



HAL
open science

Modification du métabolisme des caroténoïdes en réponse aux stress biotique et abiotique chez la carotte

Florent Perrin

► **To cite this version:**

Florent Perrin. Modification du métabolisme des caroténoïdes en réponse aux stress biotique et abiotique chez la carotte. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2016. Français. NNT : 2016ANGE0027 . tel-01457230

HAL Id: tel-01457230

<https://theses.hal.science/tel-01457230>

Submitted on 6 Feb 2017

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.

Thèse de Doctorat

Florent PERRIN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Vie, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer*
Discipline : *Biochimie et biologie moléculaire (64), Physiologie (66)*

Spécialité : *Biologie cellulaire et moléculaire végétale*
Unité de recherche : UMR1345 - Institut de Recherche en Horticulture et Semences
Soutenu le 25 Novembre 2016
Thèse N° : 135632

Modification du métabolisme des caroténoïdes en réponse aux stress biotique et abiotique chez la carotte

JURY

Rapporteurs :	Alain BOUCHEREAU , Professeur, Université de Rennes 1 Rémi LEMOINE , Directeur de Recherche, CNRS, Poitiers
Examineurs :	Anis LIMAMI , Professeur, Université d'Angers Marie-Josèphe AMIOT-CARLIN , Directrice de Recherche, INRA, Marseille Soazig LE LAY , Chargée de Recherche, INSERM, Angers
Directeur de thèse :	Emmanuel GEOFFRIAU , Maître de Conférences HDR, Agrocampus-Ouest, Angers
Encadrant de thèse :	Didier PELTIER , Maître de Conférences HDR, Université d'Angers

REMERCIEMENTS

Il est maintenant temps de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à faire de ces trois ans de thèse une belle expérience inoubliable.

Tout d'abord je remercie Alain Bouchereau et Rémi Lemoine qui ont accepté d'être rapporteurs ce travail de thèse ainsi que les examinateurs Anis Limami, Marie-Josèphe Amiot-Carlin et Soazig Le Lay. Merci à vous d'avoir accepté de me lire.

Je remercie également les membres du comité de suivi de thèse, Antoine Gravot, Soazig Le Lay, Jean-Luc Courthaudon et particulièrement Yves Gibon pour nous avoir permis de réaliser les dosages d'amidon.

Un énorme merci à mes chefs : Emmanuel, Séverine et Didier. Merci pour votre confiance ainsi que la liberté que vous m'avez accordée qui m'a vraiment permis de m'épanouir dans ce travail de recherche.

Merci Didier d'avoir porté, pendant plus de deux ans, la casquette de directeur de thèse. Tu as toujours été présent pour les choses qui fâchent : les papiers et signatures... Merci pour toutes ces questions qui m'ont fait trembler lors de nos réunions... et pour ton idée d'analyser l'expression du gène *GGPPs*. Merci également à tes secrétaires d'avoir rempli les doodles dans un délai record (en même temps il n'y avait pas beaucoup de créneaux à cocher). Après t'être fait appeler Monsieur le Vice-Président, tu pourras peut-être te faire appeler Monsieur Carototron d'ici quelques temps... ?

Merci à toi Séverine d'avoir toujours été présente dès le début de la thèse. Merci pour tous tes conseils dans l'analyse des résultats ainsi que pour les présentations orales. Je garderai en mémoire nos excursions à Paris et Limoges avec ce qui était certainement la plus vieille voiture de l'INRA... Merci d'avoir initié la collaboration avec Ralf Welsch pour les analyses du xylème et du phloème. Merci également d'avoir co-encadré les stagiaires avec moi. Merci de m'avoir appris autant de choses en biochimie et H(e)P(e)L(e)C. Je te souhaite le meilleur dans ton nouveau poste.

Merci à toi Emmanuel d'avoir porté toutes les casquettes : encadrant et directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé carte blanche pour exprimer mes idées à

travers les différentes publiés et le manuscrit. Merci également pour toutes les corrections et suggestions. J'ai également beaucoup appris en agronomie grâce à toi. Merci de m'avoir permis d'aller en congrès à Zurich ! Je pense qu'on peut dire que l'on a formé un bon petit binôme. J'espère qu'un jour tu feras, de tes propres mains, un mutant de carotte !!!

Je remercie tous les membres de l'équipe QuaRVeg. Un grand merci à toi Cécile de m'avoir aidé à faire tous les broyages, toutes les pesées, toutes les extractions de caroténoïdes !!! Merci également pour ton aide pour les extractions d'ARN. Merci pour toutes les discussions, ta bonne humeur et ta gentillesse au quotidien. Merci à toi Seb pour la mise en place, le suivi des essais en tunnel et les nombreux allers-retours que tu as faits lors des prélèvements. Merci Anita pour tes conseils en bio mol et les nombreux services que tu m'as rendu parfois même à la dernière minute. Merci Claire pour les analyses d'hormones sur tous nos échantillons à Versailles. Merci Mathilde pour avoir organisé la réunion concernant l'article xylème/phloème et de m'avoir impliqué dans l'organisation du congrès Carrot. Merci Claude d'avoir mis l'ambiance au labo et de m'avoir accompagné à Zurich c'était vraiment cool. Merci Valérie pour les nombreuses discussions autour de ma patrie perdue alias St Gaultier. Merci pour ton aide pour l'inoculation lors de la deuxième année... on a eu chaud dans ce tunnel en plein soleil. Merci également à Romain, Pascal, Julia, Latifa, Linda et Marie Hélène pour votre aide lors des prélèvements et les discussions toxines très intéressantes.

Merci à Dorine, Tricy, Laura et Diana pour leur aide et leurs efforts inconditionnels pendant leur stage. J'ai vraiment été content d'avoir pu bosser avec vous surtout sur les analyses de résultats, la rédaction du rapport et la préparation de la soutenance. J'espère que mon aide vous a été utile car la vôtre été primordiale pour ce travail. Bonne continuation pour la suite !

Je remercie toute l'équipe d'enseignement de m'avoir permis à trois reprises d'être moniteur : Catherine, Marie-Christine, Jérémy et Romain. Merci beaucoup pour votre confiance j'ai vraiment adoré cette expérience. Merci pour les nombreuses astuces et votre aide dans les moments de doute et d'urgence. Bon courage à Didier qui prend le relai après quelques années d'éloignement. Peut-être que si je reviens dans quelques années j'aurais de nouveau la « chance » de voir une PCR Crocodile que l'on pourrait presque appeler PCR Ichtyosaures. Bon courage à tous les étudiants, que j'ai pu croiser entre un 3/4 1/4 et un 9/3/3/1, dans la poursuite de leur projet professionnel.

Je remercie également Muriel, Annie et Laurence du plateau ANAN. Merci Muriel et Annie de vous êtes cassées la tête avec le robot. Je suis presque sûr que vous pourriez programmer le robot les yeux fermés !! Merci au robot de ne pas avoir été trop capricieux. Merci également à Pascale Satour pour son aide pour les dosages de sucres. Merci à Grégory Mouille et Sylvie Citerne de la plateforme de Chimie-Métabolisme de Versailles, Duyên Prodhomme et Yves Gibon de la plateforme Métabolome de Bordeaux et Philippe Hugueney du plateau d'analyse du métabolisme secondaire de la vigne de Colmar.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler dans le cadre du projet INUMAMET. Merci Marie-Charlotte pour toutes ces discussions autour du projet, des manips et du badminton !!! Merci de m'avoir épaulé pour les manips c'était vraiment sympa. Bon courage pour la suite ! Merci Mathilde pour ton aide pour l'analyse des données je pense que le clustering et l'ACP n'ont plus de secret pour toi !!! Merci également à Catherine, Naina et Mehdi pour les longues discussions autour du végétal-santé.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisés au quotidien à la fois à Agrocampus-Ouest mais également les personnes du R+1 du campus du végétal : Loly, Denis, Mathieu, Brice (pour nos longues discussions jeux vidéo), Camille (pour nos discussion stats et ton aide pour certains scripts assez obscurs), Vanessa, Laurent, Julien, Jérémy, Hanaé, Matthieu & Marie Noëlle (pour les conseils en expression de gènes) et bien d'autres !!! Merci à vous tous pour la bonne ambiance et les discussions pendant les pauses du quotidien !!

Enfin voici le temps de remercier ceux qui m'ont permis de tenir au quotidien et qui m'ont m'encourager pendant ces trois années.

Tout d'abord, merci à tous mes compagnons de badminton : Seb & Seb, Fé, Eric, Geoffrey, Boris, François, Christelle, Marion, Camille, Emna, Claude et Adrien. Les séances de bad le mardi et le jeudi ont vraiment été nécessaires pour moi. Merci à tous pour ces nombreux volants échangés !!

Merci Claude pour les soirées barbecue. T'es vraiment un chef étoilé !! On s'est quand même bien marré à Zurich avec nos traditionnelles chansons du matin « coller la petite » et

« youhououuuu ». Merci d'être passé pendant la journée au bureau ça permettait de décrocher un peu. Bon courage pour la fin de thèse n'oublie pas, la force de QuaRVeg est en toi !!!

Adrien, merci de m'avoir aidé à casser Camille de temps en temps même si je pense qu'avec le temps j'excelle dans ce domaine. Par contre arrête de cacher et changer de place toutes mes affaires de bureau... passer 1h à chercher ses clés de voiture alors qu'elles sont à 5 cm de moi... c'est assez énervant. Merci de m'avoir accompagné boire le café tous les matins pendant la fin de rédaction du manuscrit.

Merci Morgan pour les discussions Japon et jeux vidéo. Merci de m'avoir fait adoré les sushis... je ne peux plus m'en passer maintenant !

Merci Nancy d'avoir partagé le bureau avec moi pendant les 6 premiers mois après le déménagement. Encore une fois félicitations pour U. Profite un maximum !

Emna, on aura vraiment bien rigolé pendant ces trois ans. On en aura passé du temps à discuter de jeux.... D'ailleurs tu n'aurais pas un dragon à m'envoyer ? Tu crois que c'est bien ça ? Et toutes ces vidéos.... « Celui-là papa » « le meurtre parfait » et tant d'autres.... Les fous rires que l'on a eus en se moquant de Camille... et il y avait de quoi.... Le coup de la tasse de thé ou bien frapper à la porte pour sortir du bureau... normal quoi ! Merci pour tous les petits gâteaux et les crêpes au Nutella. Désolé d'être parti du bureau... heureusement qu'il y avait « On ne rentre pas tard » ! Merci pour cette bonne humeur que tu as distillé au quotidien.

Camille, merci d'être venue avec moi au campus. On a vraiment bien rigolé. « Camille, c'est du sucre ça non ? » « Juste une cuillère », « Ammmaaaaaawolleeeee ».... Merci de m'avoir soutenu du début à la fin et surtout pendant les moments de craquage. Tu as toujours été là au quotidien lorsque j'avais besoin de conseils. Merci pour les corrections du manuscrit. Je pense que l'on a en commun la meilleure passion : les pokémons. C'est vraiment le meilleur jeu du monde !! Merci pour les petits goûters de fin de rédaction ! Je pense que l'on ne peut pas avoir meilleure pote de bureau et cela va beaucoup me manquer...

Camille et Emna, vous débordez de joie de vivre et ça fait vraiment du bien. Merci infiniment pour tous ces moments de complicité !!

Je remercie tous les amis des soirées au D'Lices Pub : Fé, Eric, Aurélie, Quentin, Camille, Emna, Mathieu, Gaëtan et Aurélie !! Ces soirées étaient simplement géniales et j'espère que l'on en fera encore beaucoup d'autres.

Il est maintenant temps de remercier mes parents qui m'ont encouragé depuis le début. Merci d'avoir toujours été présents pour moi et de m'avoir soutenu surtout dans les moments difficiles. Les WE dans l'Indre m'ont vraiment fait du bien. Merci d'être passés lorsque vous en aviez l'occasion pour nous changer les idées.

Ce travail est pour vous.

Pour finir je remercie du fond du cœur ma Ninette. Tu as toujours été là lorsque j'en avais besoin et tu m'as toujours poussé à aller de l'avant. Merci pour tous tes conseils et ton aide. Merci de m'avoir supporté tous les jours et surtout dans les moments d'exaspération. Je pense que l'on s'est super bien serrés les coudes pour cette dernière ligne droite. Merci infiniment.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE 1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 1

I.	Les carotenoides : pigments essentiels du metabolisme secondaire des plantes.....	4
I.1.	Les métabolites secondaires : composés essentiels des plantes.....	4
I.2.	Les caroténoïdes : des métabolites importants du vivant	8
I.3.	Métabolisme des caroténoïdes	10
II.	LA CAROTTE : UN LEGUME-RACINE AUX FORTES TENEURS EN CAROTENOIDES	20
II.1.	L'histoire de la carotte cultivée : impact de la sélection anthropique	20
II.2.	Un modèle original pour l'étude de l'accumulation des caroténoïdes	22
II.3.	Régulation de l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte	25
III.	Impact des facteurs de l'environnement sur l'accumulation des carotenoides .	29
III.1.	Nature des facteurs environnementaux	29
III.2.	Impact des stress sur l'accumulation des caroténoïdes chez les plantes	33
III.3.	Impact des stress sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte.....	35
III.4.	Etude multifactorielle : un enjeu majeur encore méconnu	38
IV.	Objectifs et démarche expérimentale	41
IV.1.	Objectif général de l'étude.....	41
IV.2.	Premier axe de recherche : impact d'environnements contrastés	43
IV.3.	Deuxième axe de recherche : effets de stress biotique et abiotique	43
IV.3.	Troisième axe de recherche : régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans le xylème et le phloème de racine de carotte	44

CHAPITRE 2 INFLUENCE DE LA PERIODE DE CULTURE SUR L'ACCUMULATION DES CAROTENOIDES CHEZ LA CAROTTE 46

I. Introduction..... 47

II. Differential Pigment Accumulation in Carrot Leaves and Roots during Two Growing Periods..... 49

 Abstract..... 50

 Introduction..... 51

 Materials and methods 52

 Results..... 54

 Discussion 57

 Conclusion 59

 Acknowledgments 60

SUPPORTING INFORMATION 60

REFERENCES 61

CHAPITRE 3 IMPACT D'UN STRESS BIOTIQUE ET D'UN STRESS ABIOTIQUE SEULS OU EN COMBINAISON SUR L'ACCUMULATION DES CAROTENOÏDES CHEZ LA CAROTTE 65

I. Introduction..... 66

II. Combined biotic and abiotic stresses impact carotenoid content of carrot leaves and roots 68

 Abstract..... 69

 Introduction..... 70

 Material and Methods 72

 Results..... 75

 Discussion 78

 Conclusion 81

 Acknowledgments 82

 References 83

CHAPITRE 4 EVOLUTION DE LA TENEUR EN CAROTENOÏDES DANS LE XYLEME ET LE PHLOEME DE CAROTTE EN REPOSE AU STRESS HYDRIQUE..... 86

I. Introduction.....	87
II. Carotenoid gene expression explain difference of carotenoid accumulation in carrot root tissues	89
Abstract.....	90
Introduction.....	91
Materiel and methods	92
Results.....	95
Discussion	97
Conclusion	102
Acknowledgments	102
References	104
III. Perspectives de recherche : ETUDE DE GENOTYPES BICOLORES.....	107
III.1. Objectif et matériel végétal utilisé pour l'étude.....	107
III.2. Résultats & Perspectives.....	107

CHAPITRE 5 DISCUSSION GENERALE..... 109

I. La racine : un modèle original et méconnu pour l'accumulation des caroténoïdes	110
I.1. Une accumulation qui se déroule tout au long du cycle de développement.....	110
I.2. Intérêt de la racine de carotte pour l'étude du xylème et du phloème.....	112
I.3. La carotte à lycopène : un cas particulier.....	113
II. Organes sources <i>versus</i> organes puits chez la carotte : deux modes de fonctionnement bien distincts pour l'accumulation des caroténoïdes.....	114
III. Les teneurs totales en caroténoïdes : un bon indicateur du fonctionnement de la voie ?	115
IV. Quel niveau de régulation peut expliquer les variations de teneurs en caroténoïdes en réponse aux stress ?	116

V. Impact des stress combinés : résultante d'un stress majeur chez la carotte	118
VI. Interaction génotype-environnement : quelles sont conséquences pour l'optimisation des conduites culturales	119
VII. Quel impact en santé humaine ?.....	121
VII.1 Projet « Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques (INUMAMET) » : objectifs et contexte d'étude	121
VII.2 Principaux résultats et discussion	122
CONCLUSION GENERALE	124
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
ANNEXES	142
Annexe I : Figures supplémentaires du premier article	143
Annexe II : Figures supplémentaires du deuxième article	146

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A. Dauci</i> : <i>Alternaria dauci</i>	LCYE : lycopène ϵ -cyclase
AAO3 : Abscissique aldéhyde oxydase 3	MeJA : jasmonate de méthyle
ABA : acide abscissique	MEP : méthylérythritol phosphate
ABA2 : ABA alcool déshydrogénase 2	MF : matière fraîche
ABRE : ABA binding response element	MS : matière sèche
ADN : acide désoxyribonucléique	MVA : acide mévalonique
ARN : acide ribonucléique	NCED : 9-cis époxycaroténoïde dioxygénase
BOS1 : <i>Botrytis</i> susceptible 1	O ₂ : (di)oxygène
CCD : caroténoïde clivage dioxygénase	PAL : phénylalanine ammonialyase
CCS : capsanthine-capsorubine synthase	PDS : phytoène désaturase
Chl : chlorophylle	PCRq : réaction de polymérisation en chaîne quantitative
CHS : chalcone synthase	PIF : phytochrome interacting factor
CHXB : carotène β -hydroxylase	PSY : phytoène synthase
CHXE : carotène ϵ -hydroxylase	PTOX : plastid terminal oxydase
cM : centimorgan	QTL : locus lié à un caractère quantitatif
CRTISO : caroténoïde isomérase	RIN : ripening inhibitor
DMAPP : diméthylallyl pyrophosphate	ROS : espèces réactives de l'oxygène
DXS : 1-desoxyxylulose-5-phosphate synthase	SA : acide salicylique
ERE : éthylène response element	SGR : stay-green
GARE : GA-response-element	SNP : polymorphismes d'un seul nucléotide
GBSS : granule-bound starch synthase	SS : stilbène synthase
GGPPs : géranylgeranyl pyrophosphate synthase	VDE : violaxanthine dé-époxydase
GxE : interaction génotype – environnement	ZDS : ζ -carotène désaturase
IPP : isopentenyl-pyrophosphate	ZEP : zéaxanthine époxydase
JA : acide jasmonique	Z-ISO : ζ -carotène isomérase
LCYB : lycopène β -cyclase	

INTRODUCTION GENERALE

Depuis de nombreuses années, le marché de la carotte a connu une importante uniformisation si bien qu'aujourd'hui la racine de carotte est essentiellement décrite comme charnue et de couleur orange. Cependant, on observe un regain d'intérêt pour les variétés anciennes présentant des couleurs de racine différentes et il n'est plus étonnant de trouver des carottes blanches, jaunes ou bien violettes dans le commerce.

Cette diversité de couleur est essentiellement la résultante de teneurs en caroténoïdes, pigments du métabolisme secondaire des plantes, dans la racine de carotte. Ainsi, les génotypes orange présentent de fortes teneurs en α et β -carotène, les génotypes jaunes en lutéine, les génotypes rouges en lycopène tandis que les génotypes blancs n'accumulent pas de caroténoïdes dans la racine. La coloration violette des racines s'explique quant à elle, par la présence d'anthocyanes. De plus, au sein d'un même type coloré, de fortes différences de teneurs en caroténoïdes totaux peuvent être observées.

L'accumulation de ces pigments dans la racine a conduit, dans un contexte actuel où la santé humaine est au cœur des préoccupations, à donner à la carotte une image de légume santé, elle est ainsi recommandée dans le cadre d'une alimentation saine et équilibrée. Les caroténoïdes, précurseurs de la vitamine A, sont en effet impliqués dans la prévention de certaines maladies métaboliques et une carence alimentaire en caroténoïdes peut provoquer une dégénérescence maculaire ou des troubles de la croissance.

Ces composés sont également essentiels à la physiologie de la plante. Dans les organes photosynthétiques tels que les feuilles, la fonction des caroténoïdes est primordiale. Ces pigments sont associés aux chlorophylles et permettent par complémentarité d'absorption du spectre lumineux, de capter l'énergie lumineuse. Ils sont également impliqués dans la photoprotection lors de stress lumineux intenses.

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est déjà bien établie et la régulation de leur accumulation passe par plusieurs échelles (variants alléliques, expression de gènes...). Si les principaux mécanismes contrôlant l'accumulation des caroténoïdes dans les feuilles et les racines de carotte sont de mieux en mieux connus, la connaissance relative à l'impact de facteurs environnementaux reste très limitée. Depuis de nombreuses années, les études ont montré que des stress biotiques et/ou abiotiques affectaient la croissance des plantes et par conséquent leurs rendements. Mais depuis plusieurs années, les études se sont plus particulièrement focalisées sur les mécanismes de défense des plantes aux contraintes environnementales. Cependant, peu concernent l'impact des stress sur les qualités nutritionnelle et organoleptique des productions

végétales. Jusqu'à présent, seules quelques études ont montré que différentes techniques d'irrigation, de fertilisation ainsi que différents lieux de culture pouvaient moduler les teneurs en caroténoïdes dans la racine de carotte. La nécessité de préciser la connaissance de l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur les teneurs en caroténoïdes de la carotte devient alors un enjeu majeur dans une perspective de maîtrise de la qualité. Depuis quelques années, un intérêt tout particulier pour l'étude de la combinaison de stress a émergé. En effet, les plantes en culture sont confrontées simultanément à plusieurs facteurs environnementaux : l'attaque d'un pathogène et une contrainte agroclimatique telle qu'une restriction hydrique ou des températures trop faibles. De plus, l'effet de combinaisons de stress sur le développement de la plante est méconnu, et il reste encore beaucoup de mécanismes à comprendre concernant les effets de conditions multi-stress.

