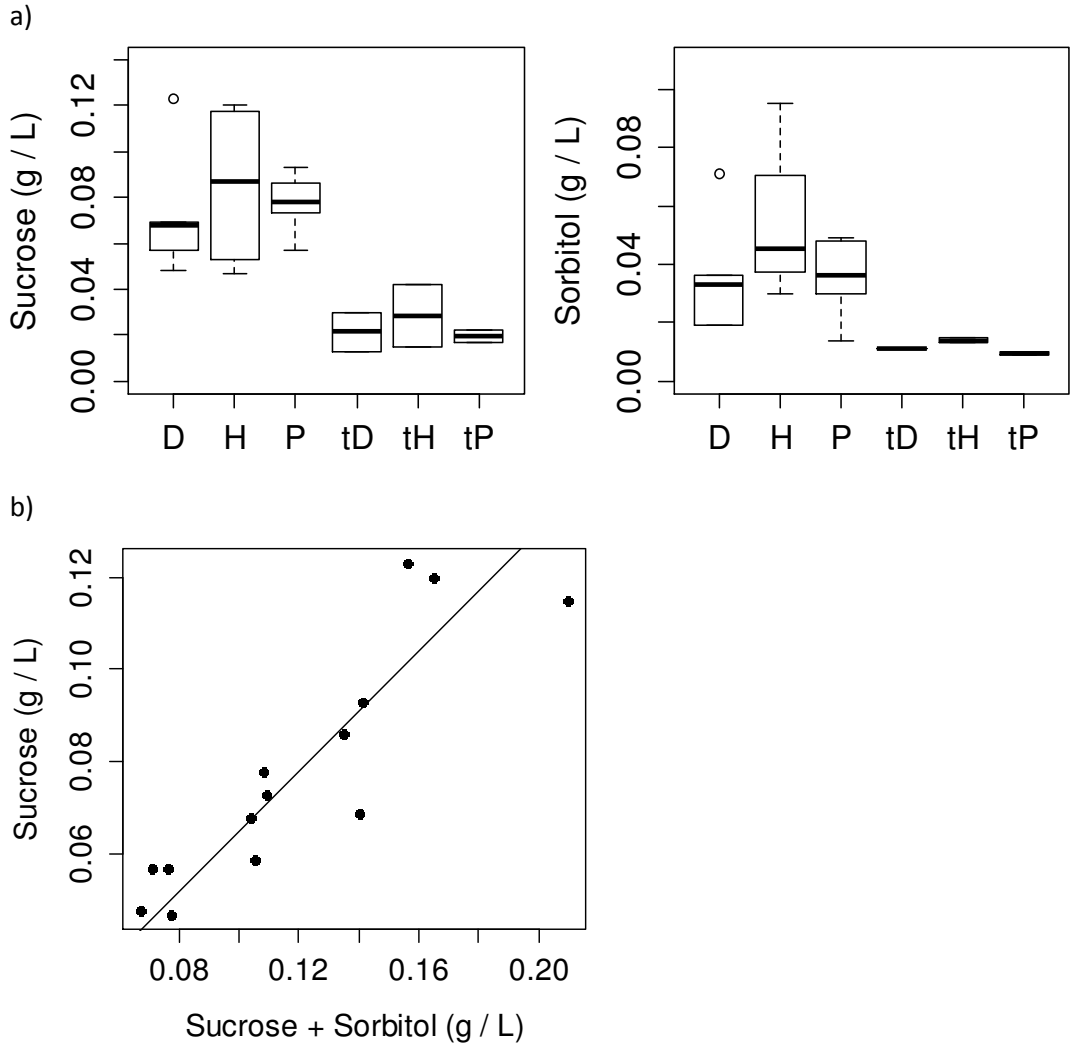
Additional data 3.2 Model parameter description

Parameter	Description	Value	Species	Reference*
Supply				
λ	Sucrose sap proportion	0.65	*P.persica*	Experimentations (Additional data)
λ_{Suc}	Sucrose proportion hydrolyzed in the apoplasm	[0.09 – 0.99]		Estimated [0 – 1]
Respiration				
Q10	temperature ratio of maintenance respiration	1.9	*P.persica*	(Génard *et al.* 2010)
q_g	growth respiration coefficient	0.084gC gDW^{-1}	*P.persica*	(Génard *et al.* 2010)
q_m	maintenance respiration coefficient	$2.76.10^{-4}$gC $gDW^{-1}day^{-1}$	*P.persica*	(Génard *et al.* 2010)
Sugar metabolism output				
OthComp	Coefficient of transfer function between hexoses phosphate and other compounds	[457.5 – 1461] mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [450 – 1500]
Transport reaction				
TactifSuc	F4 : Sucrose active import	[3.3– 400]mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 400]
KmTactifGlu	F5 : Glucose active import (affinity)	0.054 mg gFW^{-1}	*Pyrus communis*	(Shiratake *et al.* 1997)
VmTactifGlu	F5 : Glucose active import (capacity)	[0.02 – 97.8]mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 150]
TpassifGlu	F6 : Glucose passive transport, bidirectional	[24.8 – 149.8]mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 150]
KmTactifFru	F7 : Fructose active import (affinity)	0.288 mg gFW^{-1}	*Pyrus communis*	(Shiratake *et al.* 1997)
VmTactifFru	F7 : Fructose active import (capacity)	[4.8 – 110]mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 150]
TpassifFru	F8 : Fructose passive transport, bidirectional	[4 – 136]mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 150]
TpassifSor	F19 : Sorbitol passive transport, bidirectional	[0.009 – 13.7] mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 150]
Enymatic reaction				
F9: sucrose synthase (SuSy) sucrose -> fructose + hexose phosphate				
Ksusy		[16.8 – 192.7] mg gFW^{-1}		Estimated [0 – 200]
Vsusy		$6.5 – 3.8e^{-2} \times t + 2.7e^{-3} \times t^2 – 1.3e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
F10: neutral invertase (NI) sucrose -> fructose + glucose				
Kni		3.42 mg gFW^{-1}	*Saccharum officinarum*	(Voster and Botha 1998)
Vni		Standard: 10 mg gFW^{-1}	*Saccharum officinarum*	(Voster and Botha 1998)
		Low : 6.8 mg gFW^{-1}	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
F11: sorbitol dehydrogenase (SDH) sorbitol -> fructose				
Ksdh		17.54 mg gFW^{-1}	*Pyrus serotina*	(Oura *et al.* 2000)
Vsdh		$2 + 0.3 \times t – 3.1e^{-3} \times t^2 + 8.7e^{-6} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)

F12: sorbitol oxydase (SO) sorbitol -> glucose			
Kso	[4.98 – 61.48] mg gFW^{-1}		Estimated [0 – 300]
Vso	$4.9 + 0.2 \times t - 3.1e^{-3} \times t^2 - 1.3e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
F13: acid invertase (AI) Sucrose -> fructose + glucose			
Kai	1.43 mg gFW^{-1}	*P.persica*	(Moriguchi *et al.* 1991)
Vai	6.5 mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
Ki_AI	[0 – 0.2] mg gFW^{-1}		Estimated [0 – 10]
F14: fructokinase (FK) fructose -> hexose phosphate			
Kfk	[0.007 – 24.6] mg gFW^{-1}		Estimated [0 – 30]
Vfk	Standard: $75 - 1.9 \times t + 2e^{-2} \times t^2 - 6.4e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
	Low: $61 - 1.4 \times t + 1.5e^{-2} \times t^2 - 4.7e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
F15: hexokinase (HK) glucose -> hexose phosphate			
Khk	[75.4 – 289.5] mg gFW^{-1}		Estimated [0 – 300]
Vhk	Standard: $83.7 - 2.2 \times t + 2.5e^{-2} \times t^2 - 8.1e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
	Low: $88.7 - 2.4 \times t + 2.7e^{-2} \times t^2 - 8.7e^{-5} \times t^3$ mg $gFW^{-1}d^{-1}$	*P.persica*	(Desnoues *et al.* 2014)
F16: sucrose phosphate synthase (SPS) + sucrose phosphatase synthase (SPP) hexose phosphate -> Sucrose			
ReSyntSuc	[0.77 – 300] mg $gFW^{-1}d^{-1}$		Estimated [0 – 300]

*for estimated parameter lower and upper bound of the parameter space are indicated in bracket

Additional data 3.3 Sucrose to sorbitol composition of phloem sap



Additional Figure: a) Sucrose and sorbitol concentrations (g L^{-1}) in sap from apex exudation. D corresponds to plant displaying homozygous *P. davidiana* allele at the locus governing the 'low-fructose-to-glucose-ratio', H corresponds to plant heterozygous and P corresponds to plant displaying homozygous *P. persica* allele at this locus. Seven plants were represented for each category. tD, th and tP correspond to negative control placed on $CaCl_2$ solution, two plants were represented for each category. b) represents sucrose concentration (g L^{-1}) on total sap sugar concentration (g L^{-1}). The line corresponds to the ratio of 0.65 used in the model.

Chapitre 4 : Analyse du contrôle génétique du métabolisme des sucres

Chapitre 4 : Analyse du contrôle génétique du métabolisme des sucres

Ce chapitre, présenté sous la forme d'un article en préparation, décrit l'analyse du contrôle génétique du métabolisme des sucres chez la pêche. Une recherche de QTL a été effectuée sur la base des données présentées dans le chapitre 1. Elle a permis de mettre en évidence un grand nombre de loci impliqués dans la variation des sucres et des capacités enzymatiques et ce à différents stades de développement du fruit. Compte tenu de la difficulté de définir des stades de développement physiologique précis chez la pêche, nous avons réalisé cette recherche de QTL sur la base de deux jeux de données: l'un comprenant les données observées aux 6 stades de prélèvements et l'autre comprenant des données recalculées, recalées en fonction de la durée de développement des fruits pour chaque génotype. Par ailleurs, nous avons réalisé la recherche de QTL sur l'ensemble de la population mais également indépendamment sur les deux sous-groupes d'individus de fructotype différent. L'idée sous-jacente était d'augmenter nos chances de détecter des QTL supplémentaires de fructose qui auraient été masqués par le fructotype. Enfin, nous avons utilisé l'ensemble des cartes génétiques disponibles pour la population BC2. Nous avons choisi de présenter ici l'ensemble des résultats obtenus à partir de ces différentes analyses.

Dynamic QTL for sugars and enzyme capacities provide an overview of genetic control of sugar metabolism during peach fruit development

Authors : Elsa Desnoues, Valentina Baldazzi, Michel Génard, Jehan-Baptiste Mauroux, Patrick Lambert, Bénédicte Quilot-Turion

Résumé :

La connaissance du contrôle génétique du métabolisme des sucres est importante pour l'amélioration de la qualité des fruits et ainsi pour promouvoir leur consommation. Le métabolisme des sucres est contrôlé par de nombreuses enzymes et la composition en sucres des fruits évolue au cours de leur développement en suivant des tendances contrastées selon les différents sucres. La recherche de QTL (quantitative trait locus) a été réalisée sur des fruits de pêche (*Prunus persica* (L.) Batsch), espèce modèle pour les *Prunus*. Une descendance issue d'un croisement interspécifique entre des cultivars de *Prunus persica* et un clone de *Prunus davidiana* a été utilisée. Des QTL dynamiques de poids frais des fruits, de concentration en sucres et acides et de capacités enzymatiques liées au métabolisme des sucres ont été détectés à des stades différents du développement du fruit. L'exploration des effets des allèles à ces QTL a révélé une instabilité notable de certains d'entre eux au cours de la croissance des fruits. On a même parfois observé des inversions d'effet à l'approche de la maturité. Cette analyse de QTL a été complétée par la localisation sur la carte génétique des gènes structuraux des enzymes liées au métabolisme des sucres ou de transporteurs de sucre. Différents cas de co-localisation entre les gènes annotés, les QTL de capacités enzymatiques et les QTL de concentration de métabolites ont été observées et discutées. Ces co-localisations soulèvent des hypothèses de régulation fonctionnelle du métabolisme des sucres et ouvrent la voie pour des analyses supplémentaires afin d'identifier les gènes sous-jacents. Enfin, nous soulignons l'impact potentiel sur la création variétale de l'évolution de l'effet des QTL en fin de croissance des fruits.

Abstract:

Knowledge of genetic control of sugar metabolism is important to enhance fruit quality and promote fruit consumption. Sugar metabolism pathway is controlled by many enzymes and the sugar composition of the fruit evolves along fruit development following contrasted trends depending on the different sugars. A QTL (quantitative trait locus) research was performed on peach fruit (*Prunus persica* (L.) Batsch), the model species of *Prunus*. A progeny derived from an interspecific cross between *Prunus persica* cultivars and *Prunus davidiana* was used. Dynamic QTL of fresh weight, sugars, acids, and enzyme capacities related to sugar metabolism were detected at different stages along fruit development. Changing effect of alleles along fruit growth were observed, including inversions nearby maturity. This QTL analysis was completed by the identification on the peach genome of genes annotated as enzymes linked to sugar metabolism or sugar transporters. Different cases of co-locations between annotated genes, QTL of enzyme capacities and QTL of metabolite concentrations were observed and discussed. These co-locations raise hypotheses of functional regulation of the sugar metabolism and pave the way for further analyzes to enable the identification of the underlying genes. At last we pointed out the potential impact on fruit breeding of the evolution of QTL effect nearby maturity.

Introduction

Because of its relative short juvenile period, its small genome and the quality of its genome sequence, peach (Prunus persica (L.) Batsch) is the model species at least for *Prunus*. As for fruit in general, the present challenge is to improve their attractiveness to therefore increase their consumption which mainly relies on enhancing taste and nutritional quality. The sugar to acid ratio is the criterion that most affects the taste of the fruit (Colaric et al. 2005). Besides, sugar composition affects sweetness (Schaffer 1999). In peach, the major sugar at maturity is sucrose, followed by glucose and fructose and then sorbitol. Sugar metabolism is central because, in addition to controlling sweetness, it feeds respiration and acid metabolism via glycolysis and provides carbon for synthesis of structural compounds (cell wall). Sugar metabolism network in fruit is fairly complex with many enzymes involved in the interconversion of different sugars. For a complete overview of the sugar metabolism network in peach refer to additional figure 1. Profiles of sugar concentration along fruit growth are different among sugars (Moriguchi et al. 1990a) and high natural variability of sugar concentrations can be observed between genotypes (Cantín *et al.* 2009). Such specific time-courses suggest a specific regulation of the different mechanisms controlling sugar metabolism along fruit growth. Studying profiles of enzyme capacities (maximum activities) allows completing the picture of sugar metabolism and may help identifying key steps of regulation (Moriguchi *et al.* 1990b; Kanayama *et al.* 2005) during fruit development and among different genotypes (Desnoues *et al.* 2014).

Knowledge about gene architecture involved in sugar metabolism can provide further insight into mechanisms underlying sugar concentration variations. Studies from different species highlight a complex and quantitative genetic determinism of sugars (Labate et al. 2007; Lerceteau-Köhler et al. 2012). In peach, specific loci responsible for variations of sugar concentration in fruit have been identified on each of the eight linkage groups (Sosinski *et al.* 1998; Dirlewanger *et al.* 1999a; Etienne *et al.* 2002b; Quilot *et al.* 2004b). Several co-localizations were observed between QTL linked to different sugars or related to other quality traits. Many clusters of QTL for fruit quality traits have been identified in different species (Causse *et al.* 2001; Saliba-Colombani *et al.* 2001; Causse *et al.* 2002; Zorrilla-Fontanesi *et al.* 2011; Lerceteau-Köhler *et al.* 2012). According to Schauer *et al.* (2006; 2008), a large proportion of fruit metabolite QTL is negatively correlated with plant morphology traits and yield. It is particularly true for QTL of metabolites that are part of central pathways of primary metabolism and largely impacted by source-sink relationships which determine total carbon partitioning. Opposite allelic effects on sugar concentration and fruit weight observed at some common loci (Grandillo *et al.* 1999) supports pleiotropic effects. For example, a single gene was found to have pleiotropic effects on wheat grain protein, zinc and iron concentration (Uauy et al.

2006). On the contrary in some cases the link between SSC and yield can be broken, as shown in tomato (Yousef and Juvik 2001; Gur and Zamir 2004). The genes responsible for the QTL detected remain unknown in most cases. Thus, it is difficult to know if those co-localizations are due to pleiotropic effects of a gene or to the action of several genes linked in clusters.

High variations of sugar concentrations examined at maturity, as in peach (Cantín *et al.* 2009), may result from differential evolution of sugar balance along growth. However, in peach all QTL related to sugar metabolism in fruit were identified at maturity. Dynamic QTL would highlight the complex series of genetically programmed events leading to quality at maturity. Sun *et al.* (2012) showed that the concentration of lycopene in tomato is under complex genetic control with several loci involved at different stages of development. Studying the evolution of apple firmness and softening after harvest, Costa *et al.* (2010) identified three novel genomic regions influencing various physiological aspects of texture. Up to now, no study has attempted to identify loci involved in the time course of sugar metabolism along fruit growth.

Dynamics QTL of enzyme capacities may help understanding the mechanisms controlling variations of the metabolites. Indeed co-localizations between QTL of an enzyme capacity and a related metabolite strongly point to functional links. In maize several loci have been identified as associated with both variations of enzyme capacities and sugar concentrations and thereby clarify the metabolic pathways involved in the variation of some metabolites (Causse et al. 1994; Thévenot et al. 2005).

Some studies have identified co-localizations between candidate genes coding for enzymes and QTL responsible for the variability in peach fruit quality (Ogundiwin et al. 2009; Illa et al. 2011). The annotation of the peach genome (The International Peach Genome Initiative 2013) offers new possibilities in the study of candidate genes and gives essential assistance in understanding the mechanisms involved in a particular metabolism. The objective of this study is to dissect the genetic control of sugar metabolism in peach fruit. For this, we mapped QTL in a peach progeny derived from an interspecific cross. QTL for sugars, acids and related enzymatic capacities were identified at different stages along fruit growth. The stability of the QTL among developmental stages and the co-localizations between QTL were particularly investigated to draw functional hypotheses. In addition, we searched for candidate genes related to sugar metabolism based on the peach genome annotation. The co-localizations of these genes and QTL were examined to propose candidates responsible for the natural variability of sugar concentration.

Materials and methods

Plant materials

The breeding progeny is a second backcross progeny derived from an interspecific cross between *P. persica* and a wild close relative, clone P1908 of *Prunus davidiana* (Pascal *et al.* 1998). P1908 with small green fruit, was crossed with *P. persica* 'Summergrand' (S) and an F1 progeny (SD) was obtained. One F1 hybrid was then back-crossed to S to produce a BC1 progeny. Finally, BC1 individuals were used to pollinate *P. persica* 'Zephyr' (Z) to derive the breeding progeny (BC2). S and Z are, respectively, yellow and white nectarine cultivars with large tasty fruits. For brevity and clarity, this progeny will be referred to as BC2 throughout this paper although the persica parents (P) used to produce the BC1 and BC2 progeny are not identical. The possible genotypes at one locus in the BC2 progeny are presented in Table 4.1.

Trees were planted in a completely randomized design in the orchard of the INRA Research Centre of Avignon (southern France). Trees were three years old when planted in the orchard in 2001. All genotypes were grafted on GF305 seeding rootstocks and were grown under normal irrigation, fertilization and pest control conditions. All the trees were homogeneously pruned and thinned.

Table 4.1 Possible genotypes at a single locus in SD, BC1 and BC2 progenies (from (Quilot *et al.* 2004))

D x S			SD40 x S			BC1 x Z			
SD	D_1	D_2	**BC1**	D_1	S_1	**BC2**	D_1	S_1	S_2
S_1	D_1S_1	D_2S_1	S_1	D_1S_1	S_1S_1	Z_1	Z_1D_1 (1/8)	Z_1S_1 (1/4)	Z_1S_2 (1/8)
S_2	D_1S_2	D_2S_2	S_2	D_1S_2	S_2S_1	Z_2	Z_2D_1 (1/8)	Z_2S_1 (1/4)	Z_2S_2 (1/8)
SD40 genotype is coded D1S1 at one locus			Possible gametes from BC1 progeny D_1 (1/4)	S_1 (1/2)	S_2 (1/4)				

Phenotyping

Nineteen phenotypical traits were measured on 106 genotypes of the progeny describe above: Fresh weight (FW), Sucrose (Suc), Sorbitol (Sor), Fructose (Fru), Glucose (Glu), Malate (Mal), Citrate (Cit), sucrose synthase (SuSy, EC 2.4.1.13), neutral invertase (NI, EC 3.2.1.26), acid invertase (AI, EC 3.2.1.26), sorbitol dehydrogenase (SDH, EC 1.1.1.14), sorbitol oxidase (SO), fructokinase (FK, EC 2.7.1.4), hexokinase (HK, EC 2.7.1.1), ATP-phosphofructokinase (PFK, EC 2.7.1.11), fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BPase, EC 3.1.3.11), phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase, EC 2.7.7.9), Sucrose phosphate synthase (SPS, EC 2.4.1.14). These assays were presented by Desnoues *et al.* (2014) except acid concentration. Following the same sample preparation and extraction as for sugar essay presented by Desnoues *et al.* (2014), the malate concentration was measured as described by Gibon *et al.* (2009) and the citrate concentration was measured as described by Moellering *et al.* (1966).

Knowing the approximate maturity dates of each genotype (data from previous years) we achieved 6 samples during fruit development corresponding to about 40, 52, 64, 76, 88 and 100% of maturity. However the maturity date depends on environmental conditions, actual maturity date was different from that estimated a priori so the sampling dates do not correspond to the same percentage of development for all genotypes. For this reason we then rescaled the phenotyping data. For all genotypes and traits, a fit by local regression was performed with the loess function in the R software. As the data were slightly erratic for some traits, two adjustments were applied consecutively in order to maintain both the order of magnitude and the general trend of the data. Rescaled stages were defined considering the % of total fruit development duration as time unit. In order to reproduce the same design as the experimental data, the total fruit development duration was divided into five equal parts starting at 40% which corresponds to the earlier percentage common to all genotypes. Six values were thus extracted from the fitted curves at 40, 52, 64, 76, 88 and 100% of fruit development for all genotypes and traits. This dataset was further called 'rescaled phenotyping dataset' in contrast to the observed phenotyping dataset at the six sampling dates.

DNA isolation and SNP genotyping

Genotyping of the BC2 population was performed using the International Peach SNP Consortium (IPSC) 9K peach SNP array v1 (Verde *et al.* 2012)

For SNP array genotyping, isolation of genomic DNA and subsequent Infinium assay were performed as explained in Verde *et al.* (2012). DNA was extracted with the DNeasy 96 Plant kit (Qiagen), diluted to 50ng/µl and sent to IASMA Research and Innovation Centre (San Michele all'Adige, Italy) for genotyping.

SNP genotypes were scored with the Genotyping Module of GenomeStudio Data Analysis software (Illumina Inc.), using a GenCall threshold of 0.15. SNPs with GenTrain score < 0.6 were applied to clean up the datafile. SNPs showing severe segregation distortion (χ^2 test, $p < 10^{-6}$) and more than 1% of missing data were excluded.

Genetic linkage maps

In this paper, three different genetic linkage maps of the BC2 progeny were used to perform the QTL analyses, two of them monitoring the polymorphism between D and the *P. persica* parents (P) genomes and the third one tracking the heterozygosity of Z. First, the initial map developed by Foulongne *et al.* (2003) and subsequently complemented by Quilot *et al.* (2004b) and Illa *et al.* (2009), was updated. This map, further called 'SSR_D-P map' for simplicity, was improved on the basis of data from 159 individuals. In particular, two SSR markers (AMPPG021 and AMPPG071) were developed for linkage group 1. The primer sequences are available in the additional table 4.1. It now contains 133 markers polymorphic between D and S genomes (68 SSR, 40 RFLP and 25 AFLP) distributed in eight linkage groups and covering a total of 432 cM, with a density of 3.24 cM between markers.

The two SNP maps were developed from the dataset of the 9k SNP array by filtering on the basis of parental alleles. For the SNP map tracking the polymorphism between D and P genomes, we only kept markers with D nucleotide being different from both S and Z nucleotides. The map built on 115 individuals is 431 cM long with 182 independent SNP markers and a density of 2.37 cM between markers. This map will further be called 'SNP_D-P map' for simplicity.

We combined the two D versus P maps into a single medium-density map. However, this operation led sometimes to distortion, exclusion of some markers and elongation of the linkage groups. In addition, only 108 individuals were common to both datasets. Therefore, to take the most of both maps, we decided to keep them for further QTL analyses. Lastly, the third map, monitoring Zephyr heterozygosity, was based on the SNP having a specific nucleotide for one of the two alleles of Z, the nucleotides from the other alleles (the one from D, both from S and the second of Z) being all similar. The map developed on 111 individuals included 117 independent SNP markers, covered 389 cM with a density of 3.32 cM between markers, hereinafter referred to as 'SNP_Z'. Linkage group 2 was almost missing possibly due to very high homozygosity of Zephyr.

The improvement of the SSR_D-P map, and the construction of the two SNP maps were performed with JoinMap 4.1 software (Van Ooijen 2011). The deviations from a Mendelian ratio were tested using the Chi-square-goodness of fit test ($p<0.05$). Linkage groups were established using a minimum 3.0 logarithm of odds (LOD) and maximum recombination frequency of 0.45. Map construction was performed using the multipoint maximum likelihood based algorithm.

Comparison of the position of the SNPs in the physical and genetic map

The set of markers mapped in each linkage group for the three maps used in this study were aligned with their position in the physical map derived from "peach v1.0" genome to evaluate the colinearity among the linkage and physical maps, using an home-made excel macro.

QTL analysis

The two datasets (observed and rescaled) were used for the QTL detection of the 19 traits studied at the six sampling dates and the six rescaled values and that for the three genetic maps. Due to the presence of particular genotype with low fructose-to-glucose ratio in the studied progeny, three distinct QTL analyses were done: based on all genotypes, based only on 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes and based only on 'low-fructose-to-glucose' genotypes. See Table 4.2 for the number of genotypes used for all analyses.

Among the 684 datasets studied (19 traits, 6 stages, 2 treatments: observed or rescaled, 3 genotypes sets), 198 followed a normal distribution, 366 were transformed to follow a normal distribution and 120 others could not be transformed in order to follow a normal distribution. Concerning the latter datasets, a nonparametric method was used for the QTL detection based on the method described by Kruglyak and Lander (1995) using R software (R Development Core Team 2006, 'qtl' library). For the datasets that follow a normal distribution, QTL detection was performed by marker regression method (Soller *et al.* 1976). Considering the particular origin of the BC2 progeny, the analysis was performed only at the genetic markers (no interval mapping), and individuals with missing genotypes were discarded.

A physical map was built including all the SSR and SNP markers, used in the three above mentioned genetic maps, whose positions on the physical map of the genome were known. The BioMercator software (V4.2) was used to make links between the three genetic maps and this physical map and QTL detected on SSR_D-P, SNP_D-P and SNP_Z maps were projected together on the physical map. For a given trait, QTL were detected in the same region with the different datasets (observed or rescaled data, all genotypes or only 'standard' or 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, the six different sampling dates) and maps (SSR_D-P,SNP_D-P and SNP_Z). These QTL were compiled into a single one per trait (synthetic QTL) and the smallest common region between QTL for the same trait was kept to define the associated confidence interval.

Table 4.2 Number of genotypes used for QTL detection performed on the three maps and for the three analyses concerning particular genotypes.

Map	All genotypes	'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes	'low-fructose-to-glucose' genotypes
SSR_D-P	102	77	25
SNP_D-P	92	64	28
SNP_Z	90	-	-

Candidate genes identification

From the functional annotation of the *Prunus persicae* V1.0 genome (www.rosaceae.org) a systematic search was conducted in order to compile on the physical map the location of all genes coding for enzymes or transporter directly linked to sugar metabolism. Candidate gene description was reported on additional table 2. A co-location was declared between a QTL and a candidate gene when the latter was located in the confidence interval of the synthetic QTL.

Map figures were generated using MapChart 2.2 software (Voorrips 2002).

Results

Contribution of the different maps analyzed

The study presented here was based on three genetic maps, exploring different polymorphism or built with different markers. Half of the QTL detected with the two maps based on the D-P polymorphism are common (Figure 4.1a). A larger number of QTL was detected with the map SSR_D-P (69) than SNP_D-P (55), probably due to the largest number of individuals used for this analysis (Table 4.2) and to the marker repartition along the genome. Expectedly, a lower number of QTL (22) was detected from the SNP-Z map as a result of the lower polymorphism present in Z compared to the polymorphism between D and P. Chromosome 4 alone accounts for half of the QTL detected on the SNP_Z map; it arises therefore as a hot spot of Z polymorphism. Four of these QTL were also detected on D-P map.

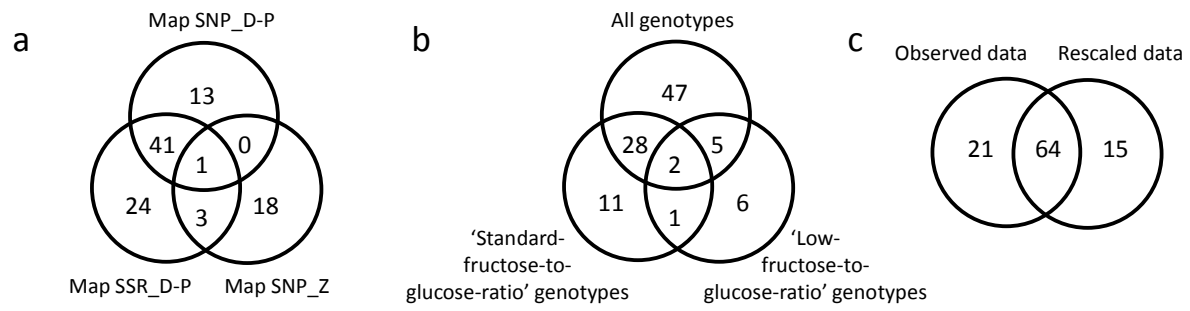


Figure 4.1 Venn diagrams of the repartition of the 100 QTL detected according to the map where they were detected (a), the subset of genotypes (b) and the dataset observed or rescaled (c).

Different subsets of genotypes according to the fructose

The most remarkable feature of the progeny studied is the presence of nearly a quarter of individuals with a very low concentration of fructose compared to glucose with a fructose to glucose ratio lower than 0.1 (Desnoues et al. 2014). Due to dominance effect, such extreme feature can hide several QTL. Therefore three separate analyses were performed: i) based on all genotypes, ii) including only the genotypes with a fructose to glucose ratio higher than 0.1 at maturity ('standard-fructose-to-glucose-ratio') and iii) on the subset of genotypes with the ratio lower than 0.1 at maturity ('low-fructose-to-glucose-ratio'). The number of genotypes in each dataset is reported in Table 4.2. Due to the low number of genotypes present in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' subset,

a small number of QTL were detected (Figure 4.1b). However, it is worth noting that six of them were not revealed with other data sets. Eleven new QTL were detected specifically with the 'standard-fructose-to-glucose-ratio' subset. These specific QTL spread over the entire genome were not only linked to fructose (4 new QTL) or glucose (1 new QTL) but also involved in the whole metabolism. Only two QTL were detected regardless of the genotype dataset used: a Glu QTL at the bottom of chromosome 5 and a FW QTL on chromosome 6.

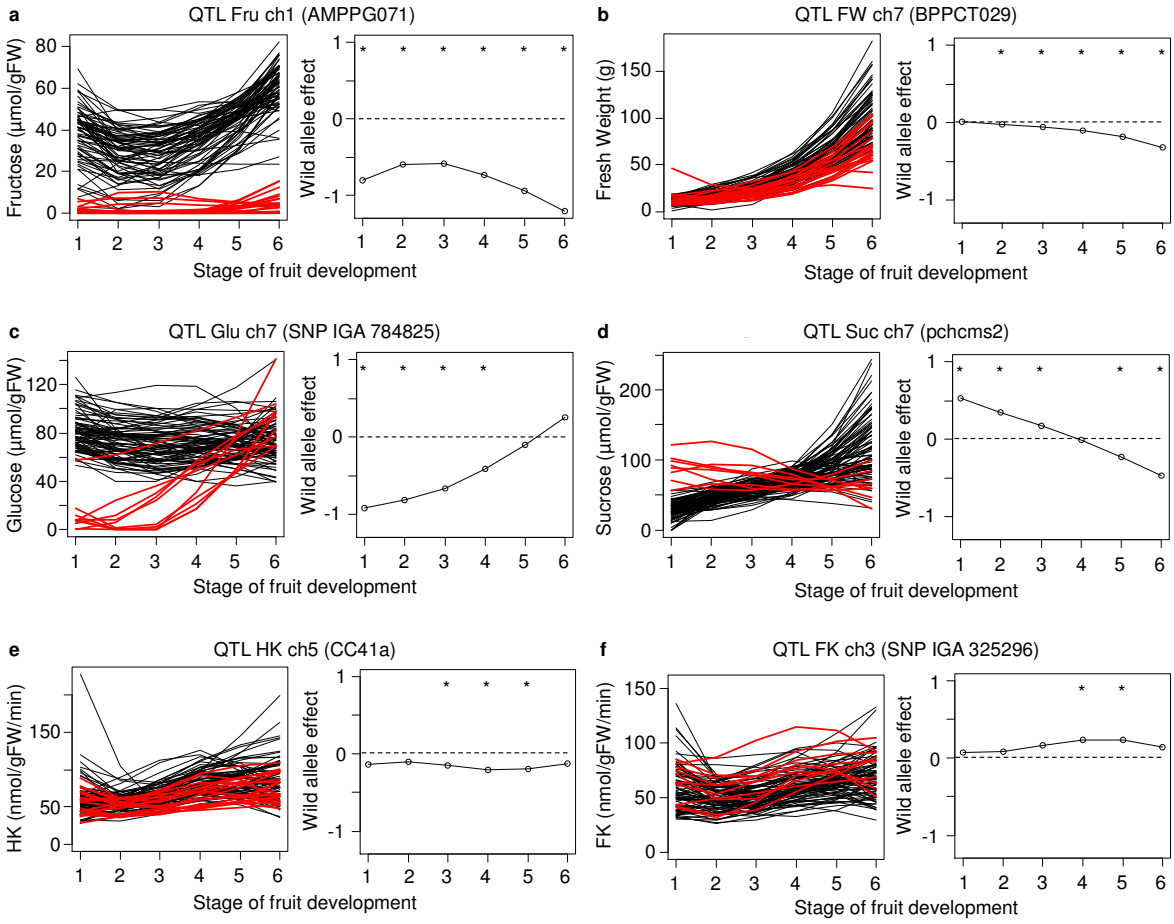


Figure 4.2 Evolution of the wild allele effect along fruit development. For the six QTL represented (a to f), the QTL name, chromosome (ch) and closest marker are specified and two panels plotted. On the left one value of traits are plotted for all genotypes along fruit development, genotypes with the wild allele at the specified marker are in red. On the right panel the wild allele effect is represented as a proportion of trait variation. Stars specify the stage at which the QTL is significant. Abbreviations: fructokinase (FK), fructose (Fru), fresh weight (FW), glucose (Glu), hexokinase (HK), sucrose (Suc).

Division of fruit growth duration in stages

Because of the persistent difficulties to identify identical physiological stages along fruit development for stone fruit in general and in particular when large genetic variability is studied, fruit growth duration is usually simply divided into equal periods. However in the progeny studied, the duration of fruit development is highly variable depending on the genotypes and the forecast of maturity date is somewhat hazardous, resulting in marked time lags between successive sampling dates. To tackle this difficulty, a rescaled dataset (Res) has been calculated from the observed dataset (Obs) on the basis of % of fruit development duration (ie Materials and methods section). QTL researches were mapped independently on the two data sets: observed (Obs) and rescaled (Res). The majority of the QTL detected were common to the two datasets (Figure 4.1 c). But, each of the two datasets provides an important number of specific QTL. These specific QTL corresponded to almost all traits and they were distributed along all the genome. In some cases, rescaling the stages resulted in mismatches of the stage number at which QTL were detected with Obs and Res datasets. This is hardly visible when the QTL is detected at several stages but seven QTL displayed a change of the stage depending on the dataset (Additional Table 4.3).

QTL stability during the fruit development

The D allele effect changes along fruit development and in a different way according to QTL. Some examples are shown in Figure 4.2. The QTL represented in figure 2a displayed a strong negative effect on the fructose concentration and that throughout the fruit development. This QTL controls fructose-to-glucose ratio and corresponds to the QTL FRU published by Quilot *et al.* (2004b). In contradiction with this stability, the D allele at the QTL of FW shown in Figure 2b had no effect at the 1st stage but then displayed a negative effect that increased with fruit development. Some QTL had an important effect on the time course shape of traits studied as shown in Figure 4.2c and Figure 4.2d, with a shift from positive to negative effects or vice-versa, of the allele D during the development.

Since the effect of an allele was not constant throughout the development, the QTL were not detected at all stages. Only one QTL was detected at the six developmental stages (Figure 4.3b), it corresponded to the above mentioned Fru QTL on chromosome 1 (Figure 4.2a). Otherwise in about half the cases (47%), QTL were detected only for a single stage (Figure 4.3b). The number of QTL detected for each stage was between 28 and 42 with higher number for stages 2 and 5 (Figure 4.3a). At each stage, there are different QTL which are detected specifically at this given stage (Figure4.3a).

Panels e and f of the Figure 4.2 illustrate QTL with negative and positive effect respectively at only a few stages of development.

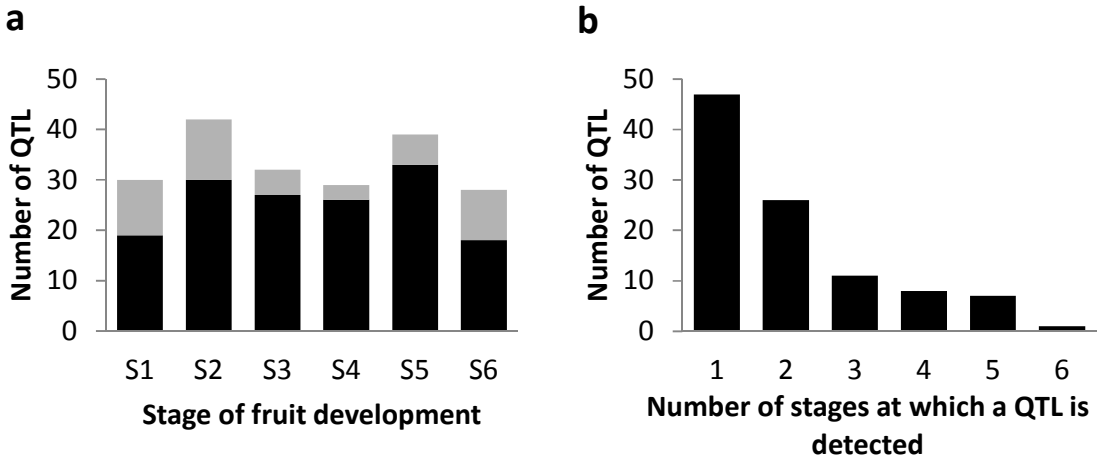


Figure 4.3 Number of QTL detected at each of six sampling dates or rescaled values (a) and number of QTL detected simultaneously at different stages of fruit development (b). The QTL specific of a single stage are represented on grey on the panel a. The QTL in black were detected at other stages.

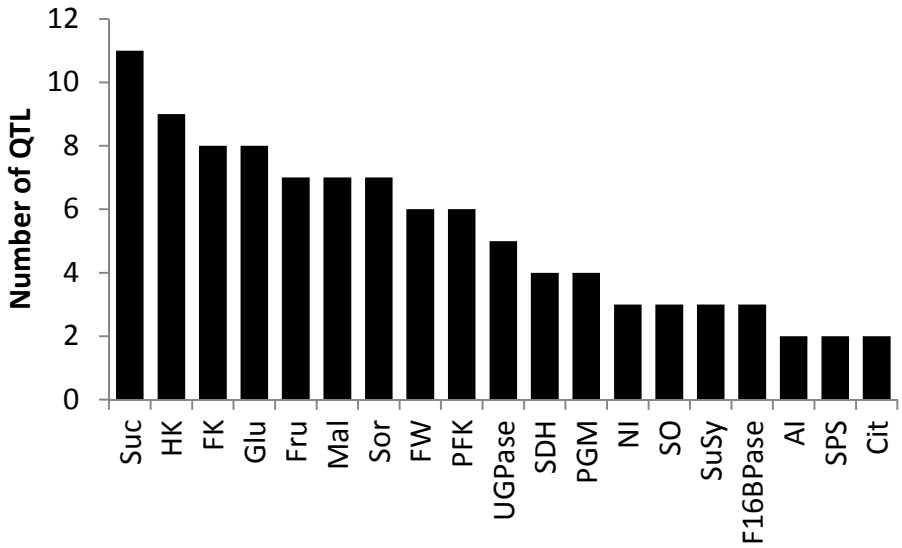


Figure 4.4 Number of QTL detected for all the 19 traits. Abbreviations: acid invertase (AI), citrate (Cit), fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase), fructokinase (FK), fructose (Fru), fresh weight (FW), glucose (Glu), hexokinase (HK), malate (Mal), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), phosphoglucomutase (PGM), sorbitol dehydrogenase (SDH), sorbitol oxidase (SO), sucrose phosphate synthase (SPS), sorbitol (Sor), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase).

QTL location

Several QTL were detected for all the 19 traits studied with at least two QTL identified in distinct regions (Figure 4.4). This was the case for AI, SPS and Cit. The maximum number of QTL detected for a single trait was 11, achieved for Suc. Sucrose is the main sugar in peach and displayed a great phenotypic variability in the progeny (Figure 4.2d). Interestingly, a large number of QTL for enzyme (HK and FK notably) were detected, that suggested a complex genetic determinism of enzymatic capacities.

The 100 QTL detected in this analysis were distributed over the entire genome (Figure 4.5 and Table 4.3 for an overview). The chromosome 4 harbored the highest number of QTL (18), more than half of them linked to Z polymorphism. In addition to this hot spot, several clusters of QTL emerged from this analysis. On the chromosomes 1 and 7, the clusters included QTL of the four sugars together with other traits. The largest cluster including 9 traits was located on the chromosome 6. Remarkably, 8 of 9 QTL related to acid and 4 of 6 QTL controlling FW co-localized with QTL controlling at least one sugar.

Functional co-location between QTL and between QTL and candidates genes

Nine QTL linked to sugar concentration co-localized with QTL of an enzyme catalyzing the synthesis or degradation of the specific sugar. Some cases are outstanding: on chromosome 1 the Suc QTL with a positive effect of the allele D co-localized with a QTL of NI (catalyzes Suc degradation) with a negative effect of the allele D; on chromosome 6, a Suc QTL co-localize with a SuSy QTL and a Glu QTL co-localize with a HK QTL each time with an opposite effect of the allele D for the enzyme and their substrate. Finally, on chromosome 4 HK and Glu QTL were identified from Z polymorphism at the stages 5 and 6 as well as Fru, FK and AI QTL. In most cases the co-locations occur between a sugar and an enzyme catalyzing its hydrolysis, offering functional hypotheses to explain the phenotypic variability observed.

To go further in the functional analysis of the QTL, 96 candidate genes were identified from their functional annotation as enzymes related to sugar metabolism or sugar transport. Six QTL controlling enzyme capacities co-localized with a gene coding for the same enzyme (Table 4.4), which made them good candidate genes for both positional and functional aspects. Added to this, there were 12 QTL of sugars that co-localized directly with genes of enzymes involved in their synthesis or degradation. At last, two QTL of enzyme and two of sugar co-localized with enzyme inhibitor genes (Table 4.4).

Figure 4.5 Location on the physical map of the QTL related to the 19 traits studied. Abbreviations: acid invertase (AI), citrate (Cit), fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase), fructokinase (FK), fructose (Fru), fresh weight (FW), glucose (Glu), hexokinase (HK), malate (Mal), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), phosphoglucomutase (PGM), sorbitol dehydrogenase (SDH), sorbitol oxidase (SO), sucrose phosphate synthase (SPS), sorbitol (Sor), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase). The numbers following the trait names refer to the stages at which the QTL was detected. The sign in parentheses refers to the D allele effect on the trait in case of QTL detected on the D-P maps. Z in parentheses means the QTL was detected on SNP-Z map. Symbols correspond to the subset of genotypes on which the QTL was detected: ~, all genotypes; †, 'standard-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, §, 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes. O and R correspond to QTL detected only with observed and rescaled datasets respectively.

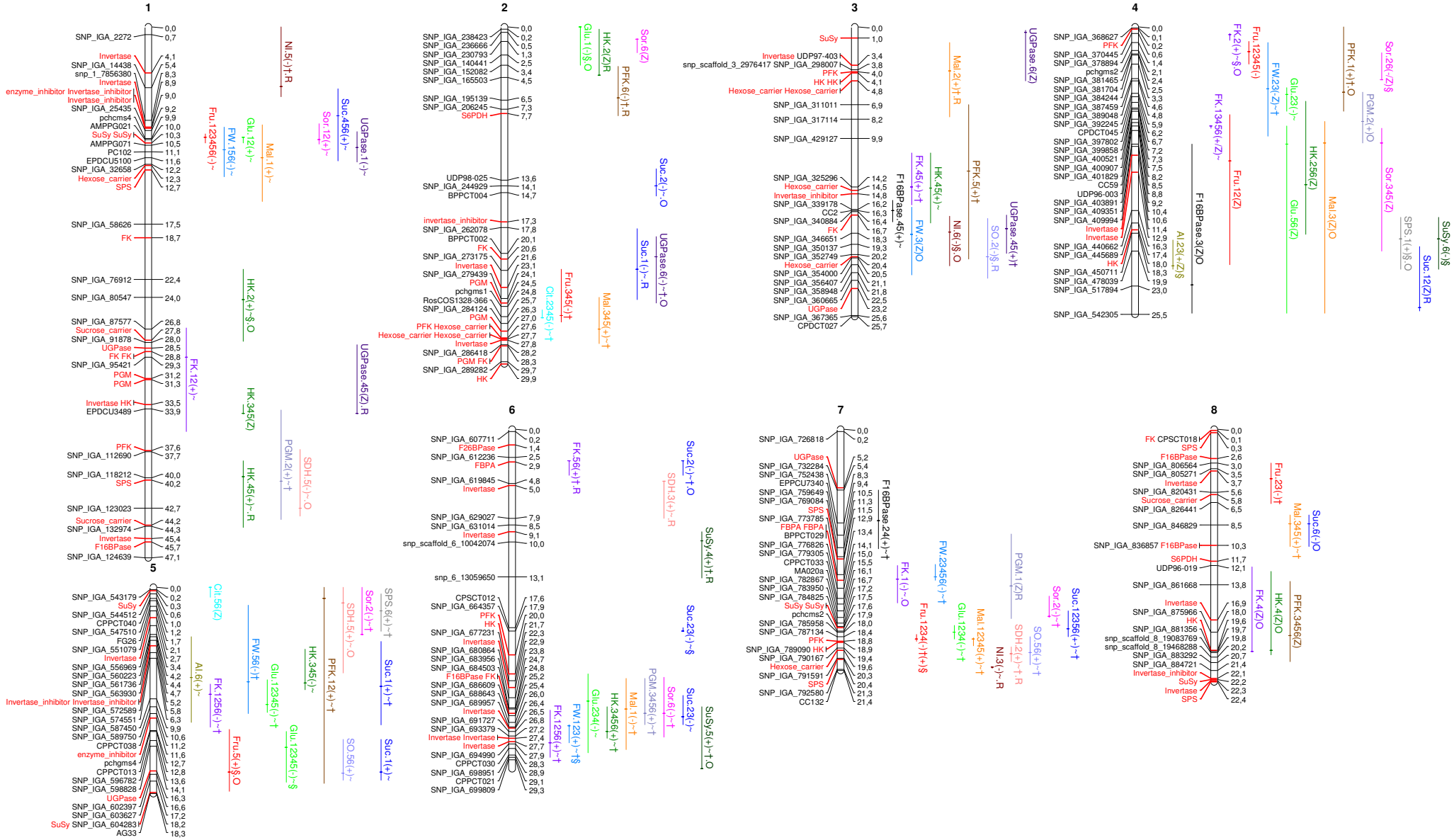

1
2
3
4
5
6
7
8

Table 4.3 QTL description

Trait	Ch	Stages	Wild allele effect (Dav)	Dataset	Map	Subset of genotype
FK	1	12	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Fru	1	123456	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
FW	1	156	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Glu	1	12	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
HK	1	345	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
HK	1	45	+	Res	SSR Dav vs Sg	all
HK	1	2	+	Obs	SSR Dav vs Sg	Low F:G
Mal	1	1	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
NI	1	5	-	Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
PGM	1	2	+	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all / Standard F:G
SDH	1	5	-	Obs	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Sor	1	12	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Suc	1	456	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
UGPase	1	45	Ze	Res	SNP_Z	all
UGPase	1	1	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Cit	2	2345	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
PFK	2	5	-	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
Fru	2	345	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	Standard F:G
Glu	2	1	-	Obs	SNP_D-P	Low F:G
HK	2	2	Ze	Res	SNP_Z	all
Mal	2	345	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
PFK	2	6	-	Res	SNP_D-P	Standard F:G
Sor	2	6	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Suc	2	1	-	Res	SNP_D-P	all
Suc	2	2	-	Obs	SSR Dav vs Sg	all
UGPase	2	6	-	Obs	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
F16BPase	3	45	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all

Table 4.3 QTL description (suite)

Trait	Ch	Stages	Wild allele effect (Dav)	Dataset	Map	Subset of genotype
FK	3	45	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
FW	3	3	Ze	Obs	SNP_Z	all
HK	3	45	+	Obs / Res	SNP_D-P	all
Mal	3	2	+	Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
NI	3	6	-	Obs	SSR Dav vs Sg	Low F:G
PFK	3	5	+	Obs / Res	SNP_D-P	Standard F:G
SO	3	2	-	Res	SSR Dav vs Sg	Low F:G
UGPase	3	6	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
UGPase	3	45	+	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
AI	4	23	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_Z	Low F:G
F16BPase	4	3	Ze	Obs	SNP_Z	all
FK	4	2	+	Obs	SSR Dav vs Sg	all / Low F:G
FK	4	123456	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_Z	all / Standard F:G
Fru	4	12	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Fru	4	12345	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
FW	4	23	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P/ SNP_Z	all / Standard F:G
Glu	4	56	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Glu	4	23	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
HK	4	256	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Mal	4	3	Ze	Obs	SNP_Z	all
PFK	4	1	+	Obs	SNP_D-P	Standard F:G
PGM	4	2	+	Obs	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Sor	4	345	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Sor	4	26	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_Z	all / Low F:G
SPS	4	1	+	Obs	SSR Dav vs Sg	Low F:G
Suc	4	12	Ze	Res	SNP_Z	all
SuSy	4	6	-	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	Low F:G

Table 4.3 QTL description (suite)

Trait	Ch	Stages	Wild allele effect (Dav)	Dataset	Map	Subset of genotype
AI	5	6	+	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all
Cit	5	56	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
FK	5	1256	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G / Low F:G
Fru	5	5	+	Obs	SSR Dav vs Sg	Low F:G
FW	5	56	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	Standard F:G
Glu	5	12345	-	Obs / Res	SNP_D-P	all / Standard F:G / Low F:G
Glu	5	12345	-	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all / Standard F:G
HK	5	345	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
PFK	5	12	+	Obs / Res	SNP_D-P	all / Standard F:G
SDH	5	5	+	Obs	SSR Dav vs Sg	all
SO	5	56	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Sor	5	2	-	Obs / Res	SNP_D-P	all
SPS	5	6	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Suc	5	1	+	Obs / Res	SNP_D-P	all / Standard F:G
Suc	5	1	+	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all / Standard F:G
FK	6	56	+	Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
FK	6	1256	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
FW	6	123	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G / Low F:G
Glu	6	234	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
HK	6	3456	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Mal	6	1	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
PGM	6	3456	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
SDH	6	3	+	Res	SNP_D-P	all
Sor	6	6	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Suc	6	23	-	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all
Suc	6	2	-	Obs	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
Suc	6	23	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G

Table 4.3 QTL description (suite)

Trait	Ch	Stages	Wild allele effect (Dav)	Dataset	Map	Subset of genotype
SuSy	6	4	+	Res	SNP_D-P	Standard F:G
SuSy	6	5	+	Obs	SSR Dav vs Sg	all / Standard F:G
F16BPase	7	24	+	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	all / Standard F:G
FK	7	1	-	Obs	SSR_D-P/ SNP_D-P	all
Fru	7	1234	- / +	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	Standard F:G/ Low F:G
FW	7	23456	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Glu	7	1234	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Mal	7	12345	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
NI	7	3	-	Res	SSR Dav vs Sg	all
PGM	7	1	Ze	Res	SNP_Z	all
SDH	7	2	+	Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
SO	7	56	+	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Sor	7	2	-	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
Suc	7	12356	+++ --	Obs / Res	SSR_D-P/ SNP_D-P	all / Standard F:G
FK	8	4		Obs	SNP_Z	all
Fru	8	23	-	Obs / Res	SSR Dav vs Sg	Standard F:G
HK	8	4	Ze	Obs	SNP_Z	all
Mal	8	345	+	Obs / Res	SNP_D-P	all / Standard F:G
PFK	8	3456	Ze	Obs / Res	SNP_Z	all
Suc	8	6	-	Obs	SNP_D-P	all

Table 4.4 Co-location between QTL and candidate genes. Abbreviations: acid invertase (AI), candidate genes (CG), chromosome (Ch), fructokinase (FK), fructose (Fru), glucose (Glu), hexokinase (HK), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy).

QTL	Ch	CG
FK	1	FK (ppa003690m; ppa004931m)
NI	1	Invertase (ppa014917m)
HK	1	HK (ppa004715m; ppa005019m)
PFK	4	PFK (ppa004167m)
FK	6	FK (ppa004431m)
HK	8	HK (ppa015470m)
Suc	1	Invertase (ppa002847m); Invertase inhibitor (ppa011560m; ppa012287m); enzyme inhibitor (ppa012287m); SuSy (ppa001845m; ppa001573m)
Fru	1	SuSy (ppa001845m; ppa001573m)
Suc	2	Invertase (ppa002149m)
Fru	2	Invertase (ppa002149m)
Fru	4	Invertase (ppa004112m; ppa018196m)
Glu	4	Invertase (ppa004112m; ppa018196m); HK (ppa004471m)
AI	5	Invertase inhibitor (ppa023516m; ppa012101m); Enzyme inhibitor (ppa026908m)
Suc	5	Invertase inhibitor (ppa023516m; ppa012101m); Enzyme inhibitor (ppa026908m)
PFK	5	Enzyme inhibitor (ppa026908m)
Fru	5	SuSy (ppa001135m)
Glu	6	Invertase (ppa019684m; ppb023165m; ppa024038m; ppa002385m; ppb022806m)
Suc	6	Invertase (ppb023165m)
Glu	7	HK (ppa004637m)
Suc	7	SuSy (ppa001535m; ppa001537m)
Fru	8	Invertase (ppa019284m)

Discussion

Identification of loci governing fruit sugar metabolism

This study provides an almost complete overview of sugar metabolism along peach development. The QTL detected explain a total of 5.3% to 86.6% of trait variability, depending on the traits, stages and analysis types (Additional Figure 4.2).

The repartition of the QTL detected revealed that sugar concentrations and enzyme capacities are under the control of several loci distributed among the eight chromosomes. This is in line with results from the few studies that aimed at detecting sugar QTL on peach fruit at maturity only. Fru QTL were found on all chromosomes, Glu on chromosomes 1, 2, 4, 5, 7, 8, Sor on chromosomes 2, 4, 5, 6 and Suc on chromosomes 3, 5, 6, 7 (Sosinski *et al.* 1998; Dirlewanger *et al.* 1999a; Etienne *et al.* 2002b; Quilot *et al.* 2004b). Our data complete this picture with additional QTL that have never been reported before. Thus, it reveals the presence of a Glu QTL on chromosome 6, Sor QTL on chromosomes 1 and 7 and Suc QTL on chromosomes 1, 2, 4 and 8 with only Suc QTL on chromosome 1 and 8 detectable at maturity. All these studies, except the one of Sosinski *et al.* (1998), found a Fru QTL on chromosome 4. In our study, a Fru QTL was detected based on D-P polymorphism. Due to the presence of QTL with high effect on chromosome 1 (28 to 85%), the QTL on chromosome 4 only explained 1.3 to 3% of the fructose variability (depending on stage and analysis type). Another Fru QTL on chromosome 4 was also detected based on Z polymorphism and explained 13 to 14.8% of fructose variability.

In addition, we detected QTL on the Z map, despite the low polymorphism of this variety. Z is a variety of nectarine with a very high gustative level relying mostly on high sugar concentrations. As observed by Quilot *et al.* (2004b), the chromosome 4 displays many QTL at maturity coming from Z, among which Glu QTL and Sor QTL. A Sor QTL and a Cit QTL were also detected at maturity on chromosomes 2 and 5, respectively. This data uncovered interesting alleles from Z for breeding aims. Indeed, considering the high level of sugars of Z fruits, one might have expected that best alleles were fixed in the Z genome. Therefore, genetic progress may still be possible in case of additive effects by doubling best alleles at the QTL.

Despite the large number of QTL detected, 6 QTL detected by Quilot *et al.* (2004b) at maturity were not detected in the present study (Suc ch3; Mal ch5; Cit ch 1 and 4; Glu ch 2 and 5) whereas the same progeny was studied. However these QTL (except Mal) were detected only one year out of the two years studied by Quilot *et al.* (2004b) suggesting a low stability of these QTL through years. Concerning the 20 QTL detected in both analyses ((Quilot *et al.* 2004b) and on the

present study), only 5 were detected at maturity in the present study: Fru and FW QTL on chromosome 1, Glu QTL on chromosome 4 and FW and Suc QTL on chromosome 7. This suggests an irregular pattern of these QTL along fruit development from one year to the other.

Several QTL were detected for all traits studied namely sugar and acid concentrations, FW and enzyme capacities for the different stages of fruit development. Even though a large number of QTL were detected, this study highlights three shortcomings that deserve special attention when performing a QTL analysis. The first one concerns the accuracy and precision of phenotyping data. Remarkably in our study, more QTL were detected for traits which displayed high homogeneity between biological and technical repetitions (ie. Suc, Glu, Fru, HK, FK). For some enzymes and citrate, the variability observed between technical replicates may explain the low number of QTL detected. This supports the importance of developing high quality robot-based phenotyping platforms (Gibon *et al.* 2004a).

Besides technical difficulties to assess trait values, a second difficulty may come from complex traits resulting from different processes affected by environmental factors. FW is exhibiting a high within-tree variability which results from multiple interactions and trade-off acting at different scales in the plant. This resulted in a relatively low number of QTL uncovered for FW, despite large variations of mean FW within the progeny. Although substantial precautions have been taken to place all fruits in conditions of potential growth (heavy fruit thinning), still within-tree variability remained. This may be due i) to dissimilar fruit sink strengths determined by the number of cells of each fruit settled in the early phase of growth (before thinning) and ii) to the micro-environment of each fruit within the tree. Since methods to detect QTL are based on an average value by genotype, this variability may only be taken into account by recording specific descriptors of this variability. An alternative way to proceed is to go further inside the processes and decipher the component traits that mainly cause the variability. Such dissection of complex traits into elementary physiological processes may be achieved through ecophysiological approaches or process-based modeling that provide adequate frameworks. For instance, QTL for tomato fruit size was further linked to cell division (Bertin *et al.* 2003), and process-based models at the organ level have been successfully used to study the co-locations of QTL for model parameters and for organ traits (Quilot *et al.* 2005; Tardieu *et al.* 2005) .