Dans ce travail de thèse, l'objectif est donc à déterminer quel est l'impact de facteurs biotiques et abiotiques, seuls ou en combinaison, sur les teneurs en caroténoïdes d'un panel diversifié de génotypes de carotte. Cette étude permettra d'une part de consolider les connaissances concernant la variabilité due au génotype mais plus particulièrement de déterminer l'effet environnemental. Cette étude en lien avec la physiologie de la plante sera réalisée à la fois dans les organes foliaires, dont les caroténoïdes sont essentiels au bon fonctionnement, mais également au niveau des racines dans lesquelles les caroténoïdes représentent un attribut de qualité nutritionnelle et organoleptique. Afin d'approfondir la compréhension des variations des teneurs en caroténoïdes en réponse aux facteurs environnementaux, le rôle potentiel de la régulation transcriptionnelle sera mesuré par l'étude du niveau de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Ce travail a pour ambition de mieux connaître le fonctionnement de l'accumulation de métabolites secondaires d'intérêt, à l'échelle de la plante entière, mais aussi d'identifier des pistes de maîtrise de la qualité du produit liées aux conditions agroenvironnementales.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

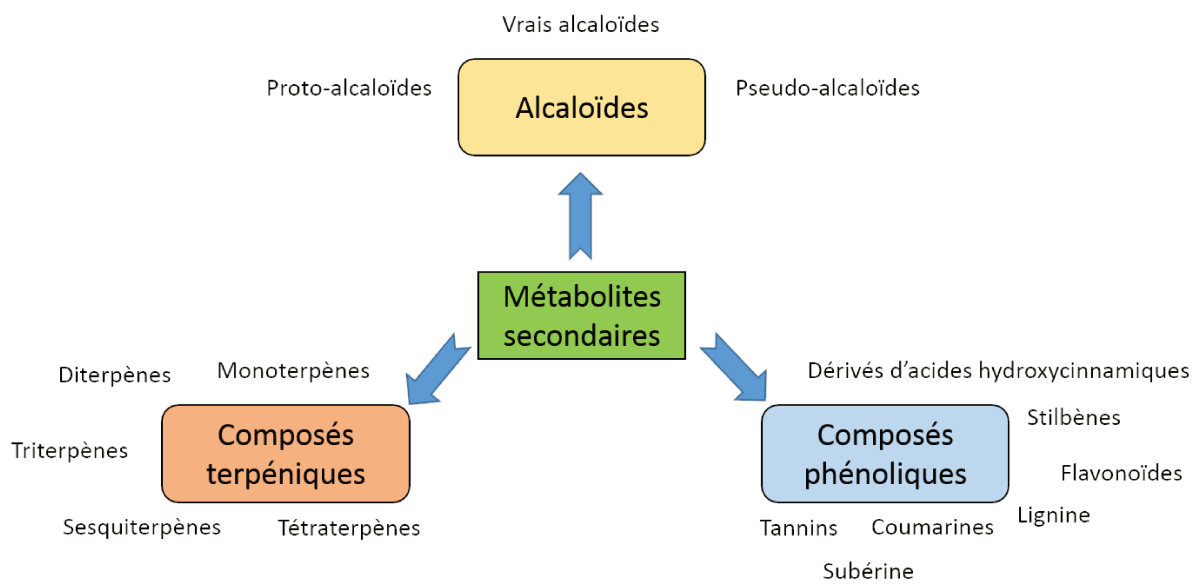


Figure 1.1 : Principales familles et sous-familles de métabolites secondaires chez les plantes.

I. LES CAROTENOIDES : PIGMENTS ESSENTIELS DU METABOLISME SECONDAIRE DES PLANTES

I.1. Les métabolites secondaires : composés essentiels des plantes

Chaque année, de plus en plus de molécules impliquées dans le métabolisme des plantes sont découvertes. Il existe actuellement de nombreuses voies métaboliques décrites et leur rôle au sein de la plante est de mieux en mieux connu. La classification de ces molécules a donc été nécessaire et aujourd'hui on distingue deux grandes familles de métabolites : les métabolites primaires et secondaires. Par opposition aux métabolites primaires, qui sont universels et impliqués dans des processus métaboliques primaires tels que la respiration et la photosynthèse par exemple, les métabolites secondaires sont généralement produits à partir des processus métaboliques primaires et ne sont parfois accumulés que chez certaines espèces spécifiquement (Seigler, 1998). Cette frontière entre métabolites primaires et secondaires est de moins en moins claire notamment parce que l'implication de certains métabolites secondaires dans la croissance de la plante s'est avérée indispensable (exemple : implication des caroténoïdes dans la photosynthèse). Depuis maintenant plusieurs années, les outils de métabolomique ont permis de mettre en évidence de plus en plus de métabolites et la chimiotaxonomie (étude des rapports entre la composition chimique des espèces vivantes et leur classification systématique) est devenu un outil important. Ainsi, au sein des métabolites secondaires des plantes, trois grandes familles peuvent être mises en avant (Bennett et Wallsgrove, 1994) (figure 1.1) : les alcaloïdes, les composés phénoliques et les composés terpéniques. Ces métabolites secondaires sont, pour la grande majorité, impliqués dans les réponses de la plante à l'environnement. De plus, de nombreux métabolites secondaires sont utilisés et/ou sont indispensables en santé humaine. Leur étude représente donc un enjeu majeur.

I.1.1. Les alcaloïdes

Depuis des milliers d'années, les plantes présentant de fortes teneurs en alcaloïdes ont été utilisées en médecine, pour la fabrication de thés ou potions. Par exemple, il semblerait que les Sumériens, Egyptiens, Grecs et Romains aient utilisé l'opium pour ses vertus sédatives et antalgiques. Il faut cependant attendre le XIX^{ème} siècle pour que l'identification de ces molécules

d'intérêt puisse être faite. Si l'on reprend le cas de l'opium, ce n'est que dans les travaux de Jean-François Derosne vers 1805 que la structure moléculaire fut véritablement caractérisée.

Les alcaloïdes sont retrouvés majoritairement chez les angiospermes (Robinson, 2012) mais il n'existe pas une seule voie de biosynthèse permettant la synthèse des différents alcaloïdes qui se distinguent en trois grandes familles :

- Les « vrais » alcaloïdes : dont la biosynthèse dérive directement des acides aminés et leur structure est souvent complexe et l'azote est situé dans un hétérocycle (tels que la nicotine et l'atropine).
- Les proto-alcaloïdes : dont la biosynthèse dérive directement des acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors du cycle, tels que la colchicine.
- Les pseudo-alcaloïdes : dont la biosynthèse ne dérive pas des acides aminés, tels que la caféine.

Certains alcaloïdes peuvent être conjugués à d'autres molécules, comme par exemple des terpènes (alcaloïdes indoliques monoterpéniques de la pervenche de Madagascar), montrant ainsi des interactions possibles entre métabolites secondaires et potentiellement des mécanismes de régulation ou de biosynthèse communs chez certaines plantes. Cependant, mettre en avant de tels mécanismes communs de régulation entre ces voies métaboliques n'est pas aisé.

Chez les plantes, les alcaloïdes ont largement été décrits comme impliqués dans la réponse des plantes aux facteurs environnementaux. Il a été montré par exemple que certains alcaloïdes étaient de bons répulsifs alimentaires contre les herbivores. De plus, ils peuvent être toxiques pour certains champignons et bactéries. En général, une augmentation de leur concentration est corrélée à une diminution des infestations foliaires (Bennett et Wallsgrove, 1994). Au sein de la plante, ces molécules sont donc principalement impliquées dans la défense face aux stress biotiques.

1.1.2. Les composés phénoliques

La famille des composés phénoliques regroupe un grand nombre de composés de structure très variable. Elle comprend de petits composés comme l'acide salicylique (considéré comme une hormone végétale), certaines isoflavones, mais également les tannins et lignines de poids moléculaire important et présentant des propriétés anti-nutritionnelles.

Les composés phénoliques, contrairement aux alcaloïdes présentés précédemment, sont synthétisés au sein de la même voie de biosynthèse dont le précurseur est la phénylalanine. La

désaturation de la phénylalanine en acide cinnamique est réalisée par la phénylalanine ammonialyase (PAL) qui est l'enzyme clé de cette voie de biosynthèse. A partir de l'acide cinnamique, différentes classes et/ou composés peuvent être identifiés.

- Les coumarines sont synthétisées pour la majorité à partir des acides trans-cinnamiques et *p*-coumarique. Cependant leur voie de biosynthèse peut varier selon les espèces (par exemple la scopolétine dérive de l'acide férulique chez le tabac) (Fritig *et al.*, 1972). Au sein des cellules, les coumarines sont, dans la plupart des cas, glycosylées afin de neutraliser leur effet toxique. Certaines coumarines peuvent être induites par des stress biotique (elles sont considérées comme des phytoalexines) ou abiotique. Elles possèdent en effet une activité antimicrobienne (Hahlbrock et Scheel, 1989).

- Les stilbènes, les flavonoïdes, isoflavonoïdes, flavonones, anthocyanes et tannins sont tous formés à partir du *p*-coumaroyl-COA. L'enzyme clé de la biosynthèse de ces composés, à l'exception des stilbènes, est la chalcone synthase (CHS). Les stilbènes sont synthétisés, quant à eux, par la stilbène synthase (SS) (Shirley, 1996). Les flavonoïdes et leurs dérivés sont stockés sous forme libre ou peuvent être conjugués. Les anthocyanes sont une classe particulière de flavonoïdes. Ce sont des pigments non photosynthétiques qui permettent la coloration des fleurs, des fruits et des graines (Dong *et al.*, 2001; Jaakola *et al.*, 2002; Winkel-Shirley, 2002). La synthèse des anthocyanes peut également être activée par des stress de l'environnement. En effet, elles sont impliquées dans la tolérance à la sécheresse, aux U.V., aux métaux lourds mais également dans la résistance aux herbivores et aux pathogènes (Gould, 2004). Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes sont également des signaux dans les interactions plante-microorganisme, mais sont surtout connus pour leur rôle dans la protection contre les rayonnements U.V. (Shirley, 1996). Les stilbènes, le plus connu étant le resvératrol, sont des phytoalexines.

- Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques représentent une importante classe de composés pour la plante. Ils sont en effet impliqués dans les processus de lignification, division cellulaire et signalisation par exemple. Parmi ces composés, nous pouvons noter les acides chlorogéniques, qui sont la forme conjuguée la plus répandue d'acides cinnamiques (acide férulique, sinapique, para-coumarique, caféique) et de l'acide quinique, mais il existe d'autres isomères selon la fonction alcool estérifiée. Leur rôle n'est pas clairement identifié, mais ils seraient impliqués dans la réponse aux stress biotiques (Tanguy et Martin, 1972). L'acide salicylique (SA), dont la biosynthèse fait intervenir des intermédiaires tels que les acides cinnamique et benzoïque, a largement été décrit comme impliqué dans la réponse aux stress biotiques et plus particulièrement aux microorganismes biotrophes. En effet, il est impliqué dans la formation de nécroses locales permettant le confinement des pathogènes au lieu d'infection. Le SA est considéré

comme une hormone végétale et est souvent opposé à l'acide jasmonique et à l'éthylène dans la réponse aux stress biotiques.

- La subérine est formée d'une matrice composée d'acides gras d'une part et de dérivés phénylpropanes d'autre part. La subérine est principalement présente dans l'écorce à la surface de la tige et à la surface de tissus souterrains tels que les tubercules de pomme de terre. Elle représente une barrière physique contre les pathogènes.

- La lignine est un polymère très complexe retrouvé dans toutes les plantes vasculaires et synthétisé au niveau de la paroi. La lignine assure rigidité aux parois cellulaires et imperméabilité aux tissus conducteurs.

1.1.3. Les composés terpéniques

Les composés terpéniques, aussi appelés terpénoïdes, sont issus de la condensation d'unités isoprènes à 5 atomes de carbone. A l'instar des composés phénoliques, la famille des terpénoïdes regroupe un large panel de molécules : faibles poids moléculaires, volatiles et molécules hautement polymérisées. La voie de biosynthèse des terpénoïdes conduit à la formation de nombreuses molécules importantes pour le développement de la plante : les caroténoïdes, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone.

Les terpénoïdes se classent en fonction du nombre d'unité(s) isoprène(s) (McGarvey et Croteau, 1995) :

- Les monoterpènes sont formés de deux unités isoprènes (C₁₀) de structures variées (linéaires, monocycliques et bicycliques). Ce sont des composés souvent volatils et aromatiques (menthol, pinène) dont certains sont impliqués dans la signalisation plantes-insectes.

- Les sesquiterpènes sont composés de 15 atomes de carbone dont la structure peut également être variable (linéaire, monocyclique et bicyclique).

- Les diterpènes composés de 20 atomes de carbone. Parmi les dérivés de diterpènes, on retrouve la queue phytol des chlorophylles a et b.

- Les triterpènes sont des composés à 30 atomes de carbone tels que le squalène.

- Les tétraterpènes, composés de 40 atomes de carbone, et comprenant notamment les caroténoïdes.

1.1.4. Bilan concernant les métabolites secondaires : un large champ d'investigation

L'étude de ces métabolites secondaires est un champ d'investigation immense dont les études ont commencé il y a plusieurs siècles et se poursuivent encore aujourd'hui. A travers la présentation de ces trois grandes familles de métabolites secondaires, il apparaît que leur synthèse peut être très hétérogène d'une espèce à une autre. Cependant un point essentiel à retenir est l'implication de ces molécules dans la réponse de la plante aux facteurs environnementaux. Bien que ces métabolites présentent une origine biosynthétique différente et donc des structures fortement hétérogènes, leur forte activité leur permet d'être efficaces contre un large spectre de facteurs biotiques et/ou abiotiques. Certains métabolites secondaires peuvent également être importants en santé humaine. Actuellement, il est difficile d'établir des schémas généraux de régulations communes ou des « modèles » de teneurs similaires entre ces différents composés, mais les outils de métabolomique ou transcriptomique peuvent permettre d'aller plus loin dans ce sens.

La biosynthèse des caroténoïdes est indépendante de celle des deux autres classes de métabolites secondaires décrites précédemment (alcaloïdes et composés phénoliques). Comparés à ceux-ci, peu de connaissances concernant l'implication des caroténoïdes en réponse aux contraintes environnementales (biotiques et abiotiques) chez les plantes sont disponibles, malgré leur intérêt pour le fonctionnement de la plante et en santé humaine.

I.2. Les caroténoïdes : des métabolites importants du vivant

1.2.1. En santé humaine

Incapables de synthétiser les caroténoïdes, les humains et plus largement les animaux, sont obligés de se les procurer par leur alimentation.

Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de maladies métaboliques et plus particulièrement dans la prévention de certains cancers ou maladies cardio-vasculaires (Bartley et Scolnik, 1995). Par exemple, ils jouent un rôle essentiel dans la différenciation des cellules épithéliales. Les caroténoïdes tel que le β -carotène sont des précurseurs de la vitamine A, et sont

par conséquent des précurseurs du rétinol et des rétinoïdes. La carence en vitamine A, dans les pays où la nourriture est principalement basée sur le riz, peut conduire à des cas de cécité, voire dans des cas extrêmes à la xérophthalmie affectant en particulier les enfants (Toennisessen, 1991; Bartley et Scolnik, 1995). De par leur propriété antioxydante, les caroténoïdes sont également capables de piéger les radicaux libres pouvant endommager l'ADN, les protéines, les lipides mais également le métabolisme carboné (Nebeling *et al.*, 1997; Krinsky et Johnson, 2005). Les principales sources en β -carotène dans l'alimentation sont les carottes fraîches (18,3 mg/100g de poids frais), les mangues (13,1 mg/100g de poids frais), la patate douce (9,5 mg/100g de poids frais) et la citrouille (6,9 mg/100g de poids frais) (Krinsky et Johnson, 2005). En revanche, les apports en lycopène proviennent essentiellement de la tomate (entre 9,3 et 29,3 mg/100g de poids frais) sous différentes formes (soupe, purée, sauce, jus) ainsi que la pastèque (4,9 mg/100g de poids frais) (Krinsky et Johnson, 2005).

Outre leur importance dans l'alimentation, les caroténoïdes sont également utilisés en tant que colorants pour l'industrie agroalimentaire.

1.2.2. Pour le développement et la défense des plantes

Chez les plantes, les caroténoïdes peuvent être synthétisés au niveau des organes chlorophylliens et non chlorophylliens. Ces pigments du métabolisme secondaire représentent, pour la physiologie de la plante, une famille importante de métabolites.

Dans les organes chlorophylliens tels que les feuilles, les caroténoïdes sont regroupés au niveau des membranes des thylakoïdes. Ces pigments absorbent la lumière dont le spectre (400 à 600nm) est complémentaire de celui de la chlorophylle. L'énergie accumulée par les caroténoïdes est ensuite transférée aux chlorophylles afin d'optimiser le mécanisme de photosynthèse. Afin d'éviter les dommages photo-oxydatifs causés à l'appareil photosynthétique par les formes réactives de l'oxygène (ROS), les caroténoïdes accumulés dans les photosystèmes II sont impliqués dans la désactivation de triplet de chlorophylle (^3Chl) et d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Dans le photosystème II, le β -carotène est impliqué plus particulièrement dans la désactivation des $^1\text{O}_2$, tandis que la lutéine et la zéaxanthine sont impliquées dans la dissipation de l'énergie d'excitation des protéines des antennes collectrices (Jahns et Holzwarth, 2012).

Dans les organes non chlorophylliens tels que les fruits et les pétales, les caroténoïdes sont accumulés en grande quantité dans les chromoplastes. Dans ces organes, leur accumulation permet une coloration orange, jaune ou rouge plus ou moins intense, afin d'attirer les insectes et

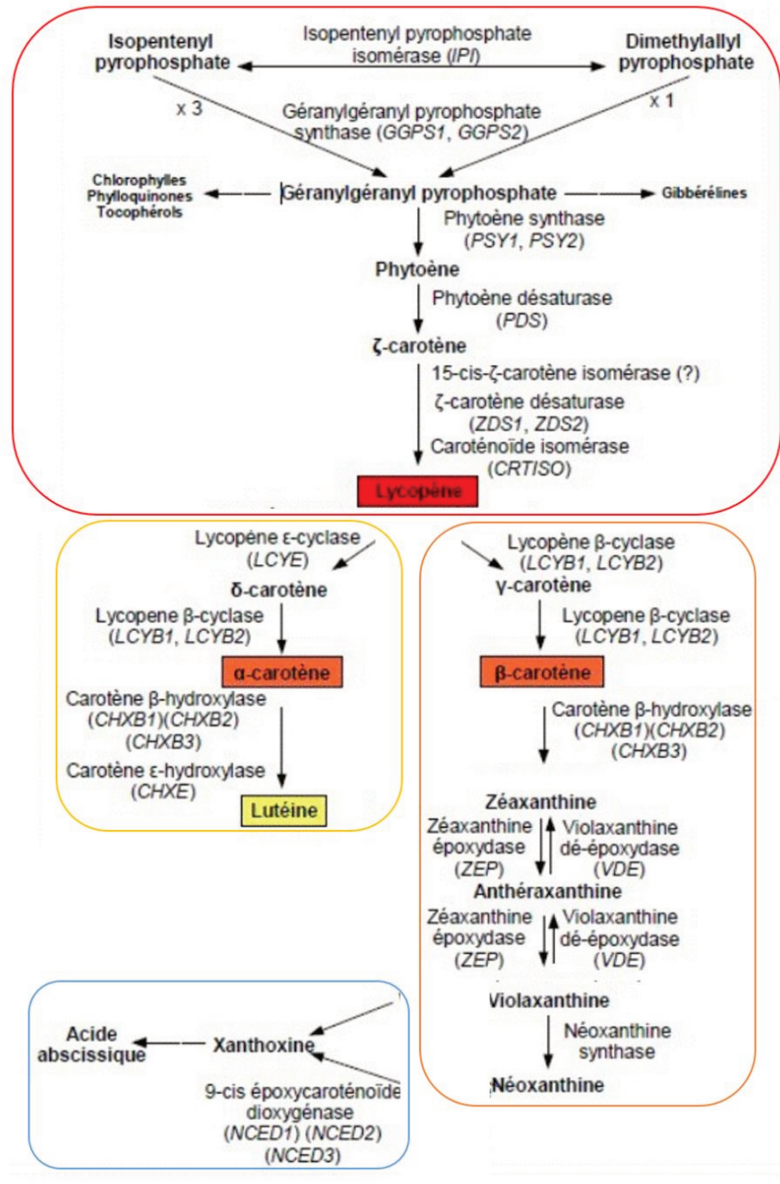


Figure 1.2 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes (Clotault 2009). Les composés majoritairement accumulés chez la carotte sont colorés selon la pigmentation obtenue. Les principales étapes sont : le tronc commun (cadre rouge), les branches β-ε, (cadre jaune) et β-β (cadre orange) et vers la synthèse de l'ABA (cadre bleu).

pollinisateurs et ainsi assurer la reproduction et/ou la dissémination de l'espèce (Howitt et Pogson, 2006). Dans les organes souterrains tels que les racines ou les tubercules, la fonction des caroténoïdes n'est pas clairement définie mais résulterait principalement de la sélection anthropique.

Les caroténoïdes sont également les précurseurs de métabolites importants pour la plante tels que l'acide abscissique (ABA) et les strigolactones. Parmi ces phytohormones, l'ABA a été la plus étudiée. L'ABA est impliqué dans de nombreux processus physiologiques de la plante et intervient à différents stades de son développement (Zeevaart et Creelman, 1988) :

- L'inhibition de la germination : processus de dormance
- L'abscission des organes de la plante (feuilles, fruits)
- La maturation des fruits non climactériques
- Le gravitropisme des racines et la tubérisation (Wareing et Jennings, 1980)
- Le contrôle de l'ouverture des stomates en réponse aux facteurs environnementaux.

L'ABA est également une hormone impliquée dans la tolérance des plantes aux stress environnementaux et plus particulièrement en réponse à la restriction hydrique (Zhang *et al.*, 2006; Raghavendra *et al.*, 2010).

Les strigolactones ont tout d'abord été décrites comme impliquées dans les interactions symbiotiques mycorrhiziennes. Plus récemment leur rôle dans la régulation de la croissance foliaire a également été mis en évidence (Yoneyama *et al.*, 2009).

Les caroténoïdes joueraient donc un rôle central en tant que précurseurs dans la régulation de la biosynthèse d'ABA et de strigolactones. La compréhension des mécanismes de régulation de leur biosynthèse est donc un élément primordial.

I.3. Métabolisme des caroténoïdes

1.3.1. Une voie de biosynthèse déjà bien établie

La voie de biosynthèse des caroténoïdes a longuement été étudiée et est actuellement bien décrite (figure 1.2). Les principaux gènes de la voie de biosynthèse ainsi que l'activité des enzymes codées par ces gènes ont été mis en évidence tout au long de la voie. La synthèse des caroténoïdes a lieu, chez les plantes, dans les plastes et est réalisée par des enzymes codées par des gènes nucléaires (Hirschberg, 2001). Pour simplifier l'étude de cette voie de biosynthèse, trois étapes successives peuvent être mises en avant : la première partie est un tronc commun essentiellement

composé d'enzymes de désaturation et d'isomérisation, la seconde étape est composée de deux branches dont les enzymes ont pour fonction de cycliser les molécules, puis une dernière étape permet la synthèse des xanthophylles ainsi que la synthèse de l'ABA.

1^{ère} étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes : le tronc commun

Les premiers précurseurs de la synthèse des caroténoïdes sont l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) ainsi que le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ces deux précurseurs sont synthétisés à partir du méthylérythritol phosphate (MEP) et de l'acide mévalonique (MVA). Chez les plantes, les voies du MEP et MVA permettent la synthèse des unités isoprènes à 5 carbones formant le squelette des caroténoïdes.

La condensation de trois molécules d'IPP avec une molécule de DMAPP par la géranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPs) permet la synthèse du géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). Le GGPP est un précurseur très important d'autres voies métaboliques permettant la synthèse des gibbérellines, des chlorophylles ainsi que des tocophérols. La condensation de deux molécules de GGPP conduit à la synthèse du phytoène, premier caroténoïde en C₄₀ et incolore. Cette réaction est catalysée par la phytoène synthase (PSY) qui est codée, chez la carotte, par deux gènes *PSY1* et *PSY2*.