The third major issue rise by this study has to do with sampling, and namely with the difficulty of identifying stages of development of peach fruit that were biologically identical between genotypes. Indeed, analyzes performed with the observed data and with the rescaled data resulted not only in many common QTL, but also in specific QTL. Neither of the two data sets appeared better than the other one. This difficulty may be exacerbated by the large variability in development times observed in the progeny. Considering the FW evolution along growth or the kinetics of concentration

of any other metabolites, no precise indicator of switch from one stage to the next one could be defined. As a result, the analysis of both datasets separately allowed to support common QTL and to detect QTL more sensitive to the developmental stage adjustment among genotypes.

Identification of functional and positional candidate genes

The identification of functional genes based on their automated annotation (The International Peach Genome Initiative 2013) and the comparison of their location with QTL loci allowed the identification of candidate genes which could be responsible for variations of sugar metabolism. Different cases of co-locations for gene, enzymatic capacitiy and metabolite concentrations QTL were observed.

Genes coding for enzymes were found to co-localize with QTL of capacity of the same enzymes and became interesting candidate genes to explain the variation of these enzyme capacities (Causse et al. 1994; Thévenot et al. 2005). Enzyme capacities depend on the number of molecules of enzyme synthesized which is linked to the transcript levels of their encoding structural genes. The level of transcription of a gene is regulated by gene expression that involves both cis-regulator elements nearby the gene and trans acting factors, usually proteins that bind to the cis-acting sequences to control gene expression. In case of cis-regulation, co-location between the structural gene and QTL of enzyme capacity may be observed (Keurentjes et al. 2008).

In contrast, variations in trans-regulation result in co-location of QTL of enzyme capacity with genes coding for regulation proteins. However, such genes are still poorly studied at the genetic level, so few genes are annotated as such on the Peach genome, except some enzyme inhibitors, especially invertase inhibitors.

Another type of cases observed is the co-location between a structural gene and a QTL of the related sugar but no QTL of capacity of the corresponding enzyme. This particular situation may be explained by the role of the level of affinity of an enzyme in the production of the metabolite. Enzyme affinity for a substrate, given by the Michaelis constant (Km), is linked to the conformation of the protein that results from the gene sequence coding the enzyme but also from allosteric regulation. For instance, allosteric inhibitors induce a conformational modification that changes the shape of the active site and reduces the affinity of the enzyme for its substrate. Affinity, which expresses the efficiency of one enzyme molecule, has nothing to do with capacity that was measured in our study. Long and fastidious experiments are needed to measure Km and phenotyping Km in a progeny sounds unrealistic. In our study, Fru QTL observed on chromosomes 1, 2, 5, 8 co-located with genes coding for SuSy and invertase. These may correspond to cases of DNA polymorphism of the structural gene. In case of allosteric regulation, the sugar QTL may co-locate with genes coding

for regulators or other enzymes controlling (de)phosphorylation. Unfortunately, most of these genes may have unknown function in the peach annotation. These cases may correspond to the QTL of sugar for which no candidate genes were recorded.

Finally, most of the annotated genes involved in sugar metabolism did not co-localize with QTL. This can be explained by a lack of polymorphism in the progeny or a lack of power of QTL detection (insufficient precision of measurements discussed below, number of individuals studied). However, it can also come from the fact that variations of enzyme capacities are generally slight compared to variations of metabolites. Biais *et al.* (2014) and Desnoues *et al.* (2014) highlighted recently the low variations of enzymatic capacities under contrasting environment and genetic variability.

Changing effect of alleles along fruit development revealed by dynamic QTL

This study marks the first time that dynamic QTL for sugar metabolism have been detected in peach. Different studies have looked for dynamic QTL during seed or fruit development in other species before (Thévenot *et al.* 2005; Costa *et al.* 2010; Han *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2013b). They all revealed that different QTL were detected depending on time and indicated that differential gene expression may be involved. In the same way, in the present study only one QTL was present at the six developmental stages studied. This QTL present on the chromosome 1 corresponds to the locus FRU detected by Quilot *et al.* (2004b) at maturity. Except this locus, only 15% of QTL were detected at 4 stages or more. Remarkably, these QTL were not randomly distributed along the genome: half of them were located on the two clusters on chromosomes 6 and 7. This highlighted the importance of these two genomic regions for sugar metabolism during the whole fruit development.

The variability of QTL detection on developmental stages comes mainly from the fact that the D allele effect is not stable during fruit development. Indeed for some QTL it changes drastically. For example the Suc QTL on chromosome 7 exhibits a switch of the D allele effect from significantly positive (stages 1, 2 and 3) to significantly negative (stages 5 and 6) (Figure 4.2d). Interestingly this QTL co-localizes with a Glu QTL that presents inverse trend of the D allele effect (Figure 4.2c) but no Glu QTL was detected at maturity. These two QTL may be the result of the same gene with an opposite effect on Suc and Glu and which may present a switch of its expression in the middle of fruit growth. The SuSy genes which catalyze sucrose hydrolyze into fructose and glucose, present in the region of this QTL would be good functional candidate genes. Further study is needed to confirm this assumption and identify the functional gene underlying these QTL.

Prunus davidiana alleles display changing effects along growth that might impair their use in breeding

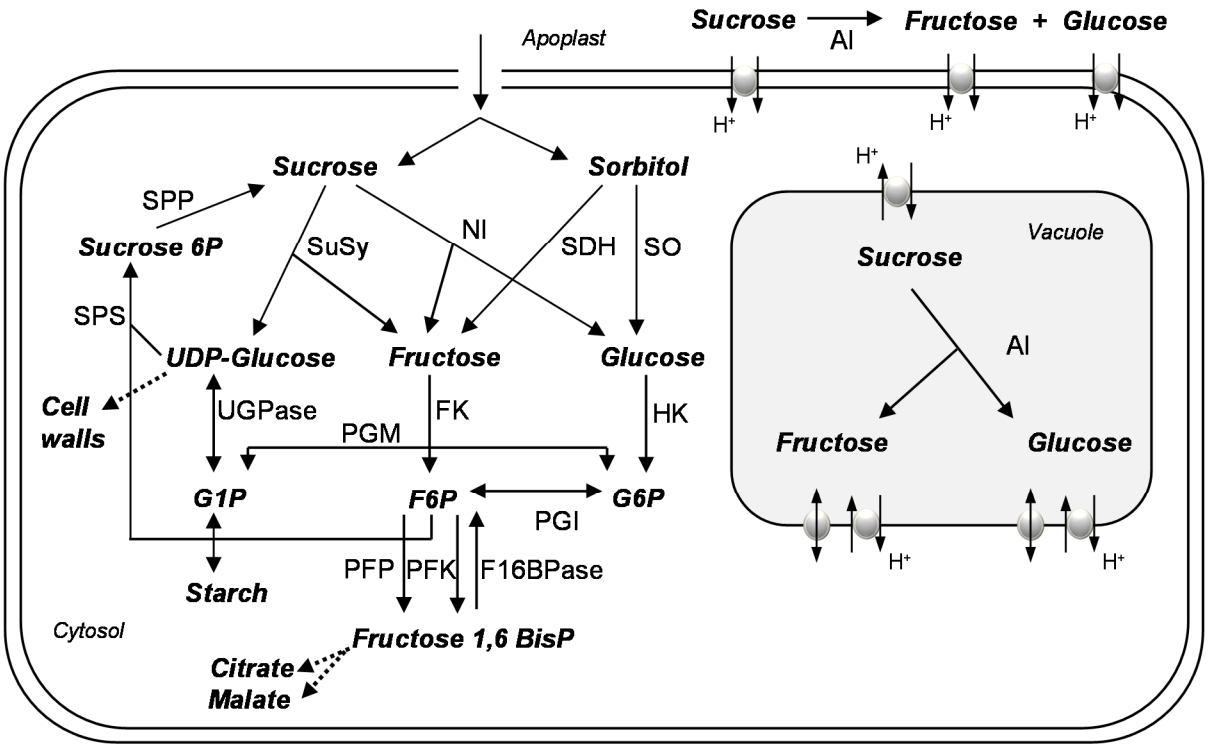
From the perspective of breeding, D was used as a source of resistance to pests and diseases but present very low agronomical attributes (Moing *et al.* 2003). We found that the effect of D allele is negative in most cases for metabolite concentrations and FW and positive for enzyme capacities whatever the developmental stages (Additional Table 4.3). Interestingly Quilot *et al.* (2004b) reported positive effects of the D allele at QTL on chromosomes 2, 4, 5 and 7 on glucose concentration at maturity. Here we reported negative effects at same loci during fruit development but no Glu QTL was detected at maturity. The effect curves at these loci display negative effects at early stages which become non significant and sometimes reverse towards positive values along growth, without reaching significant levels at maturity. An extra harvest of the fruits few days later may have enabled uncovering a positive effect. This is not without impact for breeding perspectives. Indeed, the positive desired effect of an allele may become negative depending on climatic conditions or harvest date. Moreover, the Glu QTL on chromosome 7 co-localizes with a Suc QTL for which D allele presents a negative effect at maturity. So, given this particularity and its low sweetness (0.75 compared to sucrose (Pangborn 1963)), the Glu QTL on chromosome 7 detected by Quilot *et al.* (2004b) may not be relevant for peach fruit quality improvement.

This particular case opens the door to a series of questions of interest for breeding. Indeed the particular feature relating to reverse effects along growth, uncovered in this study, is not specific to the wild species P. davidiana, since a similar pattern was found with Z polymorphism for Glu QTL on chromosome 4. To our knowledge, no other examples are available in the literature, and further studies are needed to identify the mechanisms responsible for these reversions. In this way it may be envisaged to move forwards the reversion to get stable effect within a time slot around maturity harvest. Study of gene expression along growth would probably help deciphering the mechanisms controlling these features. In the same way, this discovery raises questions on the QTL effect after harvest and on the common strategy consisting in basing selection upon effects detected at maturity only. It will certainly be of high interest to include in breeding strategy the monitoring of QTL effect during the fruit development and post-harvest.

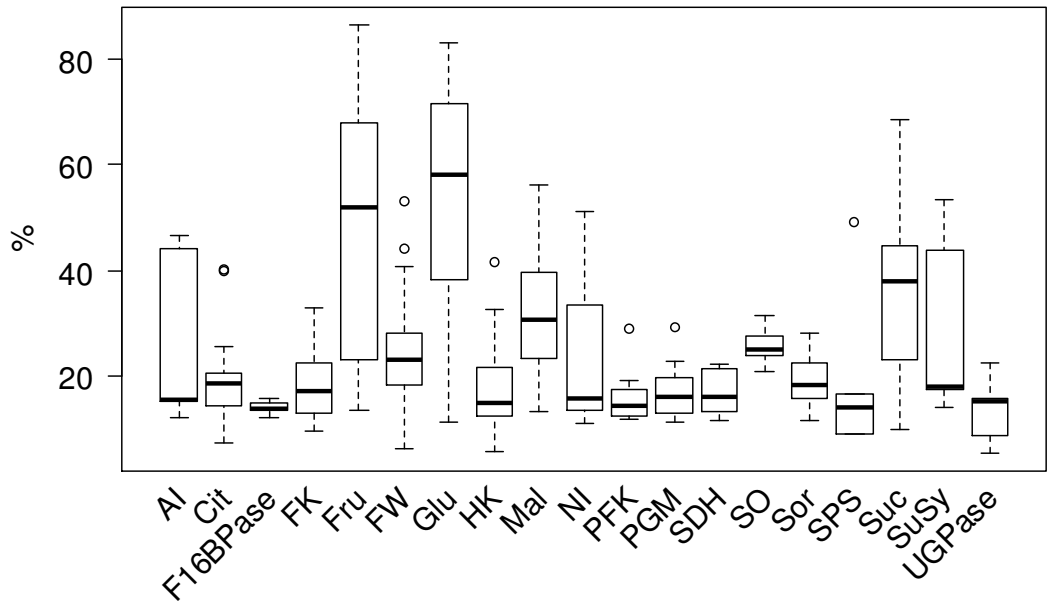
Conclusion

The present study gives a broad overview of the genetic control of the sugar metabolism during peach fruit development. QTL were detected for FW, metabolites and enzymes capacities at each developmental stages studied. Several co-locations were found between candidate genes, QTL of enzyme capacities and/or QTL of metabolites that lead to functional hypotheses. But more studies are needed to validate the candidate genes behind these QTL and uncover their function. Finally we demonstrated the non-stability of QTL effect along fruit development that can have major implications for fruit breeding.

Supplemental data



Additional Figure 4.1 Peach sugar metabolism. Abbreviations: acid invertase (AI), fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase), fructose-6-phosphate (F6P), fructokinase (FK), glucose-1-phosphate (G1P), glucose-6-phosphate (G6P), hexokinase (HK), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), phosphoglucose isomerase (PGI),phosphoglucomutase (PGM), sorbitol dehydrogenase (SDH), PPi-phosphofructokinase (PFP), sorbitol oxidase (SO), sucrose-phosphate phosphatase (SPP),sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase).



Additional Figure 4.2: Variation of the total percentage of trait variability explained by all QTL detected for a trait. For each trait, the different results come from the different analyses (observed or rescaled data, all genotypes or only 'standard' or 'low-fructose-to-glucose-ratio' genotypes, the six different sampling dates and the three maps). Abbreviations: acid invertase (AI), citrate (Cit), fructose-1,6-bisphosphatase (F16BPase), fructokinase (FK), fructose (Fru), fresh weight (FW), glucose (Glu), hexokinase (HK), malate (Mal), neutral invertase (NI), ATP-phosphofructokinase (PFK), phosphoglucomutase (PGM), sorbitol dehydrogenase (SDH), sorbitol oxidase (SO), sucrose phosphate synthase (SPS), sorbitol (Sor), sucrose (Suc), sucrose synthase (SuSy), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase).

Additional table 4.1: Polymorphic microsatellite markers developed in this study

Marker	Position in the peach v1.0 scaffold 1	Forward primer 5'> 3'	Reverse primer 5'> 3'
AMPPG021	9610870-9611109	TTTTCTATGGTCGGCTTTGG	AGCCTCCAAAAAGCAGTGTC
AMPPG071	10089914-10090099	TTTGGTTGTTGTCAAATAAATGC	AGGCGCCAGGAGAGAGCTA

Additional table 4.3 Number of QTL for which D allele has a negative or a positive effect of the 6 stages of fruit development.

	1		2		3		4		5		6		Total	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
FW	1	1	2	1	2	1	1	0	3	0	3	0	4	1
Metabolites	7	8	13	6	9	6	5	6	8	4	5	2	22	14
Enzymes	3	6	2	10	2	5	1	11	5	15	5	9	14	30

Additional Table 4.2 Candidates genes description

Gene	Ch	Transcript Start	Transcript Stop	ID	Description
ppa014917m	1	4119222	4120069	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa002847m	1	8484914	8488705	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa020400m	1	8590084	8590878	Invertase inhibitor	C/VIF1 (CELL WALL / VACUOLAR INHIBITOR OF FRUCTOSIDASE 1); enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectinesterase inhibitor
ppa011560m	1	8591918	8592766	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa012287m	1	8624789	8625422	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa001845m	1	9912782	9917014	SuSy	Sucrose synthase 2
ppa001573m	1	9918131	9923492	SuSy	Sucrose synthase 2
ppa020009m	1	11932661	11934856	Hexose carrier	MSS1; carbohydrate transmembrane transporter/ hexose:hydrogen symporter/ high-affinity hydrogen:glucose symporter/ sugar:hydrogen symporter
ppa000622m	1	12254827	12260723	SPS	Sucrose-phosphate synthase 2
ppa008494m	1	17794371	17797362	FK	Probable fructokinase-2
ppa003041m	1	26869476	26874565	Sucrose carrier	SUT2 (SUCROSE TRANSPORTER 2); carbohydrate transmembrane transporter/ sucrose transmembrane transporter/ sucrose:hydrogen symporter/ sugar:hydrogen symporter
ppa005045m	1	27617441	27620412	UGPase	UDP-glucose6-dehydrogenase
ppa003690m	1	27874370	27877220	FK	Fructokinase-2
ppa004931m	1	27875144	27877220	FK	Fructokinase-2
ppa002940m	1	30294608	30297121	PGM	Phosphomannomutase/phosphoglucomutase
ppa003354m	1	30380091	30385380	PGM	Phosphoglucomutase,cytoplasmic
ppa025225m	1	32563831	32565785	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase, putative
ppa004715m	1	32589942	32593010	HK	Hexokinase-2, chloroplastic
ppa005019m	1	32589942	32593010	HK	Hexokinase-2, chloroplastic
ppa004610m	1	36655745	36659287	PFK	6-phosphofructokinase 3
ppa000636m	1	39315271	39321798	SPS	Sucrose-phosphate synthase 1
ppb014724m	1	44027771	44029050	F16BPase	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic
ppa003670m	1	44345656	44350575	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa003670m	1	44345656	44350575	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase

Additional Table 4.2 Candidates genes description (suite)

Gene	Ch	Transcript Start	Transcript Stop	ID	Description
ppa004620m	1	45534556	45541954	Sucrose carrier	Sucrose transport protein SUC4
ppa004619m	1	45534556	45541890	Sucrose carrier	Sucrose transport protein SUC4
ppa009027m	2	6008190	6012659	S6PDH	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase
ppb019226m	2	14568694	14569269	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa008916m	2	17021919	17023453	FK	Probable fructokinase-2
ppa002149m	2	19498250	19501881	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa002945m	2	20913904	20919665	PGM	Phosphomannomutase/phosphoglucomutase
ppa007520m	2	23480434	23483881	PGM	Putative beta-phosphoglucomutase
ppa003986m	2	23999686	24005189	PFK	6-phosphofructokinase 4, chloroplastic
ppa004465m	2	24083522	24085244	Hexose carrier	Hexose carrier protein HEX6
ppa023229m	2	24086021	24088165	Hexose carrier	Hexose carrier protein HEX6
ppa016853m	2	24089561	24091410	Hexose carrier	Hexose carrier protein HEX6
ppa004378m	2	24263529	24267701	AI	beta-fructosidase (BFRUCT3) / beta-fructofuranosidase / invertase, vacuolar
ppa002825m	2	24687060	24692386	PGM	Phosphoglucomutase, chloroplastic
ppa006628m	2	24700163	24704105	FK	Putative fructokinase-5
ppa012010m	2	26378517	26380367	HK	Probable gluconokinase
ppa017606m	3	149555	153309	SuSy	Sucrose synthase 2
ppa003470m	3	2544197	2547757	Invertase	Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme CWINV1
ppa003635m	3	3157680	3163507	PFK	6-phosphofructokinase 3
ppa011439m	3	3235635	3237025	HK	Hexokinase-2
ppa009797m	3	3238194	3240207	HK	Hexokinase-1
ppa004915m	3	3912385	3919082	Hexose carrier	Probable plastidic glucose transporter 3
ppb011681m	3	3956255	3957184	Hexose carrier	Probable plastidic glucose transporter 3
ppa003780m	3	10020384	10027073	Hexose carrier	Plastidic glucose transporte r4
ppa022749m	3	10301032	10301577	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor

Additional Table 4.2 Candidates genes description (suite)

Gene	Ch	Transcript Start	Transcript Stop	ID	Description
ppa007069m	3	12579614	12589028	FK	Putative fructokinase-5
ppa003996m	3	16286986	16291067	Hexose carrier	Probable plastidic glucose transporter 1
ppa005006m	3	19158038	19160714	UGPase	UDP-glucose6-dehydrogenase
ppa004167m	4	164526	168491	PFK	6-phosphofructokinase 2
ppa018196m	4	12871571	12873201	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa004471m	4	19872425	19878277	HK	Hexokinase-4
ppa004112m	4	21585939	21589729	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa006104m	5	314133	318252	SuSy	Sucrose-phosphatase 2
ppa020161m	5	2679638	2681920	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa023516m	5	5172223	5172822	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa012101m	5	5182606	5183329	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa026908m	5	11637811	11638332	enzyme inhibitor	C/VIF1 (CELL WALL / VACUOLAR INHIBITOR OF FRUCTOSIDASE 1); enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectinesterase inhibitor
ppa005034m	5	16313887	16315980	UGPase	UDP-glucose 6-dehydrogenase
ppa001135m	5	18201753	18206006	SuSy	Sucrose synthase 2
ppa001820m	6	1427814	1435775	F26BPase	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
ppa007744m	6	2911925	2914018	FBPA	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme 1
ppa024009m	6	4963408	4964366	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa002614m	6	9114385	9120674	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa004086m	6	18525587	18531367	PFK	PFK5 (PHOSPHOFRUCTOKINASE 5); 6-phosphofructokinase
ppa025661m	6	20176525	20179338	HK	Probable hexokinase-like 2 protein
ppa019684m	6	21454522	21456148	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa007036m	6	23699131	23701238	F16BPase	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic
ppa004431m	6	23729097	23730960	FK	Fructokinase-2
ppb023165m	6	25000262	25002805	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa024038m	6	25924874	25925461	Invertase	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein

Additional Table 4.2 Candidates genes description (suite)

Gene	Ch	Transcript Start	Transcript Stop	ID	Description
ppa002385m	6	25951278	25954904	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppb022806m	6	26198850	26200965	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa024034m	7	5248460	5249911	UGPase	UDP-glucose 6-dehydrogenase
ppa006143m	7	12697894	12701833	SPS	Sucrose-phosphatase1
ppa007696m	7	14560627	14563435	FBPA	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme
ppa007714m	7	14566849	14569174	FBPA	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme
ppa001535m	7	18751831	18757844	SuSy	Sucrose synthase
ppa001537m	7	18753725	18757844	SuSy	Sucrose synthase
ppa003994m	7	19976695	19979689	PFK	6-phosphofructokinase 3
ppa004637m	7	20079554	20083733	HK	Hexokinase-1
ppa004615m	7	20798037	20802680	Hexose carrier	Probable plastidic glucose transporter 2
ppa000639m	7	21553364	21558937	SPS	Sucrose-phosphate synthase 1
ppa008482m	8	98303	100206	FK	Putative fructokinase-5
ppa000716m	8	302823	308439	SPS	Sucrose-phosphate synthase2
ppa008222m	8	2567207	2570516	F16BPase	Fructose-1,6-bisphosphatase,cytosolic
ppa019284m	8	3727102	3727623	Invertase	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
ppa004033m	8	5815223	5819531	Sucrose carrier	Sucrose transport protein SUC2
ppa006537m	8	7773504	7776264	F16BPase	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic
ppa009007m	8	10925243	10927698	S6PDH	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase
ppa003483m	8	16128809	16132727	Invertase	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase
ppa015470m	8	18836446	18840311	HK	Ketohexokinase
ppa011794m	8	21413503	21414268	Invertase inhibitor	Putative invertase inhibitor
ppa002723m	8	21434978	21439332	SuSy	Sucrose synthase 2
ppa012707m	8	21578853	21579470	Invertase	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein
ppa018322m	8	21673879	21675560	SPS	sucrose-phosphatase-related

Acknowledgments

The International Peach Genome Initiative (IPGI) is acknowledged for early online access to the draft genome sequence and an automatic annotation of genes. Construction of the linkage map was partly funded under the EU seventh Framework Programme by the FruitBreedomics project no. 265582: “Integrated approach for increasing breeding efficiency in fruit tree crops.” We thank M. Troggio and D. Micheletti for help with SNP genotyping. We thank V. Signoret and E. Pelpoir for her help in fruit sampling, Y. Gibon, P. Ballias and D. Prodhomme for their assistance at the high throughput metabolic phenotyping facility of the Bordeaux Metabolome Platform at INRA Bordeaux, France. We are grateful to the IE-EMMAH UMR1114 team for taking care of the experimental orchard. This research was funded by grants from the ‘Plant Biology and Breeding’ division of the Institut National de la Recherche Agronomique, France (FructoPech and PhenoPech).

Chapitre 5 : SWEET17, transporteur tonoplastique de fructose : un gène candidat pour le phénotype ‘peu de fructose’ chez la pêche

Chapitre 5 : SWEET17, transporteur tonoplastique de fructose : un gène candidat pour le phénotype 'peu de fructose' chez la pêche

Ce chapitre présente les différentes expérimentations réalisées dans le but de caractériser le gène responsable du phénotype 'peu de fructose'. Le modèle métabolique présenté au chapitre 3 privilégie l'hypothèse d'un Km de la FK différent pour expliquer le phénotype 'peu de fructose'. Cependant les analyses génétiques vont dans le sens d'un transporteur de fructose. En effet un gène homologue au transporteur passif SWEET17 entrainant un phénotype 'peu de fructose' chez *Arabidopsis thaliana* a été identifié dans la zone responsable de ce phénotype chez le pêcher. D'après le modèle métabolique, une augmentation du transport passif de fructose a pour conséquence une diminution de la concentration du fructose. Cependant cette diminution est moins radicale que celle engendrée par la modification du Km de la FK. Le fait que le modèle ne permette pas de représenter le phénotype 'peu de fructose' de manière optimale uniquement avec une modification du transporteur de fructose peut venir de la représentation de ce transporteur dans le modèle. Aussi la caractérisation de l'expression de ce gène ainsi que des propriétés cinétiques de la protéine permettrait une meilleure représentation de ce transporteur dans le modèle.

Plusieurs expérimentations ont été initiées afin de valider la fonction du gène candidat et son implication dans le phénotype 'peu de fructose' ainsi que pour caractériser son expression et les propriétés cinétiques de la protéine.

SWEET17, transporteur tonoplastique de fructose : un gène candidat pour le phénotype 'peu de fructose' chez la pêche

Résumé :

Parmi les sucres présents dans les fruits, le fructose possède le pouvoir sucrant le plus important. Ainsi, sa concentration affecte le plus la perception de douceur des fruits. Les pêches commerciales présentent une concentration en fructose équivalente à celle du glucose. De manière intéressante, certains pêchers sauvages ou utilisés pour l'ornement présentent un déséquilibre du rapport fructose sur glucose avec une très faible concentration en fructose. Un phénotype similaire a été observé dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* et un transporteur tonoplastique de fructose, SWEET17, rendu responsable de ce phénotype. Dans la population BC2 issue d'un croisement interspécifique entre *P. persica* et *P. davidiana* un quart des individus présente ce phénotype 'peu de fructose'. Un gène majeur localisé dans une région de 14.5kb sur le chromosome 1 contrôle ce phénotype. Dans cette région, deux gènes sont présents dont un gène homologue à SWEET17. La validation de l'effet de ce gène sur le phénotype ainsi que la validation de sa fonction de transporteur de fructose sont en cours de réalisation. Une différence d'expression de ce gène a été montrée entre des individus ayant un phénotype 'standard' et un phénotype 'peu de fructose' avec une cinétique différente au cours de la journée. Des expérimentations supplémentaires sont prévues afin d'identifier de manière plus précise la période et la durée d'expression de ce gène sur la journée pour les deux individus.

Abstract:

From sugars found in fruit, fructose is the sweetest one. Thus, its concentration most affects the perception of fruit sweetness. Commercial peach has equivalent fructose and glucose concentration. Interestingly, some wild or ornamental accessions present an imbalanced fructose-to-glucose ratio with a very low fructose concentration. A similar phenotype was observed in *Arabidopsis thaliana* leaves and a tonoplastic fructose transporter, SWEET17, was held responsible. In the BC2 population derived from an interspecific cross between *P. persica* and *P. davidiana* a quarter of genotype displays a 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. A major gene located in a region of 14.5 kb on chromosome 1 control the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. In this region, two genes are predicted. One of them is homologous at SWEET17. The validation of the effect of this gene on the phenotype and the validation of its function of fructose transporter are in progress. A difference in expression of this gene has been shown between individuals having a phenotype 'standard' and a phenotype 'low-fructose-to-glucose-ratio' with different time courses during the day. Further experiments are planned to identify more precisely the timing and duration in the day of the expression of this gene in both individuals.

Introduction

La qualité gustative des fruits dépend en grande majorité des concentrations en sucres. Dans une cellule de fruit, la vacuole qui occupe la majorité du volume de la cellule (Chapitre 3) permet le stockage des sucres en les soustrayant de l'action des enzymes catalysant leur dégradation. La perméabilité de la vacuole face aux grosses molécules comme les molécules de sucre dépend des transporteurs présents sur la membrane vacuolaire, ou tonoplaste. La caractérisation moléculaire des transporteurs permet une meilleure compréhension des mécanismes liés au stockage des sucres et offre ainsi des pistes pour l'amélioration de la qualité des fruits.

Plusieurs familles de transporteurs tonoplastiques de sucres ont été décrites à ce jour dans le règne végétal (Doidy *et al.* 2012; Martinoia *et al.* 2012). Les transporteurs de type antiport permettent de stocker les sucres dans la vacuole contre leur gradient de concentration. De tels transporteurs ont été mis en évidence dans les fruits stockant une grande quantité de sucre comme la tomate (Reuscher *et al.* 2014), le raisin (Afoufa-Bastien *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2011) ou la pomme (Wei *et al.* 2014). La présence de transporteurs passifs au niveau de la membrane de la vacuole permet la diffusion des sucres de la vacuole vers le cytosol de manière à réguler la concentration cytosolique en sucre et ainsi répondre aux besoins en carbone de la cellule en conditions de privation (Martinoia *et al.* 2012).