Le phytoène subit ensuite plusieurs étapes de désaturation pour former le lycopène. Ces étapes sont réalisées par la phytoène désaturase (PDS) et la ζ-carotène désaturase (ZDS). Deux autres enzymes, la ζ-carotène isomérase (Z-ISO) et la caroténoïde isomérase (CRTISO) permettent quant à elles la synthèse du trans-lycopène. Le lycopène est le premier caroténoïde coloré (rouge) et non cyclisé par rapport aux autres caroténoïdes colorés. Le lycopène constitue également un point d'embranchement important dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes puisque deux voies sont alors possibles à partir de ce précurseur : la branche β-ε conduisant à la synthèse de l'α-carotène et la lutéine et la branche β-β conduisant au β-carotène.

1^{ère} branche : la voie β-ε

Le lycopène est tout d'abord cyclisé en δ-carotène par la lycopène ε-cyclase (LCYE). La lycopène β-cyclase (LCYB) permet quant à elle la synthèse de l'α-carotène. L'α-carotène est ensuite hydroxylé au niveau des deux cycles par la carotène β-hydroxylase (CHXB) et la carotène ε-hydroxylase (CHXE). Ces deux étapes d'hydroxylation permettent la synthèse du produit final de cette première branche : la lutéine.

2^{ème} branche : la voie β - β

Dans cette branche de la voie de biosynthèse, le lycopène est cyclisé à ses deux extrémités par la lycopène β -cyclase. La première cyclisation permet la synthèse du γ -carotène et la seconde celle du β -carotène. Le β -carotène est ensuite hydroxylé par la CHXB pour former la zéaxanthine. Cette dernière peut alors former l'anthéroxanthine et la violaxanthine par la zéaxanthine époxydase (ZEP). Les réactions catalysées par la ZEP sont réversibles et peuvent être réalisées par la violaxanthine dé-époxydase (VDE).

Deux classes de caroténoïdes produites : Carotènes vs xanthophylles

Les voies de synthèse décrites ci-dessus conduisent à deux classes de molécules : les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes sont composés du phytoène, du lycopène, de l' α -carotène, du β -carotène ainsi que des produits intermédiaires. Les xanthophylles sont quant à elles composées notamment de la lutéine, de la zéaxanthine, de l'anthéroxanthine, de la violaxanthine et de la néoxanthine. La particularité des xanthophylles est qu'elles possèdent un ou plusieurs atome(s) d'oxygène dans leur structure, alors que les carotènes ne sont composés que de carbones et d'hydrogènes. De manière générale, les xanthophylles sont associées aux feuilles car la lutéine est le caroténoïde majoritaire mais également parce qu'elles ont été montrées comme impliquées dans la résistance au stress oxydatif. Les carotènes sont quant à eux davantage associés aux organes non chlorophylliens comme les fruits (tomate, poivron, fraise, cerise etc...), les fleurs et les organes souterrains (patate douce et racine de carotte). Cependant, il faut prendre ces généralités avec précautions car les teneurs en carotènes dans les feuilles ainsi que la présence de xanthophylles dans les organes non photosynthétiques ne sont pas négligeables.

Vers la synthèse de l'ABA et des strigolactones

Les caroténoïdes peuvent ensuite permettre la formation des apocaroténoïdes par une succession d'étapes enzymatiques. Il existe deux voies possibles pour la synthèse de l'ABA et des strigolactones. La synthèse des strigolactones est réalisée par des enzymes de la famille des caroténoïdes clivages dioxygénases (CCD). Elle a lieu dans les plastes à partir du 9-*cis*- β -carotène et du 9-*cis*-apo-10-caroténal et permet la synthèse du carlatone qui est le précurseur de la biosynthèse des strigolactones (Lopez-Obando *et al.*, 2015). La seconde voie permet la synthèse de l'ABA. La première étape enzymatique de la biosynthèse d'ABA est la formation de xanthoxine

à partir de la néoxanthine et de la violaxanthine. Cette réaction est réalisée par les enzymes de la famille des 9-cis époxycaroténoïde dioxygénases (NCED). La xanthoxine est ensuite transformée en abscissique aldéhyde par l'ABA alcool déshydrogénase (ABA2). L'ABA est ensuite synthétisé par l'abscissique aldéhyde oxydase (AAO3).

1.3.2. Un déterminisme génétique de l'accumulation des caroténoïdes basé sur les gènes de la voie de biosynthèse

De nombreuses études ont porté sur le déterminisme génétique des caroténoïdes et plus particulièrement sur l'identification de régions du génome liées à leur accumulation. Logiquement, on retrouve dans ces régions des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Avec les avancées actuelles des techniques de séquençage et leur analyse, ainsi que la possibilité d'étudier des populations en ségrégation, il a été possible d'identifier plus précisément ces régions à la fois chez des espèces modèles, de haute importance économique, mais également chez des espèces de moindre importance économique.

Parmi les espèces de haute importance économique, le maïs et le blé ont été des cibles de premier ordre pour l'étude de l'accumulation des caroténoïdes. Si la voie de biosynthèse paraît relativement simple, la diversité parfois contrastée des résultats met en avant la complexité liée à ce caractère. Chez le maïs, les analyses de locus lié à un caractère quantitatif (QTL) ont montré que les gènes *PSY* et *ZDS* étaient associés aux teneurs en caroténoïdes dans les grains contrairement au gène *PDS* (Wong *et al.*, 2004). Une seconde étude associant plusieurs approches (analyse d'association, de liaisons génétiques, d'expression et de mutagenèse) montre que le gène codant la LCYE est impliqué dans l'orientation du flux métabolique entre la branche β - β et la branche β - ϵ (Harjes *et al.*, 2008). Chez le blé, les analyses de QTL ont montré que trois copies de *PSY* (*Psy-A1*, *Psy-B1* et *Psy-D1*) étaient impliquées dans la coloration jaune en lien avec les teneurs en lutéine, pigment majoritaire du grain de blé (Ravel *et al.*, 2013). Chez les céréales, les facteurs génétiques en lien avec l'accumulation des caroténoïdes dans les grains sont donc différents, suggérant l'existence de mécanismes ou de gènes spécifiques impliqués dans l'accumulation des caroténoïdes.

L'accumulation des caroténoïdes dans les fruits est un des principaux attributs de la qualité du produit. Chez le piment, trois gènes majeurs sont impliqués dans la coloration du fruit mais seulement deux d'entre eux ont pu être identifiés jusqu'à présent : le gène codant la capsanthine-capsorubine synthase (CCS) est responsable de la couleur jaune et présente une forte

homologie avec les gènes codant les lycopène cyclases (LCYE, LCYB), alors que le gène codant la PSY est responsable de la couleur rouge ou orange (Hurtado-Hernandez et Smith, 1985). Chez la tomate, des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont également été identifiés comme étant corrélés aux teneurs en caroténoïdes. Les analyses de QTL ont mis en évidence que les gènes codant la PSY, la LCYB et la LCYE étaient impliqués dans l'intensité de la couleur rouge (Liu *et al.*, 2003). Chez la pastèque, la simple mutation non synonyme dans le gène *LCYB* conduit à un phénotype jaune (présence d'une thymine en position 226) ou un phénotype rouge (présence d'une guanine en position 226) (Bang *et al.*, 2007). Les hétérozygotes sont quant à eux de couleur jaune, montrant ainsi le caractère dominant de la mutation.

Seules quelques espèces cultivées accumulent des caroténoïdes dans les organes non-photosynthétiques et souterrains tels que les racines ou tubercules : principalement la carotte, la pomme de terre et la patate douce. Dans ces organes, contrairement aux fruits, l'accumulation des caroténoïdes se fait tout au long du cycle de développement. Cependant leur rôle n'est *a priori* pas lié ni à la photosynthèse et à la photoprotection, ni à la dispersion de l'espèce. L'accumulation des caroténoïdes dans ce type d'organes serait d'avantage liée à la sélection anthropique. Chez la pomme de terre et la patate douce, peu de connaissances existent sur le déterminisme génétique de l'accumulation des caroténoïdes qui ne représente pas un critère majeur de sélection.

Le déterminisme génétique en lien avec l'accumulation des caroténoïdes est donc relativement contrasté en fonction de l'espèce considérée et il n'est pas possible d'établir un schéma général ou de mettre en avant un gène en particulier. Néanmoins, l'étude du déterminisme génétique a permis de mettre en avant des gènes clés de la voie de biosynthèse en lien avec l'accumulation des caroténoïdes. Pour une meilleure compréhension de l'accumulation de ces pigments des études fines mêlant des techniques de biologie moléculaire et de biochimie sont nécessaires.

1.3.3. Une régulation complexe dépendante du tissu et de l'espèce considérée

Comme montré précédemment, les caroténoïdes sont impliqués dans de nombreuses fonctions indispensables à la plante et sont accumulés plus particulièrement dans les feuilles, les pétales et les fruits. Au niveau de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, différents niveaux de régulation pouvant expliquer leur accumulation peuvent s'exercer en fonction du type d'organe et de l'espèce considérée. Cette régulation peut se faire à l'échelle transcriptionnelle, au niveau enzymatique ou des teneurs même en protéine, ou encore au niveau de l'organisation cellulaire

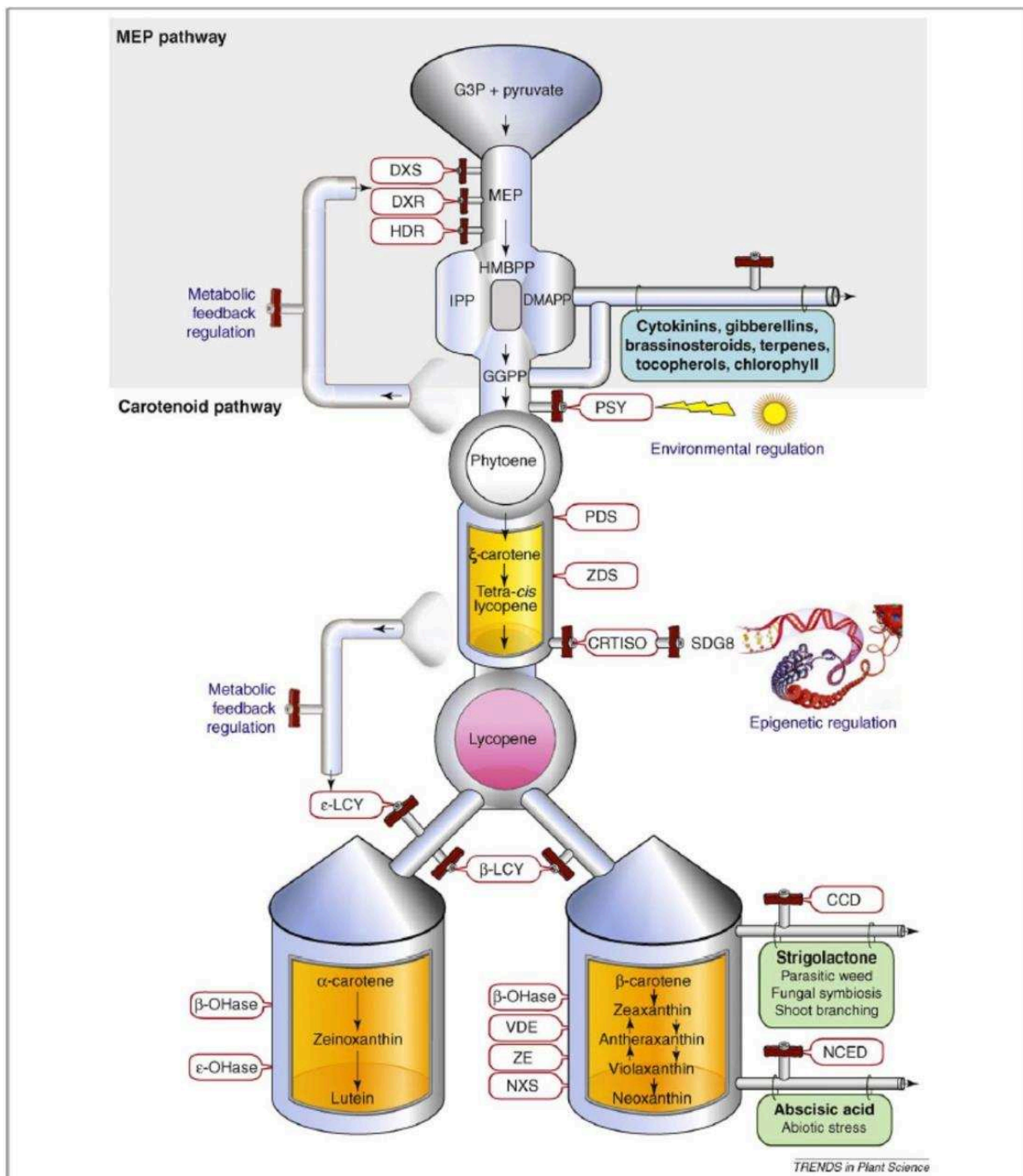


Figure 1.3 : Schéma global des niveaux de régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Cazzonelli et Pogson 2010).

et tissulaire (figure 1.3) (Cazzonelli et Pogson, 2010). Ces différents niveaux de régulation peuvent correspondre à des étapes limitantes de l'accumulation des caroténoïdes se retrouvant tout au long de la voie de biosynthèse.

Ces niveaux de régulation sont importants puisqu'ils interviennent à des moments cruciaux du développement de la plante : au moment du développement du feuillage pour la photosynthèse, pour la photoprotection lorsque le feuillage est développé, lors de la maturation des fruits, lors de la floraison mais également pour la résistance aux stress généraux tel que le stress oxydatif (induit par un stress lumineux, salin ou hydrique par exemple), pour la synthèse d'ABA.

- La disponibilité des précurseurs de la voie.

La biosynthèse des caroténoïdes est réalisée par la voie du MEP dont les substrats initiaux sont le glycéraldéhyde-3-phosphate et le pyruvate et conduisent à la formation du GGPP. La première étape limitante pour la synthèse des caroténoïdes est la synthèse même du MEP. Chez la tomate, l'expression du gène *DXS* (1-desoxyxylulose-5-phosphate synthase) est corrélée aux teneurs en caroténoïdes mais est spécifique de certains organes et stades de développement (Lois *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, la synthèse des isoprénoïdes (chlorophylles, tocophérols, caroténoïdes, gibbérelline et ABA) est régulée par la *DXS* (Estévez *et al.*, 2001). La GGPPs est également une enzyme clé pour l'accumulation des caroténoïdes car elle est impliquée dans la synthèse de nombreux composés importants pour la plante (figure 1.3). Il a été montré que l'expression de la *GGPPs* chez le poivron est forte au moment de la maturation du fruit (accumulation de lycopène). De façon surprenante, peu d'études se sont intéressées à la compétition pouvant exister entre les différentes voies/métabolites dont le précurseur est le GGPP. Fray *et al.* (1995) ont par exemple montré que la surexpression de la *PSY* chez la tomate conduisait à un nanisme des plantes car le pool de GGPP était exclusivement utilisé pour la synthèse de caroténoïdes au détriment de la synthèse de gibbérellines. Cette question autour du gène GGPP est un point très intéressant qui pourrait expliquer les teneurs en chlorophylles et caroténoïdes et plus particulièrement leur ratio au niveau des membranes des thylakoïdes.

- La PSY : enzyme clé de la voie de biosynthèse

La PSY est généralement présentée comme l'enzyme clé pour la synthèse des caroténoïdes. Le gène codant cette enzyme est présent en deux homologues ou plus chez la tomate, le riz, le blé et le maïs mais n'est présent qu'en un seul exemplaire chez *Arabidopsis thaliana* (Cazzonelli et Pogson, 2010). Si l'activité de la PSY reste inchangée, quels que soient les homologues, la localisation tissulaire et la régulation par des facteurs de l'environnement peuvent en revanche changer. Chez la carotte par exemple, le gène *PSY1* serait exprimé principalement dans les feuilles

alors que *PSY2* serait plus spécifique des racines (Fuentes *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Dans la racine de maïs ainsi que chez le riz, un stress salin induirait plus particulièrement l'expression du gène *PSY3* (Li *et al.*, 2008; Welsch *et al.*, 2008).

Des analyses de promoteur ont permis d'identifier des motifs *cis*-régulateurs de type ATCTA également retrouvés dans les promoteurs d'autres gènes liés à la photosynthèse, et qui seraient donc des éléments importants de régulation de *PSY* (Welsch *et al.*, 2003). De plus, d'autres motifs importants de régulation ont également été identifiés sur le promoteur : ABRE (ABA Binding Reponse Element), GARE (GA-Response-Element), ERE (Ethylene Response Element), MeJA (Methyl jasmonate), Circadian (Wang *et al.*, 2014). Ces analyses de promoteurs suggèrent d'une part que l'expression de *PSY* pourrait être corrélée avec l'expression d'autres gènes impliqués dans la photosynthèse et peut-être plus particulièrement les chlorophylles, et d'autre part que le gène *PSY* serait induit en réponse à l'environnement.

L'expression de *PSY* pourrait également être régulée par rétrocontrôle et plus particulièrement par les gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes mais également par l'ABA. Ainsi un rétrocontrôle positif de l'ABA sur *PSY3* a été mis en évidence chez le riz et serait important dans la réponse aux stress abiotiques (Welsch *et al.*, 2008). Chez la carotte, il a été montré que la surexpression du gène *CYP97A3* codant l'enzyme carotène hydroxylase était corrélée à une diminution des teneurs en protéine *PSY*, sans affecter le niveau d'expression du gène correspondant, ainsi qu'à une diminution des teneurs totales en caroténoïdes. Ces résultats suggèrent donc un rétrocontrôle négatif des caroténoïdes sur les teneurs en protéine *PSY* ainsi que sur le flux global de la voie (Arango *et al.*, 2014).

- Régulation de la synthèse du lycopène par les désaturases et isomérases

La régulation de la production de lycopène est également une étape importante notamment parce que ce composé constitue un critère de qualité pour de nombreux fruits (tomate, poivron, pastèque etc...). Chez la tomate, il a été montré que l'accumulation du lycopène au cours du développement du fruit était corrélée avec une augmentation de l'expression de *PSY* et *PDS* (en amont du lycopène) et une diminution de l'expression des gènes en aval du lycopène (Pecker *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999). On peut noter, ici encore, l'importance du gène *PSY* pour l'accumulation des caroténoïdes. Dans la pulpe d'orange, l'accumulation de lycopène est corrélée négativement avec l'expression de *LCYE* mais est très positivement avec celle de *LCYB*, suggérant un rôle primordial de *LCYE* pour l'accumulation de lycopène (Wang *et al.*, 2011). L'expression du gène *LCYB* chez les citrus (Alquézar *et al.*, 2009) et la pastèque (Kang *et al.*, 2010) a également été montrée comme impliquée dans l'accumulation de lycopène au cours de la maturation.

Ces études permettent donc de mettre en avant le rôle central de la régulation transcriptionnelle pour l'accumulation de caroténoïdes plus particulièrement du lycopène chez

les fruits. Les gènes en aval du lycopène joueraient donc un rôle primordial et constitueraient un goulot d'étranglement important au sein de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

- Orientation de la voie vers les branches β - ϵ ou β - β

Comment les tomates peuvent-elles être jaunes ou rouges, les poivrons rouges, jaunes ou orange, la pomme de terre jaune mais la patate douce plutôt orange et les citrons exclusivement jaunes ? C'est une question intéressante à laquelle les chercheurs et sélectionneurs ont voulu répondre. La réponse réside, en grande partie, au cœur de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et plus particulièrement au niveau des branches β - β et β - ϵ .

Chez *Arabidopsis thaliana*, des études de mutants montrent que les teneurs en lutéine peuvent être modifiées par le niveau de transcrits de *LCYE* (Pogson et Rissler, 2000). Chez la pomme de terre, il a été montré que l'inhibition de l'expression de la *LCYE* conduisait à une augmentation des teneurs en β -carotène dans le tubercule (Diretto *et al.*, 2006). Cependant, dans la graine de colza, l'inhibition de *LCYE* par ARNi (ARN interférent) a pour conséquence une augmentation des teneurs en β -carotène, zeaxanthine, violaxanthine, mais de façon surprenante aussi de lutéine, suggérant des mécanismes de rétrocontrôle spécifiques chez le colza (Yu *et al.*, 2008). Chez la patate douce par exemple, l'inhibition de l'expression du gène *LCYE* conduit à une orientation préférentielle de la synthèse des caroténoïdes vers la branche β - β et augmente la résistance au stress salin des cals (Kim *et al.*, 2013). Dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, il a également été montré que la surexpression du gène *CHXB* entraînait une augmentation des teneurs en xanthophylles et conduisait à un phénotype résistant à un stress lumineux intense (Davison *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent donc que l'orientation préférentielle de la voie de biosynthèse, vers la branche β - β par exemple ou la synthèse de composés spécifiques, permettrait l'induction de réponses de défense de la plante et donc un fort niveau de résistance aux facteurs environnementaux. Des éléments régulateurs de type ARBRE au niveau des promoteurs pourraient être impliqués, au niveau de différents gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, comme cela a pu être mis en évidence pour *PSY*. Avec les récentes données du génome de la carotte (Iorizzo *et al.*, 2016 et Xu *et al.*, 2014), il serait intéressant d'approfondir le rôle des séquences promotrices des gènes de la caroténogénèse.

- Le catabolisme des caroténoïdes

La synthèse de la zéaxanthine et de la violaxanthine, catalysée par la ZEP et VDE, est contrôlée par la lumière. En effet, ces deux métabolites présentent une propriété antioxydante forte et permettent la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse. La ZEP est principalement activée le jour et conduit à la synthèse de zéaxanthine et violaxanthine, alors qu'à l'obscurité la VDE est activée et permet la réaction inverse (Demmig-Adams et Adams, 2002).

L'expression des gènes de la famille des *NCED* et *CCD* a également été montrée comme corrélée à la teneur en caroténoïdes. La perte de fonction de ces gènes entraîne une augmentation des teneurs en caroténoïdes chez *Arabidopsis thaliana* (Auldrige *et al.*, 2006) chez les citruses (Kato *et al.*, 2006) ou encore chez la fraise (García-Limones *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'expression des gènes *NCED* a été démontrée comme modulée par les facteurs environnementaux et plus particulièrement pour la synthèse d'ABA chez *Arabidopsis thaliana* (Iuchi *et al.*, 2001), chez l'avocat (Chernys et Zeevaart, 2000) ou encore durant la maturation des fruits (Leng *et al.*, 2014). Il apparaît donc que le catabolisme des caroténoïdes est finalement assez méconnu, contrairement aux autres étapes de la voie. Or, dans le cas d'étude de facteurs environnementaux, cette étape peut être essentielle pour la synthèse d'ABA, hormone impliquée dans la résistance des plantes aux stress.

- Régulation par les facteurs de transcription : mécanisme de régulation encore peu connu

Jusqu'à présent l'étude de facteurs de transcription agissant sur le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes reste limitée. De façon intéressante, leur étude n'a été que principalement réalisée sur les gènes du début de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Dans les organes chlorophylliens, Toledo-Ortiz *et al.* (2010) ont montré que les facteurs de transcription de type PIF (Phytochrome factor) inhibent l'expression de *PSY* en lien avec la transduction du signal lumineux durant les cycles jour/nuit. Chez la tomate, plusieurs facteurs de transcription ont été mis en évidence. Le facteur de transcription SGR (Stay-green) a été identifié comme un régulateur positif de RIN (Ripening Inhibitor) et jouant un rôle déterminant dans la dégradation des chlorophylles des fruits et feuilles de tomate (Liu *et al.*, 2015). Le facteur de transcription RIN interagit directement sur le promoteur du gène *PSY* permettant la maturation du fruit de tomate (Martel *et al.*, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, un facteur de transcription de la famille APETA2 (RAP2.2) se fixe spécifiquement au promoteur de *PSY* et régule l'expression de *PSY* et *PDS* et donc les teneurs en caroténoïdes (Welsch *et al.*, 2007). Chez la tomate, la surexpression d'un facteur de transcription de type MYB issu de la vigne (*VvMyb5b*) a entraîné une augmentation de la teneur en β -carotène (Mahjoub *et al.*, 2009).