La famille des transporteurs SWEET, transporteur passif bidirectionnel (Chen *et al.* 2010; Guo *et al.* 2014) comprend plusieurs types de transporteurs spécifiques du saccharose, du glucose ou du fructose dont la majorité sont localisés sur la membrane plasmique à l'exception de AtSWEET16 (Klemens *et al.* 2013) et AtSWEET17 (Chardon *et al.* 2013) localisés sur le tonoplaste. Les transporteurs SWEET ont des rôles importants pour le développement de la plante, les résistances aux stress (Klemens *et al.* 2013), les interactions avec les pathogènes (Chen *et al.* 2010; Chong *et al.* 2014), le transport des sucres via le phloème (Chen *et al.* 2012; Chen 2014) ainsi que la répartition des sucres dans les compartiments cellulaires (Chardon *et al.* 2013). Le transporteur SWEET17 a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* comme étant un transporteur tonoplastique spécifique du fructose (Chardon *et al.* 2013). L'expression de ce transporteur au niveau des feuilles entraine une réduction des concentrations du fructose mais ne modifie pas les niveaux de concentration des autres sucres. Un phénotype semblable (très faibles concentrations en fructose dans les fruits sans forte modification de celles des autres sucres) est observé dans les fruits de pêchers sauvages (Kanayama *et al.* 2005) ou ornementaux (Moriguchi *et al.* 1990a) ainsi que dans la population étudiée.

Le génome du pêcher a été récemment séquencé et annoté (The International Peach Genome Initiative 2013). Quatre gènes ont été annotés comme transporteur de saccharose et neuf

comme transporteur d'hexose (voir additional table 2, chapitre 2), mais aucun gène n'a été annoté comme transporteur de la famille SWEET. Par une approche de génétique quantitative puis de cartographie fine, nous avons identifié deux gènes candidats positionnels pour le phénotype 'peu de fructose' observé dans les pêches, dont l'un se trouve être homologue au gène SWEET17. Ce gène est davantage exprimé dans les génotypes de type 'peu de fructose' ce qui va dans le sens d'un transporteur tonoplastique de fructose comme cela a été montré chez arabidopsis. Ce chapitre reprend les différentes pistes suivies afin de valider ce gène candidat comme étant responsable du phénotype 'peu de fructose'. Les expérimentations en cours ainsi que les perspectives à court terme de ce travail seront également présentées dans cette partie.

Résultats et discussion

Le phénotype 'peu de fructose' est lié à un mécanisme interne du fruit

Le phénotype 'peu de fructose' correspondant à un faible ratio fructose sur glucose est détectable uniquement au niveau des fruits. Bien que le phénotype ne soit pas détectable dans le reste de la plante, des facteurs de régulation produits dans d'autres organes pourraient être responsables ou participer au phénotype observé dans les fruits. En effet le phloème transporte les sucres des organes sources vers les organes puits mais également de nombreuses autres molécules comme des molécules de signalisation qui peuvent affecter le développement des organes à longue distance (Dinant 2008). Il a également été montré que l'expression des gènes d'un organe peuvent être affectées à distance par la présence d'ARNm dans le phloème (Ueki and Citovsky 2001).

Afin d'explorer les effets respectifs des mécanismes internes du fruit et de ceux de la plante entière sur le phénotype 'peu de fructose', nous avons réalisé une expérimentation inédite de greffage de bourgeons floraux. Ainsi des bourgeons floraux de génotypes C216 (phénotype des fruits : 'peu de fructose') et C227 (phénotype des fruits : 'standard') issus de la population BC2 ont été greffés sur des portes greffes commerciaux GF305 (phénotype des fruits : 'peu de fructose') et Rubira (phénotype des fruits : 'standard') (Figure 5.1). Ces plantes greffées ont été menées jusqu'à l'obtention de jeunes fruits pour lesquels les concentrations en fructose et glucose ont été mesurées. La figure 5.2 montre que le rapport fructose sur glucose rencontré dans les fruits ainsi obtenus correspond à celui du génotype greffé sans influence du porte-greffe. Ainsi le phénotype 'peu de fructose' vient d'un mécanisme interne du fruit et ne dépend pas de mécanisme de régulation longue distance au niveau de la plante entière.

Figure 5.1 Illustrations du greffage des bourgeons floraux

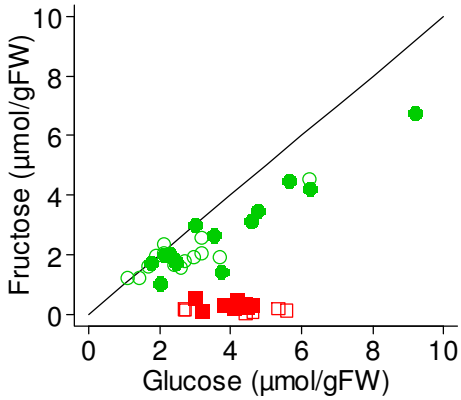


Figure 5.2 Concentration en glucose et en fructose (µmol gFW^{-1}) des fruits issus des greffes de bourgeons floraux. Le génotype greffé C216 (peu de fructose) est représenté en carré rouge, le génotype greffé C227 ('standard') est représenté en cercle vert, le porte-greffe GF305 (peu de fructose') est représenté en symbole plein et le porte-greffe Rubira (standard) en symbole vide.

Cartographie fine du QTL contrôlant le phénotype 'peu de fructose'

Une région génomique de 1 500 Kb responsable du phénotype 'peu de fructose' a été identifiée à partir d'une recherche de QTL sur la population BC2 (Quilot *et al.* 2004b). Le phénotype 'peu de fructose' est provoqué par un allèle dominant provenant de *P. davidiana*. Des travaux précédent cette thèse ont permis de réduire cette zone à 500Kb grâce à une cartographie fine de la population (Cammas 2010). Afin de réduire la zone responsable du phénotype 'peu de fructose', 5000 individus issus d'autofécondation du génotype C216 au phénotype 'peu de fructose' en 2010 et 2011 ont été génotypé avec les marqueurs microsatellites définis par Cammas (2010) ainsi que des marqueurs SNP (matériels et méthodes). Ces individus peuvent présenter trois génotypes: homozygotie de l'allèle de *P. persica*, homozygotie de l'allèle de *P. davidiana* ou hétérozygotie. Seuls les individus du 1er génotype (homozygotie de l'allèle de *P. persica*) au niveau du gène contrôlant le phénotype 'peu de fructose' présentent des fruits de type 'Standard'. Les individus présentant une recombinaison dans la zone du QTL ont été phénotypés. Pour cela ils ont été conduits de manière à accélérer la fructification. Les mesures des concentration en fructose et glucose des fruits de ces individus ont permis de réduire la zone responsable du phénotype 'peu de fructose' à 14.5Kb, entre les marqueurs SP132 et SP142 (Figure 5.3). Dans cette zone, deux individus au phénotype 'peu de fructose' présentent une recombinaison: l'un est hétérozygote au marqueur SP132 et homozygote *P. persica* au marqueur SP142, l'autre homozygote *P. persica* au marqueur SP132 et hétérozygote au marqueur SP142. Par conséquent, la région génomique contrôlant le phénotype 'peu de fructose' correspond au chevauchement de la zone d'hétérozygotie de ces deux individus recombinants. La localisation précise des recombinaisons permettra de réduire la zone d'intérêt. Pour cela, nous avons entrepris de cloner les 2 allèles de ces deux individus recombinants pour les séquencer.

L'annotation du génome du pêcher prédit deux gènes dans cette région (The International Peach Genome Initiative 2013): ppa010394m et ppa022820m. L'annotation automatique de la fonction de ces deux gènes (protéine de rupture du grain de pollen et protéine inconnue) n'a pas permis de mettre en évidence un gène candidat fonctionnel en lien avec le phénotype 'peu de fructose'.

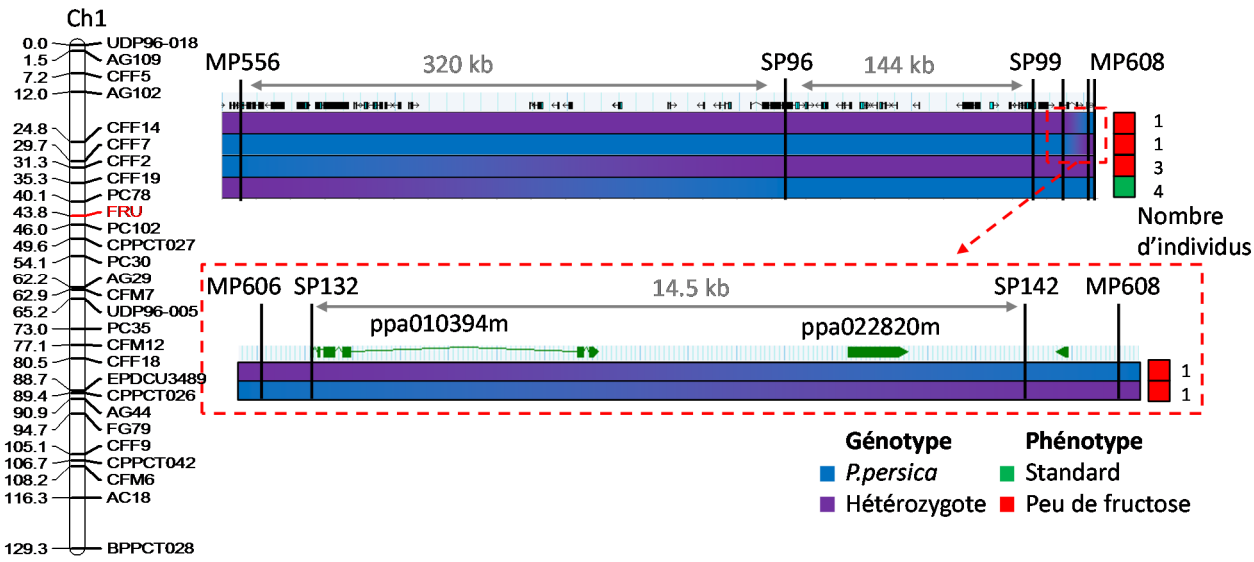


Figure 5.3 Bilan des individus recombinants dans la région FRU située au niveau du chromosome 1 (Quilot *et al.* 2004). A chaque génotype est associé le phénotype correspondant et le nombre d'individus. La zone responsable du caractère 'peu de fructose' correspond à la zone de chevauchement de l'hétérozygotie des deux individus recombinants entre les marqueurs SP132 et SP142.

Le gène ppa010394m homologue à SWEET17, un transporteur tonoplastique de fructose

L'annotation manuelle du gène ppa022820m dont la fonction est inconnue ainsi que la recherche d'homologie par blast n'a pas permis d'identifier une fonction pour ce gène. Afin d'identifier un possible lien entre ce gène et le phénotype 'peu de fructose', son expression sera prochainement caractérisé chez des individus appartenant au deux fructotype.

En revanche, nous avons identifié à l'aide du logiciel Blast2GO que le gène ppa010394m est un transporteur de sucre (GO:0008643). Ceci est conforté par le fait que ce gène présente une forte homologie de séquence (97% d'identité entre les ARNm) avec un gène annoté SWEET17 (transporteur tonoplastique de fructose) chez *Prunus mume*. Le gène SWEET17 a récemment été décrit comme étant un transporteur de fructose dont l'activité entraine un phénotype 'peu de fructose' chez *Arabidopsis thaliana* (Chardon *et al.* 2013). Ces informations font du gène ppa010394m un bon gène candidat à la fois fonctionnel et positionnel pour expliquer le phénotype 'peu de fructose' rencontré dans les fruits de pêche.

Incertitude autour de la séquence codante du gène ppa010394m

L'annotation du gène ppa010394m (Figure 5.4) prédit la présence de 6 exons séparés par des introns dont la taille varie de 97 à 4746pb. Afin de rechercher un polymorphisme de séquence entre les allèles du parent sauvage *P. davidiana* et des parents commerciaux *P. persica*, nous avons séquencé l'ADN génomique de différents individus de type 'standard' et 'peu de fructose'. Les parents de la population ne sont pas des haploïdes doublés, c'est-à-dire qu'ils peuvent présenter une hétérozygotie et donc deux allèles pour le gène étudié. De plus dans la population BC2, les individus 'peu de fructose' présentent un allèle *P. davidiana* et un allèle *P. persica*. C'est pourquoi, les parents de la population ainsi que deux individus de la BC2, C216 et C227 (un de chaque fructotype) ont été clonés avant d'être séquencés, de manière à séparer les différents allèles. Nous avons également séquencé quatre individus issus de l'autofécondation de C216 ayant permis la réalisation de la cartographie fini, pour lesquels nous avons caractérisé l'homozygotie de la zone contenant le gène d'intérêt. Ces données nous ont permis de mettre en évidence la présence de peu de polymorphisme de séquence, principalement localisés dans les introns 3 et 4 (Annexe 5.1). Dans les régions codantes, deux polymorphismes ont été identifiés. Le premier situé dans l'exon 1 correspond au marqueur SP132 utilisé pour la cartographie fine. Le second est une mutation synonyme situé dans l'exon 4 (Annexe 5.1).

Cette absence de polymorphisme a également été validée par le séquençage de l'ADNc du gène ppa010394m. Cependant nous n'avons pu amplifier une partie de l'ADNc correspondant au premier exon. Nous avons alors cherché à savoir si cette partie s'exprimait réellement chez le pêcher. En effet, l'étude de la séquence génomique montre la présence d'un second codon d'initiation ATG (start-codon) 20pb après le début du deuxième exon (Figure 5.4) à partir duquel l'amplification de l'ADNc est possible. La prédiction de la structure 2D de la protéine commençant au niveau du deuxième exon diffère de celle de la protéine de référence annotée, par la perte d'une hélice transmembranaire (six au lieu de sept) (Figure 5.5). La grande majorité des gènes homologues à SWEET17 possèdent sept hélices transmembranaires (d'après la structure 2D prédite à partir des séquences protéiques annotées chez différentes espèces, voir matériels et méthodes). Cependant, pour 20% des gènes homologues six hélices transmembranaires sont prédites (Figure 5.6). L'étude des données RNA-seq disponibles sur plusieurs accessions de *P. persica* nous a permis de mettre en évidence l'expression du premier exon (Figure 5.7). De manière à clarifier ce point et à obtenir une séquence d'ADNc complète, nous avons réalisé une approche par race PCR. Malheureusement, suite à des difficultés techniques, nous n'avons pu obtenir une séquence complète à ce jour.

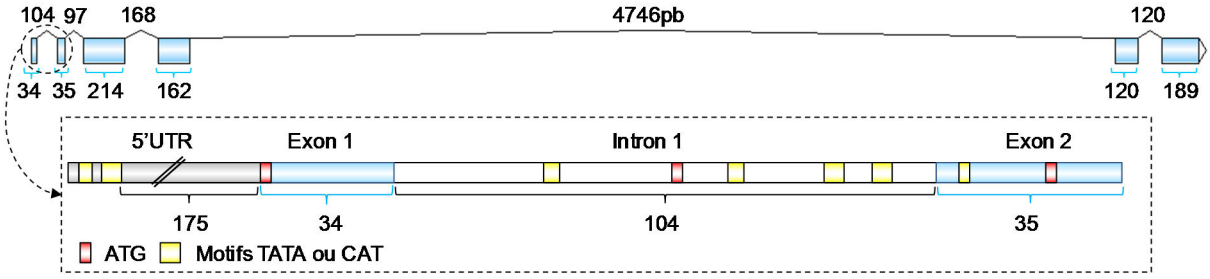


Figure 5.4 Représentation schématique de la prédiction du gène ppa010394m avec un agrandissement du début de la séquence. Les exons sont représentés en bleu, les introns en blanc, le 5'UTR en gris, les motifs TATA ou CAT en jaune et les motifs ATG en rouge.

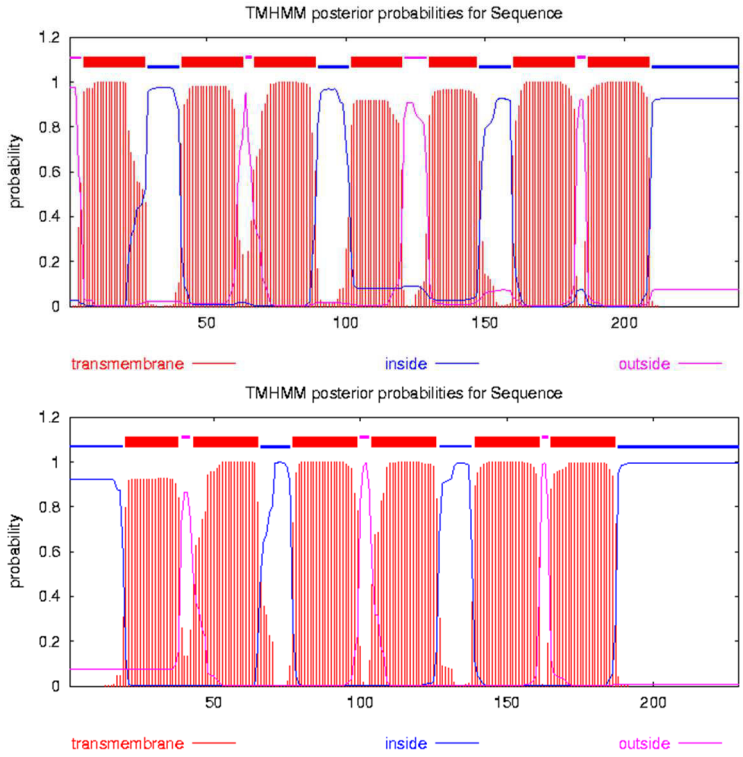


Figure 5.5 Prediction de la structure 2D via TMHMM à partir de la séquence de ppa010394m de référence (en haut) et de la séquence débutant à partir du milieu de l'exon 2 (en bas). Les hélices transmembranaires sont représentées en rouge.

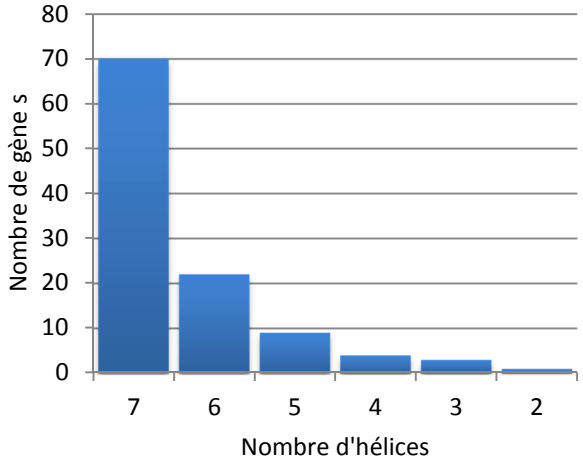


Figure 5.6 Répartition des gènes homologues à SWEET17 en fonction du nombre d'hélices transmembranaires prédites par TMHMM.

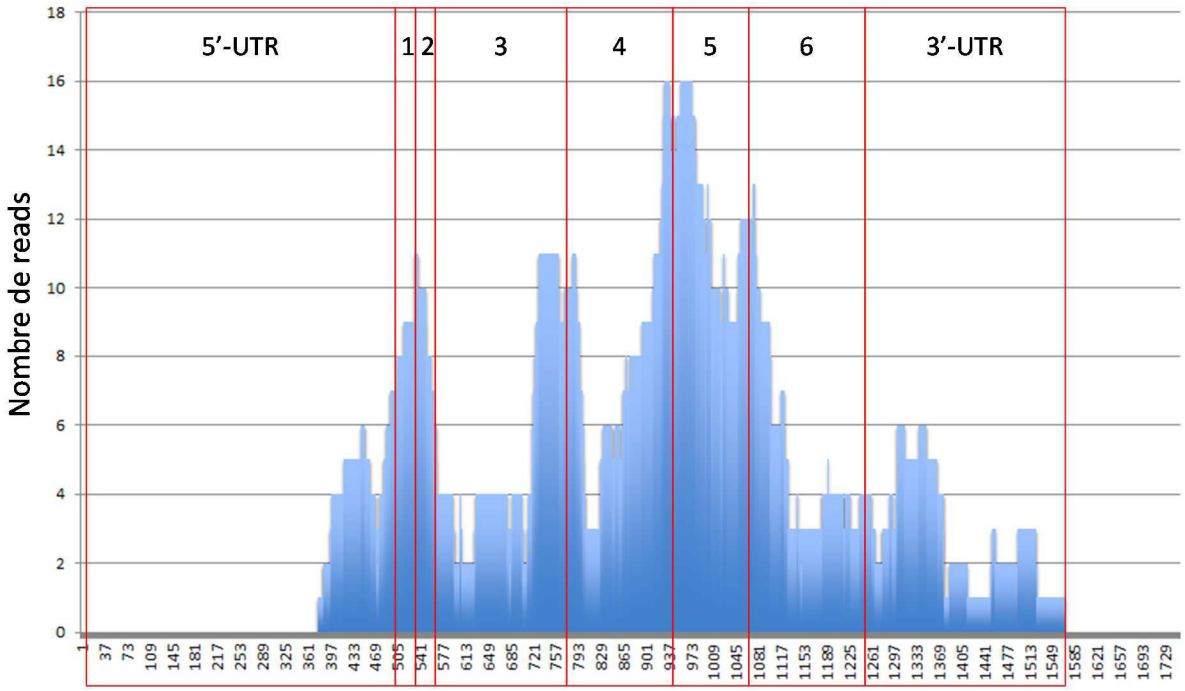


Figure 5.7 Niveau d'expression du gène ppa010394m à partir de données RNA-seq provenant de plusieurs accessions de *P. persica* (voir matériels et méthodes)

Une différence d'expression de ppa010394m à l'origine du phénotype 'peu de fructose'

L'expression du gène candidat a été étudiée dans les fruits de deux individus au phénotype contrasté à différentes heures de la journée, ainsi que dans les fruits d'accessions non apparentées. La figure 5.8 montre une différence importante entre les individus C216 et C227 à 7h et 13h avec une expression du gène plus importante pour l'individu 'peu de fructose'. De même que les accessions présentant un phénotype 'peu de fructose' ont une expression du gène candidat supérieur à ceux présentant un phénotype 'standard'. L'expression du génotype C227 augmente à 19h jusqu'à atteindre le niveau d'expression rencontré chez C216. Les accessions ont été étudiées à 10h, Chardon et *al.* (2013) ont montré que le gène AtSWEET17 présente une augmentation d'expression au milieu de la journée, ce qui correspond au pic de sucres accumulés pendant la phase de lumière au niveau des feuilles (Gibon *et al.* 2004b). D'après Sharkey et Pate (1976) il y a une synchronisation rapide entre la variation diurne des sucres dans les feuilles, la sève et les fruits de *Lupinus albus*. Ce qui ne semble pas être confirmé au niveau des arbres fruitiers. En effet, Klages *et al.* (2001) montrent une faible variation diurne des concentrations en sucres chez la pomme. Or les sucres sont connus pour être des molécules de signalisation dont dépend l'expression de certains transporteurs (Atanassova *et al.* 2003). De ce fait des modifications de concentration en sucres pourraient expliquer les différences d'expression du transporteur. L'étude du rythme circadien de l'expression du gène ppa010394m sera prochainement complétée sur les deux génotypes avec l'étude de plusieurs prélèvements, notamment entre 13h et 19h et entre 19h et 7h. Les concentrations en différents sucres seront également caractérisées sur ces échantillons afin de mettre en évidence les variations circadiennes des sucres chez la pêche et également rechercher des corrélations avec l'expression du gène. De même l'expression des différents transporteurs de sucres annotés sur le génome du pêcher sera étudié afin d'explorer le rythme circadien des transporteurs en lien avec les concentrations en sucres.

L'étude de l'expression du gène ppa010394m sera également élargie à différents organes (feuille, pétiole). Le phénotype 'peu de fructose' n'est pas observé dans ces organes, de ce fait l'expression du gène candidat devrait être très faible comme le suggère des études préliminaires (données non présentées). D'après la cartographie fine, la région promotrice du gène ppa010394m est exclue de la zone régissant le phénotype 'peu de fructose' de la même manière que cela a été montré chez arabidopsis (Chardon *et al.* 2013). Ainsi, la modification de l'expression du gène ne viendrait pas du promoteur mais plutôt d'une modification de la stabilité de l'ARNm qui serait liée à un polymorphisme de séquence présent au niveau du quatrième intron du gène AtSWEET17. Dans la séquence de *P. persica*, le quatrième intron représente environ 6Kb et présente un polymorphisme important entre l'allèle 'standard' et celui entrainant le caractère 'peu de fructose' (Annexe 5.1) et pourrait de ce fait être responsable de la différence d'expression observée.

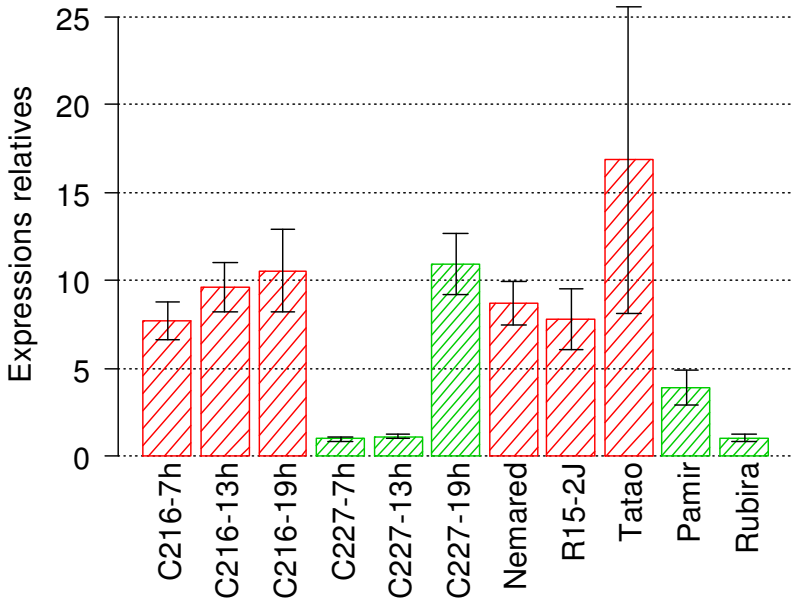


Figure 5.8 Expressions relatives du gène ppa010394m dans les fruits des génotypes C216 ('peu de fructose') et C227 ('standard') à 7, 13 et 19 heures ainsi que dans les fruits de génotypes non apparentés à 10h dont 3 présentent un phénotype 'peu de fructose' (rouge) et 2 présentent un phénotype standard (vert).

Validation fonctionnelle de ppa010394m

Différentes approches permettant de valider la fonction du gène ppa010394m comme transporteur de fructose ainsi que son implication dans le phénotype 'peu de fructose' ont été entreprises au cours de cette thèse.

Tout d'abord, afin de mettre en évidence un lien entre le phénotype et les flux de fructose au niveau du tonoplaste des cellules de fruits, nous avons entrepris des mesures de flux de fructose par une technique de marquage radioactif en collaboration avec Lee Sweetlove (Departement of Plant Science, Oxford university). Cette technique passe par une étape clé d'extraction et de purification de vésicules de tonoplaste puis la mesure de flux s'effectue par le dosage de la radioactivité des vésicules soumises à différents temps d'incubation dans une solution contenant du fructose marqué au carbone 14. Cette technique n'ayant jamais été menée sur fruit de pêche auparavant, des mises au point des étapes d'extraction et de purification de vésicules de tonoplaste seraient encore nécessaires afin de limiter la contamination par des vésicules de membrane plasmique. A ce jour,

nous ne pouvons statuer sur le lien entre le flux tonoplastique de fructose et le phénotype 'peu de fructose'.

Afin de valider l'effet du gène ppa010394m sur le phénotype 'peu de fructose' une complémentation de ce gène de *P. persica* dans des mutant d'*A. thaliana* n'exprimant pas le gène AtSWEET17 a été entreprise en collaboration avec Fabien Chardon (UMR1318 IJPB Institut Jean Pierre Bourgin, Versailles-Grignon). Suite aux difficultés rencontrées dans l'obtention d'une séquence d'ADNc complète et surtout au fait qu'aucun polymorphisme dans la séquence codante n'ait été identifié, la complémentation sera réalisée à partir de la séquence d'ADN génomique. Cette complémentation permettra de valider l'effet du gène: les mutants d'*A. thaliana* ainsi transformés devraient présenter un phénotype 'peu de fructose'.

Des études plus directes de la fonction de la protéine sont également prévues avec l'expression du gène ppa010394m dans un système hétérologue. Une collaboration avec Benoit Lacombe (UMR 5004 Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier) a été initiée afin de réaliser cette expression dans des œufs de Xénope. Cette expérimentation devrait permettre de valider la fonction de transporteur de fructose du gène ppa010394m, sa spécificité face au fructose ainsi que de mesurer son affinité.

Conclusion et perspectives

Pour conclure, différentes approches ont été entreprises afin de caractériser le déterminisme génétique du phénotype 'peu de fructose' identifié dans la population d'étude. Le gène ppa010394m est un bon gène candidat à la fois positionnel et fonctionnel. La validation de sa fonction de transporteur tonoplastique de fructose ainsi que la validation de son implication dans le phénotype 'peu de fructose' sont en cours de réalisation. Plusieurs expérimentations sont également prévues à court terme. Tout d'abord l'étude, par Northern blot, de la taille des séquences d'ARN transcrites permettra de clarifier la présence ou l'absence du premier exon et nous donnera des informations quant à la présence d'éventuels fragments introniques pouvant jouer sur la stabilité des ARN.

Afin d'explorer le lien entre le gène ppa010394m et le phénotype 'peu de fructose' dans un fond génotype différent, nous avons étudié son expression chez 5 accessions non apparentées cette étude sera complétée avec l'étude de plusieurs accessions. En effet, nous avons réuni l'ADN de 47 accessions non apparentées dont 31 ont un phénotype 'peu de fructose'. Le séquençage du gène pour ces différentes accessions permettra d'explorer le polymorphisme du quatrième intron, et de le lier au phénotype 'peu de fructose' comme cela a été montré chez arabidopsis (Chardon *et al.* 2013). L'expression du gène sera étudiée chez les accessions pour lesquelles nous aurons accès à de l'ARN de fruit.