La variation du niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes pourrait donc en partie s'expliquer par les facteurs de transcription. Comme souligné précédemment, les données issues des génomes récemment séquencés permettraient l'analyse des promoteurs des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Dans un premier temps concernant les gènes de début de la voie de biosynthèse pour confirmer plus en détail ce qui a été montré dans les différents travaux présentés. Dans un second temps concernant l'ensemble des gènes de la voie de biosynthèse. Des analyses fines des promoteurs passant par l'étude de

promoteur délétés permettraient de vérifier et mettre en avant le ou les éléments clés permettant l'induction des gènes de la caroténogénèse.

- Différenciation des proplastes en chromoplastes : une étape importante pour le stockage des caroténoïdes

La différenciation des plastes en chromoplastes constitue une barrière importante pour l'accumulation des caroténoïdes. Le gène *Or* a ainsi été montré comme impliqué dans la différenciation des plastes en chromoplastes et a un impact important sur les teneurs en caroténoïdes, sans pour autant être directement impliqué dans la régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Li et Van Eck, 2007). Ainsi, chez la pomme de terre, la fusion du promoteur GBSS (granule-bound starch synthase) avec le gène *Or* conduit à une production de tubercule à chair jaune-orangée et des teneurs en caroténoïdes jusqu'à six fois plus importantes par rapport au génotype sauvage (Li et Van Eck, 2007). Le même résultat a pu être observé chez le chou-fleur (Lu *et al.*, 2006). Cette augmentation des teneurs en caroténoïdes n'est pas liée directement à l'expression du gène *Or* et donc à l'activité de l'enzyme codée par ce gène, mais plus particulièrement à la séquestration des caroténoïdes au sein du chromoplaste.

- Implication de la régulation épigénétique

Très peu d'études se sont intéressées à la régulation des caroténoïdes par l'épigénétique. Une méthyltransférase histone lysine « SDG8 » a été découverte comme régulateur de la lutéine chez un mutant *ccr1* (carotenoid et chlorophyll regulation). SDG8 ciblerait le gène *CRTISO* mais plusieurs questions relatives à l'interaction entre SDG8 et *CRTISO* ainsi que le fonctionnement de la régulation épigénétique pour l'accumulation des caroténoïdes restent en suspens (Cazzonelli et Pogson, 2010).

Les connaissances actuelles sur la voie de biosynthèse de ces pigments sont relativement nombreuses mais les mécanismes de régulation peuvent varier d'un organe à un autre et d'une espèce à l'autre rendant difficile l'élaboration d'un schéma général de régulation pour l'ensemble des espèces. Néanmoins il apparaît que la régulation par le niveau d'expression des gènes explique relativement bien les variations de teneurs en caroténoïdes, en particulier chez les fruits. Dans le contexte sociétal actuel où la santé humaine est au cœur des préoccupations, il apparaît évident que l'étude de l'accumulation de ces pigments chez des espèces d'intérêt était et reste une nécessité notamment dans les organes souterrains tels que les racines ou les tubercules pour lesquels les connaissances restent à l'heure actuelle encore très limitées.

Apparition des types blanc et orange (17^e s.)

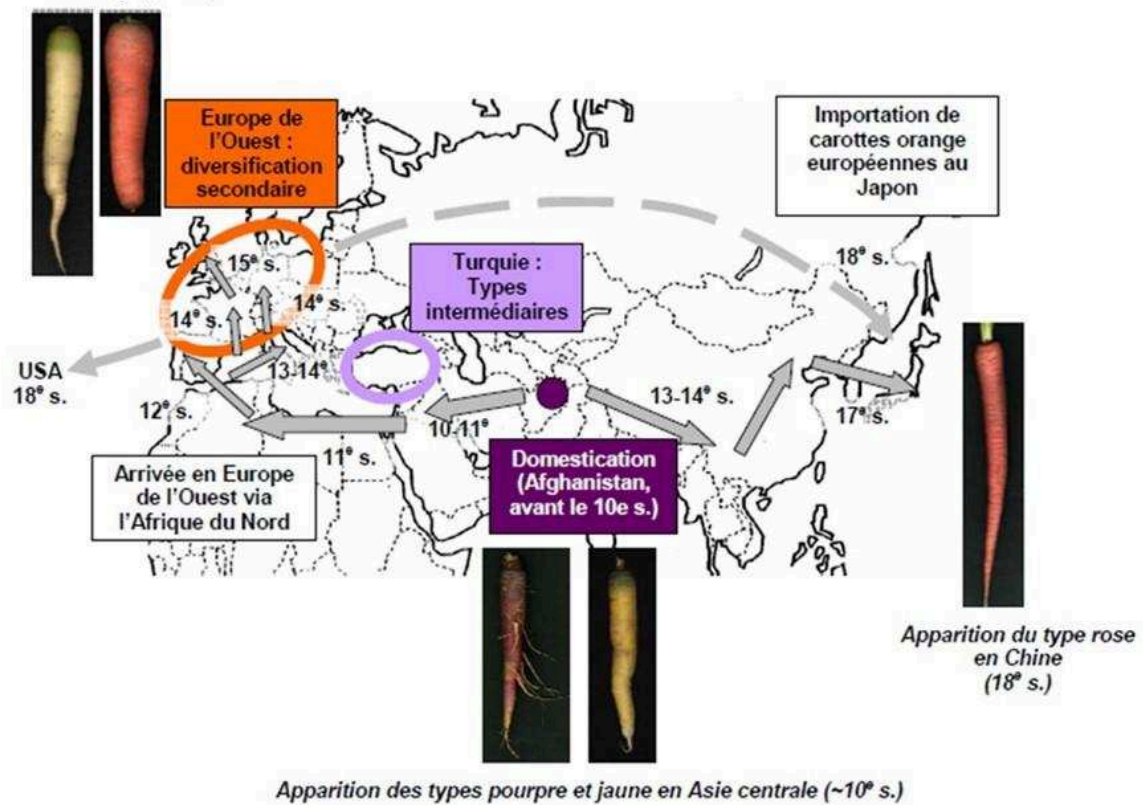


Figure 1.4 : Centre de domestication et dispersion de la carotte cultivée (Clotault 2009).

II. LA CAROTTE : UN LEGUME-RACINE AUX FORTES TENEURS EN CAROTENOIDES

De par ses propriétés nutritionnelles, la carotte est l'un des légumes racines le plus consommé dans le monde. La Chine est le premier producteur de carotte avec 16,2 millions de tonnes en 2013 suivie par la Russie, l'Ouzbékistan et les Etats-Unis (environ 1,5 millions de tonnes chacun). En 2013, la France a produit environ 565 mille tonnes de carotte et se situe au 4^{ème} rang européen. La production nationale est relativement stable avec des rendements en augmentation (18%) alors que la superficie tend à diminuer (-7%) (FAOStat). Les bassins de production majeurs de carotte en France sont la région Aquitaine et la Normandie. Les carottes sont utilisées pour l'alimentation (carottes fraîches et industrie) et l'alimentation animale. La consommation de carottes en France est d'environ 11kg/habitant/an ce qui en fait le second légume le plus consommé par ménage. Très accessible et facile d'utilisation, ce légume est consommé par la plupart des ménages (taux de pénétration très élevé de 85% (Scandella, 2010)).

II.1. L'histoire de la carotte cultivée : impact de la sélection anthropique

II.1.1. Origine et histoire de la carotte cultivée

Les semences de carotte, comme de nombreuses autres Apiacées, ont été utilisées pour leur propriété aromatique comme épice ou produit médicinal (Simon *et al.*, 2008). Chez les Grecs et les Romains, il est même rapporté la consommation de carottes à racine blanche d'où l'hypothèse d'une domestication de carottes dans ces régions. Cette hypothèse serait en fait due à une confusion avec le panais (Rubatzky *et al.*, 1999).

Les populations originelles de carotte d'Afghanistan présentent des racines charnues de couleur violet clair jusqu'à noir, caractérisées par une forte teneur en anthocyanes contrairement à la carotte sauvage européenne qui présentait, quant à elle, une racine peu charnue, fibreuse et désagréable au goût (Reduron, 2007). L'Afghanistan est actuellement considéré comme le centre de domestication de la carotte (figure 1.4). Cette région est également considérée comme le centre principal de diversification de l'espèce *Daucus carota* (Mackevic, 1929; Banga, 1963).

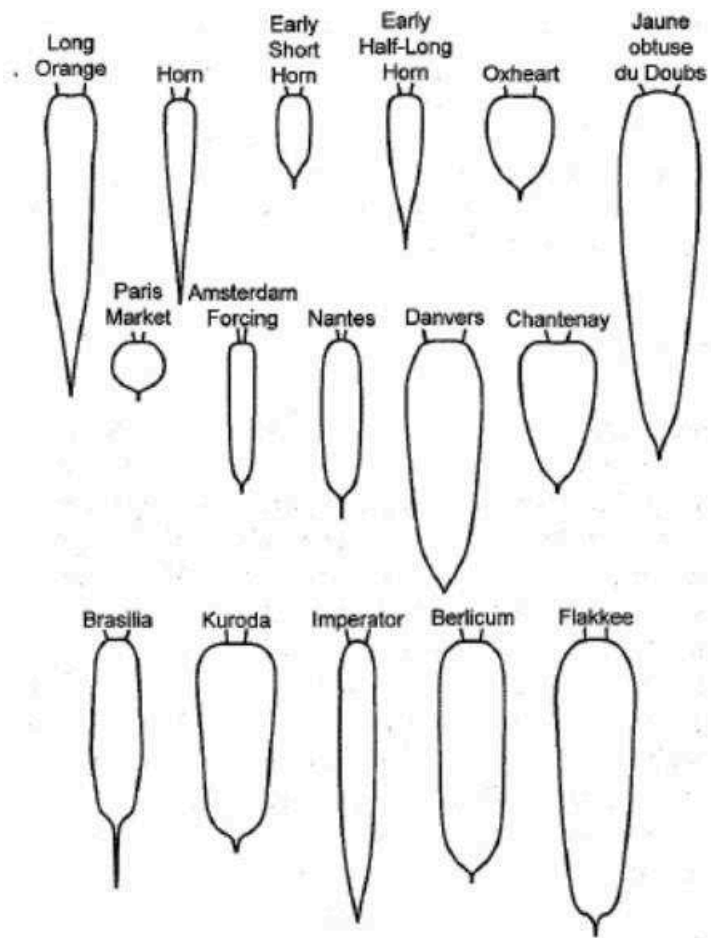


Figure 1.5: Variabilité des types morphologiques de racine de carotte (Simon et al., 2008).

La domestication aurait consisté à sélectionner des plantes à racine charnue, moins fibreuse et moins ramifiée. La carotte jaune, également présente dans les mêmes régions que la carotte pourpre, est considérée comme un mutant dépourvu d'anthocyanes (Laufer, 1919) dont les profils chromatographiques en caroténoïdes sont relativement proches.

A partir du XI^{ème} siècle, la zone de diversification de la carotte s'est étendue vers l'Ouest jusqu'en Europe en suivant les routes commerciales. Ainsi sa présence a été rapportée au Moyen Orient et en Afrique du Nord puis en Espagne au XII^{ème} siècle (Clément-Mullet, 1866), en Italie au début du XIV^{ème} (Crescenzi, 1548) et en France (Gibault, 1912), en Allemagne et aux Pays-Bas (Sangers, 1952) durant le XIV^{ème} siècle. Les racines de carotte étaient alors de couleur jaune ou pourpre. Ce n'est qu'à la fin du XVII^{ème} qu'est apparue la carotte blanche, dérivée des types jaunes ou pourpres, ce qui a été confirmé par des analyses de structuration de diversité génétique (Clotault, 2009).

L'origine de la racine de couleur orange est cependant mal connue, les premières indications de son existence ont été des tableaux flamands du XVII^{ème} siècle (Banga, 1963). Banga (1963) propose que la carotte orange soit le résultat d'une mutation naturelle au sein de carottes jaunes accentué par la sélection anthropique pour de fortes teneurs en carotènes. La carotte aurait été introduite en Chine vers le XIII^{ème} ou XIV^{ème} siècle (Laufer, 1919), puis au Japon à partir de 1631. La sélection anthropique a abouti à l'apparition du type rose ou rouge, symbole de chance en Asie. Aujourd'hui encore, certaines variétés de carotte rose, notamment la « Kintoki », sont encore cultivées. A partir du XVIII^{ème} siècle, des variétés européennes orange auraient été introduites au Japon (Simon *et al.*, 2008) via les Etats-Unis (figure 1.4).

Actuellement les ressources génétiques disponibles sont très nombreuses et il reste une forte diversité à exploiter pour la couleur de la racine notamment (Jourdan 2015).

II.1.2. Une racine sous forte sélection anthropique

Depuis de nombreuses années, les cultures locales de variétés de carotte ont abouti à une grande diversité phénotypique des types cultivés (figure 1.5). Cependant, le marché de la carotte a conduit la sélection variétale vers une uniformisation si bien que la racine de carotte largement répandue actuellement est de calibre standard, de forme cylindrique et de couleur orange. Cette uniformisation a été rendue possible grâce au développement de variétés hybrides, suite à la découverte de deux types de stérilité mâle géno-cytoplasmique (Peterson et Simon, 1986). Le type « étamines pétaloïdes » identifié par Munger en 1953 qui se caractérise par la transformation des étamines en pièces pétaloïdes, et le type « anthères brunes » découverte par Welch et Grimal en

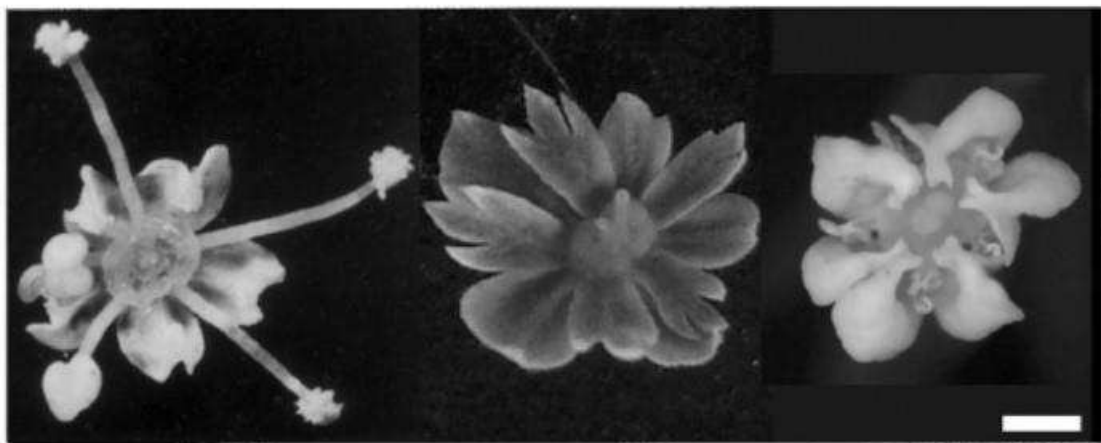


Figure 1.6 : Morphologie de la fleur de carotte selon le type de stérilité mâle : mâle fertile à gauche, stérilité mâle de type « étamines pétaloïdes » au centre et stérilité mâle de type « anthères brunes » à droite (Simon et al., 2008).

1947 se caractérisant par des anthères recroquevillées et les cellules mères des grains de pollen ne dépassant pas le stade tétrade (figure 1.6).

Les principaux critères de sélection de la carotte de nos jours (Simon *et al.*, 2008) sont :

- Le rendement, facteur essentiel de rentabilité économique : les rendements totaux en carotte peuvent varier entre 30 et plus de 100t/ha mais dépendent des pertes liées particulièrement aux contraintes environnementales.
- La résistance aux pathogènes, dans un contexte de limitation des intrants : principalement la brûlure foliaire causée par *Alternaria dauci*, *Cercospora carotae* et *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, la mouche de la carotte (*Psila rosae*), la maladie de la tache (cavity spot) (espèces du genre *Pythium*) et certains nématodes (*Meloidogyne* spp.).
- L'uniformité de la forme de la racine : longueur, diamètre et couleur (racine concolore, « cœur » (xylème) et cortex (phloème) de couleur identique).
- La qualité nutritionnelle et organoleptique : teneurs en caroténoïdes, sucres et terpènes mais également texture et saveur de la racine.
- La production de semences : fertilité et bonne qualité du pollen, attractivité pour les pollinisateurs et semences avec un taux de germination élevé.

La diversité des types colorés représente également un atout pour la segmentation du marché de la racine de carotte mais reste encore mal exploitée. Aujourd'hui il n'est plus rare de retrouver des carottes jaunes, blanches ou violettes en grande distribution. La couleur représente indirectement pour le consommateur un indicateur de qualité organoleptique mais également nutritionnelle (Abbott, 1999).

II.2. Un modèle original pour l'étude de l'accumulation des caroténoïdes

II.2.1. Une richesse importante en composés bénéfiques

Depuis de nombreuses années, la carotte a l'image de légume santé, et est par conséquent recommandée dans le cadre d'une alimentation saine et équilibrée. En effet, elle se compose majoritairement de sucres solubles, caroténoïdes et fibres.

La racine de carotte est riche en fibres (3,4g.100g⁻¹ MF (matière fraîche)) qui comprend l'ensemble des glucides pariétaux (cellulose, hémicellulose et pectine). Au cours du développement, le pourcentage de fibres augmente très fortement lors des trois premiers mois de culture mais tend à diminuer en fin de cycle (Nicolle, 2003).



Figure 1.7 : Différences de couleur chez la carotte dues à l'accumulation majoritaire d'un ou plusieurs caroténoïdes ou d'anthocyanes (Clotault 2009).

Tableau 1.1 : Variabilité des teneurs en caroténoïdes dans différents géotypes de carotte (Nicolle et al., 2004).

Table 1. Carotenoids content in carrot (*Daucus carota* L.) cultivars. Extractions were carried out in triplicate for each cultivar.

Cultivar	Color	Lutein	α -carotene	β -carotene	Total carotenoids
		$\mu\text{g}/100\text{ g}$ (fresh weight)			
Hyb 1 [‡]	Orange	94 ± 4 af [‡]	1972 ± 183 ad	5433 ± 462 ag	9374 ± 565 a
New Kuroda	Orange	93 ± 3 af	1635 ± 17 ac	3632 ± 64 bd	6448 ± 650 b
Carentan	Orange	145 ± 14 bdf	1644 ± 50 ac	5932 ± 360 ac	9684 ± 792 a
Hyb 2 [‡]	Orange	164 ± 29 b	3131 ± 263 b	6653 ± 564 c	12524 ± 492 c
Hyb 3 [‡]	Orange	60 ± 7 a	1419 ± 99 cg	4149 ± 112 bg	9588 ± 734 a
Kokubu	Orange	161 ± 4 b	1748 ± 29 ac	3740 ± 25 bd	8351 ± 565 a
Hyb 4 [‡]	Orange	157 ± 8 bf	2291 ± 224 d	6190 ± 403 ac	11435 ± 317 c
San Nâï	Orange	180 ± 5 b	1333 ± 85 c	3206 ± 182 d	6648 ± 472 bf
Blanche des Vosges	White	ND [‡]	ND e	ND e	ND d
HCM	Dark-orange	103 ± 14 adf	7583 ± 619 f	17206 ± 643 f	26548 ± 1436 e
Violette jordanienne	Purple	224 ± 9 e	ND e	381 ± 24 e	605 ± 32 d
Blanche à collet vert	White	ND c	ND e	ND e	ND d
Yellowstone	Yellow	232 ± 12 e	ND e	332 ± 15 e	563 ± 19 d
Jaune obtuse du Doubs	Yellow	138 ± 24 bdf	ND e	332 ± 21 e	469 ± 45 d
Hyb 5 [‡]	Orange	116 ± 14 bf	1916 ± 138 adg	4730 ± 319 g	9414 ± 539 a
Violette turque	Purple	176 ± 19 b	ND e	318 ± 18 e	493 ± 36 d
De Guérande	Orange	161 ± 28 b	1278 ± 234 c	3354 ± 457 bd	5998 ± 389 b
Hyb 6 [‡]	Orange	157 ± 8 b	2322 ± 233 d	5404 ± 305 ag	11944 ± 550 c
La Merveille	Orange	175 ± 9 b	2092 ± 36 d	5869 ± 101 ac	9663 ± 794 a
Nantaise améliorée	Orange	61 ± 8 a	1369 ± 150 c	3625 ± 329 bd	8138 ± 590 af
Mean		144	1858	4471	8219

[‡]Commercial French hybrids (Hyb).

[‡]Means followed by same letter in column are not significantly different ($P < 0.05$).

[‡]ND = not detected.

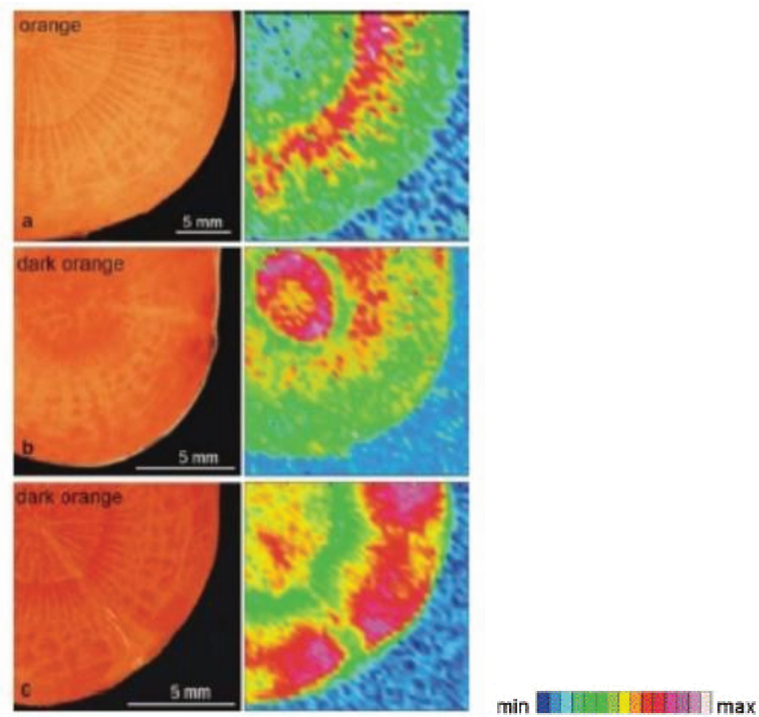


Figure 1.8 : Répartition du β -carotène dans trois coupes transversales de racines orange. Détection réalisée par FT-Raman (Baranska et al., 2006).