D'après les premiers résultats, une différence d'expression du gène ppa010394m pourrait être responsable du phénotype 'peu de fructose'. Mais plus qu'une différence de niveau d'expression, ce pourrait être une différence dans la période d'expression au cours de la journée avec une désynchronisation entre l'expression du transporteur et l'entré des sucres dans le fruit qui pourrait être à l'origine de la différence de phénotype observée.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les parents de la population BC2 décrite dans la partie Matériel végétal de la thèse ont été étudiés ici ainsi que deux génotypes de la population, un présentant un phénotype 'standard' (C227) et un présentant un phénotype 'peu de fructose' (C216). Des autofécondations de ce dernier ont été réalisées en 2010 et 2011 et ont permis l'obtention d'individus recombinants dans la zone régissant le caractère 'peu de fructose'. Ces individus peuvent présenter trois génotypes: homozygotie de l'allèle de *P. persica*, homozygotie de l'allèle de *P. davidiana* ou hétérozygotie.

Greffage de bourgeons floraux

Les greffes ont été réalisées avec la méthode chip-budding sur des porte-greffes commerciaux d'un an à partir de bourgeons à œil poussant provenant de baguettes prélevées sur les arbres des génotypes C216 et C227 de la population BC2 décrite ci-dessus. Le tableau 5.1 reprend le nombre de fruits obtenus en fonction du génotype des bourgeons et du porte-greffe. Les fruits ont été traités individuellement. Ils ont été pelés, coupés en petits morceaux et immédiatement congelés à l'azote liquide. Ils ont ensuite été broyés et aliquotés par 20mg pour le dosage des sucres. Les concentrations en fructose et en glucose ont été dosées par méthode enzymatique (Gibon et al. 2009) avec deux répétitions techniques par fruit.

Tableau 5.1 Nombre de fruits obtenus pour chaque combinaison de génotype de bourgeon et de porte-greffe.

Bourgeon / Porte greffe	C216 ('peu de fructose')	C227 ('standard')
GF305 ('peu de fructose')	11	14
Rubira ('standard')	6	14

Réduction de la zone responsable du caractère 'peu de fructose' par recherche d'individus recombinants

L'extraction d'ADN des individus issus des autofécondations du génotype C216 a été réalisée sur plaque 96 d'après la méthode Dneasy kit de Quigen. Le génotypage des individus a été réalisé avec la technique KASPar à partir des amorces SNP présentés dans le tableau 5.2 et les marqueurs microsatellites présentés en annexe du chapitre 4.

Les individus recombinants dans la zone ont été conduits de façon à accélérer leur fructification. Les fruits ainsi obtenus sur des plants de 2 ans ont été traités de la même manière que les fruits issus des greffages de bourgeons floraux. Trois lots de trois fruits ont été réalisés par génotype. Les dosages du fructose et du glucose sur ces échantillons ont été réalisés par HPLC. Les individus présentant un ratio fructose sur glucose inférieur à 0.1 ont été classés comme ayant un phénotype 'peu de fructose'.

Tableau 5.2 Marqueurs SNP développés au cours de cette étude

Nom	Séquence 5' > 3'	Tm (°C)	%GC
SP096_IGA_28064 F1	CTTTCCCCTGCATGCTGGGCG	66,52	66,67
SP096_IGA_28064 F2	CTTTCCCCTGCATGCTGGGCA		
SP096_IGA_28064 R	TGATAATTGACCATTACAATGCAGG	57,96	36,00
SP099_IGA_28294 F1	ACGTAGGGTAAGAGGGTGTGA	59.92	52.38
SP099_IGA_28294 F2	ACGTAGGGTAAGAGGGTGTGG		
SP099_IGA_28294 R	CCCACACGATCCAAACTCCCT	62.06	57.14
SP132 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAAGTTTTCTAAACATGGAAGGATTAATTT	66	57.18
SP132 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAAGTTTTCTAAACATGGAAGGATTAATTA		
SP132 R	TAGTGGTTTTCTTACCTATGACCC	76	57.70
SP142 F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCATGTATCTTTTGGAGAGT	55.53	40.91
SP142 F2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTCATGTATCTTTTGGAGAGC		
SP142 R	TAGCACAAAATTGACAAAAATTACT	54.70	24

Tableau 5.3 Gènes homologues à SWEET17

Espèce	ID	Espèce	ID
Aegilops tauschii	F775_32289	Malus domestica	XP_008360271
Arabidopsis lyrata	ARALYDRAFT_479135	Maurus notabilis	L484_007213
Arabidopsis lyrata	ARALYDRAFT_493293	Medicago truncatula	ACJ84783
Arabidopsis thaliana	AT3G16690	Medicago truncatula	KEH37225
Arabidopsis thaliana	AT4G15920	Morus notabilis	EXB81015
Brachypodium distachyon	LOC100832850	Morus notabilis	L484_003052
Brachypodium distachyon	LOC100834766	Oryza Brachyantha	LOC102718727
Camelia sinensis	AHG94617	Oryza sativa indica	OsI_11516
Capsella rubella	CARUB_v10006856mg	Oryza sativa japonica	Os03g0341300
Capsella rubella	CARUB_v10014504mg	Phaseolus vulgaris	PHAVU_009G249700g
Ceratis capitata	LOC101463208	Picea sitchensis	ABK26262
Cicer arietinum	X1LOC101509872	Picea sitchensis	ADE7695
Cicer arietinum	X2LOC101509872	Populus trichocarpa	POPTR_0005s02370g
Citrus clementina	CICLE_v10001944mgX1	Populus trichocarpa	POPTR_0008s22390g
Citrus clementina	CICLE_v10001944mgX2	Populus trichocarpa	POPTR_0013s01540g
Citrus clementina	CICLE_v10002302mg	Populus trichocarpa	POPTR_0013s01550g
Citrus clementina	CICLE_v10003933mg	Populus trichocarpa	POPTR_0013s01590g
Citrus clementina	CICLE_v10005737mgX1	Poupulus trichocarpa	POPTR_0013s01600g
Citrus clementina	CICLE_v10005737mgX2	Prunus mume	LOC103323033
Citrus clementina	CICLE_v10005737mgX3	Prunus mume	LOC103331493
Citrus clementina	CICLE_v10005737mgX4	Prunus persica	ppa010394m
Citrus clementina	LOC102626671	Prunus persica	PRUPE_ppa010394mg
Citrus sinensis	CISIN_1g021755m	Prunus persica	PRUPE_ppa017165mg
Citrus sinensis	CISIN_1g026722mg	Ricinus communis	RCOM_0681600
Citrus sinensis	LOC102616345	Ricinus communis	RCOM_1433870
Citrus sinensis	LOC102618120	Ricinus comunis	RCOM_0458270
Citrus sinensis	LOC102624210	Setaria italica	LOC101782544
Cucumis sativus	LOC101203449	Setaria italilca	LOC101779488
Cucumis sativus	LOC101206107	Solanum lycopersicum	LOC101244429
Cucumis sativus	LOC101229673	Solanum lycopersicum	LOC101258901
Cucumis sativus	LOC101231542	Solanum tuberosum	LOC102584252
Erythranthe guttata	MIMGU_mgv1a012972mg	Solanum tuberosum	LOC102584588
Eucalyptus grandis	EUGRSUZ_H04549	Solanum tuberosum	LOC102584909
Eucalyptus grandis	EUGRSUZ_H04549	Sorghum bicolor	SORBIDRAFT_01g035840
Eucalyptus grandis	EUGRSUZ_H04550	Theobroma cacao	TCM_021237
Eutrema salsugineum	EUTSA_v10021447mg	Theobroma cacao	TCM_026675
Eutrema salsugineum	EUTSA_v10026502mg	Theobroma cacao	TCM_026676X1
Eutrema salsuguineum	EUTSA_v10021447mg	Theobroma cacao	TCM_026676X2
Eutrema salsuguineum	EUTSA_v10026320mgX1	Theobroma cacao	TCM_026677
Eutrema salsuguineum	EUTSA_v10026320mgX2	Theobroma cacao	TCM_026679X1
Fragaria vesca	LOC101306564	Theobroma cacao	TCM_026679X2
Fragaria vesca	LOC101313503	Theobroma cacao	TCM_026680
Glycine max	LOC100776607	Triticum urartu	TRIUR3_27939
Glycine max	LOC100782814	Triticum uratu	TRIUR3_02393

Tableau 5.3 Gènes homologues à SWEET17 (suite)

Espèce	ID	Espèce	ID
Glycine max	LOC100791868	Vitis vinifera	CBI39543
Glycine max	LOC100792454	Vitis vinifera	LOC100240774
Glycine max	LOC100802750	Vitis vinifera	LOC100245867
Glycine max	LOC100808537	Vitis vinifera	LOC100255033
Glycine max	LOC102670412	Vitis vinifera	LOC100257903
Glycine max	NM_001250489	Vitis vinifera	VITISV_022055
Hordeum vulgare	BAJ85375	Zea mays	ACG28395
Hordeum vulgare	BAJ96341	Zea mays	ACG38480
Horduem vualgare	BAK03081	Zea mays	AFW80577
Jatropha curcas	JCGZ_22533	Zea mays	LOC100275818
Jatropha curcas	JCGZ-23294	Zea mays	ZEAMMB73_831923
Jatrophas curcas	JCGZ_18896	Zea mays	ZEAMMB73_857611

Recherche d'homologie et annotation fonctionnelle

Des recherches d'homologie par BLASTn de la séquence de l'ADNm des gènes ppa010394m et ppa022820m ont été réalisées à partir de la base de données nucléotidique disponible sur la base de données NCBI avec les paramètres par défaut. L'annotation fonctionnelle a été réalisée à partir du logiciel Blast2GO (Conesa et al. 2005; Götz et al. 2008) (e-value=10-6, maximum de similarité=55). La prédiction des hélices transmembranaires (structure 2D) a été réalisée à partir de TMHMM Server v. 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). Le tableau 5.3 reprend la liste des gènes homologues à SWEET17 utilisés pour la comparaison du nombre d'hélices transmembranaires prédites par TMHMM.

Analyse du polymorphisme de séquence du gène ppa010394m

Afin de rechercher le polymorphisme de séquence entre les allèles *P. persica* et *P. davidiana* du gène ppa010394m, les parents de la population BC2, les génotypes C216 et C227 ainsi que 4 individus issus des autofécondations de C216 (deux individus homozygotes *P. persica* et deux individus homozygotes *P. davidiana* dans la région du gène candidat) ont été séquencés pour ce gène. Pour cela, leur ADN a été extrait à partir de jeunes apex avec la méthode décrite par (Bernatzky and Tanksley 1986; Michaels *et al.* 1994). Les fragments à séquencer ont été clonés afin de séparer les deux allèles (sauf pour les quatre individus homozygotes) avec la technique du clonage Gateway® (Lifetechnologies) (Lurin *et al.* 2004).

Les amorces utilisées pour le séquençage sont présentées dans la figure 5.9 et le tableau 5.4.

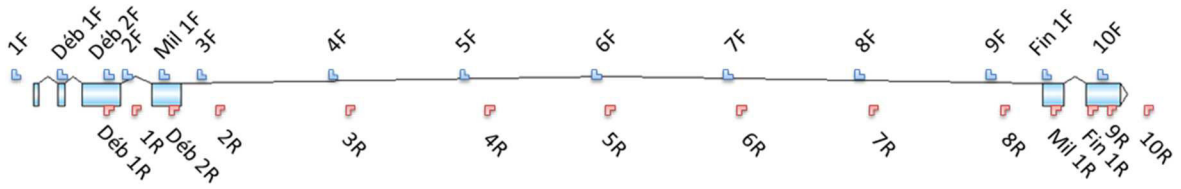


Figure 5.9 Localisation des amorces utilisées pour le séquençage et l'analyse de l'expression du gène ppa010394m.

Tableau 5.4 Amorces utilisées pour le séquençage et l'analyse de l'expression du gène ppa010394m

Nom	Séquence 5' > 3'	Taille (pb)	Tm (°C)	%GC
1F	TCAAACCATGTATATGTTAAAATGAAG	27	57,8	25,9
1R	AAATGTTGTTGCCGACATAAAATAG	25	60,5	32,0
2F	CAGACTGTGAATTCAGACGATTGAT	25	61,8	40,0
2R	GGACGGAAAGAAAAGGATCAAAC	23	62,3	43,5
3F	TTGTTGTTTTAATATGGAAGGGAAA	25	60,0	28,0
3R	TGGACTAATGTTTTAATGGGTTTATG	26	59,5	30,8
4F	CCAAATTCAATCCAAATATACATTACAA	28	60,4	25,0
4R	TTCTCTGAGCTTAATTTCCAATTTATTT	28	60,2	25,0
5F	GAAAAACTGAAAAACAAAGATTAAAGC	27	59,3	25,9
5R	GAGGAGAATCAGGCACTACAGC	22	60,4	54,5
6F	CAATTGTACAGGAGCACACATAGAC	25	60,0	44,0
6R	GGTATGGGACCTGAGTTTCTAGATT	25	60,1	44,0
7F	CGGTTCGGTTTGGATTTGACTC	22	64,9	50,0
7R	TTTTAGGCAACACATTCAGTCTTCT	25	60,5	36,0
8F	TTGCCATCTGAAGTCACAATATAAC	25	59,5	36,0
8R	GAGGGTTTTAGGGATTTTAAAGAAA	25	59,4	32,0
9F	TATTTTTATTGAGGCCCTGCAACTT	25	60,1	36,0
9R	AGCAGAAGAAGGTGAGATAAGAGGT	25	60,3	44,0
10F	GCAGCTAGTGCTATATGCGATTTAC	25	60,6	44,0
10R	GTACGTAGCCCACTCACTAGATCAT	25	60,0	48,0
Déb-1F	TGCTAATGTTCCTTGCTCCTG	21	60,4	47,6
Déb-1R	CAACGACACCAAAACCATTG	20	59,9	45,0
Déb-2F	CAATGGTTTTGGTGTCGTTG	20	59,9	45,0
Déb-2R	GCCTGCACAAATGAACCCTA	20	61,0	50,0
Mil-1F	TTAGCTACCTGGCTGGCATT	20	59,9	50,0
Mil-1R	CATCTCGTATGAGCCAAGCA	20	60,0	50,0
Fin-1F	ACATGCCATTCTTCCTCTCA	20	58,2	45,0
Fin-1R	ATGTTGCCTTCCTTCTTCCA	20	59,7	45,0

Expression dans différents organes, génotypes et moment du cycle circadien

Afin d'étudier l'expression du gène ppa010394m, neuf fruits du génotype C227 et neuf fruits du génotype C216 ont été prélevés à 7h, 13h et 19h. Les fruits ont été groupés en trois lots de trois fruits. Ils ont été immédiatement pelés, coupés en petits morceaux et congelés à l'azote liquide. Suivant la même méthode, trois lots de trois fruits (lorsque le nombre de fruits le permettait) ont été prélevés à 10h sur des accessions non apparentées de phénotype 'standard (Rubira, Pamir) et 'peu de fructose' (Tatao, Nemared, R15Japon). Les extractions d'ARN ont été réalisées à partir du Kit QIAGEN Rneasy (Plant Mini kit Cat. N°74904) en suivant les instructions du fabricant. La conversion des ARN en ADNc (RT PCR) a été réalisée avec le kit SuperScript®VILO™ . Les PCR quantitatives (qPCR) ont été réalisées à partir du kit Brillant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix With High ROX (Agilent Technologies Cat#600889). Les amorces correspondant aux gènes de références utilisées sont représentées dans le tableau 5.5. Les analyses d'expressions ont été réalisées avec le couple d'amorce Mil1 (figure 5.9, tableau 5.4).

Tableau 5.5 : Amorces des gènes de références utilisés pour la qPCR

Nom	Séquence 5' > 3'	Tm (°C)	%GC
GAPDH	F : ATTTGGAATCGTTGAGGGTCTTATG	56	40
	R : AATGATGTTGAAGGAAGCAGCAC	55	43.5
Translation elongation factor 2 (TEF2)	F : GGTGTGACGATGAAGAGTGATG	57	50
	R : TGAAGGAGAGGGAAGGTGAAAG	57	50
60S ribosomal protein L13 (RPL13)	F : GCAGCGACTGAAGACATACAAG	56	50
	R : GGTGGCATTAGCAAGTTCCTC	56	52.4

Analyse de données RNA-seq

Les données RNA-seq (Illumina) disponibles sur *P. persica* (SRR531862 : *Prunus persica* feuilles, SRR531863 : *Prunus persica* racines, SRR531864 : *Prunus persica* fruit, exp_43_s_6, SRR531865 : *Prunus persica*, embryons et cotylédons, exp_43_s_8) ont été mappées sur la séquence de référence du gène ppa010394m en utilisant le logiciel Bowtie 2 (Langmead *et al.* 2009). Les paramètres utilisés sont 'score-min: G, 52, 8' pour la fonction logarithmique naturelle $f(x)= 52 + 8 * ln(x)$, ou x correspond à la longueur des reads. Le fichier d'alignement au format '.SAM' de Bowtie 2 a été converti au format '.PILEUP' à partir de la suite de logiciel Samtools (Li *et al.* 2009). La profondeur de reads correspondant au gène ppa010394m a été calculée à partir de scripts développés en langage python.

Personnes ayant participés à ce travail et pressenties comme co-auteur pour l'article à venir :

Elsa Desnoues, Laure Heurtevin, Véronique Signoret, Carole Confolent, Fabien Chardon, Bénédicte Quilot-Turion

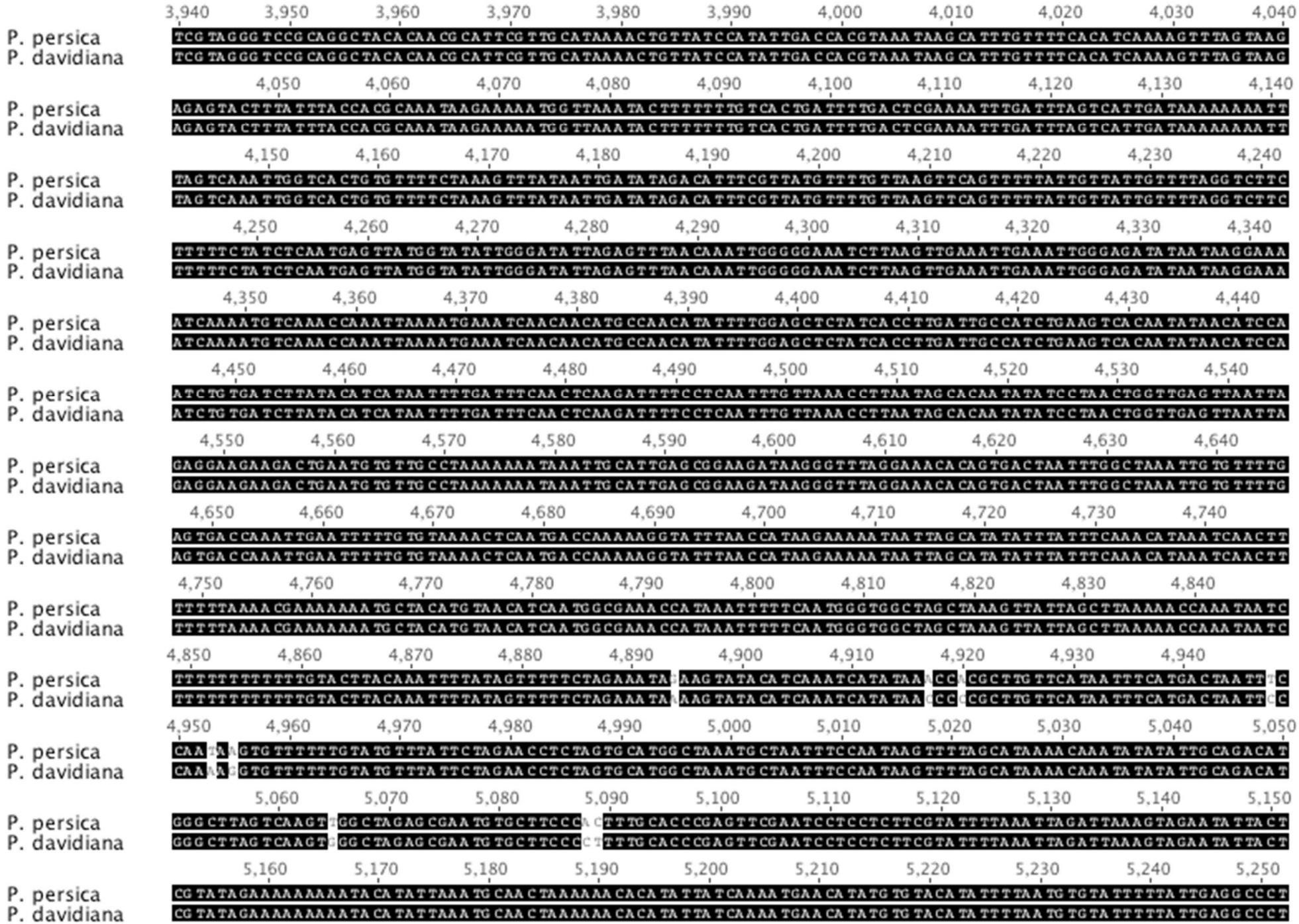
Annexe

Annexe 5.1: Séquences d'ADNg de l'allèle *P. persica* et de l'allèle *P. davidiana* obtenues à partir des différents génotypes séquencés.

P. persica
P. davidiana
Exon 1
Exon 2
Exon 3
Exon 4

```
                1,320     1,330     1,340     1,350     1,360     1,370     1,380     1,390     1,400     1,410
P. persica      TTCCGGGGGAAAAATGGAACCTAATCCGATAGTGCAGACCGGTTCGGTTTGGACCGGTTCTGCTCAACATCCATACAGAAATCCGAACCAACCCGGACCTG
P. davidiana    TTCCGGGGGAAAAATGGAACCTAATCCGATAGTGCAGACCGGTTCGGTTTGGACCGGTTCTGCTCAACATCCATACAGAAATCCGAACCAACCCGGACCTG

                1,420     1,430     1,440     1,450     1,460     1,470     1,480     1,490     1,500     1,510
P. persica      TCCGGTTCCGGTTCGGTTCTTGCGGTTCCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTTAAATTTTAACAAATCTGCCCAAAATGTATTT
P. davidiana    TCCGGTTCCGGTTCGGTTCTTGCGGTTCCGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATTTTAAATTTTAACAAATCTGCCCAAAATGTATTT

                1,520     1,530     1,540     1,550     1,560     1,570     1,580     1,590     1,600     1,610
P. persica      TATATACTAACATACCCCAAATTTGAGGTTCCATCAAGCTTTCAACACATTAAAATGAATCCAACTTCAACAAAAATACAATCCAAATTCAAATGAATCCA
P. davidiana    TATATACTAACATACCCCAAATTTGAGGTTCCATCAAGCTTTCAACACATTAAAATGAATCCAACTTCAACAAAAATACAATCCAAATTCAAATGAATCCA

                1,620     1,630     1,640     1,650     1,660     1,670     1,680     1,690     1,700     1,710
P. persica      ACTTCAACAAAAATTCAATCCAACTTCAACATCATCAAAATGAATCCAACTTCAACAAAAATACAATCCAAATTAAATCCAACTTCAACATATAAATTACA
P. davidiana    ACTTCAACAAAAATTCAATCCAACTTCAACATCATCAAAATGAATCCAACTTCAACAAAAATACAATCCAAATTAAATCCAACTTCAACATATAAATTACA

                1,720     1,730     1,740     1,750     1,760     1,770     1,780     1,790     1,800     1,810
P. persica      ACCCAAATTAAATCAAACTTCAACAAAATAAGTTCCAAAATAAATTACTAGCCAAATACAACCCAAATTCAATCCAAATATACATTACAACCCAAATTAAA
P. davidiana    ACCCAAATTAAATCAAACTTCAACAAAATAAGTTCCAAAATAAATTACTAGCCAAATACAACCCAAATTCAATCC-AATATACATTACAACCCAAATTAAA

                1,820     1,830     1,840     1,850     1,860     1,870     1,880     1,890     1,900     1,910
P. persica      TTCCTCCTAACATTGAAAAGTAGTTGGAGCTATGGTGCTAGGTGTGGATGAACTCATAATATCTACATAAAAAAACATAAACCCATTAAAACATTAGTCC
P. davidiana    TTCCTCCTAACATTG-AAAGTAGTTGGAGCTATGGTGCTAGGTGTGGATGAACTCATAATATCTACATAAAAAAACATAAACCCATTAAAACATTAGTCC

                1,920     1,930     1,940     1,950     1,960     1,970     1,980     1,990     2,000     2,010     2,020
P. persica      AACATACATATTATATAATACATTAATAAAGCACATATAAAATTACAAAAACAAAAAACAAAGAAAAAAACTTAACATGATATATATTAACAAAAACACAA
P. davidiana    AACATACATATTATATAATACATTAATAAAGCACATATAAAATTACAAAAACAAAAAACAAAGAAAAAAACTTAACATGATATATATTAACAAAAACACAA

                2,030     2,040     2,050     2,060     2,070     2,080     2,090     2,100     2,110     2,120
P. persica      CTTAACAACATAAACAACCCTCATATATACAATCCAATTACAAATTATCATTTCCAACTAAATGATAATATCAACACTTAACTAGAAAGCAACTGAAAAAC
P. davidiana    CTTAACAACATAAACAACCCTCATATATACAATCCAATTACAAATTATCATTTCCAACTAAATGATAATATCAACACTTAACTAGAAAGCAACTGAAAAAC

                2,130     2,140     2,150     2,160     2,170     2,180     2,190     2,200     2,210     2,220
P. persica      AGAAACCAATTAACTGAAAAACTGAAACCAATTATACACTGTCAAACCTATGACAGCAGTAATAAAGCAAAACAAAAATATGCAAAACTGAAAATCTGCAA
P. davidiana    AGAAACCAATTAACTGAAAAACTGAAACCAATTATACACTGTCAAACCTATGACAGCAGTAATAAAGCAAAACAAAAATATGCAAAACTGAAAATCTGCAA

                2,230     2,240     2,250     2,260     2,270     2,280     2,290     2,300     2,310     2,320
P. persica      AACTGAAAAACTGCAAAATGAAAAACTGAAAAACTGAACAGCAACAGCAGTAATAAAGCAAAACAAAAATATGCAAAACTGAAAATCTGCAAAACTAAAAA
P. davidiana    AACTGAAAAACTGCAAAATGAAAAACTGAAAAACTGAACAGCAACAGCAGTAATAAAGCAAAACAAAAATATGCAAAACTGAAAATCTGCAAAACTAAAAA

                2,330     2,340     2,350     2,360     2,370     2,380     2,390     2,400     2,410     2,420
P. persica      ACTGCAAAACTGAAAAACTGAAAAACAAAGATTAAAGCCCGACTAGGATAGTATGGTGATTACAAAATGTAGAGATATCTAAGTCTTCACATTTGTGTGTG
P. davidiana    ACTGCAAAACTGAAAAACTGAAAAACAAAGATTAAAGCCCGACTAGGATAGTATGGTGATTACAAAATGTAGAGATATCTAAGTCTTCACATTTGTGTGTG

                2,430     2,440     2,450     2,460     2,470     2,480     2,490     2,500     2,510     2,520
P. persica      ATGAGAAAGAGATTTCTACTAATCTAAAACTAGAGGGTAAAATAAATTGGAAATTAAGCTCAGAGAACAGTGCATGGAAGCAAAACCAAATATTCCTCCAT
P. davidiana    ATGAGACAGAGATTTCTACTAATCTAAAACTAGAGGGTAAAATAAATTGGAAATTAAGCTCAGAGAACAGTGCATGGAAGCAAAACCAAATATTCCTCCAT

                2,530     2,540     2,550     2,560     2,570     2,580     2,590     2,600     2,610     2,620
P. persica      ATAATTTCTGCTAAATGTAAAAACAAACAACTGACCGATACAAAAGGCATGAGTGGGTTCTTAATTAAACCTTTTTGGCTCTTTGCAAAAATTCCAGTGAA
P. davidiana    ATAATTTCTGCTAAATGTAAAAACAAACAACTGACCGATACAAAAGGCATGAGTGGGTTCTTAATTAAACCTTTTTGGCTCTTTGCAAAAATTCCAGTGAA
```

2,630 2,640 2,650 2,660 2,670 2,680 2,690 2,700 2,710 2,720
P. persica
P. davidiana
2,730 2,740 2,750 2,760 2,770 2,780 2,790 2,800 2,810 2,820
P. persica
P. davidiana
2,830 2,840 2,850 2,860 2,870 2,880 2,890 2,900 2,910 2,920
P. persica
P. davidiana
2,930 2,940 2,950 2,960 2,970 2,980 2,990 3,000 3,010 3,020 3,030
P. persica
P. davidiana
3,040 3,050 3,060 3,070 3,080 3,090 3,100 3,110 3,120 3,130
P. persica
P. davidiana
3,140 3,150 3,160 3,170 3,180 3,190 3,200 3,210 3,220 3,230
P. persica
P. davidiana
3,240 3,250 3,260 3,270 3,280 3,290 3,300 3,310 3,320 3,330
P. persica
P. davidiana
3,340 3,350 3,360 3,370 3,380 3,390 3,400 3,410 3,420 3,430
P. persica
P. davidiana
3,440 3,450 3,460 3,470 3,480 3,490 3,500 3,510 3,520 3,530
P. persica
P. davidiana
3,540 3,550 3,560 3,570 3,580 3,590 3,600 3,610 3,620 3,630
P. persica
P. davidiana
3,640 3,650 3,660 3,670 3,680 3,690 3,700 3,710 3,720 3,730
P. persica
P. davidiana
3,740 3,750 3,760 3,770 3,780 3,790 3,800 3,810 3,820 3,830
P. persica
P. davidiana
3,840 3,850 3,860 3,870 3,880 3,890 3,900 3,910 3,920 3,930
P. persica
P. davidiana


3,940 3,950 3,960 3,970 3,980 3,990 4,000 4,010 4,020 4,030 4,040
P. persica
P. davidiana
4,050 4,060 4,070 4,080 4,090 4,100 4,110 4,120 4,130 4,140
P. persica
P. davidiana
4,150 4,160 4,170 4,180 4,190 4,200 4,210 4,220 4,230 4,240
P. persica
P. davidiana
4,250 4,260 4,270 4,280 4,290 4,300 4,310 4,320 4,330 4,340
P. persica
P. davidiana
4,350 4,360 4,370 4,380 4,390 4,400 4,410 4,420 4,430 4,440
P. persica
P. davidiana
4,450 4,460 4,470 4,480 4,490 4,500 4,510 4,520 4,530 4,540
P. persica
P. davidiana
4,550 4,560 4,570 4,580 4,590 4,600 4,610 4,620 4,630 4,640
P. persica
P. davidiana
4,650 4,660 4,670 4,680 4,690 4,700 4,710 4,720 4,730 4,740
P. persica
P. davidiana
4,750 4,760 4,770 4,780 4,790 4,800 4,810 4,820 4,830 4,840
P. persica
P. davidiana
4,850 4,860 4,870 4,880 4,890 4,900 4,910 4,920 4,930 4,940
P. persica
P. davidiana
4,950 4,960 4,970 4,980 4,990 5,000 5,010 5,020 5,030 5,040 5,050
P. persica
P. davidiana
5,060 5,070 5,080 5,090 5,100 5,110 5,120 5,130 5,140 5,150
P. persica
P. davidiana
5,160 5,170 5,180 5,190 5,200 5,210 5,220 5,230 5,240 5,250
P. persica
P. davidiana

P. persica
P. davidiana
Exon 5
Exon 6

Chapitre 6 : Discussion générale

Chapitre 6 : Discussion générale

L'approche pluridisciplinaire suivie au cours de cette thèse et les connaissances acquises à différents niveaux d'échelles nous ont permis de considérer le métabolisme des sucres sous différents angles. L'objectif de ce travail était d'étudier le métabolisme des sucres d'un point de vue métabolique, enzymatique et génétique ainsi que de concevoir un modèle métabolique décrivant l'accumulation des sucres dans le fruit au cours de son développement.