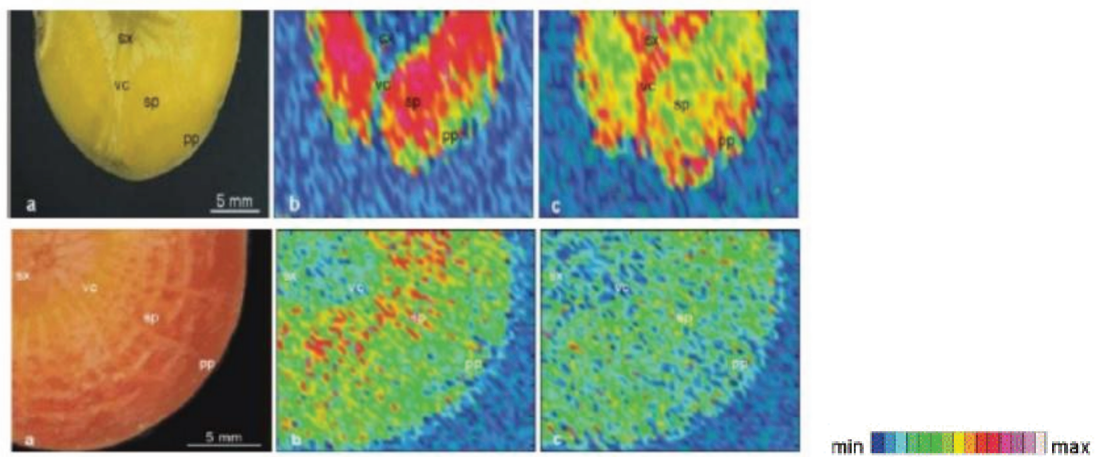


Figure 1.9 : Répartition de la lutéine (en haut) et du lycopène (en bas) dans une section de racine jaune et orange. Détection par FT-Raman (Baranska et al., 2006).

L'analyse de la composition glucidique de la racine de carotte montre que le saccharose est la forme de stockage majoritaire ($1,5$ à $5\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF) par rapport au glucose ($0,5$ à $2\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF) et au fructose ($0,5$ à $1,5\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF) et varie en fonction du génotype-couleur considéré (Alasarvar *et al.*, 2001). Durant le développement de la racine, les teneurs en sucres solubles augmentent. L'analyse fine des différents sucres montre que les teneurs en saccharose augmentent très rapidement ainsi que le rapport saccharose/glucose + fructose. Les teneurs en sucres sont également différentes entre les tissus de la racine de carotte. Ainsi les teneurs en sucres sont plus importantes dans le phloème secondaire par rapport au xylème secondaire avec un rapport pouvant varier entre 1,2 et 3,3 durant le cycle de développement (Phan et Hsu, 1973). Les teneurs en amidon restent quant à elles relativement négligeables. Durant le développement, les teneurs en amidon augmentent rapidement en début de cycle mais seraient vite reconverties en saccharose (Platenius, 1932).

De plus, les racines de carotte sont composées de minéraux qu'elles captent dans le sol. Le potassium est le macroélément le plus abondant dans la racine (environ $500\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF) suivi du calcium, du sodium, du magnésium et en moindre mesure du fer et zinc (Nicolle *et al.*, 2004). Néanmoins, les teneurs de ces éléments varient non seulement en fonction du phénotype-couleur considéré mais également en fonction du génotype considéré au sein d'un même type coloré (Nicolle *et al.*, 2004).

Cependant, deux caractéristiques originales de la carotte sont l'accumulation en caroténoïdes anormalement très élevée pour un végétal et la diversité liée à ces composés.

II.2.2. Une accumulation particulière en caroténoïdes

L'accumulation des caroténoïdes dans la racine de carotte en fait sans doute une racine originale, présentant une pigmentation orangée, jaune, rouge ou blanche (figure 1.7). La carotte présente donc un large panel de couleur dû à l'accumulation majoritaire d'un ou deux caroténoïdes. Cependant au sein d'un même type coloré, les teneurs en caroténoïdes totaux peuvent varier (tableau 1.1) (Nicolle *et al.*, 2004). Au sein même d'une racine, les caroténoïdes ne sont pas répartis de façon homogène. En effet des analyses par spectroscopie FT-Raman de coupes transversales de racine de carotte montrent que les caroténoïdes sont majoritairement accumulés dans le tissu phloémien (figures 1.8 et 1.9) (Baranska *et al.*, 2006). Le β -carotène ainsi que l' α -carotène représentent les principaux caroténoïdes des racines orange (environ 90%) dont les teneurs peuvent varier d'environ 5 à $30\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF (Nicolle *et al.*, 2004; Surles *et al.*, 2004). Chez les génotypes jaunes, le caroténoïde majoritairement accumulé est la lutéine. De manière générale, les génotypes jaunes accumulent peu de caroténoïdes totaux, environ $0,5\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ MF

Tableau 1.2 : Variabilité des teneurs en caroténoïdes au sein de chaque type coloré (Nicolle et al., 2004).

concentrations of carotenoids (mg/100 g carrot)					
carrot type	α -carotene	β -carotene (β C)	lycopene	lutein	total
high- β C orange	3.1 \pm 2.4	18.5 \pm 2.8	1.7 \pm 0.83	0.44 \pm 0.07	28.3 \pm 0.8
orange ^b	2.2 \pm 0.8	12.8 \pm 3.3	nd ^d	0.26 \pm 0.08	15.2 \pm 4.1
purple	4.1 \pm 1.2	12.3 \pm 5.1	nd	1.1 \pm 0.73	17.5 \pm 7.0
red	0.11 ^c	3.4 \pm 0.89	6.1 \pm 0.6	0.32 \pm 0.26	9.8 \pm 1.4
yellow	0.05 ^c	0.18 \pm 0.17	nd	0.51 \pm 0.27	0.71 \pm 0.38
white	nd	0.006 \pm 0.003	nd	0.009 \pm 0.002	0.014 \pm 0.001

^a Data are expressed as mean \pm SD of three determinations on a fresh weight basis. ^b Typical orange carrots were not used in the sensory evaluation but are shown here for carotenoid comparison. ^c Carotenoid values were found in only one of the three carrots. ^d nd, not detected.

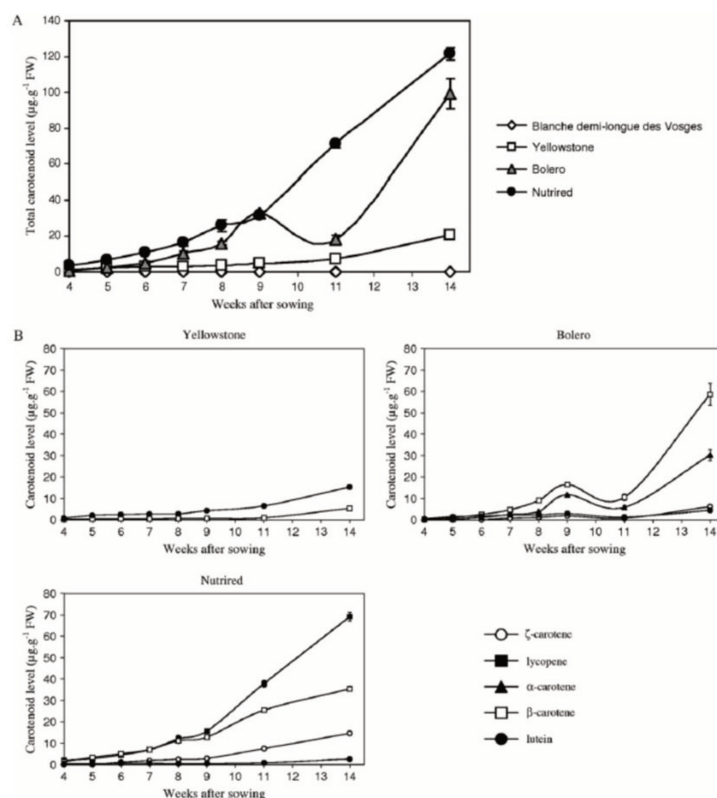


Figure 1.10 : (A) : Evolution des teneurs en caroténoïdes au cours du développement dans la racine de quatre génotypes de carotte. (B) : Evolution au cours du développement des teneurs de chaque caroténoïde présents dans les différents génotypes étudiés (Clotault et al., 2008).

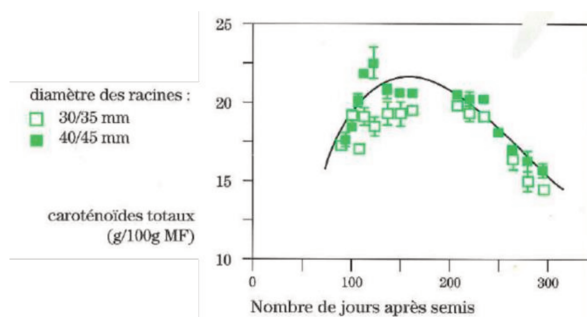


Figure 1.11 : Evolution des teneurs en caroténoïdes totaux au cours du temps pour différents diamètre de racine de carotte (Villeneuve et Leteinturier 1992).

(Nicolle *et al.*, 2004; Surles *et al.*, 2004). Les géotypes rouges accumulent majoritairement du lycopène avec des teneurs totales d'environ 10mg.100g⁻¹ MF (Surles *et al.*, 2004) et sont de façon générale moins étudiés par rapport aux autres classes de couleur de racine. Les racines blanches ne contiennent quant à elles pas de caroténoïdes. Il existe également des racines de carotte violettes accumulant des anthocyanes mais également de la lutéine, du β -carotène et de l' α -carotène (tableau 1.2).

II.2.3. Evolution de la teneur en caroténoïdes au cours du développement de la carotte

Pour la carotte de consommation, le cycle de développement peut être découpé en trois stades (Villeneuve et Leteinturier, 1992) :

- Levée et installation : correspond à la sortie des cotylédons et des deux premières feuilles ainsi que le développement d'une fine racine primaire.
- Développement du feuillage : les feuilles sont disposées en rosette, la production d'énergie carbonée par la photosynthèse.
- tubérisation : dernier stade du développement, la racine s'épaissit en commençant par le haut.

Durant le développement de la racine de carotte, les teneurs en caroténoïdes augmentent graduellement tout au long du cycle mais plus particulièrement à partir de la 9^{ème} semaine (Figure 1.10) (Clotault *et al.*, 2008), stade correspondant au début de la tubérisation. On observe également une forte accumulation entre la 11^{ème} et la 14^{ème} semaine après semis jusqu'à atteindre le stade de maturité biochimique (Villeneuve et Leteinturier, 1992). Dans le cas d'un cycle long avec conservation au champ, une diminution des teneurs en caroténoïdes est observée et l'évolution des teneurs en caroténoïdes peut être représentée par une courbe en cloche (Figure 1.11) (Villeneuve et Leteinturier, 1992).

L'accumulation des caroténoïdes dans la racine de carotte se réalise donc tout au long du développement mais plus particulièrement pendant la phase de tubérisation contrairement aux fruits tels que la tomate pour laquelle un pic d'accumulation apparaît en quelques jours seulement (Ronen *et al.*, 1999). La tubérisation est un stade déterminant pour l'élaboration de la qualité chez la carotte. Cependant, la connaissance de l'accumulation en caroténoïdes au cours du développement reste très partielle. Par exemple, l'influence des facteurs environnementaux, appliqués à des stades précoces du développement sur les teneurs finales en caroténoïdes n'est

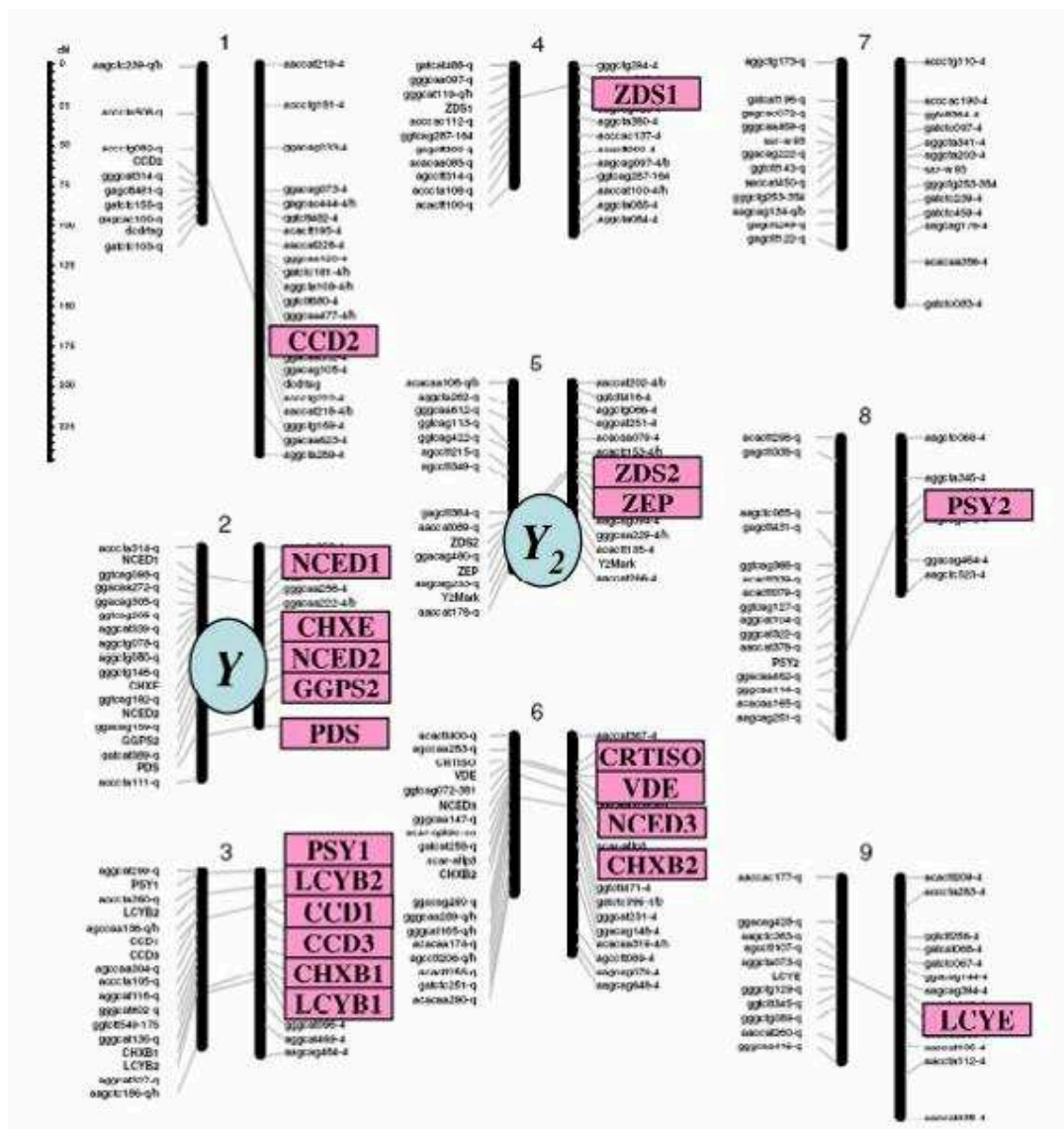


Figure 1.12 : Position des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes sur la carte génétique de la carotte (Just et al., 2007; Just et al., 2009).

pas connu, ainsi que la remobilisation potentielle de caroténoïdes sous forme d'énergie carbonée pour la résistance aux facteurs environnementaux ou la floraison.

II.3. Régulation de l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte

II.3.1. Déterminisme génétique : des locus et QLTs liés aux gènes de la voie de biosynthèse

Chez la carotte, le déterminisme génétique de l'accumulation des caroténoïdes, critère majoritaire de la qualité, a relativement bien été étudié. Une première étude focalisée sur l'héritabilité du différentiel de couleur entre le xylème et le phloème de racine de carotte a pu mettre en évidence un gène majeur (locus *Y*) impliqué dans le contrôle de la couleur (orange ou blanc) dans ces deux tissus (figure 1.12). La version dominante du gène *Y* confère la couleur blanche et les génotypes *yy* sont de phénotype orange suggérant un rôle dans le blocage de l'accumulation des caroténoïdes dans la racine (Buishand et Gabelman, 1979). Une carte génétique permet de mettre en évidence la position des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ainsi que les loci *Y* et *Y2* situés sur les groupes de liaison 2 et 5 respectivement (Just *et al.*, 2007, 2009). Un second gène majeur (*Y2*) a également été mis en évidence dans la coloration jaune ou orange du xylème et phloème (figure 1.12) (Buishand et Gabelman, 1979).

Depuis plusieurs années, les travaux de l'équipe « Qualité et résistance aux bioagresseurs des espèces légumières » (QuaRVeg) se sont focalisés sur le déterminisme génétique de l'accumulation des caroténoïdes dans des populations présentant une grande variabilité de phénotypes-couleur. Les premiers travaux visaient à améliorer la connaissance de la diversité génétique de la carotte cultivée. L'étude a été menée à partir de 48 individus appartenant à des cultivars différents pour maximiser les différences phénotypiques et sur 7 gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Les analyses du polymorphisme nucléotidique (SNP) ont permis de mettre en évidence une structuration des individus liée à leur origine géographique (carotte de l'est et de l'ouest) (Clotault *et al.*, 2010). Ces premiers travaux permettent de mettre en avant l'impact de la sélection anthropique sur la structuration de la diversité génétique de la carotte cultivée. Suite à ces travaux, une seconde étude a été réalisée sur une population déstructurée (issue d'intercroisements entre individus de racines blanches, orange, roses, violettes et jaunes) et visait à mettre en évidence de façon fine le déterminisme génétique des teneurs en caroténoïdes par génétique d'association sur gènes candidats issus de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Jourdan *et al.*, 2015). Cette étude a permis en particulier d'identifier l'implication des gènes *ZEP*

et *PDS* dans le contrôle des teneurs globales en caroténoïdes. De plus, les auteurs suggèrent que *ZEP* pourrait être le gène candidat correspondant au locus *Y2* et que les gènes *PDS* et *PTOX* pourraient correspondre au locus *Y* (Jourdan *et al.*, 2015). Récemment, le séquençage du génome de la carotte a permis de mettre en évidence une proximité importante (3,5cM) entre le gène *Y* et le gène *CHXB*. Cependant l'identification de ce gène comme étant *CHXB* n'a pu être confirmée (Iorizzo *et al.*, 2016). Il a également été montré qu'un allèle déficient (décalage du cadre de lecture) du gène *CYP93A* codant une carotène hydroxylase expliquait les variations de teneurs en α -carotène dans une grande population de carotte (Arango *et al.*, 2014). Dans les travaux de Jourdan (2013) il a été montré qu'une lycopène β -cyclase ainsi qu'une carotène hydroxylase pourraient être responsables de l'accumulation de lycopène chez la carotte.

Chez la carotte, les différentes études réalisées jusqu'à présent ont pu permettre d'établir des relations entre des locus et des variants alléliques et les teneurs en caroténoïdes dans la racine. De façon très intéressante, la majorité des locus et QTLs correspondent à des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Ces résultats laissent donc supposer que l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes serait importante pour l'accumulation de ces composés dans la racine de carotte.

II.3.2. Régulation moléculaire et cellulaire : des gènes clés et une capacité de stockage déterminante

Au cours du développement de la carotte, le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des caroténoïdes n'explique qu'en partie l'évolution des teneurs en caroténoïdes car il dépend fortement du génotype considéré (Clotault *et al.*, 2008). En effet, dans cette étude, il a été mis en évidence que l'expression relative des gènes ne pouvait pas expliquer l'absence de caroténoïdes chez le génotype blanc. En effet dans ce génotype, un niveau d'expression relative équivalent aux génotypes colorés était détecté. Chez le génotype rouge en revanche, les gènes en amont du lycopène étaient de plus en plus exprimés et ceux en aval moins exprimés au cours du développement et plus particulièrement en fin de cycle. Ces variations d'expression de gènes pour ce génotype étaient cependant corrélées à l'évolution des teneurs en lycopène et sont en accord avec d'autres études menées sur tomate par exemple. Pour les génotypes orange, le niveau d'expression des gènes était également bien corrélé aux teneurs totales en caroténoïdes mais seulement lors des stades précoces du développement, en fin de cycle les niveaux d'expression génique étaient difficilement reliés aux variations de teneurs. Ces travaux ont également pu émettre les premières hypothèses du rôle clé de la *PSY* pour l'accumulation des caroténoïdes et

l'existence de deux variants chez la carotte (Clotault *et al.*, 2008). L'étude d'un génotype blanc muté surexprimant le gène *PSY* chez la carotte (Maass *et al.*, 2009) a permis de confirmer la première hypothèse proposée par Clotault *et al.* (2008). Ce mutant présentait un phénotype orange et accumulait des caroténoïdes au sein de la racine. Ces travaux ont également été confirmés par Bowman *et al.* (2014). Une étude plus récente de la *PSY* a permis de mettre en évidence une expression organe-spécifique de chacun de ses variants (*PSY1* et *PSY2*) présents chez la carotte (Wang *et al.*, 2014). Cette étude a permis de mettre en évidence que l'expression du gène *PSY1* était beaucoup plus importante dans les feuilles de carotte mais ne serait pas liée aux variations de couleur dans la racine. Ces résultats montrent donc que le niveau d'expression des gènes peut être corrélé au niveau des teneurs en caroténoïdes durant le développement de la carotte mais que cela dépend du génotype considéré. De plus, ils mettent en évidence le rôle clé du gène *PSY* chez la carotte, rôle qui dépend néanmoins de l'organe considéré.

Une autre étude a montré que le gène *LCYB1* jouait un rôle important pour l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte. En effet des mutants de carotte surexprimant ou n'exprimant pas le gène *LCYB1* présentaient des teneurs en chlorophylles, caroténoïdes totaux et β -carotène plus importantes ou moins importantes respectivement par rapport au contrôle (Moreno *et al.*, 2013). Cette étude montre également que l'expression du gène *LCYB1* n'est pas spécifique d'un type d'organe contrairement à *PSY*.

Dans leur étude, Fuentes *et al.* (2012) ont montré que l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes était corrélée aux teneurs en caroténoïdes en fonction des différentes sections de la racine de carotte (partie haute exposée à la lumière et partie basse à l'obscurité). Cette étude montrait également que la différenciation des chromoplastes coïncidait avec l'accumulation des caroténoïdes dans la partie haute de la racine qui est exposée à la lumière dont l'action empêche la différenciation des plastides en chromoplastes (Fuentes *et al.*, 2012). Des études de microscopie ont montré que chez les génotypes de couleur orange, l'accumulation des caroténoïdes dans les chromoplastes se faisait sous forme de cristaux et qu'une plus forte teneur en caroténoïdes était davantage liée à un nombre important de cristaux plutôt qu'au nombre de chromoplastes (Kim *et al.*, 2010). Dans les génotypes blancs, les chromoplastes accumulent davantage d'amidon et présentent une structure en forme d'amyloplaste plutôt qu'une forme chromoplastique (Kim *et al.*, 2010). Ces travaux montrent donc qu'au-delà du niveau même d'expression des gènes des caroténoïdes, la capacité de stockage de ces composés dans les chromoplastes de la racine de carotte est un facteur limitant pour l'accumulation de ces composés.

S'il apparaît que la régulation transcriptionnelle explique plutôt bien le pic d'augmentation de caroténoïdes chez les fruits, il est difficile d'établir un schéma global de régulation à l'échelle transcriptionnelle chez la carotte. En effet on s'aperçoit qu'il existe un fort effet génotype mais également un effet de l'organe considéré. Cependant, ces études suggèrent que la capacité de stockage des caroténoïdes dans les chromoplastes de la racine est un facteur limitant quel que soit le génotype considéré. De plus l'existence possible d'une régulation commune entre chlorophylles et caroténoïdes dans les feuilles laisse penser que leurs teneurs sont strictement régulées.

Nous avons donc vu à travers les nombreux travaux issus de la bibliographie que les connaissances concernant l'accumulation des caroténoïdes, le déterminisme génétique et la régulation à l'échelle moléculaire et cellulaire permettaient d'expliquer relativement bien les teneurs en caroténoïdes chez la carotte en fonction du génotype considéré. Cependant, l'influence de facteurs environnementaux sur le déterminisme génétique et les mécanismes de régulation reste méconnue et pourrait contribuer à mieux comprendre l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte.

III. IMPACT DES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT SUR L'ACCUMULATION DES CAROTENOÏDES

Actuellement, l'une des problématiques majeures en culture est l'impact de facteurs environnementaux sur les productions végétales. Ces changements environnementaux représentent un enjeu fort en production végétale car les plantes sont soumises à des contraintes telles que des sécheresses ou des inondations mais également l'apparition de nouvelles maladies.

Ces contraintes de l'environnement peuvent donc impacter les rendements mais également les propriétés nutritionnelles et organoleptiques des productions végétales. Dans ce contexte les caroténoïdes possèdent potentiellement un rôle central. En effet, comme vu précédemment, ils peuvent être impliqués dans la réponse aux stress directement ou indirectement en tant que précurseurs, mais ils représentent également un attribut de qualité nutritionnelle et organoleptique chez les fruits et la carotte.

III.1. Nature des facteurs environnementaux

III.1.1. Généralités

Dans leur environnement, les plantes sont soumises à une multitude de variations de facteurs environnementaux. Ces facteurs environnementaux peuvent être de nature variée, biotique et/ou abiotique et peuvent conduire à des changements métaboliques importants au sein de la plante. Le terme stress, utilisé pour caractériser ces changements environnementaux comparés à des conditions standards de culture, est parfois remis en question tant sa définition conduit à de nombreux désaccords. Plusieurs questions restent alors en suspens : (i) Un stress correspond-il au fait que la plante ne se trouve pas dans ses conditions optimales de développement sans pour autant affecter profondément sa croissance ? Ou cela correspond-il au fait qu'il y ait vraiment une ou plusieurs modification(s) de la morphologie de la plante et des modifications biochimiques au sein de la plante ? (ii) Comment peut-on « mesurer » le stress ?

Actuellement plusieurs définitions peuvent être trouvées. Par exemple, Larcher (1987) définit le stress comme « un état dans lequel il y a augmentation des demandes en énergie de la plante conduisant à une déstabilisation des fonctions suivie par une augmentation de la

résistance. Si les limites de tolérance sont dépassées et la capacité d'adaptation surchargée, cela entraînera des dommages permanents ou bien la mort ». Par contre, Grime (1991) a défini le stress comme « une contrainte qui limite l'utilisation des ressources pour la croissance et la reproduction ». Dans ces deux définitions on peut voir deux éléments communs : détournement de l'énergie de la plante pour lutter contre le stress et des fonctions vitales qui vont être perturbées.

L'efficacité plus ou moins importante des réponses aux contraintes environnementales de la plante vont conduire celle-ci à être résistante, tolérante ou sensible aux facteurs environnementaux.

La résistance peut être représentée à deux niveaux : la résistance *sensu stricto* et la tolérance. Une plante résistante (*sensu stricto*) est une plante qui a pu éviter ou contrecarrer le facteur environnemental et dont la croissance et le rendement ne vont pas être affectés. La résistance peut être induite face aux attaques biotiques ou aux facteurs abiotiques par la mise en place de composés toxiques, le renforcement des parois cellulaires ou par la production de molécules de défense (Simms, 2000; Koskela *et al.*, 2002; Horns et Hood, 2012).

La tolérance des plantes est définie initialement en agriculture par la capacité de la plante à produire un rendement en présence de maladie (Painter, 1951).

Lorsqu'une plante n'est ni résistante (*sensu stricto*) ni tolérante, elle est qualifiée de sensible au(x) facteur(s) considéré(s). Dans le meilleur des cas, la plante termine son cycle de développement avec les rendements quasi-nuls, mais dans la plupart des cas la plante meurt.

En culture, il est difficile de mesurer l'impact d'une variation environnementale. La plupart du temps on se réfère directement à l'état de la plante à un instant t. Il est donc primordial de connaître quelles sont les différentes contraintes environnementales pouvant s'exercer sur les plantes ainsi que l'impact de ces contraintes sur la croissance mais également sur les rendements et les métabolites impliqués dans les propriétés nutritionnelles et organoleptiques des productions végétales.

III.1.2. Facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques sont certainement les plus aléatoires à prévoir en culture car il est difficile de les mesurer avec précision et d'anticiper leur intensité et leur durée. De plus les moyens techniques pour lutter contre des variations de température, luminosité, gel et de fortes précipitations ne peuvent pas être facilement mis en place.

Parmi les facteurs abiotiques, l'eau est celui qui a été le plus étudié. En effet, il s'agit de l'un des premiers facteurs limitants en culture (Chaves et Oliveira, 2004). Le déficit hydrique ainsi que l'excès en eau peuvent avoir un impact très fort sur le rendement des productions végétales. Un déficit hydrique est le résultat d'une diminution temporaire en eau pour la plante. L'absorption de l'eau par la plante est insuffisante pour compenser l'évapotranspiration (Chaves et Oliveira, 2004). Ainsi chez la patate douce, une restriction hydrique diminue le développement foliaire ainsi que le rendement (Van Heerden et Laurie, 2008) et un excès d'eau conduit aux mêmes résultats chez le blé (Sharma et Swarup, 1988).

L'effet de contraintes hydriques conduit également à des modifications du métabolisme primaire et secondaire chez les plantes. Par exemple, chez le romarin, les teneurs en chlorophylles et en β -carotène diminuent en condition de restriction hydrique liée à une diminution des teneurs relatives en eau de la plante (Munné-Bosch et Alegre, 2000). Chez l'oignon, une restriction hydrique induit également une diminution des teneurs en chlorophylles et caroténoïdes mais provoque une augmentation de proline (Hanci et Cebeci, 2014). Chez la prune, les teneurs en acides rosmarinique (composé phénolique), ursolique et oléanolique (composés terpéniques) sont augmentées en condition de restriction hydrique (Chen *et al.*, 2011). Ces résultats montrent l'impact de la restriction hydrique sur différentes molécules du métabolisme secondaire de la plante. De façon générale, des conditions de restriction en eau tendent à diminuer les teneurs en chlorophylles a et b (Yordanov *et al.*, 2000). Cependant cette évolution ne peut pas être généralisable à l'ensemble des molécules du métabolisme primaire et secondaire. Afin d'éviter la déshydratation, la plante peut mettre en place des stratégies telles que la fermeture des stomates, la réduction des surfaces foliaires par arrêt de croissance ou jaunissement des feuilles ou bien l'augmentation de la croissance racinaire (Chaves *et al.*, 2003).

La lumière est également un facteur abiotique important en termes de quantité (intensité), de photopériode mais également de qualité (spectre lumineux). L'effet de la lumière impacte directement le fonctionnement de la photosynthèse. En absence de lumière, la plante ne peut pas synthétiser l'énergie carbonée *via* la photosynthèse et l'excès de lumière peut entraîner une dégradation de l'appareil photosynthétique *via* la formation de formes réactives de l'oxygène et des triplets de chlorophylles (Havaux *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2002). On retrouve dans la littérature de nombreux résultats montrant une augmentation des teneurs en xanthophylles en condition d'excès lumineux, car ces molécules présentent de fortes propriétés antioxydantes (Dall'Osto *et al.*, 2007; Demmig-Adams et Adams, 1996; Jahns et Holzwarth, 2012).

Les variations de températures sont importantes car elles déterminent notamment la distribution géographique des plantes dans la nature (Alden et Hermann, 1971). La répartition des bassins de production à l'échelle mondiale, continentale et même nationale est également liée

au climat et plus particulièrement aux températures locales. Depuis plusieurs années, les recherches ont porté sur l'effet de la température sur les plantes et plus particulièrement sur les températures optimales de développement (Ritchie et NeSmith, 1991; Bitá et Gerats, 2013; Bahuguna et Jagadish, 2015)(Lu *et al.*, 2006). Chez le blé, il a été montré qu'une augmentation de la température moyenne de 2 à 2,5°C tout au long du cycle de culture provoquait une augmentation de la biomasse aérienne, des rendements et du nombre d'épis/m² (Fang *et al.*, 2015). Des températures extrêmement basses peuvent provoquer au contraire un ralentissement du développement de la plante (Alden et Hermann, 1971; Anekonda et Adams, 2000).

III.1.3. Facteurs biotiques

Les facteurs biotiques sont représentés par un large panel d'organismes pathogènes : insectes, bactérie, virus, champignon, bactéries et nématodes. Dans cette partie nous définirons et décrirons de manière succincte les différents types d'interaction existant entre les plantes hôtes et les pathogènes. Tout d'abord, la relation entre la plante et un pathogène peut être qualifiée soit de non hôte ou bien d'hôte. La relation est dite non-hôte lorsque le pathogène est incapable d'infecter la plante (Lepoivre, 2003). Cette relation est définie comme étant l'incompatibilité fondamentale entre tous les cultivars d'une espèce végétale donnée et tous les biotypes d'un pathogène déterminé. Dans ce type de relation, l'agent pathogène ne parvient pas à surmonter les défenses préformées de la plante ou bien les réponses de défense induites pas des éliciteurs généraux (non spécifiques), on parle alors de relation non hôte de type I. On parle de relation non hôte de type II lorsque l'agent pathogène parvient à surmonter les défenses néoformées, des éliciteurs spécifiques du pathogène sont reconnus par la plante entraînant une réaction hypersensible (HR). Lorsque le pathogène parvient à surmonter les défenses préformées et les réactions hypersensible induites, il peut alors se développer et la relation avec la plante est dite hôte. Contrairement à l'impact de stress abiotique, un dialogue moléculaire s'installe entre la plante et le pathogène dans le cadre de la relation hôte. Lorsque la résistance de la plante est totale (un gène majeur de résistance), l'interaction est qualifiée d'incompatible et lorsque la résistance est partielle (implication de plusieurs gènes de défense) l'interaction est dite compatible.

Dans les mécanismes de défense des plantes aux stress biotiques, un grand nombre de voies métaboliques sont impliquées, et plus particulièrement celles des métabolites issus du métabolisme secondaire tels que les alcaloïdes, les composés phénoliques et terpéniques. Ces métabolites peuvent en effet être impliqués dans la signalisation pour l'activation d'autres métabolites, jouer le rôle de toxines contre l'agent pathogène ou bien induire des modifications cellulaires (exemple : mort cellulaire) pour empêcher la progression de l'agent pathogène.

Les variations des facteurs environnementaux peuvent constituer des stress et sont donc importantes à prendre en compte pour l'élaboration du rendement des productions végétales. L'étude de leur impact sur le métabolisme des caroténoïdes est donc un champ d'investigation important à la fois pour le développement de la plante mais également pour les qualités nutritionnelle et organoleptique des fruits et de la carotte notamment.

III.2. Impact des stress sur l'accumulation des caroténoïdes chez les plantes

III.2.1. Dans les organes chlorophylliens

L'impact de facteurs environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes dans les feuilles a été relativement bien étudié mais les résultats sont parfois en contradiction et dépendants des stress appliqués et des génotypes étudiés.

Ainsi, Duan et al. (2012) ont montré, sur feuille de tomate, qu'un stress salin induisait l'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes et une augmentation des teneurs en ABA (deux fois supérieures au témoin) chez un génotype peu tolérant mais pas chez un génotype tolérant. Les auteurs suggèrent l'existence d'un haut niveau constitutif de caroténoïdes et d'ABA chez le génotype tolérant. Une autre étude a montré qu'une restriction hydrique provoquait une augmentation de 13% des teneurs en composés phénoliques mais une diminution de 27% des teneurs en caroténoïdes dans les feuilles de tomate cerise (Hassan *et al.*, 2015). Les auteurs en concluent que les composés phénoliques seraient des métabolites secondaires impliqués dans la réponse de la plante au stress hydrique. Ces travaux indiquent également qu'il pourrait exister une compétition entre caroténoïdes et composés phénoliques dans la défense des plantes. Chez l'oignon, la restriction hydrique conduit à une diminution des teneurs en chlorophylles et caroténoïdes des feuilles (Hanci et Cebeci, 2014) ce qui est en accord avec ceux obtenus sur feuilles de tomate (Hassan *et al.*, 2015) et est généralement observé pour les chlorophylles. Ce résultat suggère néanmoins un contrôle possible des teneurs en chlorophylles par rapport aux teneurs en caroténoïdes dans les organes photosynthétiques.

Il a également été montré, dans les feuilles de tomate, que de fortes températures (45°C pendant 2h) entraînent une diminution du rapport chlorophylles / caroténoïdes totaux (environ 25%) et donc une augmentation de la teneur relative en caroténoïdes totaux chez le génotype résistant mais pas chez le sensible (Camejo *et al.*, 2005). Les travaux de Camejo et al. (2005) ainsi

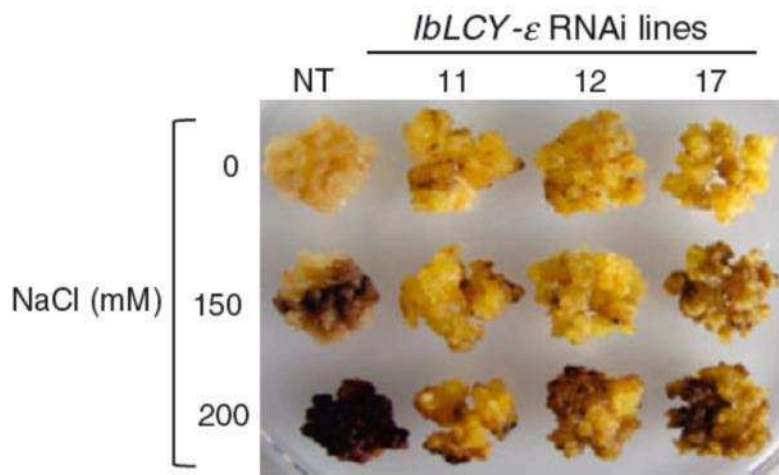


Figure 1.13 : Phénotypes de calls de patate douce déficients pour le gène *Icye* en réponse au stress salin (Kim et al., 2013)

que ceux de Hassan et al. (2015) sont en désaccord avec les travaux obtenus en condition de stress salin présentés précédemment (Duan *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent donc qu'il existerait deux mécanismes impliqués dans la résistance aux stress chez la tomate en fonction du stress considéré : une accumulation constitutive d'ABA et de caroténoïdes ou alors l'induction de ces métabolites en réponse au stress. Cela pourrait également signifier que l'utilisation du pool déjà existant, ou la synthèse *de novo* de caroténoïdes, passerait par des voies de signalisation différentes.

III.2.2. Dans les organes non photosynthétiques

Dans le fruit de tomate, il a été montré que le stress salin induisait une augmentation des teneurs en lycopène (jusqu'à 3 fois supérieures par rapport au témoin), ainsi qu'en β -carotène mais également en anthocyanes. Les auteurs ont également montré que ces différences de teneurs se traduisaient par des différences de la couleur du fruit (Borghesi *et al.*, 2011). De façon intéressante, ce travail suggère que dans les organes non chlorophylliens, les caroténoïdes pourraient peut-être jouer un rôle en tant que molécules de réponse au stress. En effet, la synthèse de ces composés aux propriétés antioxydantes est induite en condition de stress. Ce résultat ouvre donc de nouvelles perspectives d'étude et une meilleure connaissance du rôle des caroténoïdes dans les organes non-photosynthétiques.

Chez le poivron, il a été montré que l'induction de ROS (mimant un stress oxydatif) par des éliciteurs provoquait une augmentation de l'expression des gènes de la biosynthèse des caroténoïdes et une augmentation des teneurs en capsanthine dans le fruit. La production de ROS serait donc un messager secondaire dans la réponse au stress oxydant (Bouvier *et al.*, 1998) et permettrait la synthèse de molécules antioxydantes telles que les caroténoïdes. Ici encore, le rôle potentiel des caroténoïdes dans la réponse au stress oxydatif dans les fruits peut être mis en avant. Une autre étude a cependant montré que les teneurs en β -carotène chez le fruit du poivron étaient diminuées d'environ 50% en condition de stress salin (Maurya *et al.*, 2015). Il aurait cependant été intéressant de mesurer les teneurs en caroténoïdes totales ainsi qu'en xanthophylles pour infirmer ou confirmer le rôle potentiel des caroténoïdes dans la résistance au stress dans les organes non chlorophylliens. Par exemple, il a été montré chez la patate douce que la sous-expression du gène *LCYE* entraînait une redirection de la voie de biosynthèse des caroténoïdes vers la branche β - ϵ avec une augmentation des teneurs en xanthophylles (sauf lutéine) en ABA (2 fois plus importante par rapport au contrôle) et entraînait une résistance plus importante au stress salin (Fig 1.13) (Kim *et al.*, 2013). Les résultats obtenus par Maurya et al. (2015) suggèrent

néanmoins l'implication d'autres voies métabolites et par conséquent d'autres molécules dans la défense de la plante et donc un rôle minoritaire ou nul des caroténoïdes dans la résistance. L'impact de contrainte environnementale sur l'accumulation des caroténoïdes chez le poivron serait dépendant du stress considéré.

Chez le riz, l'augmentation de l'expression de *PSY3* est corrélée à la synthèse d'ABA en réponse aux stress salins dans la racine (Welsch *et al.*, 2008) suggérant l'implication de ce gène dans la résistance de la plante. Des résultats proches ont également été observés au niveau des racines chez *Arabidopsis thaliana* (Ruiz-Sola *et al.*, 2014) pour la résistance au stress salin. Ces résultats montrent le lien potentiel entre gène de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et la synthèse d'ABA dans la réponse aux contraintes environnementales.

Les études concernant l'impact de contraintes environnementales sur l'accumulation des caroténoïdes sont relativement nombreuses. Dans certains cas, elles permettent de mettre en avant l'implication directe (propriété antioxydante) ou indirecte (pour la synthèse d'ABA par exemple) de ces pigments dans la tolérance aux contraintes environnementales mais les effets dépendent de l'espèce, de l'organe et du stress considéré. De manière surprenante, les caroténoïdes pourraient être impliqués dans la tolérance aux stress dans les organes non chlorophylliens alors qu'il ne s'agit pas de leur rôle principal dans ces organes.

III.3. Impact des stress sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte

La carotte présente une morphologie relativement simple : le feuillage (organe aérien) et la racine (organe souterrain). Si le feuillage peut être logiquement sensible aux variations de l'environnement qui s'exercent directement sur lui, à l'instar d'autres plantes présentées ci-dessus, la racine, enterrée, pourrait être moins exposée et donc moins sensible à ces facteurs. Ainsi, les teneurs en caroténoïdes dans la racine pourraient être moins influencées par des variations de l'environnement comparées à celles des organes foliaires.

III.3.1. Impact de facteurs de l'environnement pendant le cycle de culture

Chez la carotte, l'étude de l'impact de facteurs environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes est finalement limitée.

Deux lieux de culture différents peuvent entraîner une variation de teneurs en α -carotène et β -carotène de 25 à 50% (Kidmose *et al.*, 2004). Cependant les auteurs de cette étude laissaient penser que les variations de teneur en caroténoïdes étaient liées aux variations de facteurs environnementaux (par exemple température et rayonnement) mais les données climatiques n'étaient pas disponibles. Plusieurs études ont également permis de montrer l'impact de pratiques culturales sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte. Ainsi, Ombódi *et al.* (2014) ont montré que l'irrigation (apport par sprinkler versus eau de pluie) réduit les teneurs en caroténoïdes totales mais n'impacte pas la composition relative de chacun des caroténoïdes au sein de la carotte. Par contre, Zeipiņa *et al.* (2014) ont montré que le mode d'irrigation (goutte à goutte versus sprinkler) n'impacte pas les teneurs en caroténoïdes. Sørensen *et al.* (1997) ont également mis en évidence un effet variable du stress hydrique sur la teneur en caroténoïdes en fonction de la durée du stress. Une autre étude a montré qu'un apport minéral (bore et calcium) supplémentaire lors de l'arrosage entraînait une diminution de 33 à 50% des teneurs en α et β -carotène dans la racine de carotte (Singh *et al.*, 2012). Plusieurs études concluent que de hautes doses d'azote entraînent une augmentation des teneurs en caroténoïdes (Evers, 1989; Freeman *et Harris*, 1951; Hochmuth *et al.*, 2006). Ces études démontrent que les techniques culturales influencent les teneurs en caroténoïdes dans la racine de carotte.

Par contre, les études focalisées sur l'impact de stress précis sur les teneurs en caroténoïdes chez la carotte sont rares. Wang *et al.* (2014) ont montré que l'expression des gènes *PSY1* et *PSY2* est modulée par la lumière mais les teneurs en caroténoïdes n'ont pas été parallèlement étudiées. L'influence de la température a également été recherchée. Sakamoto *et Suzuki* (2015) ont observé que des variations de températures (20, 25, 29, 33°C) au niveau de la racine de carotte n'affectent pas les teneurs en caroténoïdes. Fuentes *et al.* (2012) ont montré que l'accumulation des caroténoïdes et le niveau d'expression des gènes sont modulés en fonction de la région de la racine considérée. Dans la région racinaire exposée à la lumière (le collet), les teneurs en caroténoïdes étaient globalement inchangées ou bien tendaient à diminuer au cours du développement de la racine, alors que dans la région racinaire à l'obscurité (partie centrale charnue) les teneurs étaient fortement augmentées. L'expression de *PSY* pouvant être liée à la

différenciation des proplastés en chromoplastes, l'une des hypothèses importantes de cette étude est que cette différenciation serait favorisée à l'obscurité et plutôt réduite à la lumière. Cette hypothèse suppose donc un rôle important de la lumière pour l'accumulation des caroténoïdes. L'évolution des teneurs en caroténoïdes de la racine à l'obscurité observée par Fuentes et al. (2012) confirme les précédents travaux réalisés durant le développement de la racine de carotte par Cloutault et al. (2008). Dans leur étude cependant, l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes étaient globalement bien reliées aux variations de teneur en caroténoïdes, ce qui n'est qu'en partie le cas (effet génotype important) dans les résultats de Cloutault et al. (2008). Ces résultats soulignent qu'il est difficile d'établir, pour l'ensemble des génotypes de carotte, un schéma général de régulation de l'accumulation des caroténoïdes par le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse.

III.3.2. Impact des conditions de conservation

Lorsque que la carotte a atteint le stade de maturité se caractérisant par un calibre et une coloration corrects de la racine, deux types de conservation sont possibles, ce qui est important à prendre en compte en lien avec la qualité nutritionnelle et organoleptique de la carotte.

Le premier type de conservation est la conservation au champ mais des pertes importantes pouvant atteindre 80% peuvent être observées. Ces pertes sont principalement dues aux aléas climatiques (températures par exemple) mais également à l'attaque de pathogènes. Ces facteurs peuvent affecter le potentiel en caroténoïdes de la carotte à la récolte.