Les sucres jouent un rôle particulièrement important dans la qualité des fruits. De ce fait, plusieurs études dans la littérature ont caractérisé les concentrations en sucres dans la pêche avant ce travail de thèse. En effet une trentaine d'études ont mesuré les concentrations en saccharose, glucose, fructose et sorbitol au sein de pêches de variétés commerciales ou dans des accessions sauvages; environ la moitié de ces études ont porté sur l'évolution de ces concentrations à différents stades de développement du fruit (ces travaux sont listés dans le fichier additional file 1 chapitre1). En revanche la littérature est très pauvre en ce qui concerne les concentrations des hexoses phosphates dont les teneurs sont négligeables en terme de qualité. Il en est de même pour les enzymes dont les capacités de certaines n'ont pas ou peu été caractérisées chez la pêche (*ie* : PGM, F16BPase, PGI, PFP, PFK, HK, UGPase, FK). Malgré ces différents travaux, il n'était pas possible avant ce travail de thèse, de dresser un tableau complet du métabolisme des sucres chez la pêche décrivant à la fois les concentrations en sucres et les capacités enzymatiques associées et ce au cours du développement du fruit. En effet, les travaux réalisés au cours de cette thèse (présentés dans le chapitre 1) ont permis la caractérisation quasi exhaustive du métabolisme des sucres ainsi que la description de la variabilité génétique au sein d'une population issue d'un croisement interspécifique entre des variétés commerciales de *Prunus persica* et un pêcher sauvage *Prunus davidiana*. Certains composés n'ont pu être mesurés pour des raisons techniques de mise au point de protocole sur pêche et l'impossibilité de réaliser ces dosages en haut débit (concentration en UDP-Glucose, capacité de l'invertase pariétale). L'arrêt de production de certains réactifs a également rendu impossible la mesure de la PGI.

La détection de locus liés à la variation des concentrations en sucres est un premier pas vers l'intégration, par la sélection assistée par marqueurs, du critère de douceur du fruit dans les schémas de sélection. Des QTL (Quantative Trait Loci) responsables de la variation des 4 sucres majoritaires ont été identifiés sur les 8 chromosomes du pêcher (Sosinski *et al.* 1998; Dirlewanger *et al.* 1999a; Etienne *et al.* 2002b; Quilot *et al.* 2004b). Cependant, toutes ces analyses ont été réalisées sur fruit à maturité. Or, au cours de cette thèse, nous avons montré que l'effet des QTL peut ne pas être stable au cours du développement du fruit. Ces résultats ont été mis en évidence grâce à la recherche de QTL à différents stades de croissance du fruit. Certains QTL ont un effet qui s'inverse (effet négatif

qui devient positif) à l'approche de la maturité ce qui ne les rend pas favorables pour une utilisation à des fins de sélection. Seule une analyse en cinétique permet de révéler ces dynamiques particulières. Outre leur utilisation en sélection, les QTL permettent d'inférer les mécanismes fonctionnels sous-jacents des modifications de concentrations en sucres. Pour cela nous avons réalisé pour la première fois chez une espèce fruitière, une recherche de QTL sur les capacités enzymatiques. La co-localisation entre les QTL de concentration en sucres, les QTL de capacités enzymatiques et les gènes annotés comme enzyme ou transporteur a permis d'identifier des gènes candidats (à la fois fonctionnels et positionnels) pour la modification des concentrations en sucres chez la pêche. Des études fonctionnelles restent nécessaires pour la validation de ces gènes. Nous avons également montré que le métabolisme des sucres est un réseau complexe avec l'action de gènes régulateurs peu connus et qui n'apparaissent pas au niveau de l'annotation du génome. C'est le cas par exemple des QTL ne co-localisant pas avec des gènes fonctionnels.

Le premier modèle mathématique permettant de simuler les concentrations en sucres chez la pêche au cours du développement du fruit a été développé par Génard and Souty (1996). Wu *et al.* (2012) ont montré la limite de ce modèle pour l'exploration des mécanismes intervenant dans le phénotype particulier 'peu de fructose'. Les principales différences entre le modèle SUGAR et le modèle métabolique développé au cours de cette thèse résident en la représentation des compartiments cellulaires que sont la vacuole et le cytosol ainsi que l'introduction des paramètres cinétiques des enzymes dans les équations des réactions. Ce modèle métabolique permet ainsi d'étudier de manière plus précise les mécanismes moléculaires intervenant dans l'accumulation des sucres dans le fruit au cours de son développement. De plus il met en lumière le manque d'information dans la littérature sur les transporteurs des sucres dans les fruits ainsi que leurs paramètres cinétiques.

Ce travail ouvre la voie à des études plus précises comme l'étude des propriétés des transporteurs de sucres ou la validation fonctionnelle de gènes candidats ayant un impact sur les concentrations en sucres. Il nous a également permis de comprendre les mécanismes à l'origine du phénotype particulier 'peu de fructose' rencontré dans la population d'étude à partir de travaux en cours de validation sur l'étude d'un transporteur de fructose *a priori* responsable de ce phénotype. L'intégration de différents points de vue a pour objectif de construire une représentation conceptuelle de l'ensemble des mécanismes intervenant dans le métabolisme des sucres au cours du développement du fruit chez la pêche. Il s'agit, dans ce chapitre, de poursuivre cet effort d'intégration, engagé dans les différents chapitres de la thèse, afin d'exploiter les résultats obtenus et de mettre en relation l'ensemble des niveaux de contrôle et de régulation mis en lumière indépendamment.

Caractérisation du métabolisme des sucres à différents niveaux d'échelle

Les différents niveaux d'un métabolisme communément admis dans les études de biologie intégratives sont les suivants (Figure6.1):

- le métabolome représenté ici par les concentrations en sucres
- le protéome, comprenant les enzymes et transporteurs qui agissent sur les molécules de sucres, via leurs différentes caractéristiques
- le transcriptome qui correspond au niveau d'expression des gènes
- le génome qui contient l'ensemble de l'information génétique de l'individu ou d'une espèce.

Nous avons également ajouté à ces quatre niveaux la notion de compartimentation qui agit, comme nous le verrons ci-dessous, fortement sur le métabolisme des sucres en régulant l'action des protéines sur les métabolites.

Nous présenterons dans un premier temps les interactions entre les différents niveaux, du génome au métabolome par la voie des réactions enzymatiques puis les effets de la compartimentation avec l'action des transporteurs.

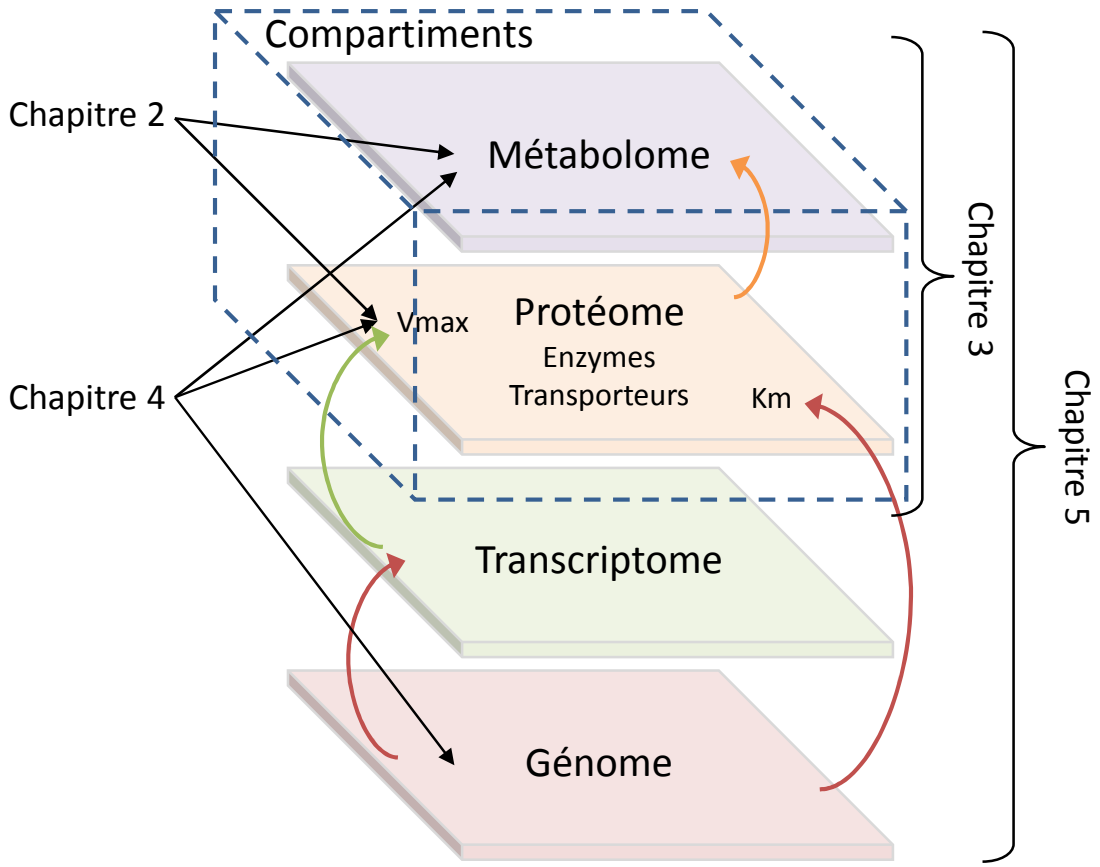


Figure 6.1 : Bilan des différents niveaux du métabolisme des sucres étudiés. Les interactions entre les niveaux sont représentées par des flèches de couleurs.

Liens Métabolites – Enzymes – Gènes

Les concentrations en métabolites sont directement accessibles par dosage dans la chair du fruit. Ainsi nous avons pu doser la concentration des différents sucres au cours du développement du fruit sur 106 génotypes. Le sorbitol et le saccharose sont les sucres produits par la photosynthèse qui sont transloqués des feuilles vers les fruits via le phloème (Moriguchi *et al.* 1990a). Au sein d'une cellule de fruit, ces sucres sont hydrolysés par des enzymes qui permettent la synthèse du fructose et du glucose; puis la synthèse des hexoses phosphates qui constituent le point de départ de la respiration via la glycolyse ainsi que de la synthèse de composés structuraux (Etienne *et al.* 2002b; Kanayama *et al.* 2005). Les enzymes jouent donc un rôle à la fois sur la quantité de sucres présents dans le fruit et sur la composition en sucres (niveaux relatifs des différents sucres). D'après les mesures réalisées, nous avons montré que la variabilité génétique s'exprime principalement sur les niveaux de concentrations en sucres et peu sur l'importance relative des sucres au sein de la même

espèce ; hormis pour des cas particuliers comme le phénotype 'peu de fructose' étudié au cours de cette thèse.

Une réaction enzymatique est caractérisée par les paramètres Km (représentant l'affinité) et Vmax (représentant la capacité) intervenant dans l'équation de Michaelis-Menten. Les capacités enzymatiques peuvent varier en fonction du génotype et du stade de développement et ainsi être responsables de la modification des concentrations en sucres. Elles ont été mesurées pour 12 enzymes du métabolisme des sucres à 6 stades de développement du fruit sur l'ensemble de la population d'étude. Ces données révèlent une faible variabilité entre les génotypes et les stades de développement. De plus, peu de corrélations ont été mises en évidence entre la capacité d'une enzyme et la vitesse de synthèse de son produit ou la vitesse de dégradation de son substrat. Les QTL détectés sur la base de ces capacités enzymatiques et des concentrations des sucres permettent d'aborder le lien entre le niveau des métabolites et celui des enzymes sous un autre angle. En effet, la recherche de QTL permet d'identifier des régions génomiques dont le polymorphisme est statistiquement lié à la variation des capacités enzymatiques et des concentrations en sucres. De cette manière nous avons mis en évidence plusieurs régions génomiques du pêcher agissant à la fois sur la capacité d'une enzyme et sur la concentration de son substrat ou produit, malgré les faibles liens observés entre ces deux niveaux d'échelle. Ces informations suggèrent un lien de cause à effet. Cependant des études complémentaires sont nécessaires afin de valider les mécanismes sous-jacents. Comme la capacité enzymatique correspond à une approximation du nombre de molécules d'enzymes, les différences de capacité peuvent être liées à l'expression du gène codant pour cette enzyme. Cependant, il a été reporté dans plusieurs études une très faible corrélation entre capacité enzymatique et expression des gènes structuraux (Steinhauser *et al.* 2010; Pascual *et al.* 2013). En effet, ces relations ne sont pas linéaires ; ceci est dû à des régulations post transcriptionnelles et/ou à la stabilité des protéines dont la durée de vie n'est pas sur le même pas de temps que l'expression des gènes. En résumé, la capacité enzymatique est l'un des éléments qui agit sur les concentrations en sucres mais dont le contrôle et les effets ne sont pas facilement quantifiables. D'autres mécanismes moins étudiés pourraient aussi avoir une grande importance sur les concentrations en sucres comme l'affinité des enzymes ou la compartimentation.

L'affinité des enzymes dépend de la conformation de la molécule, elle est de ce fait relativement stable pour une enzyme donnée. Cependant, il a été montré que certaines enzymes possèdent différentes formes, ou isoenzymes, présentant des affinités différentes (Kanayama *et al.* 1997; Tanase and Yamaki 2000). Ces isoenzymes proviennent de séquences d'acides aminés différentes répétées au sein du génome (Kanayama *et al.* 1997). Une modification de l'expression des gènes codants pour ces isoenzymes pourrait entrainer un déséquilibre entre les différentes formes

d'une enzyme et donc une variation du Km apparent de l'enzyme (résultant de l'ensemble des isoenzymes catalysant la même réaction), et ainsi modifier la vitesse des réactions enzymatiques et les concentrations en sucres. Plusieurs régions génomiques pouvant correspondre à un tel mécanisme ont été identifiées dans notre étude. Il s'agit des régions pour lesquelles ont été identifiés un gène codant pour une enzyme co-localisant avec un QTL du produit ou substrat de cette enzyme, sans toutefois observer de co-localisation avec un QTL de capacité de l'enzyme. Une étude des propriétés cinétiques de l'enzyme produite par les différents allèles est nécessaire pour valider cette fonction. Cependant, les expérimentations permettant de quantifier le Km d'une enzyme purifiée ou même du Km apparent d'un échantillon sont longues et n'ont pu être réalisées ici. D'énormes progrès sont encore nécessaires d'un point de vue expérimental pour accéder à ces informations pour un grand nombre d'échantillons. Pour intégrer ces paramètres dans le modèle développé, nous avons utilisé des valeurs de Km issues de la littérature. Lorsque ces données n'étaient pas disponibles ou lors de la présence avérée d'isoenzymes, nous avons estimé ces paramètres directement via le modèle et de manière indépendante pour chaque génotype.

Liens Métabolites – Compartimentation – Gènes

Les dosages des concentrations en sucres sont réalisés de manière globale sur un tissu et ne prennent pas en compte la compartimentation subcellulaire. Or cette compartimentation est un facteur fondamental qui influence grandement le métabolisme des sucres en rendant disponible ou non les sucres pour les réactions enzymatiques. Il est également indispensable de la prendre en compte pour analyser l'effet de la dilution différentielle des composés (Génard *et al.* 2014). Les enzymes relatives au métabolisme des sucres sont majoritairement présentes dans le cytosol à l'exception de l'invertase acide vacuolaire et de l'invertase acide pariétale. Les compartiments représentent une barrière physique entre les sucres et les enzymes capables de les dégrader, ainsi, la répartition des sucres au sein des différents compartiments cellulaires contribue grandement à leur dégradation ou à leur stockage.

Il est communément admis qu'au sein d'une cellule de fruit, les sucres sont stockés dans la vacuole. Cette affirmation vient-elle de la taille prédominante de la vacuole dans une cellule ou suppose-t-elle une concentration de sucres plus importante dans la vacuole ?

La vacuole occupe 80 à 95% du volume d'une cellule de fruit à maturité. Ce postulat est souvent énoncé tel quel mais les données dans la littérature permettant de l'étayer sont très rares et même inexistantes à ce jour lorsque l'on s'intéresse à une cellule au cours du développement du fruit. Pour vérifier ce postulat dans le cas d'une cellule de pêche et construire un modèle compartimenté, nous avons caractérisé le volume occupé par la vacuole et celui occupé par le

cytosol dans une cellule de mésocarpe de pêche à différents stades de développement. Nous avons montré que la vacuole occupe environ 80% du volume d'une cellule de fruit. Le cytosol représente 2% du volume, le reste étant composé de la paroi cellulaire ainsi que des autres organites présents dans la cellule. Ces données ont été intégrées au modèle métabolique afin de simuler le volume des compartiments ainsi que leur évolution au cours du développement du fruit. Le modèle prédit que le saccharose est stocké de manière importante dans la vacuole, dans le sens où la concentration du saccharose dans la vacuole est grandement supérieure à sa concentration dans le cytosol. Pour les autres sucres, le modèle prédit des concentrations équivalentes dans les deux compartiments. Cependant, ce résultat peut être contraint par les hypothèses de construction du modèle et principalement par la représentation des transporteurs. Le manque de données de la littérature concernant les concentrations des sucres dans les compartiments cellulaires ne nous permet pas de valider cet aspect du modèle. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous avons entrepris de mesurer la quantité des sucres dans les différents compartiments par la méthode de fractionnement anhydre. Cependant les quantités de sucres dans le cytosol étant indétectables, nous n'avons pu en inférer les concentrations.

Différents types de transporteurs de sucres ont été mis en évidence dans des cellules d'organe puits, des transporteurs passifs agissant en fonction du gradient de concentration et des transporteurs actifs permettant d'aller à l'encontre de ces gradients (Doidy *et al.* 2012; Martinoia *et al.* 2012; Ludewig and Flügge 2013). Il a été montré que les réactions liées aux transporteurs actifs ont des caractéristiques semblables à celles d'une réaction enzymatique et peuvent être représentées par une équation de Michaelis-Menten avec un Vmax correspondant à l'activité maximale et un Km représentant l'affinité du transporteur pour le substrat. La caractérisation de ces paramètres cinétiques nécessite des expérimentations lourdes c'est pourquoi peu d'informations sont disponibles dans la littérature. Nous nous sommes également confrontés à un manque d'information au niveau génétique, en effet peu de gènes sont annotés comme transporteur de sucres sur le génome du pêcher (The International Peach Genome Initiative 2013). De même que pour les enzymes, la séquence des gènes, leur expression, les régulations pré et post transcriptionnelles ont un rôle sur les propriétés cinétiques des transporteurs. Nous avons donc estimé à partir du modèle la majorité des paramètres relatifs aux transporteurs.

Le modèle que nous avons développé au cours de cette thèse permet d'intégrer différents niveaux présentés ici. En effet, ce modèle prédit l'évolution des concentrations des 4 sucres majoritaires chez la pêche (saccharose, glucose, fructose et sorbitol) au cours du développement du fruit. Il simule la croissance de la cellule et l'évolution des volumes du cytosol et de la vacuole et prend en compte dans les équations des réactions les paramètres Vmax et Km des enzymes et des

transporteurs au travers desquels s'expriment les effets de l'expression des gènes. L'intégration des paramètres cinétiques dans les équations du modèle métabolique offre la possibilité d'explorer l'impact de leur variation sur les concentrations en sucres.

Démarche du gène au phénotype avec le cas particulier 'peu de fructose'

Un phénotype particulier rencontré dans la population d'étude et appelé 'peu de fructose' en raison de la faible concentration en fructose présent dans les fruits a été étudié au cours de cette thèse selon les différents niveaux présentés en figure 6.1. Nous avons posé 3 hypothèses fonctionnelles pour expliquer ce phénotype :

- la synthèse du fructose
- sa dégradation
- son stockage (une perturbation dans le stockage du fructose pourrait avoir pour conséquence une augmentation du fructose dans le cytosol où il serait d'avantage dégradé)

La mesure des capacités enzymatiques révèle, aux différents stades de développement étudiés, une différence de la capacité de la fructokinase entre les deux fructose types qui, bien que faible, pourrait expliquer une augmentation de la dégradation du fructose chez les génotypes 'peu de fructose'. De plus, des isoenzymes de la fructokinase avec des affinités différentes ont été mises en évidence chez la pêche (Kanayama *et al.* 2005). La présence plus importante de l'isoenzyme ayant une affinité supérieure pour le fructose dans le cas des génotypes 'peu de fructose' combiné avec la différence de capacité observée pourrait expliquer la faible concentration de fructose. Dans le modèle développé, nous disposons de la valeur du Vmax en fonction du fructose type (par dosage de la capacité enzymatique) et nous avons testé l'hypothèse d'un Km différent (par estimation et modification des valeurs du Km). Il s'avère que pour simuler le phénotype 'peu de fructose' le modèle nécessite obligatoirement un Km de la fructokinase très faible (ce qui augmente la vitesse de dégradation du fructose par rapport à un Km élevé) et réciproquement une simulation effectuée avec un Km de la fructokinase très faible entrainera un phénotype 'peu de fructose' et ce même avec la valeur de la capacité enzymatique des génotypes 'standard'. Entre les trois hypothèses posées au départ, c'est celle que le modèle privilégie. Ce qui fait de l'affinité de la fructokinase un bon candidat pour expliquer le phénotype 'peu de fructose'.

Cependant une région génomique a été identifiée comme étant responsable de ce caractère à maturité (Quilot *et al.* 2004b) ainsi qu'à tous les stades de développement du fruit étudiés ici. Une cartographie fine a été réalisée à l'aide d'individus recombinants dans la zone de ce QTL, grâce à

laquelle nous avons pu diminuer la zone autour de 2 gènes : l'un annoté comme responsable de la rupture du grain de pollen et l'autre comme ayant une fonction inconnue. Récemment Fabien Chardon de l'INRA de Versailles et ses collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un transporteur tonoplastique de fructose (SWEET17) dont l'activité a pour conséquence un phénotype semblable à celui observé ici dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* (Chardon *et al.* 2013). Nous avons réalisé une recherche à partir de la séquence de ce transporteur, SWEET17, qui a permis de mettre en évidence que le gène annoté comme responsable de la rupture du grain de pollen est en fait un homologue du gène SWEET17 d'arabidopsis. A partir de cette information, nous avons étudié les niveaux d'expression de ce gène dans des fruits de génotypes 'standard' et 'peu de fructose'. Nous avons mis en évidence que ce gène est effectivement d'avantage exprimé au sein des individus 'peu de fructose'. Ces informations appuient l'hypothèse qu'un déstockage du fructose serait responsable du phénotype 'peu de fructose'.

Afin de mettre en évidence une éventuelle différence dans les flux de fructoses au travers de la membrane vacuolaire entre des fruits standard et de type 'peu de fructose', nous avons réalisé des expérimentations par une technique de marquage radioactif du fructose en collaboration avec Lee Sweetlove (université d'Oxford). Malheureusement, des travaux seraient encore nécessaires pour finaliser la mise au point de la technique de séparation de vésicules vacuolaires sur pêche. Or la qualité de cette séparation est primordiale pour étudier ces flux. Nous n'avons donc pus déterminer s'il existe une différence des flux entre les deux fructose types. Cependant la complémentation du gène du pêcher dans *Arabidopsis thaliana*, réalisée prochainement, permettra de valider l'effet du gène sur le phénotype 'peu de fructose'. De même que l'expression du gène de pêcher dans un système hétérologue (œufs de Xénope) dont la réalisation est prévue en collaboration avec Benoit Lacombe de l'INRA de Montpellier permettra de valider la fonction de ce gène comme transporteur spécifique du fructose et de définir son affinité pour le fructose.

Avec le modèle métabolique, nous avons entrepris la même démarche que pour le Km de la fructokinase et nous avons modifié la valeur du paramètre du transporteur passif de fructose car SWEET17 a été décrit comme un transporteur passif bidirectionnel spécifique du fructose (Guo *et al.* 2014). Cependant le modèle ne permet pas de simuler des individus sans fructose uniquement avec la modification de ce transporteur. Cela peut venir du fait que les transporteurs ne sont pas représentés de manière optimum dans le modèle et ceci par manque d'information à leur sujet.

Perspectives

Prédiction du phénotype en fonction du génotype

La biologie prédictive permet d'explorer l'effet de modifications génétiques et/ou environnementales sur des traits complexes (Hammer *et al.* 2006; Baldazzi *et al.* in prep). Pour cela il est nécessaire d'intégrer des informations du contrôle génétique dans les modèles prédictifs. L'une des perspectives à court terme de ce travail de thèse est la finalisation de l'intégration des informations obtenues aux différents niveaux d'échelles avec l'intégration du contrôle génétique dans le modèle métabolique. La définition des génotypes par un jeu de paramètres dont la valeur dépend des combinaisons alléliques, permettra de prendre en compte les effets du génotype sans informations spécifiques sur les gènes. Pour cela, nous allons réaliser une recherche de QTL liés aux paramètres du modèle. La caractérisation de l'effet des allèles sur la valeur des paramètres permettra de prédire les valeurs des paramètres du modèle pour différentes combinaison d'allèles. Il sera ainsi possible de prédire les concentrations en sucres pour différentes combinaisons d'allèles existantes ou pour des 'génotypes virtuels'.

Cette intégration nécessite la simulation d'un grand nombre de génotypes et passera de ce fait par une étape de simplification du modèle avec une réduction du nombre de paramètres à estimer. En effet, 14 paramètres sont estimés actuellement par génotypes basés sur 72 points expérimentaux (3 répétitions biologiques x 6 dates x 4 sucres). Or pour les génotypes de l'ensemble de la population, nous disposons seulement d'une répétition biologique par date (24 points). De plus la réduction du nombre de paramètres ainsi que des bornes de recherche pour les paramètres restant permettrait de diminuer le temps de calcul et les problèmes d'intégration. Le choix des paramètres fixés sera basé sur une analyse de sensibilité et une étude de corrélations entre les paramètres actuellement estimés ainsi que sur la variabilité parmi les 10 génotypes étudiés. Suite à cette simplification, les estimations de paramètres génotype-dépendants (affinités des enzymes, activités des transporteurs et de l'invertase pariétale, resynthèse du saccharose via la SPS, synthèse des composés structuraux) seront réalisées sur l'ensemble des génotypes de la population d'étude. Les valeurs estimées de ces paramètres seront traitées comme des variables quantitatives et une recherche de QTL sera réalisée. Les QTL ainsi détectés représenteront les régions génomiques ayant un effet sur un paramètre précis et donc sur la fonction liée. L'intérêt d'un modèle représentant les mécanismes moléculaires réside ici dans le fait que les paramètres ont un sens biologique précis; ce qui devrait faciliter les études de génétique fonctionnelle afin de mettre en évidence l'existence de nouveaux gènes d'intérêt. La description des effets des différents allèles aux QTL des paramètres permettra par la suite de déterminer la valeur des paramètres du modèle en fonction de l'allèle

présent à chaque locus associé aux QTL détectés. C'est ainsi qu'on pourra simuler la composition en sucres de fruits d'individus avec de nouvelles combinaisons d'allèles (Reymond *et al.* 2004; Quilot *et al.* 2005).

Prédiction du phénotype en fonction du génotype et de l'environnement

Combiner les informations moléculaires au niveau de l'organe ou de la plante en relation avec des facteurs environnementaux permet de simuler les traits d'intérêts en fonction des pratiques culturales et des conditions environnementales ce qui représente un des objectifs majeur de la biologie intégrative.