La seconde méthode de conservation, moins utilisée pour des raisons économiques, est la conservation en chambre froide. Contrairement à la conservation au champ, les teneurs en caroténoïdes sont stables sur quelques mois (Villeneuve et Leteinturier, 1992). De même, la conservation au congélateur à -24°C par rapport au réfrigérateur (1°C) n'affecte pas les teneurs en β -carotène et α -carotène (Kidmose *et al.*, 2004). Les chercheurs se sont particulièrement intéressés à l'impact de différents traitements post-récolte sur les teneurs en métabolites d'intérêt de la racine de carotte. Dans l'étude d'Alegria et al. (2012), il a été montré que le traitement aux chocs thermiques ainsi qu'aux UV-B induisaient une augmentation des teneurs en polyphénols par rapport au témoin ainsi qu'une augmentation des teneurs en caroténoïdes durant la conservation. Les caroténoïdes pourraient ici encore jouer un rôle d'antioxydants pour protéger la plante des traitements aux UV-B. Une rupture dans la chaîne du froid lors de la conservation de la racine de carotte entraîne par contre une diminution des teneurs en caroténoïdes (Zude *et al.*,

2007). Les conditions de conservations peuvent donc agir comme des stress pour la carotte et affecter les teneurs en caroténoïdes dans la racine.

Les différents impacts observés indiquent que les caroténoïdes sont des métabolites secondaires importants pouvant être impliqués directement ou indirectement dans les mécanismes de réponse de la carotte aux variations de l'environnement. Pourtant, les études actuellement disponibles ne traitent que des stress ou facteurs pris séparément, en culture, les plantes sont soumises à la combinaison de plusieurs contraintes environnementales. L'effet combiné de ces facteurs peut se traduire par des modifications du métabolisme des caroténoïdes différentes de celles observées en condition de stress individuel.

III.4. Etude multifactorielle : un enjeu majeur encore méconnu

III.4.1. Intérêt de l'interaction stress biotiques et abiotiques

En culture comme dans leur environnement naturel, les plantes sont soumises à une multitude de stress biotiques et abiotiques. Les plantes sont soumises dans la plupart des cas à l'effet simultané de plusieurs stress. L'analyse bibliographique conduit à deux types d'études concernant la combinaison de stress. On peut distinguer les études concernant l'impact de facteurs environnementaux en combinaison sur les paramètres physiologiques liés aux rendements, la biomasse foliaire ou du fruits/grain mais également l'accumulation de métabolites d'intérêts, des études s'intéressant davantage à l'interaction entre les stress en combinaison et plus particulièrement les stress de nature différente (biotique et abiotique).

Chez le sorgho, la combinaison d'une restriction hydrique avec des températures élevées entraîne une diminution d'environ 50% de la matière sèche, du rendement par grain et du nombre de grains par rapport au contrôle (Craufurd et Peacock, 1993). Chez le pois de printemps, il a également été montré que la combinaison d'une restriction hydrique et de fortes températures entraîne une forte diminution (80%) des teneurs en chlorophylles par rapport aux stress individuels. Dans cette étude, l'activité photosynthétique était également diminuée (facteur variant de 2 à 4 fois) en condition de stress combinés comparé aux stress individuels ainsi que de nombreux autres paramètres : nombre de grains, poids de chaque grain et rendement en grain (Prasad *et al.*, 2008).

Dans l'étude menée par Yermiyahu et al. (2008) la combinaison d'un stress salin combiné à un excès toxique de bore entraîne une diminution plus importante de la matière sèche dans les racines, les feuilles et les fruits chez le poivron, comparée aux stress seuls. Cependant chez la tomate, l'effet négatif de chacun de ces stress (bore et salin) sur la biomasse de la tige, des feuilles et des fruits était annulé en condition de stress croisés (Ben-Gal et Shani, 2002). Ces résultats mettent en avant que l'impact de stress croisés peut être différent des stress individuels mais également qu'il dépend de l'espèce considéré.

Jusqu'à présent, une seule étude a montré l'impact de la combinaison d'un stress biotique et d'un stress abiotique sur l'accumulation des caroténoïdes. Atkinson et al. (2011) ont mis en évidence chez la tomate que la combinaison d'une restriction hydrique et de l'infection par un nématode, *Meloidogyne incognita*, diminuait plus fortement les teneurs en lycopène que les stress individuels. Au contraire, les teneurs en glucose et fructose étaient augmentées en condition de stress combinés mais pas lorsque les stress étaient appliqués seuls.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'effet de stress combinés peut être soit positif ou négatif comparé aux stress individuels et qu'il dépend du stress mais également de l'espèce étudié.

En condition de stress combinés de nature différente, l'impact d'un stress sur l'autre peut être significatif. En effet, d'un point de vue global, les changements climatiques impacteraient le développement des pathogènes et leur capacité à infester une plante hôte, mais également le niveau de résistance de la plante (Garrett *et al.*, 2006). Il a été montré que la combinaison de températures élevées et d'une infection par des virus entraînent une diminution de la résistance de la plante aux virus de la mosaïque du tabac (TMV) et de la maladie bronzée chez le poivron (TSWV) (Moury *et al.*, 1998; Király *et al.*, 2008). De la même façon, de fortes températures associées à une infection par *Pseudomonas syringae* induit une inhibition de la défense basale liée au gène majeur de résistance R chez *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2008). Si ces études montrent que la combinaison des stress biotiques et abiotiques provoque en général un effet négatif renforcé pour la plante, des effets positifs ont également été montrés sur le niveau de résistance aux maladies. Ainsi, des températures élevées lors d'une infection par l'agent causal de la rouille (*Puccinia striiformis*) entraînent une augmentation de la résistance à la rouille chez le blé de printemps (Carter *et al.*, 2009). Une combinaison entre un stress salin et une infection par *Blumeria graminis* conduit à une augmentation de la résistance à la maladie du mildiou chez l'orge (Wiese *et al.*, 2004).

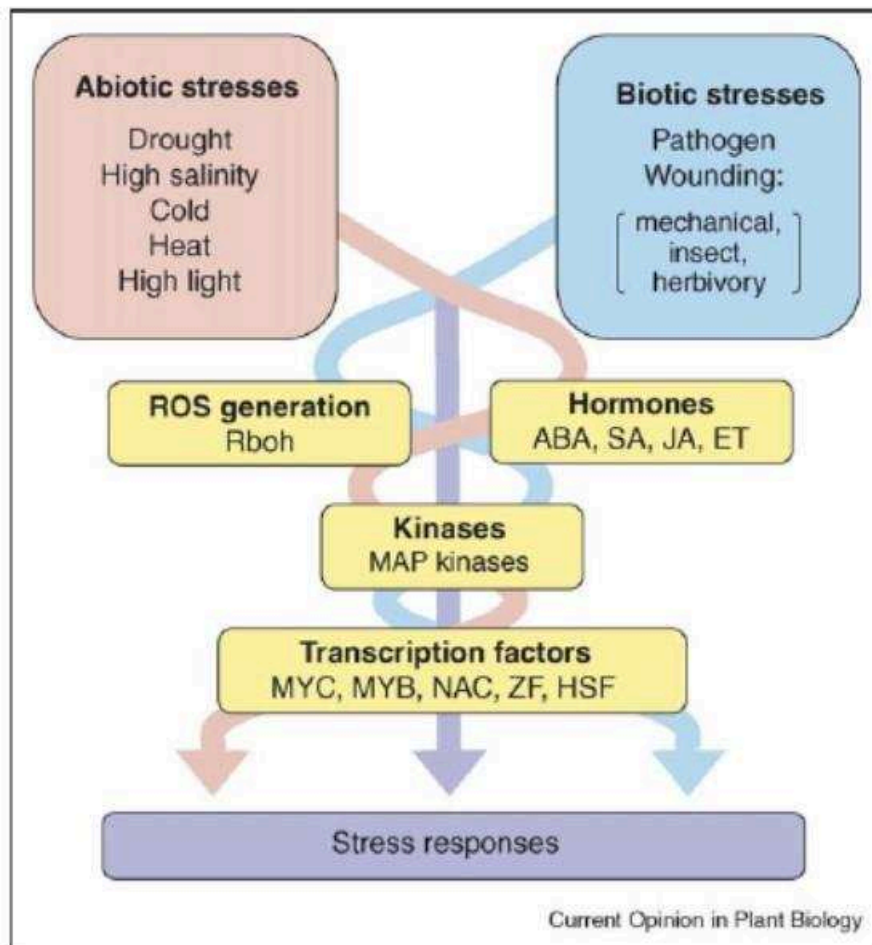


Figure 1.14 : Schéma montrant l'implication de métabolites, hormones et facteurs de transcription en réponse au stress biotique et abiotique chez les plantes d'après Fujita et al. (2006)

L'ensemble de ces résultats suggère que lors de stress biotiques et abiotiques, les plantes mettent en place des mécanismes complexes de défense conduisant soit à la résistance soit à la sensibilité, selon le type de pathogène et le type de facteur abiotique considérés.

Malgré leur intérêt évident, l'étude de combinaisons de stress est relativement récente. Il est à remarquer qu'aucune étude n'a cherché à mettre en évidence l'effet de stress combinés chez la carotte.

III.4.2. Les signaux métaboliques et facteurs de transcription : omniprésents et indispensables pour la réponse de la plante

La capacité des plantes à faire face aux stress biotiques et abiotiques en combinaison nécessiterait l'induction de réponses moléculaires adaptées mais n'est pas, dans la plupart des cas, liée directement à la réponse de la plante à chacun des stress considéré individuellement (Atkinson et Urwin, 2012).

Lorsque l'on considère un stress seul, il peut être relativement simple de trouver plusieurs travaux mettant en avant un ou plusieurs métabolites majeurs impliqués dans la défense de la plante. Par exemple, l'ABA est une phytohormone qui a été montrée comme étant impliquée dans la défense aux stress abiotiques et plus particulièrement en réponse à la restriction hydrique. L'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène ont largement été décrits comme impliqués dans les mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes. Cependant lorsque l'on considère la combinaison de ces différents types de stress, les réponses de la plante peuvent être relativement complexes et impliquer un nombre important de métabolites de défense (figure 1.14) (Fujita *et al.*, 2006). Dans beaucoup de cas, l'ABA joue un rôle de régulateur négatif pour la résistance aux maladies (Mauch-Mani et Mauch, 2005). Par exemple, un mutant de tomate déficient en ABA est plus résistant à l'infection par des pathogènes mais redevient sensible après application exogène d'ABA (Audenaert *et al.*, 2002). Il a également été montré que l'ABA et l'éthylène présentent une interaction antagoniste. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, l'application exogène d'ABA ou bien une restriction de l'apport en eau conduit à une inhibition du gène *PDF1.2* (jasmonic acid-ethylène responsive antifungal defensin), impliqué dans la synthèse de l'acide jasmonique et à l'éthylène, et entraîne un phénotype sensible (Anderson *et al.*, 2004). L'ABA étant une hormone impliquée dans la réponse aux stress abiotiques plus généralement, ces études ont montré qu'en condition de stress croisés les interactions entre voies métabolites sont difficiles à prédire et leur étude est souvent dépendante de l'espèce considérée, du stade de développement, de l'intensité et de la durée des stress impliqués (Ramegowda et Senthil-Kumar, 2015).

Les facteurs de transcription ont également un rôle central dans la réponse de la plante face aux stress environnementaux (Ramegowda et Senthil-Kumar, 2015). Les facteurs de transcription de type MYC et MYB ont été décrits comme généralement impliqués dans la réponse au stress hydrique. Des plantes surexprimant les facteurs MYC2 et MYB2 sont plus résistantes au stress hydrique en comparaison avec le génotype sauvage. D'autre part, l'infection par *Botrytis* conduit à la surexpression du gène *BOS1* (*Botrytis* susceptible 1) présentant une forte homologie de séquence avec le facteur de transcription MYB2. Il serait également possible que le facteur de transcription R2R3MYB soit un médiateur important pour la réponse aux stress combinés (Mengiste *et al.*, 2003). Il a également été montré qu'un facteur de transcription RD26 (facteur de transcription en réponse à la sécheresse de type CUC pour cup-shaped cotyledon) pourrait potentiellement moduler la réponse de la plante en réponse aux stress biotique et abiotique. L'expression de RD26 serait induite par l'acide jasmonique, le peroxyde d'hydrogène, la sécheresse, le stress salin, l'ABA et l'infection par les pathogènes (Atkinson et Urwin, 2012).

L'ensemble de ces études montre que des stress croisés induisent un grand nombre de voies de défense des plantes. L'implication positive d'un métabolite en réponse à un stress seul n'est pas forcément bénéfique en condition de stress croisés tant les interactions avec d'autres métabolites/voies métaboliques sont nombreuses. Le fonctionnement des stress croisés reste, à l'heure actuelle, encore relativement méconnu bien que les enjeux soient déterminants pour la production au champ.

IV. OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

IV.1. Objectif général de l'étude

A travers cet état de l'art, nous avons pu voir que les caroténoïdes représentent une classe importante de métabolites en santé humaine. Précurseurs de la vitamine A et présentant un rôle antioxydant, ils sont impliqués dans la prévention de nombreuses maladies métaboliques chez l'homme. Chez les plantes, ces métabolites secondaires ont un rôle également très important pour la photosynthèse, la photoprotection et la coloration des organes non chlorophylliens. Il apparaît même que ces pigments seraient impliqués dans la résistance des plantes au niveau des organes non photosynthétiques. Chez la carotte, les caroténoïdes sont accumulés au niveau de la racine, et la sélection anthropique a permis d'obtenir des génotypes présentant de fortes teneurs en ces

composés. De plus, l'accumulation de différents caroténoïdes a permis l'obtention d'un panel de couleur diversifié qui présente un intérêt particulier en lien avec les mécanismes de régulation sous-jacents à l'accumulation des caroténoïdes. La carotte représente donc un modèle tout particulier pour l'étude des caroténoïdes à la fois dans les feuilles, en lien avec le développement de la plante, et dans les racines en lien avec les propriétés nutritionnelle et organoleptique. L'étude des mécanismes de régulation liés à l'accumulation des caroténoïdes dans l'organe « racine » est également un champ d'investigation intéressant puisque l'accumulation se fait de façon progressive pendant le développement contrairement au modèle fruit. Actuellement, le déterminisme génétique de l'accumulation des caroténoïdes dans les racines de carotte est relativement bien connu. Les teneurs en caroténoïdes semblent également être sous régulation transcriptionnelle même si les résultats dépendent du génotype considéré.

L'état de l'art souligne néanmoins un grand manque de connaissance concernant l'impact de contraintes environnementales sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte. Chez d'autres espèces telles que la tomate et le poivron, les études montrent pourtant que l'impact de contraintes abiotiques sur le métabolisme des caroténoïdes est important. Jusqu'à présent, une seule étude a mis en évidence que la combinaison d'un stress abiotique et biotique diminue la teneur en lycopène chez le fruit de la tomate alors qu'elle entraîne une augmentation des teneurs en sucre comparé aux stress individuels. L'étude des stress biotique et abiotique en combinaison devient incontournable pour une meilleure compréhension du fonctionnement de la plante pour une gestion optimisée des productions végétales, en particulier dans un contexte de changements climatiques pouvant affecter à la fois la biologie de la plante mais aussi le comportement des agents pathogènes.

La question de recherche de ce travail de thèse est de déterminer quel est l'impact de stress individuels ou en combinaison sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte

Afin de répondre à cette question de recherche, trois axes de recherche ont été conduits.

IV.2. Premier axe de recherche : impact d'environnements contrastés

Il s'agit dans un premier temps d'évaluer l'importance de l'effet d'environnements contrastés en culture. Le premier axe de recherche de ce travail de thèse vise donc à déterminer quel est l'impact d'environnements contrastés sur les teneurs en caroténoïdes chez la carotte. Cette première étude vient approfondir les travaux menés par Kidmose et al. (2004) qui ont établi que la localisation géographique de la culture de carotte impactait les teneurs en caroténoïdes sans pour autant faire de lien avec des facteurs d'environnement. Les deux objectifs sont ici (i) de déterminer dans quelle mesure des paramètres agroclimatiques induisent des variations de teneurs en caroténoïdes au niveau de la plante entière, (ii) de déterminer si ces variations peuvent être liées au niveau de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et (iii) de déterminer si une régulation est possible entre caroténoïdes et chlorophylles dans les feuilles.

Cette première étude a été réalisée en décalant le cycle de culture des carottes. Cela s'est traduit essentiellement par des différences de température moyenne et de rayonnement global. Les analyses de quantification de caroténoïdes et chlorophylles ainsi que de l'expression des gènes ont été réalisées dans les feuilles et racines d'un panel composé de 5 géotypes aux couleurs de racine contrastées (deux orange, jaune, violet et blanc).

IV.3. Deuxième axe de recherche : effets de stress biotique et abiotique

Le deuxième axe de recherche constitue le cœur de ce travail de thèse et vise à comprendre l'impact de facteurs de stress appliqués seuls ou en combinaison. Les objectifs spécifiques ici sont donc de déterminer (i) quel est l'impact d'un facteur abiotique et d'un facteur biotique sur l'accumulation des caroténoïdes, (ii) si l'application de ces facteurs en combinaison conduit à un effet différent de celui des facteurs individuels, (iii) si ces variations peuvent être liées à l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes et de l'ABA et (iv) si le métabolisme secondaire est affecté spécifiquement, indépendamment du métabolisme primaire.

Pour cette étude, les choix concernant les stress ont été faits de la façon suivante :

- Pour le stress abiotique, le choix s'est porté sur une restriction de l'apport en eau. Les données bibliographiques montraient en effet un impact significatif de la restriction hydrique sur les teneurs en caroténoïdes dans les organes foliaires mais également dans le fruit. De plus, les deux études réalisées par Ombódi et al. (2014) et Zeipiņa et al. (2014) suggéraient que les apports en eau pourraient être un facteur limitant pour l'accumulation des caroténoïdes dans la racine de carotte.
- A notre connaissance, peu d'études étaient disponibles quant à l'effet d'un stress biotique sur l'accumulation des caroténoïdes chez les plantes. Pour le stress biotique, le choix s'est porté sur une infection artificielle avec *Alternaria dauci* (*A. dauci*), qui est l'un des agents pathogènes les plus dommageables sur carotte. Il provoque des nécroses sur le feuillage et rend la préhension des fanes impossible. De plus, l'équipe QuaRVeg (Qualité et Résistance aux Bioagresseurs des Espèces Légumières) travaille depuis plusieurs années sur les mécanismes de défense de la carotte à *A. dauci* ainsi que sur les composantes du pouvoir pathogène de celui-ci.

Dans cette étude, 6 génotypes ont été choisis soit pour leur phénotype-couleur contrasté (orange, rouge, violet et blanc) ou bien pour leur niveau de résistance au pathogène *A. dauci*. En plus des teneurs en caroténoïdes, les teneurs en sucres et en ABA ont été quantifiées dans les feuilles et les racines, ainsi que les teneurs en amidon dans les racines et en chlorophylles dans les feuilles. Le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes a également été quantifié dans les deux organes.

IV.3. Troisième axe de recherche : régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans le xylème et le phloème de racine de carotte

La racine de carotte est constituée de deux parties bien distinctes correspondant à des fonctions physiologiques différentes : le xylème et le phloème. Le métabolisme des caroténoïdes et la sensibilité à des facteurs de l'environnement dans ces deux tissus est méconnu. De plus, la coloration de ces deux tissus, en lien avec l'accumulation différentielle de caroténoïdes, représente un critère de sélection important. Il s'agit alors de mieux comprendre l'accumulation différentielle en caroténoïdes entre ces deux tissus. Le troisième axe de ce travail de thèse a donc pour objectifs spécifiques (i) d'évaluer les variations d'accumulation des caroténoïdes

respectivement dans le xylème et le phloème de la racine de carotte en réponse à un facteur abiotique et (ii) de savoir si des niveaux de régulation des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ou de la protéine PSY peuvent expliquer ces variations.

Les résultats obtenus permettront de confirmer ou non les observations qui auront pu être faites à l'échelle de la racine entière et de mieux comprendre le fonctionnement de cet organe quant à l'accumulation des caroténoïdes. La racine de carotte, par sa morphologie, permet d'étudier le rôle des différents tissus, ce qui est plus difficile à faire chez d'autres espèces.

Pour cette dernière étude, 5 génotypes de carotte aux couleurs contrastées (orange, violet, rouge et blanc) ont été cultivées en condition contrôle et en condition de restriction hydrique. Ce choix a été fait sur les bases de la fonction de l'organe racine et plus particulièrement en lien avec le rôle du xylème qui est de transporter la sève brute de la racine vers les autres organes ainsi qu'un besoin professionnel pour une meilleure gestion des apports en eau. Dans cette étude, les teneurs en caroténoïdes ainsi le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été quantifiés. L'une des plus importantes originalités de ce travail a été de quantifier la protéine PSY par immunomarquage en collaboration avec Dr Ralf Welsch de l'Université de Freiburg (Allemagne). Cette analyse a été réalisée à la fois sur le tissu xylémien et phloémien.

CHAPITRE 2

**INFLUENCE DE LA PERIODE DE CULTURE SUR
L'ACCUMULATION DES CAROTENOIDES CHEZ LA
CAROTTE**

I. INTRODUCTION

Actuellement, peu d'informations sont disponibles sur l'impact de facteurs environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte. De plus rares sont les études portant sur l'ensemble de la plante et plus particulièrement les feuilles et les racines. Une étude antérieure menée par Kidmose et al. (2004) a permis de mettre en évidence que la production de carotte à deux localités différentes impactait les teneurs en caroténoïdes dans la racine. Cependant, dans cette étude, les paramètres climatiques n'étaient pas enregistrés et il n'était pas possible d'émettre des hypothèses quant à l'effet particulier de certains facteurs environnementaux.

La première étude de la thèse, présentée ici, vise donc à déterminer quel pouvait être l'effet de la variation de facteurs environnementaux globaux sur l'accumulation des caroténoïdes à la fois dans les feuilles et dans les racines de carotte. Pour cela, les plantes ont été cultivées à deux périodes de l'année. Ces deux périodes de l'année représentent en effet un deux conditions agroclimatiques contrastés représentant des variations d'un ensemble de facteurs de l'environnement tels que la lumière et les températures. La première période correspondant à une période standard de culture de carotte et la seconde étant repoussée de plusieurs semaines lors de la même année. L'étude à la fois des feuilles et des racines chez la carotte constitue la première originalité de ce travail. Cette étude a été réalisée sur un panel de carottes présentant une variabilité phénotypique de racine relativement contrastée : orange, jaune, rouge, violette et blanche. L'étude de ce panel est l'un des éléments clés de la compréhension de l'accumulation des caroténoïdes dans la racine car l'accumulation spécifique d'un ou deux caroténoïdes est sans doute liée à des niveaux de régulation différents au sein de la voie de biosynthèse. Cette approche constitue le second point original de cette étude.

Afin de mieux comprendre l'impact de facteurs environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes, le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes a également été déterminé par PCR quantitative. L'objectif était de déterminer si la régulation transcriptionnelle pouvait expliquer les variations de teneurs en caroténoïdes observées à la fois dans les feuilles et dans les racines.

Cette première étude a donc pour but (i) de montrer que des facteurs de l'environnement impactent l'accumulation des caroténoïdes dans un large panel de géotypes de carotte (ii) de déterminer si les variations de teneurs sont les mêmes dans les feuilles et dans les racines et (iii)

déterminer si le niveau d'expression des gènes peut expliquer ces variations au sein des deux organes.