Nous pouvons distinguer deux niveaux de variables environnementales. Tout d'abord celles agissant sur les entrées du modèle, à savoir la quantité de carbone arrivant au niveau du fruit. Pour tenir compte de leurs effets, le modèle pourra être couplé au modèle 'Fruit Virtuel' (Lescourret and Génard 2005) prédisant la croissance du fruit (en matière sèche et matière fraiche) en fonction du génotype et de l'environnement (irrigation, charge en fruit, température) (Quilot-Turion *et al.* 2012).

Par ailleurs, certaines variables environnementales pourraient avoir un effet direct sur le métabolisme des sucres comme par exemple la température qui pourrait, jusqu'à un certain seuil, augmenter les vitesses des réactions enzymatiques, et les bloquer dans des cas extrêmes (Trasar-Cepeda *et al.* 2007). Dans le cas de ces variables environnementales, il faudrait explicitement décrire leur effet par le biais de courbes de réponse des paramètres touchés afin de prendre en compte leurs effets au niveau du métabolisme.

Ainsi le travail présenté ici permet une caractérisation fine du métabolisme des sucres chez la pêche à différents niveaux d'échelle. Il ouvre la voie à l'intégration du contrôle génétique dans un modèle métabolique prenant en compte de manière explicite les informations du niveau moléculaire. Cette intégration multi échelle donnera de nouvelles pistes à l'innovation variétale afin d'améliorer la qualité gustative des fruits.

Annexe 1 : informations complémentaires sur l'espèce *P. persica*

Annexe 1 : informations complémentaires sur l'espèce *P. persica*

Présentation de l'espèce

La famille des *Rosaceae* est très diversifiée. Elle comprend des plantes de types arborescente, arbustive et herbacée avec une large gamme de types de fruits tels que les follicules, akènes, pommes ou drupes. Un grand nombre d'espèces appartenant à cette famille ont un intérêt économique important que ce soit pour les fruits, le bois ou l'ornement. On peut citer par exemple le pommier, cerisier, fraisier, rosier, pêcher et bien d'autres.

Le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch) est originaire de Chine où il est cultivé depuis plus de 4 000 ans (Scorza and Okie 1990). Aujourd'hui, la pêche est cultivée dans de nombreux pays, majoritairement en Chine, en Italie et aux Etats-Unis et représente 20 millions de tonnes produites par an ce qui la place dans les 50 productions agricoles mondiales les plus importantes (Faostat). Parmi les Rosacées fruitières, la pêche est le 2ème fruit produit en Europe et le 3ème au niveau mondial, après la pomme et la poire.

La période juvénile du pêcher est relativement courte (2 à 3 ans) en comparaison aux autres arbres fruitiers (entre 5 et 10 ans pour le pommier, poirier et cerisier). Les arbres peuvent vivre jusqu'à 20 ou 30 ans mais sont renouvelés en général tous les 12-15 ans dans les plantations commerciales à cause de la perte de productivité (Layne and Bassi 2008). Les fruits produits sont des drupes, fruits charnus à noyau résultant de la différentiation des parois de l'ovaire. Ils sont composés d'un épicarpe plus ou moins pubescent, d'un mésocarpe charnu (la pulpe ou chair) et d'un endocarpe lignifié, le noyau dur contenant la graine (amande) (Figure Annexe 1). Il s'agit de fruits climactériques comme la pomme, la banane ou la tomate ; la maturation est donc liée à un pic dans la respiration et la production d'éthylène.

Les fleurs de pêcher sont fortement auto compatibles. Après la pollinisation, l'ovaire se développe, on parle de nouaison. Le fruit ainsi formé va passer par différents stades de croissance. Comme tous les fruits à noyau lignifié, la courbe de croissance du fruit (exprimée en diamètre) correspond à une double sigmoïde avec 3 phases distinctes (Figure Annexe 2)(Connors 1919). La première phase est caractérisée par une forte division cellulaire. Cette phase est cruciale car elle détermine le nombre de cellules du fruit et par conséquent sa taille maximale à maturité. Lors de cette division cellulaire, le fruit en développement est caractérisé par une croissance très rapide. Vient ensuite une phase où la croissance du fruit stagne: la phase de durcissement du noyau. Jusque-là bien que l'endocarpe soit différencié, il est encore souple et non lignifié. Dans la dernière phase du développement du fruit, la croissance reprend de manière très rapide jusqu'à la maturité, il s'agit de l'expansion cellulaire. La durée de chacune de ces phases est variable en fonction des variétés.

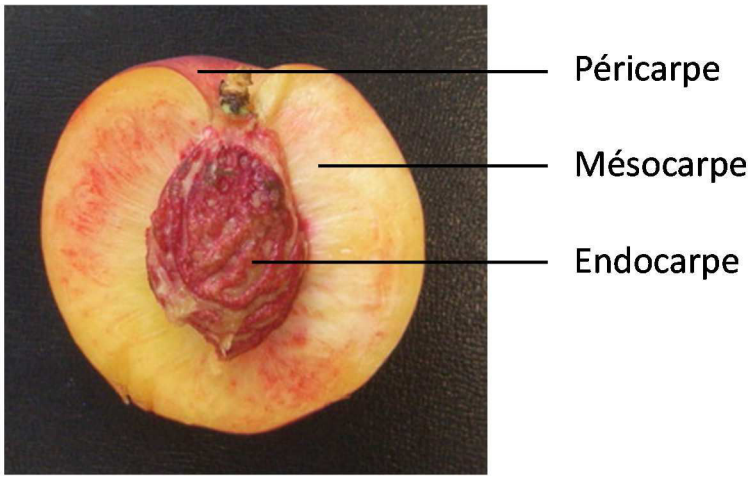


Figure Annexe 1 : Présentation des différents tissus d'une pêche

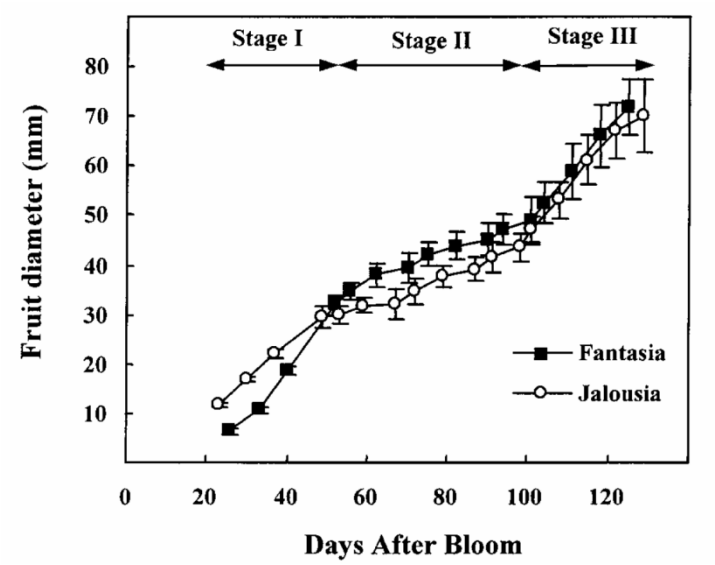


Figure Annexe 2 : Différentes phases de croissance des fruits représentées par l'évolution du diamètre des fruits (mm) en fonction des jours après floraison (Etienne et al. 2002). Les trois stades correspondent à la phase de division cellulaire, puis la phase de durcissement du noyau et la phase d'expansion cellulaire.

Diversité phénotypique des fruits

Le pêcher possède une très grande diversité phénotypique que ce soit sur les caractéristiques de l'arbre lui-même (hauteur, architecture), la résistance aux maladies et pathogènes ou encore au niveau du fruit. Nous allons nous intéresser uniquement à la diversité phénotypique au niveau des fruits.

Les deux premiers caractères bien connus des consommateurs caractérisent la peau qui peut être duveteuse ou glabre et le noyau qui est libre ou adhérent. La combinaison de ces 2 caractères est reportée dans le Tableau Annexe 1 avec les noms vernaculaires associés. Une autre caractéristique bien connue des pêches est la couleur de la chair qui peut être blanche ou jaune en présence de xanthophylles dérivées des caroténoïdes. La chair peut présenter des zones plus ou moins rouges souvent localisées près de la peau ou du noyau. Cette coloration est due à l'accumulation d'anthocyanes et dépend grandement de facteurs environnementaux. Le type sanguin qui possède une coloration plus importante est sous contrainte environnementale moindre. La chair peut également être fondante (M : melting), ferme (NM : non-melting) voir croquante (SH : stony-hard)(Layne and Bassi 2008). La forme du fruit est sujette à variation avec des fruits ronds, allongés ou plats. De même la masse des fruits est de l'ordre de 50 g pour les formes sauvages et varie de 100 à 680 g pour les variétés commerciales (Li 1984). La masse du fruit à maturité (le calibre) dépend de nombreux facteurs. Le nombre de cellules, caractère sous contrôle génétique, est un des traits fortement soumis à sélection, mais la masse dépend également de la compétition pour les assimilats (position du fruit sur le rameau, son exposition, le rapport fruit/feuille de l'arbre etc…).

D'un point de vue gustatif, certaines variétés sont plus acides et d'autres plus douces. Ceci dépend essentiellement des teneurs en sucres et acides qui peuvent être très variables en fonction des génotypes (Cantín *et al.* 2009).

Tableau Annexe 1 : Correspondance entre les noms vernaculaires et les phénotypes.

		Peau	
		Duveteuse	Glabre
Noyau	Libre	Pêche	Nectarine
	Adhérent	Pavie	Brugnon

Sélection chez le pêcher

Depuis que le pêcher est cultivé pour ses fruits il n'a cessé d'être sélectionné afin de rendre ses fruits plus attractifs ou faciliter sa culture. La sélection est orientée en fonction des exigences des producteurs (date de maturité, résistance…) et des goûts des consommateurs. Ces derniers varient en fonction de la région du monde. En effet les consommateurs d'Asie préfèrent les pêches à faible acidité, aux Etats-Unis les fruits acides sont davantage recherchés et en Espagne ce sont les fruits jaune-orangé à chair ferme qui sont préférentiellement choisis par les consommateurs (Byrne 2005). La sélection a également beaucoup porté sur les résistances aux maladies et pathogènes, la durée du développement des fruits ou les besoins en froid conditionnant la date des récoltes ou encore l'architecture de l'arbre qui peut faciliter la récolte. Cependant la sélection entraine inévitablement une perte importante de variabilité.

De plus par son histoire, le pêcher a subi plusieurs goulots d'étranglement au moment de son introduction dans les différents continents ce qui a également pour conséquence une perte importante de polymorphisme. Pour pallier à la baisse des résistances des variétés cultivées, des espèces proches de pêchers sauvages ont été utilisées comme porte greffe. Puis certaines études ont cherché à réintroduire de la variabilité en croisant des variétés commerciales avec des espèces de pêcher sauvages originaires de Chine. Comme par exemple Foulongne *et al.* (2003) qui ont croisé *P.davidiana*, espèce de pêcher sauvage avec des variétés commerciales de *P.persica* dans le but d'introduire de la résistance à l'oïdium et au puceron vert. Cependant ce genre de croisement entraine également l'introgression de caractères négatifs pour la qualité des fruits.

La qualité de la pêche est un trait complexe qui dépend de facteurs génétiques et des conditions culturales et environnementales, avec souvent des actions antagonistes. On sait par exemple que la concentration en sucres solubles diminue quand la période de développement est réduite ou que le calibre des fruits augmente (Byrne 2005).

Génome du pêcher

L'étude des génomes des arbres et arbustes fruitiers représente un intérêt et un enjeu important dans le cadre de l'amélioration des fruits. Grâce au développement ces dernières années des technologies de séquençage haut-débit ou NGS (Next Generation Sequencing) tel que le pyroséquençage (Roche-454) ou le séquençage par synthèse (Illumina), on compte aujourd'hui un nombre important de génomes d'espèces séquencées, cultivées pour leurs fruits, tels que le génome de la tomate (*Solanum lycopersicum*)(Tomato Genome Consortium 2012), du papayer (*Carica*

papaya)(Ming *et al.* 2008), du bananier (*Musa acuminata*)(D'Hont *et al.* 2012), ou de nombreuses Rosacées comme le fraisier (*Fragaria vesca*)(Shulaev *et al.* 2011), la pomme (*Malus x domestica Bork.*)(Velasco *et al.* 2010), l'abricotier du Japon (*Prunus mume*)(Zhang *et al.* 2012) ou encore le pêcher (*prunus persica*)(The International Peach Genome Initiative 2013).

Le pêcher est une espèce diploïde (*2n*=*2x*=16) avec un génome de petite taille (265 Mb) soit environ 2 fois le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Au génome annoté du pêcher en accès libre depuis avril 2010 (GDR : Genome Database for Rosaceae : www.rosaceae.org), vient s'ajouter un grand nombre d'informations génomiques disponibles tels que les ESTs (Expressed sequence tag), unigènes, protéines, ou les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) par exemple (voir la revue de Jung et Main (2014) pour le bilan des ressources disponibles). La grande qualité du séquençage et de l'assemblage du génome du pêcher (exhaustivité et exactitude) (The International Peach Genome Initiative 2013) permet une bonne transposition des connaissances génétiques acquises sur d'autres espèces ce qui résulte en une bonne prédiction et annotation des gènes sur l'ensemble de la séquence.

Toutes ces caractéristiques (importance économique, courte période juvénile, autogamie, qualité des données génotypiques) font du pêcher une espèce modèle pour les Rosacées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abnasan, N., Shiratake, K. and Yamaki, S. (1999). Change in sugar content and sorbitol - and sucrose - related enzyme activities during development of loquat (*Rriobotrya japonica* Lindl. cv. Mogi) fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **68**(5): 942-948.

Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thevenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R. and Laloi, M. (2010). The Vitis vinifera sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC Plant Biol.* **10**(1): 245.

Alcobendas, R., Mirás-Avalos, J., Alarcón, J. J. and Nicolás, E. (2013). Effects of irrigation and fruit position on size, colour, firmness and sugar contents of fruits in a mid-late maturing peach cultivar. *Sci. Hort.* **164**: 340-347.

Allen, D., Libourel, I. and Shachar-Hill, Y. (2009). Metabolic flux analysis in plants: coping with complexity. *Plant, Cell Environ.* **32**(9): 1241-1257.

Aluri, S. and Büttner, M. (2007). Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 2537-2579.

Arús, P., Verde, I., Sosinski, B., Zhebentyayeva, T. and Abbott, A. (2012). The peach genome. *Tree Genet. Genom.* **8**.

Atanassova, R., Leterrier, M., Gaillard, C., Agasse, A., Sagot, E., Coutos-Thévenot, P. and Delrot, S. (2003). Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol.* **131**(1): 326-334.

Baldazzi, V., Bertin, N., Génard, M., Gautier, H., Desnoues, E. and Quilot-Turion, B. (in prep). Chapter 1 : Challenges in interating genetic control in crop/plant models.

Barratt, D. H. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N.*, et al.* (2009). Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(31): 13124-13129.

Basciano, H., Federico, L. and Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr. Metab.* **2**(5).

Basson, C., Groenewald, J., Kossmann, J. and Cronjé, C. (2010). Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chem.* **121**: 1156-1162.

Beauvoit, B. P., Colombié, S., Monier, A., Andrieu, M.-H., Biais, B.*, et al.* (2014). Model-assisted analysis of sugar metabolism throughout tomato fruit development reveals enzyme and carrier properties in relation to vacuole expansion. *The Plant cell* **26**(8): 3224-3242.

Bernatzky, R. and Tanksley, S. (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **72**(3): 314-321.

Bertin, N., Borel, C., Brunel, B., Cheniclet, C. and Causse, M. (2003). Do genetic make-up and growth manipulation affect tomato fruit size by cell number, or cell size and DNA endoreduplication? *Ann. Bot.* **92**(3): 415-424.

Biais, B., Bénard, C., Beauvoit, B., Colombié, S., Prodhomme, D.*, et al.* (2014). Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. *Plant Physiol.* **164**(3): 1204-1221.

Biester, A., Weigley Wood, M. and Stone Wahlin, C. (1925). Carbohydrate studies. I. Relative sweetness of pure sugars. *Am. J. Physiol.* **73**: 387-400.

Boorer, K., Loo, D., Frommer, W. and Wright, E. (1996). Transport mechanism of the cloned potato H+/sucrose cotransporter StSUT1. *J. Biol. Chem.* **271**(41): 25139-25144.

Borsani, J., Budde, C., Porrini, L., Lauxmann, M., Lombardo, V., Murray, R., Andreo, C., Drincovich, M. and Lara, M. (2009). Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *J. Exp. Bot.* **60**(6): 1823-1860.

Borstlap, A. and Schuurmans, J. (2004). Sucrose transport into plasma membrane vesicles from tobacco leaves by H+ symport or counter exchange does not display a linear component. *J. Membr. Biol.* **198**(1): 31-42.

Brooks, S. J., Moore, J. N. and Murphy, J. B. (1993). Quantitative and qualitative changes in sugar content of peach genotypes *Prunus persica* (L.) Batsch *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **118**(1): 97-100.

Bugaud, C., Belleil, T., Daribo, M. and Génard, M. (2012). Does bunch trimming affect dry matter content in banana? *Sci. Hort.* **144**: 125-129.

Büttner, M. (2007). The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Lett.* **581**: 2318-2342.

Byrne, D. H. (2005). Trends in stone fruit cultivar development. *HortTechnology* **15**(3): 494-500.

Byrne, D. H., Nikolic, A. N. and Burns, E. E. (1991). Variability in sugars, acids, firmness, and color characteristics of 12 peach genotypes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **116**(6): 1004-1006.

Cammas, M. (2010). Identification du (des) gène(s) lié(s) au QTL contrôlant le rapport des concentrations fructose/glucose dans la pêche, Licence Professionnelle Biotechnologies Végétales et Création Variétale.

Cantín, C., Gogorcena, Y. and Moreno, M. A. (2009). Analysis of phenotypic variation of sugar profile in different peach and nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch] breeding progenies. *J. Sci. Food Agric.* **89**: 1909-1917.

Cao, S., Yang, Z. and Zheng, Y. (2013). Sugar metabolism in relation to chilling tolerance of loquat fruit. *Food Chem.* **136**(1): 139-143.

Carrari, F. and Fernie, A. (2006). Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* **57**(9): 1883-1897.

Causse, M., Duffe, P., Gomez, M., Buret, M., Damidaux, R.*, et al.* (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *J. Exp. Bot.* **55**: 1671-1756.

Causse, M., Rocher, J. P., Henry, A. M., Charcosset, A., Prioul, J. L. and de Vienne, D. (1994). Genetic dissection of the relationship between carbon metabolism and early growth in maize, with emphasis on key-enzyme loci. *Mol. Breed.* **1**(3): 259-272.

Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffé, P., Rousselle, P. and Buret, M. (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *J. Exp. Bot.* **53**(377): 2089-2098.

Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I. and Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 273-283.

Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P., Spinner, L.*, et al.* (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **23**(8): 697-702.

Chen, L.-Q. (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol.* **201**: 1150-1155.

Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.*, et al.* (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**: 527-559.

Chen, L.-Q. Q., Qu, X.-Q. Q., Hou, B.-H. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R. and Frommer, W. B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* **335**(6065): 207-211.

Chong, J., Piron, M.-C., Meyer, S., Merdinoglu, D., Bertsch, C. and Mestre, P. (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* **65**(22): 6589-6601.

Colaric, M., Veberic, R., Stampar, F. and Hudina, M. (2005). Evaluation of peach and nectarine fruit quality and correlations between sensory and chemical attributes. *J. Sci. Food Agric.* **85**: 2611-2616.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**(18): 3674-3676.

Connors, C. (1919). Growth of fruits of peach. *New Jersey Agricultural Experimental Station Annual Report* **40**: 82-88.

Costa, F., Peace, C. P., Stella, S., Serra, S., Musacchi, S., Bazzani, M., Sansavini, S. and Van de Weg, W. E. (2010). QTL dynamics for fruit firmness and softening around an ethylene-dependent polygalacturonase gene in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *J. Exp. Bot.* **61**(11): 3029-3039.

Cross, J., von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N. and Stitt, M. (2006). Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol.* **142**(4): 1574-1588.

Curien, G., Bastien, O., Robert-Genthon, M., Cornish-Bowden, A., Cárdenas, M. L. and Dumas, R. (2009). Understanding the regulation of aspartate metabolism using a model based on measured kinetic parameters. *Mol. Syst. Biol.* **5**(1).

D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F.-C., Carreel, F.*, et al.* (2012). The banana (Musa acuminata) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* **488**(7410): 213-217.

Dai, Z., Léon, C., Feil, R., Lunn, J., Delrot, S. and Gomès, E. (2013). Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera L.*), a non-climacteric fleshy fruit. *J. Exp. Bot.* **64**(5): 1345-1355.

Del Mar Sola, M., Gutiérrez, M. and Vargas, A. M. (1994). Regulation of hexose-phosphate cycle determines glucose and fructose accumulation in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) during ripening. *J. Plant Physiol.* **144**: 569-575.

Desnoues, E., Gibon, Y., Baldazzi, V., Signoret, V., Génard, M. and Quilot-Turion, B. (2014). Profiling sugar metabolism during fruit development in a peach progeny with different fructose-to-glucose ratios. *BMC Plant Biol.* **14**: 336.

Dinant, S. (2008). Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *C. R. Biol.* **331**(5): 334-346.

Dirlewanger, E., Moing, A., Rothan, C., Svanella, L., Pronier, V., Guye, A., Plomion, C. and Monet, R. (1999a). Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theor. Appl. Genet.* **98**: 18 - 31.

Doehlert, D. C. (1987). Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition. *Plant Sci.* **52**: 153-157.

Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L. and Wipf, D. (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* **17**(7): 413-322.

Esti, M., Messia, M., Sinesio, F., Nicotra, A., Conte, L., La Notte, E. and Palleschi, G. (1997). Quality evaluation of peaches and nectarines by electrochemical and multivariate analyses: relationships between analytical measurements and sensory attributes. *Food Chem.* **60**(4): 659-666.

Etienne, C., Moing, A., Dirlewanger, E., Raymond, P., Monet, R. and Rothan, C. (2002a). Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: involvement in regulating peach fruit acidity. *Physiol. Plant.* **114**: 259-529.

Etienne, C., Rothan, C., Moing, A., Plomion, C., Bodénès, C.*, et al.* (2002b). Candidate genes and QTLs for sugar and organic acid content in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* **105**: 145-304.

Farré, E. M., Tiessen, A., Roessner, U., Geigenberger, P., Trethewey, R. N. and Willmitzer, L. (2001). Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method. *Plant Physiol.* **127**: 685-700.

Font i Forcada, C., Gogorcena, Y. and Moreno, M. A. (2013). Fruit sugar profile and antioxidants of peach and nectarine cultivars on almond×peach hybrid rootstocks. *Sci. Hort.* **164**: 563-572.

Foulongne, M., Pascal, T., Arús, P. and Kervella, J. (2003). The potential of Prunus davidiana for introgression into peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] assessed by comparative mapping. *Theor. Appl. Genet.* **107**(2): 227-238.

Fridman, E., Pleban, T. and Zamir, D. (2000). A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(9): 4718-4723.

Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.-D., van Nocker, S. and Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiol.* **131**(4): 1566-1575.

Gaxiola, R., Palmgren, M. and Schumacher, K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Lett.* **581**(12): 2204-2214.

Génard, M., Baldazzi, V. and Gibon, Y. (2014). Metabolic studies in plant organs: don't forget dilution by growth. *Front. Plant Sci.* **5**: 85.

Génard, M., Bertin, N., Gautier, H., Lescourret, F. and Quilot, B. (2010). Virtual profiling: a new way to analyse phenotypes. *Plant J.* **62**(2): 344-355.

Génard, M., Bruchou, C. and Souty, M. (1991). Variabilité de la croissance et de la qualité chez la pêche (*Prunus persica* L Batsch) et liaison entre croissance et qualité. *Agronomie* **11**: 829-845.

Génard, M., Lescourret, F., Gomez, L. and Habib, R. (2003). Changes in fruit sugar concentrations in response to assimilate supply, metabolism and dilution: a modeling approach applied to peach fruit (*Prunus persica*). *Tree Physiol.* **23**(6): 373-385.

Génard, M. and Souty, M. (1996). Modeling the peach sugar contents in relation to fruit growth. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **121**(6): 1122-1131.

Gerhardt, R., Stitt, M. and Heldt, H. (1987). Subcellular metabolite levels in spinach leaves : regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning. *Plant Physiol.* **83**(2): 399-407.

Gibon, Y., Blaesing, O., Hannemann, J., Carillo, P., Höhne, M.*, et al.* (2004a). 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* **16**: 3304-3329.

Gibon, Y., Bläsing, O., Palacios-Rojas, N., Pankovic, D., Hendriks, J., Fisahn, J., Höhne, M., Günther, M. and Stitt, M. (2004b). Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *The Plant journal* **39**: 847-909.

Gibon, Y., Pyl, E.-T., Sulpice, R., Lunn, J., Höhne, M., Günther, M. and Stitt, M. (2009). Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant, Cell Environ.* **32**: 859-933.

Gibon, Y., Vigeolas, H., Tiessen, A., Geigenberger, P. and 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. *Plant J.* **30**(2): 221-235.

Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H.*, et al.* (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* **36**(10): 3420-3435.

Grandillo, S., Ku, H. M. and Tanksley, S. D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **99**(6): 978-987.

Gündüz, K. and Ozdemir, E. (2014). The effects of genotype and growing conditions on antioxidant capacity, phenolic compounds, organic acid and individual sugars of strawberry. *Food Chem.* **155**: 298-303.

Guo, W.-J., Nagy, R., Chen, H.-Y., Pfrunder, S., Yu, Y.-C., Santelia, D., Frommer, W. B. and Martinoia, E. (2014). SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiol.* **164**(2): 777-789.

Gur, A. and Zamir, D. (2004). Unused Natural Variation Can Lift Yield Barriers in Plant Breeding. *PLoS Biol* **2**(10): e245.

Hammer, G., Cooper, M., Tardieu, F., Welch, S., Walsh, B., van Eeuwijk, F., Chapman, S. and Podlich, D. (2006). Models for navigating biological complexity in breeding improved crop plants. *Trends Plant Sci.* **11**(12): 587-593.

Han, Y., Xie, D., Teng, W., Zhang, S., Chang, W. and Li, W. (2011). Dynamic QTL analysis of linolenic acid content in different developmental stages of soybean seed. *Theor. Appl. Genet.* **122**(8): 1481-1488.

Harker, F., Stec, M., Hallett, I. and Bennett, C. (1997). Testure of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biol. Technol.* **11**: 63-72.

He, F. J., Nowson, C. A. and MacGregor, G. A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet* **367**(9507): 320-326.

Illa, E., Eduardo, I., Audergon, J., Barale, F., Dirlewanger, E.*, et al.* (2011). Saturating the Prunus (stone fruits) genome with candidate genes for fruit quality. *Mol. Breed.* **28**(4): 667-682.

Illa, E., Lambert, P., Quilot, B., Audergon, J., Dirlewanger, E.*, et al.* (2009). Linkage map saturation, construction, and comparison in four populations of Prunus. *J Horticultural Sci Biotechnol ISAFRUIT Spec Issue* **84**: 168-175.

Jiang, F., Wang, Y., Sun, H., Yang, L., Zhang, J. and Ma, L. (2013a). Intracellular compartmentation and membrane permeability to sugars and acids at different growth stages of peach. *Sci. Hort.* **161**: 210-215.

Jiang, P., Wan, Z., Wang, Z., Li, S. and Sun, Q. (2013b). Dynamic QTL analysis for activity of antioxidant enzymes and malondialdehyde content in wheat seed during germination. *Euphytica* **190**(1): 75-85.

Jung, S. and Main, D. (2014). Genomics and bioinformatics resources for translational science in Rosaceae. *Plant biotechnology reports* **8**: 49-64.

Kanayama, Y., Dai, N., Granot, D., Petreikov, M., Schaffer, A. and Bennett, A. B. (1997). Divergent fructokinase genes are differentially expressed in tomato. *Plant Physiol.* **113**(4): 1379-1384.

Kanayama, Y., Granot, D., Dai, N., Petreikov, M., Schaffer, A., Powell, A. and Bennett, A. B. (1998). Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. *Plant Physiol.* **117**(1): 85-90.

Kanayama, Y., Kogawa, M., Yamaguchi, M. and Kanahama, K. (2005). Fructose content and the activity of fructose - related enzymes in the fruit of eating - quality peach cultivars and native - type peach cultivars. *J. Jpn.Soc. Hortic. Sci* **74**(6): 431-436.

Keurentjes, J., Sulpice, R., Gibon, Y., Steinhauser, M.-C., Fu, J., Koornneef, M., Stitt, M. and Vreugdenhil, D. (2008). Integrative analyses of genetic variation in enzyme activities of primary carbohydrate metabolism reveal distinct modes of regulation in Arabidopsis thaliana. *Genome Biol.* **9**(5).

King, R. W. and Zeevaart, J. A. D. (1974). Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol.* **53**: 96-103.

Klages, K., Donnison, H., Wünsche, J. and Boldingh, H. (2001). Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. *Funct. Plant Biol.* **28**(2): 131-139.

Klemens, P. A. W., Patzke, K., Deitmer, J., Spinner, L., Le Hir, R.*, et al.* (2013). Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **163**(3): 1338-1352.

Kobashi, K., Gemma, H. and Iwahori, S. (1999). Sugar accumulation in peach fruit as affected by abscisic acid (ABA) treatment in relation to some sugar metabolizing enzymes. *J. Jpn.Soc. Hortic. Sci* **68**(3): 465-470.

Kobashi, K., Gemma, H. and Iwahori, S. (2000). Abscisic acid content and sugar metabolism of peaches grown under water stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **125**(4): 425-428.

Kopka, J., Fernie, A., Weckwerth, W., Gibon, Y. and Stitt, M. (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biol.* **5**(6): 109.

Kortstee, A., Appeldoorn, N., Oortwijn, M. and Visser, R. (2007). Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta* **226**(4): 929-939.

Kruglyak, L. and Lander, E. S. (1995). A nonparametric approach for mapping quantitative trait loci. *Genetics* **139**: 1421-1428.

Labate, J. A., Grandillo, S., Fulton, T. and al., e. (2007). 1- Tomato. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plant*. Kole, C., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **5:** 11-135.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. and Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**(3): R25.

Layne, D. and Bassi, D. (2008). *The peach : botany, production and uses*, CABI.

Lecomte, L., Duffé, P., Buret, M., Servin, B., Hospital, F. and Causse, M. (2004). Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theor. Appl. Genet.* **109**(3): 658-668.

Ledbetter, C., Peterson, S. and Jenner, J. (2006). Modification of sugar profiles in California adapted apricots (*Prunus armeniaca* L.) through breeding with Central Asian germplasm. *Euphytica* **148**: 251-259.

Lerceteau-Köhler, E., Moing, A., Guérin, G., Renaud, C., Petit, A., Rothan, C. and Denoyes, B. (2012). Genetic dissection of fruit quality traits in the octoploid cultivated strawberry highlights the role of homoeo-QTL in their control. *Theor. Appl. Genet.* **124**(6): 1059-1077.

Lescourret, F. and Génard, M. (2005). A virtual peach fruit model simulating changes in fruit quality during the final stage of fruit growth. *Tree Physiol.* **25**(10): 1303-1315.

Levin, I., Gilboa, N., Yeselson, E., Shen, S. and Schaffer, A. (2000). Fgr, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theor. Appl. Genet.* **100**: 256-518.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G. and Durbin, R. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**(16): 2078-2079.

Li, M., Feng, F. and Cheng, L. (2012a). Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PloS one* **7**(3): e33055.

Li, Z. (1984). Peach germplasm and breeding in China. *HortScience* **19**: 348-351.

Lionneton, E., Aubert, G., Ochatt, S. and Merah, O. (2004). Genetic analysis of agronomic and quality traits in mustard (Brassica juncea). *Theor. Appl. Genet.* **109**(4): 792-799.

Lo Bianco, R. and Rieger, M. (2002a). Partitioning of sorbitol and sucrose catabolism within peach fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **127**(1): 115-121.

Lo Bianco, R. and Rieger, M. (2002b). Roles of sorbitol and sucrose in growth and respiration of 'Encore' peaches at the three developmental stages. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **127**(2): 297-302.

Lo Bianco, R., Rieger, M. and Sung, S. J. S. (1999). Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach cultivar 'Encore'. *Tree Physiol.* **19**(2): 103-109.

Lombardo, V., Osorio, S., Borsani, J., Lauxmann, M., Bustamante, C*., et al.* (2011). Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiol.* **157**: 1696-2406.

Ludewig, F. and Flügge, U.-I. (2013). Role of metabolite transporters in source-sink carbon allocation. *Front. Plant Sci.* **4**: 231.

Lunn, J. (2007). Compartmentation in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* **58**(1): 35-47.

Lunn, J. and Furbank, R. (1997). Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. *Planta* **202**(1): 106-111.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F*., et al.* (2004). Genome-wide analysis of arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell Online* **16**(8): 2089-2103.

Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L. and Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD. *Food Chem.* **145**: 784-788.

Manjunath, S., Lee, C., VanWinkle, P. and Bailey-Serres, J. (1998). Molecular and biochemical characterization of cytosolic phosphoglucomutase in maize. Expression during development and in response to oxygen deprivation. *Plant Physiol.* **117**(3): 997-1006.

Martinoia, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.* **58**(1): 83-102.

Martinoia, E., Meyer, S., De Angeli, A. and Nagy, R. (2012). Vacuolar transporters in their physiological context. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**: 183-213.

Mazerolles, G., Boccard, J., Hanafi, M. and Rudaz, S. (2011). Analysis of experimental design with multivariate response: A contribution using multiblock techniques. *Chemometrics Intellig. Lab. Syst.* **106**(1): 65-72.

Michaels, S., John, M. and Amasino, R. (1994). Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. *BioTechniques* **17**(2): 274:276.

Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A.*, et al.* (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* **452**(7190): 991-996.

Moellering, H. and Gruber, W. (1966). Determination of citrate with citrate lyase. *Anal. Biochem.* **17**: 369-376.

Moing, A., Carbonne, F., Rashad, M. H. and Gaudillère, J. P. (1992). Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiol.* **100**(1878-1884).

Moing, A., Poessel, J. L., Svanella-Dumas, L., Loonis, M. and Kervella, J. (2003). Biochemical basis of low fruit quality of *Prunus davidiana*, a pest and disease resistance donor for peach breeding. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **128**(1): 55-62.

Moing, A., Svanella, L., Rolin, D., Gaudillere, M., Gaudillere, J. P. and Monet, R. (1998). Compositional changes during the fruit development of two peach cultivars differing in juice acidity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **123**(5): 770-775.

Morandi, B., Corelli Grappadelli, L., Rieger, M. and Lo Bianco, R. (2008). Carbohydrate availability affects growth and metabolism in peach fruit. *Physiol. Plant.* **133**: 229-270.

Morell, M. and Copeland, L. (1985). Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiol.* **78**: 149-154

Moriguchi, T., Ishizawa, Y. and Sanada, T. (1990a). Differences in sugar composition in *Prunus persica* fruit and classification by the principal component analysis. *J. Jpn.Soc. Hortic. Sci* **59**(2): 307-312.

Moriguchi, T., Ishizawa, Y., Sanada, T., Teramoto, S. and Yamaki, S. (1991). Role of sucrose synthase and other related enzymes in sucrose accumulation in peach fruit *J. Jpn.Soc. Hortic. Sci* **60**(3): 531-538.

Moriguchi, T., Sanada, T. and Yamaki, S. (1990b). Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **115**(2): 278-281.

Moriguchi, T. and Yamaki, S. (1988). Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus persica*) fruit. *Plant Cell Physiol.* **29**(8): 1361-1366.

Nadwodnik, J. and Lohaus, G. (2008). Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta* **227**(5): 1079-1089.

Nägele, T., Henkel, S., Hörmiller, I., Sauter, T., Sawodny, O., Ederer, M. and Heyer, A. (2010). Mathematical modeling of the central carbohydrate metabolism in Arabidopsis reveals a substantial regulatory influence of vacuolar invertase on whole plant carbon metabolism. *Plant Physiol.* **153**(1): 260-272.

Nägele, T. and Weckwerth, W. (2014). Mathematical modeling reveals that metabolic feedback regulation of SnRK1 and hexokinase is sufficient to control sugar homeostasis from energy depletion to full recovery. *Front. Plant Sci.* **5**: 365.

Nardozza, S., Boldingh, H., Osorio, S., Höhne, M., Wohlers, M.*, et al.* (2013). Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism. *J. Exp. Bot.* **64**(16): 5049-5063.

Neuhaus, H. (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett.* **581**(12): 2223-2226.

Nonis, A., Ruperti, B., Falchi, R. and Casatta, E. (2007). Differential expression and regulation of a neutral invertase encoding gene from peach (*Prunus persica*): evidence for a role in fruit development. *Physiol. Plant.* **129**: 436-446.

Ogundiwin, E. A., Peace, C. P., Gradziel, T. M., Parfitt, D. E., Bliss, F. A. and Crisosto, C. H. (2009). A fruit quality gene map of Prunus. *BMC Genomics* **10**: 587.

Orazem, P., Stampar, F. and Hudina, M. (2011). Quality analysis of 'Redhaven' peach fruit grafted on 11 rootstocks of different genetic origin in a replant soil. *Food Chem.* **124**: 1691-1698.

Orth, J. D., Thiele, I. and Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* **28**(3): 245-248.

Oura, Y., Yamada, K., Shiratake, K. and Yamaki, S. (2000). Purification and characterization of a NAD(+)-dependent sorbitol dehydrogenase from Japanese pear fruit. *Phytochemistry* **54**(6): 567-572.

Pangborn, R. M. (1963). Relative taste intensities of selected sugars and organic acids. *J. Food Sci.* **28**: 726-733.

Pascal, T., Kervella, J., Pfeiffer, F., Sauge, M. and Esmenjaud, D. (1998). Evaluation of the interspecific progeny *Prunus persica* cv Summergrand x *Prunus davidiana* for disease resistance and some agronomic features. *Acta Hort.* **465**: 185-192.

Pascual, L., Xu, J., Biais, B., Maucourt, M., Ballias, P.*, et al.* (2013). Deciphering genetic diversity and inheritance of tomato fruit weight and composition through a systems biology approach. *J. Exp. Bot.* **64**(18): 5737-5752.

Patrick, J. W., Botha, F. C. and Birch, R. G. (2013). Metabolic engineering of sugars and simple sugar derivatives in plants. *Plant Biotechnol. J.* **11**(2): 142-156.

Pavel, E. W. and Dejong, T. M. (1993). Relative growth-rate and its relationship to compositional changes of nonstructural carbohydrates in the mesocarp of developing peach fruits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **118**(4): 503-508.

Petreikov, M., Dai, N., Granot, D. and Schaffer, A. (2001). Characterization of native and yeast-expressed tomato fruit fructokinase enzymes. *Phytochemistry* **58**: 841-847.

Preisser, J. and Komor, E. (1991). Sucrose uptake into vacuoles of sugarcane suspension cells. *Planta* **186**.

Pressey, R. (1969). Role of invertase in the accumulation of sugars in cold-stored potatoes. *Am. Potato J.* **46**: 291-297.

Quilot-Turion, B., Ould-Sidi, M.-M., Kadrani, A., Hilgert, N., Génard, M. and Lescourret, F. (2012). Optimization of parameters of the 'Virtual Fruit' model to design peach genotype for sustainable production systems. *European Journal of Agronomy* **42**(0): 34-48.

Quilot, B., Génard, M., Kervella, J. and Lescourret, F. (2004a). Analysis of genotypic variation in fruit flesh total sugar content via an ecophysiological model applied to peach. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 440-449.

Quilot, B., Kervella, J., Génard, M. and Lescourret, F. (2005). Analysing the genetic control of peach fruit quality through an ecophysiological model combined with a QTL approach. *J. Exp. Bot.* **56**(422): 3083-3092.

Quilot, B., Wu, B., Kervella, J., Genard, M., Foulongne, M. and Moreau, K. (2004b). QTL analysis of quality traits in an advanced backcross between *Prunus persica* cultivars and the wild relative species *P. davidiana*. *Theor Appl Genet* **109**: 884 - 897.

Ranwala, A. P., Suematsu, C. and Masuda, H. (1992). Soluble and wall-bound invertases in strawberry fruit. *Plant Sci.* **84**(1): 59-64.

Rémésy, C. (2008). Sucres simples purifiés versus sucres des fruits, ont-ils les mêmes effets métaboliques? *Phytothérapie* **6**: 91-95.

Reuscher, S., Akiyama, M., Yasuda, T., Makino, H., Aoki, K., Shibata, D. and Shiratake, K. (2014). The sugar transporter inventory of tomato: genome-wide identification and expression analysis. *Plant Cell Physiol.* **55**(6): 1123-1141.

Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A. and Tardieu, F. (2003). Combining Quantitative Trait Loci Analysis and an Ecophysiological Model to Analyze the Genetic

Variability of the Responses of Maize Leaf Growth to Temperature and Water Deficit. *Plant Physiol.* **131**(2): 664-675.

Reymond, M., Muller, B. and Tardieu, F. (2004). Dealing with the genotype×environment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. *J. Exp. Bot.* **55**(407): 2461-2472.

Rios-Estepa, R. and Lange, B. (2007). Experimental and mathematical approaches to modeling plant metabolic networks. *Phytochemistry* **68**(16-18): 2351-2374.

Rizkalla, S. (2010). Health implications of fructose consumption: a review of recent data. *Nutr. Metab.* **7**: 82.

Robertson, J. A., Horvat, J. A., Lyon, B. G., Meredith, F. I., Senter, S. D. and Okie, W. R. (1990). Comparison of quality characteristics of selected yellow- and white-fleshed peach cultivar. *J. Food Sci.* **15**: 323-334.

Rohwer, J. (2012). Kinetic modelling of plant metabolic pathways. *J. Exp. Bot.* **63**(6): 2275-2292.

Rohwer, J. and Botha, F. (2001). Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *The Biochemical journal* **358**(Pt 2): 437-445.

Ross, H. A. and Davies, H. V. (1992). Purification and characterization of sucrose synthase from the cotyledons of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **100**: 1008-1013.

Salazar, J., Ruiz, D., Campoy, J., Sánchez-Pérez, R., Crisosto, C.*, et al.* (2014). Quantitative Trait Loci (QTL) and Mendelian Trait Loci (MTL) Analysis in Prunus: a Breeding Perspective and Beyond. *Plant Mol Biol Rep* **32**(1): 1-18.

Saliba-Colombani, V., Causse, M., Langlois, D., Philouze, J. and Buret, M. (2001). Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 259-272.

Sampietro, A. R., Vattuone, M. A. and Prado, F. E. (1980). A regulatory invertase from sugar cane leaf-sheaths. *Phytochemistry* **19**: 1637-1642.

Schaffer, A. (1999). Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit. *HortScience* **34**(6): 1024-1027.

Schaffer, A. and Petreikov, M. (1997a). Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol.* **113**(3): 739-746.

Schaffer, A. A. and Petreikov, M. (1997b). Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. *Physiol. Plant.* **101**(4): 800-806.

Schauer, N., Semel, Y., Balbo, I., Steinfath, M., Repsilber, D., Selbig, J., Pleban, T., Zamir, D. and Fernie, A. R. (2008). Mode of inheritance of primary metabolic traits in tomato. *The Plant Cell Online* **20**(3): 509-523.

Schauer, N., Semel, Y., Roessner, U., Gur, A., Balbo, I.*, et al.* (2006). Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotech* **24**(4): 447-454.

Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E.*, et al.* (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *Plant J.* **68**(1): 129-136.

Scorza, R. and Okie, W. (1990). Peach (*Prunus*). *Acta Hort.* **290**: 175-231.

Shampine, L. and Reichelt, M. (1997). The MATLAB ODE Suite. *SIAM Journal on Scientific Computing* **18**(1): 1-22.

Sharkey, P. J. and Pate, J. S. (1976). Translocation from leaves to fruits of a legume, studied by a phloem bleeding technique: Diurnal changes and effects of continuous darkness. *Planta* **128**(1): 63-72.

Sheveleva, E. V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R. G. and Bohnert, H. J. (1998). Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase expression in transgenic tobacco: high amounts of sorbitol lead to necrotic lesions. *Plant Physiol.* **117**(3): 831-839.

Shiratake, K., Kanayama, Y. and Yamaki, S. (1997). Characterization of Hexose Transporter for Facilitated Diffusion of the Tonoplast Vesicles from Pear Fruit. *Plant Cell Physiol.* **38**.

Shulaev, V., Sargent, D., Crowhurst, R., Mockler, T., Folkerts, O.*, et al.* (2011). The genome of woodland strawberry (Fragaria vesca). *Nat. Genet.* **43**(2): 109-116.

Soller, M., Brody, T. and Genizi, A. (1976). On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitatie loci in crosses between imbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **47**: 35-39.

Sosinski, B., Sossey-Alaoui, K., Rajapakse, S., Glassmoyer, K., Ballard, R. E., Abbott, A. G., Lu, Z. X., Baird, W. V. and Reighard, G. (1998). Use of AFLP and RFLP markers to create a combined linkage map in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] for use in marker assisted selection. *Acta Hort.* **465**: 61-68.

Steinhauser, M.-C., Steinhauser, D., Koehl, K., Carrari, F., Gibon, Y., Fernie, A. and Stitt, M. (2010). Enzyme activity profiles during fruit development in tomato cultivars and *Solanum pennellii*. *Plant Physiol.* **153**: 80-178.

Stevens, M. A., Kader, A. A., Albright-Holton, M. and Algazi, M. (1977). Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **102**(5): 680-689.

Stitt, M. (1990). Fructose-2, 6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **41**(1): 153-185.

Sulpice, R., Nikoloski, Z., Tschoep, H., Antonio, C., Kleessen, S.*, et al.* (2013). Impact of the carbon and nitrogen supply on relationships and connectivity between metabolism and biomass in a broad panel of arabidopsis accessions. *Plant Physiol.* **162**(1): 347-363.

Sun, Y. D., Liang, Y., Wu, J. M., Li, Y. Z., Cui, X. and Qin, L. (2012). Dynamic QTL analysis for fruit lycopene content and total soluble solid content in a Solanum lycopersicum x S. pimpinellifolium cross. *Gen. Mol. Res.* **11**(4): 3696-3710.

Sun, Z., Li, Y., Zhou, J. and Zhu, S.-H. (2011). Effects of exogenous nitric oxide on contents of soluble sugars and related enzyme activities in 'Feicheng' peach fruit. *J. Sci. Food Agric.* **91**: 1795-2595.

Sweetlove, L. and Ratcliffe, R. (2011). Flux-balance modeling of plant metabolism. *Front. Plant Sci.* **2**: 38.

Tanase, K. and Yamaki, S. (2000). Sucrose synthase isozymes related to sucrose accumulation during fruit development of japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **69**(6): 671-676.

Tardieu, F. (2003). Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends Plant Sci.* **8**(1): 9-14.

Tardieu, F., Reymond, M., Muller, B., Granier, C., Simonneau, T., Sadok, W. and Welcker, C. (2005). Linking physiological and genetic analyses of the control of leaf growth under changing environmental conditions. *Crop and Pasture Science* **56**(9): 937-946.

Tauzin, A. S., Sulzenbacher, G., Lafond, M., Desseaux, V., Reca, I. B.*, et al.* (2014). Functional characterization of a vacuolar invertase from Solanum lycopersicum: post-translational regulation by N-glycosylation and a proteinaceous inhibitor. *Biochimie* **101**: 39-49.

The International Peach Genome Initiative (2013). The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.* **45**(5): 487-494.

Thévenot, C., Simond-Côte, E., Reyss, A., Manicacci, D., Trouverie, J., Le Guilloux, M., Ginhoux, V., Sidicina, F. and Prioul, J.-L. (2005). QTLs for enzyme activities and soluble carbohydrates involved in starch accumulation during grain filling in maize. *J. Exp. Bot.* **56**(413): 945-958.

Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**(7400): 635-641.

Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. and Leirós, M. C. (2007). Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biol. Biochem.* **39**(1): 311-319.

Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A. and Dubcovsky, J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* **314**(5803): 1298-1301.

Ueki, S. and Citovsky, V. (2001). RNA commutes to work: regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules. *Bioessays* **23**(12): 1087-1090.

Uys, L., Botha, F., Hofmeyr, J.-H. S. and Rohwer, J. (2007). Kinetic model of sucrose accumulation in maturing sugarcane culm tissue. *Phytochemistry* **68**: 2375-2392.

Van Ooijen, J. (2011). Multipoint maximum likelihood mapping in a full-sib family of an outbreeding species. *Genetics research* **93**(05): 343-349.

Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A.*, et al.* (2010). The genome of the domesticated apple (Malus × domestica Borkh.). *Nat. Genet.* **42**(10): 833-839.

Verde, I., Bassil, N., Scalabrin, S., Gilmore, B., Lawley, C. and al, e. (2012). Development and evaluation of a 9 K SNP array for peach by internationally coordinated SNP detection and validation in breeding germplasm. *PLoS One* **7**(4): e35668.

Vizzotto, G., Pinton, R., Varanini, Z. and Costa, G. (1996). Sucrose accumulation in developing peach fruit. *Physiol. Plant.* **96**(2): 225-230.

Voorrips, R. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* **93**(1): 77-78.

Voster, D. J. and Botha, F. (1998). Partial purification and characterisation of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry* **49**(3): 651-655.

Wei, X., Liu, F., Chen, C., Ma, F. and Li, M. (2014). The *Malus domestica* sugar transporter gene family: identifications based on genome and expression profiling related to the accumulation of fruit sugars. *Front. Plant Sci.* **5**: 569.

White, J. W. and Hoogenboom, G. (1996). Simulating effects of genes for physiological traits in a process-oriented crop model. *Agron. J.* **88**: 416-422.

Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O.*, et al.* (2010). Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **154**(2): 665-677.

Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S., Schmidt, U., Martinoia, E. and Neuhaus, H. (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant cell* **18**(12): 3476-3490.

Wu, B., Quilot, B., Génard, M., Kervella, J. and Li, S. (2005). Changes in sugar and organic acid concentrations during fruit maturation in peaches, *P. davidiana* and hybrids as analyzed by principal component analysis. *Sci. Hort.* **103**: 429-868.

Wu, B., Quilot, B., Génard, M., Li, S., Zhao, J., Yang, J. and Wang, Y. (2012). Application of a SUGAR model to analyse sugar accumulation in peach cultivars that differ in glucose–fructose ratio. *J. Agric. Sci.* **150**: 53-63.

Wu, B., Quilot, B., Kervella, J., Génard, M. and Li, S. (2003). Analysis of genotypic variation of sugar and acid contents in peaches and nectarines through the Principle Component Analysis. *Euphytica* **132**: 375-759.

Yakushiji, H., Nonami, H., Fukuyama, T., Ono, S., Takagi, N. and Hashimoto, Y. (1996). Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in Satsuma mandarin fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **121**(3): 466-472.

Yamaki, S. and Ino, M. (1992). Alteration of cellular compartmentation and membrane permeability to sugars in immature and mature apple fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **117**(6): 951-954.

Yamaki, S. and Moriguchi, T. (1989). Seasonal fluctuation of sorbitol-related enzymes and invertase activities accompanying maturation of japanese pear (*Pyrus serotina* Rehder var. culta Rehder) fruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **57**(4): 602-607.

Yang, Z., Wang, T., Wang, H., Huang, X., Qin, Y. and Hu, G. (2013). Patterns of enzyme activities and gene expressions in sucrose metabolism in relation to sugar accumulation and composition in the aril of *Litchi chinensis* Sonn. *J. Plant Physiol.* **170**(8): 731-740.

Yativ, M., Harary, I. and Wolf, S. (2010). Sucrose accumulation in watermelon fruits: genetic variation and biochemical analysis. *J. Plant Physiol.* **167**(8): 589-596.

Yin, X., Chasalow, S. C., Dourleijn, C. J., Stam, P. and Kropff, M. J. (2000). Coupling estimated effects of QTLs for physiological traits to a crop growth model: predicting yield variation among recombinant inbred lines in barley. *Heredity* **85**: 539-549.

Yousef, G. G. and Juvik, J. A. (2001). Evaluation of breeding utility of a chromosomal segment from Lycopersicon chmielewskii that enhances cultivated tomato soluble solids. *Theor. Appl. Genet.* **103**(6-7): 1022-1027.

Zeng, L., Wang, Z., Vainstein, A., Chen, S. and Ma, H. (2011). Cloning, localization, and expression analysis of a new tonoplast monosaccharide transporter from *Vitis vinifera* L. *J. Plant Growth Regul.* **30**: 199-212.

Zhang, C., Shen, Z., Zhang, Y., Han, J., Ma, R., Korir, N. K. and Yu, M. (2013). Cloning and expression of genes related to the sucrose-metabolizing enzymes and carbohydrate changes in peach. *Acta Physiol. Plant.* **35**: 589-602.

Zhang, H. P., Wu, J. Y., Qin, G. H., Yao, G. F., Qi, K. J., Wang, L. F. and Zhang, S. L. (2014a). The role of sucrose-metabolizing enzymes in pear fruit that differ in sucrose accumulation. *Acta Physiol. Plant.* **36**: 71-77.

Zhang, L.-Y., Peng, Y.-B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y.-F.*, et al.* (2004). Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol.* **135**(1): 574-586.

Zhang, L., Xiong, Z.-t. T., Xu, Z.-r. R., Liu, C. and Cai, S.-w. W. (2014b). Cloning and characterization of acid invertase genes in the roots of the metallophyte Kummerowia stipulacea (Maxim.) Makino from two populations: Differential expression under copper stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **104**: 87-95.

Zhang, M. and Li, Z. (2005). A comparison of sugar-accumulating patterns and relative compositions in developing fruits of two oriental melon varieties as determined by HPLC. *Food Chem.* **90**: 785-790.

Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., Zhao, F., Huang, B.*, et al.* (2012). The genome of *Prunus mume*. *Nature communications* **3**: 1318.

Zhang, X.-Y., Wang, X.-L., Wang, X.-F., Xia, G.-H., Pan, Q.-H., Fan, R.-C., Wu, F.-Q., Yu, X.-C. and Zhang, D.-P. (2006). A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiol.* **142**(1): 220-232.

Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza, A., Domínguez, P., Medina, J. J., Valpuesta, V., Denoyes-Rothan, B., Sánchez-Sevilla, J. F. and Amaya, I. (2011). Quantitative trait loci and underlying candidate genes controlling agronomical and fruit quality traits in octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Theor. Appl. Genet.* **123**(5): 755-778.

RESUME : La qualité du fruit est un caractère multicritère avec des relations antagonistes fréquentes. La perception de la qualité du fruit dépend fortement de l'équilibre entre les teneurs en sucres et acides. Parmi les 3 sucres dits majeurs dans les fruits que sont le saccharose, le glucose et le fructose, le fructose présente un pouvoir sucrant plus important et sa concentration est le facteur qui affecte le plus le goût sucré du fruit. L'objectif de cette thèse est d'analyser le métabolisme des sucres chez la pêche d'un point de vue métabolique, enzymatique et génétique et d'intégrer dans un modèle mathématique l'ensemble des informations obtenues. Ce travail porte plus particulièrement sur la mise en évidence de l'effet d'une perturbation de la teneur en fructose sur l'ensemble du métabolisme des sucres ainsi que sur la compréhension des mécanismes à l'origine de ce phénotype appelé 'peu de fructose'. Une caractérisation biochimique quasi-exhaustive du métabolisme des sucres a été réalisée au cours du développement du fruit. Pour cela 6 métabolites et 12 capacités enzymatiques ont été mesurés chez 106 génotypes d'une population issue d'un croisement interspécifique. Cette étude a révélé une grande stabilité des capacités enzymatiques malgré l'importante variation des métabolites. Sur la base des données de 10 des génotypes, un modèle métabolique dynamique permettant de simuler l'accumulation des sucres au cours du développement du fruit a été développé et validé. Ce modèle permet de simuler des phénotypes contrastés et aide ainsi à l'exploration des mécanismes sous-jacents au phénotype 'peu de fructose'. La caractérisation biochimique de la population a également fait l'objet d'une recherche de QTL. Cette étude a mis en exergue l'inconstance de l'effet de certains loci au cours du développement du fruit ainsi que des co-localisations de QTL de métabolites et capacités enzymatiques et de gènes candidats. Cette recherche a également confirmé la région génomique responsable du phénotype 'peu de fructose' au sein de laquelle un gène candidat fonctionnel a été mis en évidence. Il s'agit d'un gène homologue au transporteur vacuolaire exportateur de fructose (SWEET17) découvert récemment chez *Arabidopsis*. Une analyse de ce gène a été engagée afin de valider sa fonction et son implication dans le phénotype 'peu de fructose'. Grâce à l'intégration des informations obtenues sur le contrôle génétique du métabolisme des sucres dans le modèle métabolique, une perspective de cette thèse sera de simuler les concentrations en sucres de génotypes virtuels ayant différentes combinaisons d'allèles. On pourra alors optimiser les combinaisons d'allèles pour augmenter les concentrations en sucres dans la pêche, ce qui donnera sans doute de nouvelles pistes à l'innovation variétale.
Mots-clés : Métabolisme des sucres, qualité du fruit, déterminisme génétique, modélisation, *P. persica*

ABSTRACT : Fruit quality is a multi-criteria character with frequent antagonistic relationships. The perception of the fruit quality is highly dependent on the balance between the levels of sugars and acids. Among the three so-called major sugars in fruit that are sucrose, glucose and fructose, fructose is the sweetest and its concentration is the factor that most affects the fruit sweetness. The objective of the present thesis is to analyze the sugar metabolism in peach fruit from metabolic, enzymatic and genetic aspects and integrate into a mathematical model all information obtained. This work focuses on the identification of the effect of a low fructose concentration on the whole sugar metabolism and the understanding of the mechanisms responsible of this phenotype called 'low-fructose-to-glucose-ratio'. A nearly exhaustive biochemical characterization of sugar metabolism was conducted along peach fruit development. For this, 6 metabolites and 12 enzyme capacities were assayed in 106 genotypes of a population derived from an interspecific cross. This study revealed a high stability of the enzyme capacities despite large variations of metabolites. Based on data from 10 genotypes, a kinetic metabolic model that simulates the sugar accumulation in fruit was developed and validated. This model simulates contrasting phenotypes and helps in understanding the underlying mechanisms of the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. The biochemical characterization of the population gave the opportunity to perform a QTL research. It highlighted the instability of the effect of certain loci along fruit development and QTL collocations of metabolites, enzyme capacities and candidate genes. It also confirmed the genomic region responsible for the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype within which a functional candidate gene was identified. It is a gene homologous to fructose vacuolar transporter (SWEET17) recently discovered in Arabidopsis. An analysis of this gene was engaged to validate its function and its responsibility in the 'low-fructose-to-glucose-ratio' phenotype. In the future, the integration of the genetic control into the metabolic model will allow simulating virtual genotypes with different combinations of alleles and predict their sugar content. Optimizing allele combinations to increase sugar concentrations in peach fruit will undoubtedly give new breeding opportunities.

Key words: Sugar metabolism, fruit quality, genetic control, modelling, *P. persica*