II. DIFFERENTIAL PIGMENT ACCUMULATION IN CARROT LEAVES AND ROOTS DURING TWO GROWING PERIODS

Premier article de la thèse, il a été publié dans Journal of Agricultural and Food Chemistry

Florent Perrin,^{†‡} Marwa Brahem,^{†‡} Cécile Dubois-Laurent,[†] Sébastien Huet,[†] Matthieu Jourdan,^{†‡} Emmanuel Geoffriau,[†] Didier Peltier,[†] and Séverine Gagné^{†*}

[†] Université d'Angers, Institut de Recherche en Horticulture et Semences - UMR 1345, SFR 4207 QUASAV, Angers, France

[‡] Agrocampus Ouest, Institut de Recherche en Horticulture et Semences - UMR 1345, SFR 4207 QUASAV, Angers, France

Corresponding author: E-mail: severine.gagne@univ-angers.fr. Tel.: +33.2.41.22.57.30. Fax +33.2.41.22.55.15.

Abstract

Carotenoids are important secondary metabolites involved in plant growth and nutritional quality of vegetable crops. These pigments are highly accumulated in carrot root but the knowledge about the environmental factors on their accumulation is limited. The purpose of this work was to investigate the impact of environmental variations on carotenoid accumulation in carrot leaves and roots. In this work, carrots were grown during two contrasted periods to maximize bioclimatic differences. In leaves, carotenoid and chlorophyll contents were lower in the less favorable growing condition while relative contents were well conserved for all genotypes suggesting a common regulatory mechanism. The down-regulation of all genes under environmental constraints demonstrates that carotenoid accumulation is regulated at transcriptional level. In roots, the decrease in α -carotene and lutein contents was accompanied by an increase of β -carotene relative content. At transcriptional level, *LCYB* and *ZEP* expression increased while *LCYE* expression decreased in less favorable condition, suggesting that carotenoid biosynthesis is switched toward the β -branch.

KEYWORDS: Carotenoid, Chlorophyll, *Daucus carota* L., Environmental factors, Growing conditions, Transcriptional regulation

Introduction

Environmental factors impact not only plant growth and yield but also nutritional and organoleptic quality due to important modifications in plant metabolism. These modifications are induced by a diversity of adverse biotic (virus, bacteria, fungus, herbivores) or abiotic (light, wind, temperature, water...) factors. Data about the impact of environmental factors on primary and particularly secondary plant metabolites are numerous (see review Ramakrishna and Ravishankar 2011). Reviews have been published about the impact of biotic and abiotic factors on important families of secondary metabolites like anthocyanins (Gould 2004), flavonoids (Mierziak et al. 2014) or polyamines (Liu et al. 2007). These reviews highlight the involvement of these secondary metabolites in plant response to drought, UV, temperature as well as pathogen attack. The importance of secondary metabolites makes critical the studies about the impact of environmental factors on their biosynthesis.

Carotenoids are terpenoid plant secondary metabolites synthesized in plastids by nuclear encoded enzymes. The carotenoid biosynthetic pathway is well described (see review Cazzonelli and Pogson 2010). In photosynthetic organs, carotenoids are associated to chlorophyll for photosynthesis and thus act as photoprotectants (Frank and Cogdell 1996). These pigments are also stored in chromoplast of non-green tissues like fruits and flowers where they play a role as attractors for pollinators and disseminators (Bartley and Scolnik 1995). However, in underground organs like tubers or roots, their role is not clearly understood. Carotenoids are particularly highly accumulated in carrot root which is therefore considered as a healthy vegetable. Indeed, carotenoids exhibit antioxidant properties, and are necessary in human diet as provitamin A precursors (Parker 1996; Fraser and Bramley 2004; El-Agamey et al. 2004). If genetic factors are quite well studied (Just et al. 2009; Jourdan et al. 2015) and the kinetics of root carotenoid accumulation described over plant development (Clotault et al. 2008), the impact of environmental factors on carotenoid accumulation is only partially known.

Several studies have shown that carotenoid accumulation is modulated depending on environmental factors. These studies mostly focused on fruits since carotenoids are a major quality attribute and accumulated during ripening process. In tomato under salinity stress, carotenoid content increased in fruits (Borghesi et al. 2011) but not in leaves (Duan et al. 2012). In tomato leaves, carotenoid content was not differentially affected by salt stress while carotenogenesis gene expression and ABA content were higher under stress condition compared to control (Duan et al. 2012). Carotenoid contents in pepper increased (phytoene) or decreased (β -carotene) in response to oxidative induced stress (Bouvier et al. 1998). In this study, carotenogenesis gene expression was induced compared to non-treated plants. These works have

shown that carotenoid accumulation could differ between different plant organs or species could not be systematically linked to gene expression in relation to environmental stress.

In carrot, data about the impact of environmental factors on carotenoid accumulation are limited. It has been shown that carotenoid contents in carrot roots are modulated depending on growth locations (Kidmose et al. 2004) which suggests an effect of environmental factors on carotenoid accumulation. Sandhu *et al.* (Sandhu et al. 1988) have shown that a higher nitrogen fertilization increased carotenoid accumulation in carrot root. In addition, Singh *et al.* (Singh et al. 2012) have shown that mineral nutrient application (boron and calcium) in water supply decreased carotenoid content. Recently, other works concerning water supply (drip irrigation, sprinkler and rain fed irrigation) have been investigated. Zeipiņa *et al.* (Zeipiņa et al. 2014) have shown that drip and sprinkler irrigation systems did not affect carotenoid accumulation in carrot roots. Ombódi *et al.* (Ombódi et al. 2014) have shown that carotenoid accumulation is modulated depending on water quantity supply (sprinkler irrigation system compared to rain supply) but results depended on the year. These works showed that agronomic processes affect carotenoid accumulation in carrot. To our knowledge, only carotenoid accumulation has been investigated but no regulation scale like gene expression.

Abiotic factors, including environmental and agronomic parameters, seem to have a significant but variable impact on carotenoid accumulation depending on organs and species. In order to measure the impact importance of bioclimatic conditions, the objective of this work was to compare the carotenoid accumulation in carrot between two contrasted growing periods, in both leaves and roots. Pigment content and carotenogenesis gene expression were investigated in five different root color genotypes.

Materials and methods

Plant material and growing conditions. Five carrot S2 inbreds with different root colors derived from Yamanouchi Ishyaku senko (orange), Cosmic Purple (orange/purple), Lobberich (yellow), Kintoki (red) and Blanche des Vosges (white) were grown in the same field in close plots following similar practices at Agrocampus Ouest (Angers, France). Two batch productions were performed with two sowing dates in a randomized 3 blocks design. The first growing period (GP 1) was done from 12 July 2013 (sowing) to 25 September 2013 (harvest), the mean temperature was 18.4°C with a minimum and maximum of 9.1 and 26.8°C respectively and the mean of global ray was 1,8 J.cm⁻² with a minimum and maximum of 0,3 and 2,9 J.cm⁻² respectively. This period corresponds to a regular cultural period for carrot growing. The second one (GP 2) was done

between 7 August 2013 and 19 November 2013 in order to maximize condition differences, the mean temperature and the mean of global ray were significantly lower compared to the first growing period: 14.6°C (decrease by 21%) and 1,3 J.cm⁻² (decrease by 28%), respectively. The minimum and maximum were 5.1 and 25.7°C respectively for temperatures and were 0,1 and 2,6 J.cm⁻² respectively for global ray. Harvest was done at the same root development stage; the sum of temperatures was only 8% lower in the first growing period compared to the second one (1,382.5°C and 1,505.9°C respectively) (Figure S2.1, Annexe I). In both growing periods the same irrigation program was applied so that water supply was not a limiting factor, which is in accordance with the observation that the relative water content in both organs was not affected for any genotype.

At harvest, 10 plants per inbred and per block were collected. Leaves were separated from roots and immediately stored in liquid nitrogen. Three medial parts of the root were taken from each root, and immediately stored in liquid nitrogen. All samples were ground to powder and stored at -80°C.

Carotenoid and chlorophyll analysis. As pigments associated to photosynthesis, carotenoids and chlorophylls were simultaneously analysed in leaves. Pigment extraction from roots and leaves, and quantification were performed as described in (Jourdan et al. 2015), with slight modifications for the elution program according to the organ. The analyses for carotenoid quantification were done on a Shimadzu HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) equipped with a thermostated autosampler (SIL-10AD *VP*), a diode array detector (SPD-M10A *VP*) and carotenoid were separated along an YMC C30 (YMC, Japan) column (150 x 4.6; 3µm). For leaf carotenoid and chlorophyll analyses, the elution program had the following proportions of solvent A (MeOH/ACN/H₂O, 84/14/2, v/v/v): 0-5 min, 95-70%; 5-25 min, 70-45%; 25-30 min, 45-10%; 30-35 min, 10-95%; 35-42 min, 95%. For root carotenoid analyses, the elution program had the following proportions of solvent A: 0-12 min, 80-45%; 12-14 min, 45-10%; 14-17 min, 10-80%; 17-23 min, 80%.

Carotenoid compounds were identified and quantified as in (de Rosso and Mercadante 2007; Jourdan et al. 2015). Data represent the mean of three assays per sample, and carotenoids are expressed as mg of β-carotene equivalent per 100 g of dry weight (DW). Chlorophyll contents are expressed as chlorophyll a equivalent in mg per 100 g of DW.

Gene expression analysis. Total RNA were extracted using the NucleoSpin® RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Germany), with slight modifications in the supplier's specifications. Before the first step, 2 mg of PVP40 was added, and the DNase treatment lasted 30 min. RNA quality was checked by agarose gel electrophoresis and absorbance quantification.

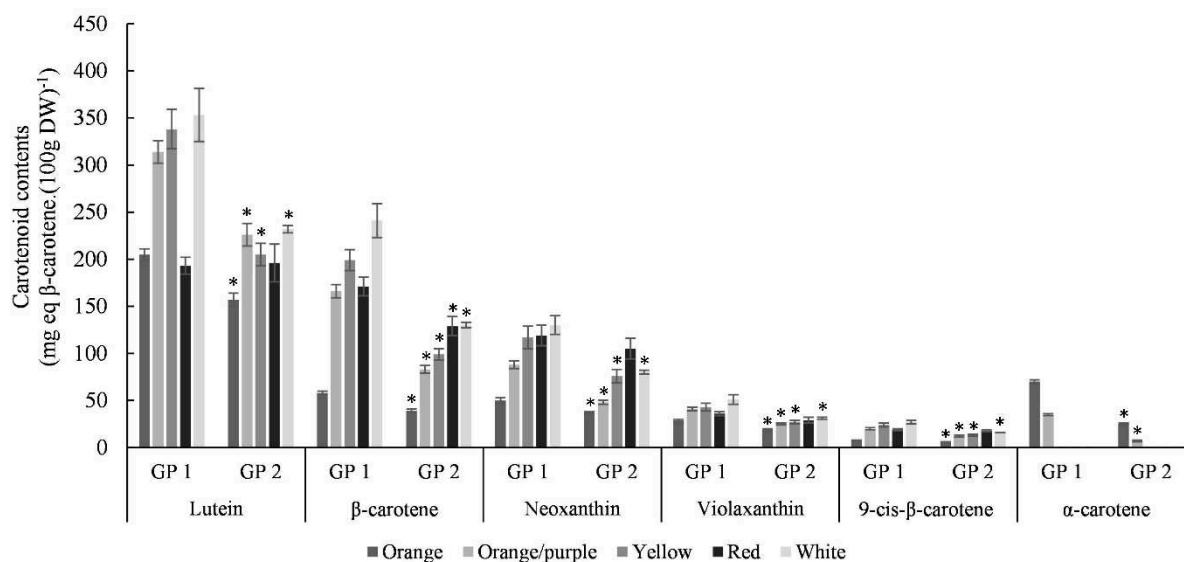


Figure 2.1: Carotenoid content in leaves depending on the genotype during the first (GP 1) and the second (GP 2) growing period. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% between GP 2 and GP 1 for a given compound (Tukey test).

Table 2.1: Total carotenoid and chlorophyll content and ratio of total carotenoid (C)/ total chlorophyll (Chl) in leaves in the five studied genotypes in the first (GP 1) and the second (GP 2) growing periods.

genotype	total carotenoid content in leaves (mg equiv β -carotene (100 g DW) ⁻¹)		total Chl content in leaves (mg equiv chlorophyll a (100 g DW) ⁻¹)		C/Chl	
	GP 1	GP 2	GP 1	GP 2	GP 1	GP 2
orange	458 \pm 33	288 \pm 18*	871 \pm 66	451 \pm 21*	0.52	0.64
orange/purple	643 \pm 21	399 \pm 20*	1498 \pm 52	748 \pm 41*	0.43	0.53
yellow	740 \pm 39	419 \pm 27*	1418 \pm 72	736 \pm 41*	0.52	0.57
red	510 \pm 30	443 \pm 38*	1075 \pm 59	823 \pm 50*	0.47	0.53
white	801 \pm 62	492 \pm 10*	1525 \pm 148	874 \pm 23*	0.52	0.56

^aValues are the mean \pm SD of three biological replications ($n = 3$). * indicates a significant difference at 5% between GP 2 and GP 1 for a given genotype (Tukey test).

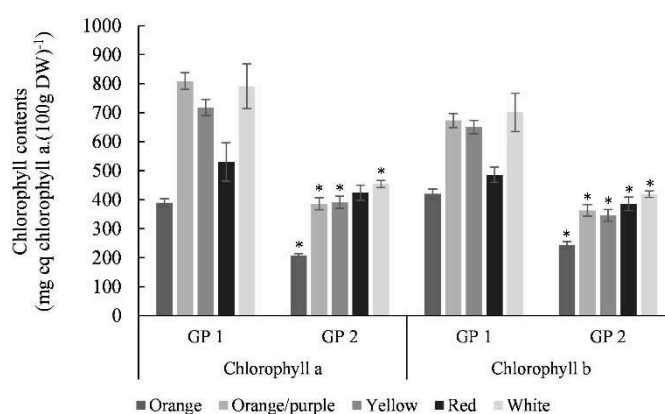


Figure 2.2: Chlorophyll content in leaves depending on the genotype during the first (GP 1) and the second (GP 2) growing period. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% between GP 2 and GP 1 for a given compound (Tukey test).

Retro-transcription was performed using MLV-Reverse transcriptase (Promega, USA) and oligo(dT)₁₅ (Promega, USA). The absence of gDNA contamination was checked by PCR by using EF1 α primers bordering an intron to discriminate the size of the amplicons.

Quantitative real-time PCR was performed by using GoTaq[®] qPCR Master Mix 1X (Promega, USA), 0.3 μ M of each primer, 2.5 μ g of cDNA, and sterile water in a final volume of 10 μ L. The thermal cycling conditions (CFX384 Touch Real-Time PCR, BioRad, USA) were the following: pre-incubation at 95°C for 10 min, 15 s at 95° and 1 min at 60°C for 40 cycles. Relative gene expression was calculated using the E^{- Δ Ct} method (efficiency^{- Δ Ct}) with Δ Ct being the difference of Ct between plants cultivated in the growing period 2 and the plant cultivated in the growing period 1 (Pfaffl 2001). The data were normalized by using *Actin*, *EF1 α* , and *Tubulin β* housekeeping genes. PCR efficiency were determined by a range of 5 points (a cascade dilution 1/4 of total cDNA) (BioRad CFX Manager software). Negative controls were done by replacing cDNA by sterile water.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed by using R version 3.1.0 program. Differences were analysed by an ANOVA test followed by a Tukey test for pigment contents. Variance analyses were performed by an ANOVA test on three biological replications (n=3). Principal Component Analyses (PCA) were performed on the mean of three biological replications for each factor using the FactoMineR package.

Results

Carotenoid and chlorophyll contents lower in carrot leaves in the second growing period.

In carrot leaves, the main carotenoid was lutein (36% to 49% of total carotenoids in the first growing period), then β -carotene (14% to 32%), neoxanthin (12% to 22%), violaxanthin (6% to 7%), and 9-*cis*- β -carotene (2% to 4%) (Figure 2.1). Alpha-carotene was only found in orange and orange/purple genotypes (17% and 6%, respectively). Total carotenoid contents were significantly lower in the second growing period compared to the first one for all genotypes (significant effect of growing period, *p-value* < 0.05): orange (37%), orange/purple genotype (38%), yellow (44%), and white (39%) (Table 2.1). Carotenoid content was lower by 13% in the red genotype compared to an average decrease of 40% for all the other studied genotypes. Each carotenoid content was lower in the second growing period compared to the first one as observed for total content for all genotypes but in a lesser extent for the red genotype (Figure 2.1). Despite

Table 2.2: Total carotenoid content in roots in the five studied genotypes in the first (GP 1) and the second (GP 2) growing periods.

genotype	total carotenoid content in roots (mg equiv β -carotene (100 g DW) ⁻¹)	
	GP 1	GP 2
orange	14.94 \pm 0.51	11.89 \pm 0.46*
orange/purple	66.41 \pm 1.90	46.85 \pm 1.93*
yellow	5.66 \pm 0.25	2.92 \pm 0.24*
red	69.48 \pm 2.46	82.67 \pm 2.27*
white	0	0

*Values are the mean \pm SD of three biological replications ($n = 3$). * indicates a significant difference at 5% between GP 2 and GP 1 for a given genotype (Tukey test).

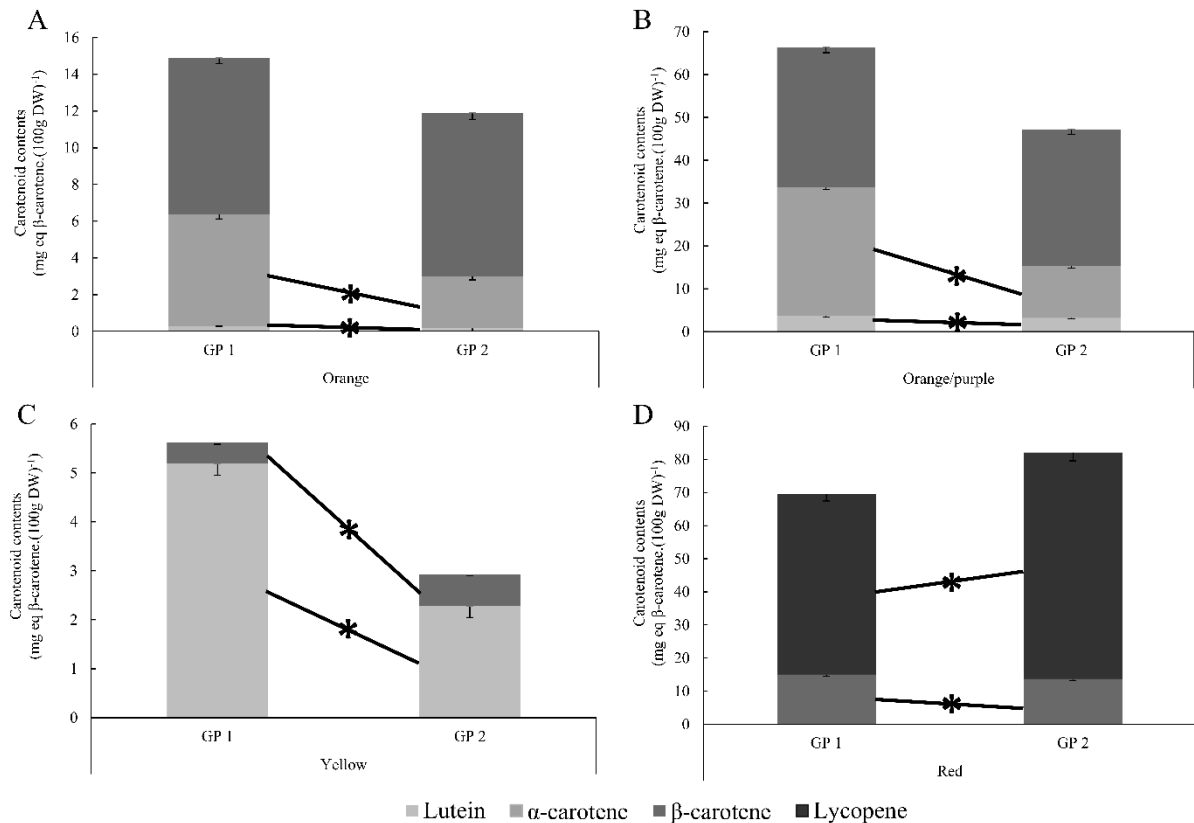


Figure 2.3: Carotenoid content in roots in the (A) orange, (B) orange/purple, (C) yellow and (D) red genotypes cultivated during the first (GP 1) and the second (GP 2) growing period. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% between GP 2 and GP 1 for a given compound (Tukey test).

a lower total contents, the relative content of each carotenoid was conserved. The maximum variation between the two growing periods for a given carotenoid and genotype ranged only between 3 and 8%.

Similarly to carotenoids, total chlorophyll content was significantly lower in the second growing period compared to the first one for all genotypes: orange (48%), orange/purple (50%), yellow (48%), red (24%), and white (43%) (Table 2.1). Chlorophyll a and chlorophyll b contents were significantly lower (43%) in the second growing period compared to the first one independently of the genotype (Figure 2.2). As observed for carotenoids, the chlorophyll a and b relative contents were conserved between the two growing periods for all genotypes (less than 3% of difference). The ratios of total carotenoids / total chlorophylls (C/Chl) were relatively conserved (on average 50%) whatever the growing period and the genotype (Table 2.1).

A PCA analysis including all leaf pigments was realized to study the distribution of variation based on growing period and genotype (Figure S2.2, Annexe I). The first dimension represented 83.3% of the variability, and was explained by β -carotene (14.7%), 9-*cis*- β -carotene (14.6%), violaxanthin (14.5%), chlorophyll a (14.0%), chlorophyll b (13.9%) and lutein (12.9%). The second dimension represented 13.2% of the variability and was explained by α -carotene (76.7%). PCA analysis showed a clear differentiation between the two growing periods, with a higher dispersion for the first one. However genotypes were separated only depending on the second dimension which was essentially related to α -carotene. The genotype effect was therefore separating orange genotypes accumulating α -carotene from non-orange genotypes.

Carotenoid content in carrot roots varied depending on the two growing periods. Total root carotenoid contents were significantly lower in the second growing period compared to the first one for the orange (21%), orange/purple (29%), yellow (48%) genotypes, but were higher for the red one (19%) (Table 2.2).

Contrary to leaves, most individual carotenoids were affected by the environment according to the genotype. In the orange genotype, α -carotene and lutein contents were lower by 54% and 45% respectively in the second growing period compared to the first one (Figure 2.3A). In the orange/purple genotype, α -carotene and lutein contents were significantly lower in the second growing period in comparison to the first one (60% and 22% less, respectively) (Figure 2.3B). In both orange genotypes, the significant higher α -carotene relative content (17 and 19%) corresponded to an increase by 18% of β -carotene relative content in root. In the yellow genotype, β -carotene content was higher (49%) whereas lutein content was lower (56%) in the second growing period compared to the first one (Figure 2.3C). Lutein proportion was lower by 14%, and resulted in a higher β -carotene proportion (14%) in the second growing period compared to the first one. The content in lycopene, which was the main pigment in the red genotype was higher

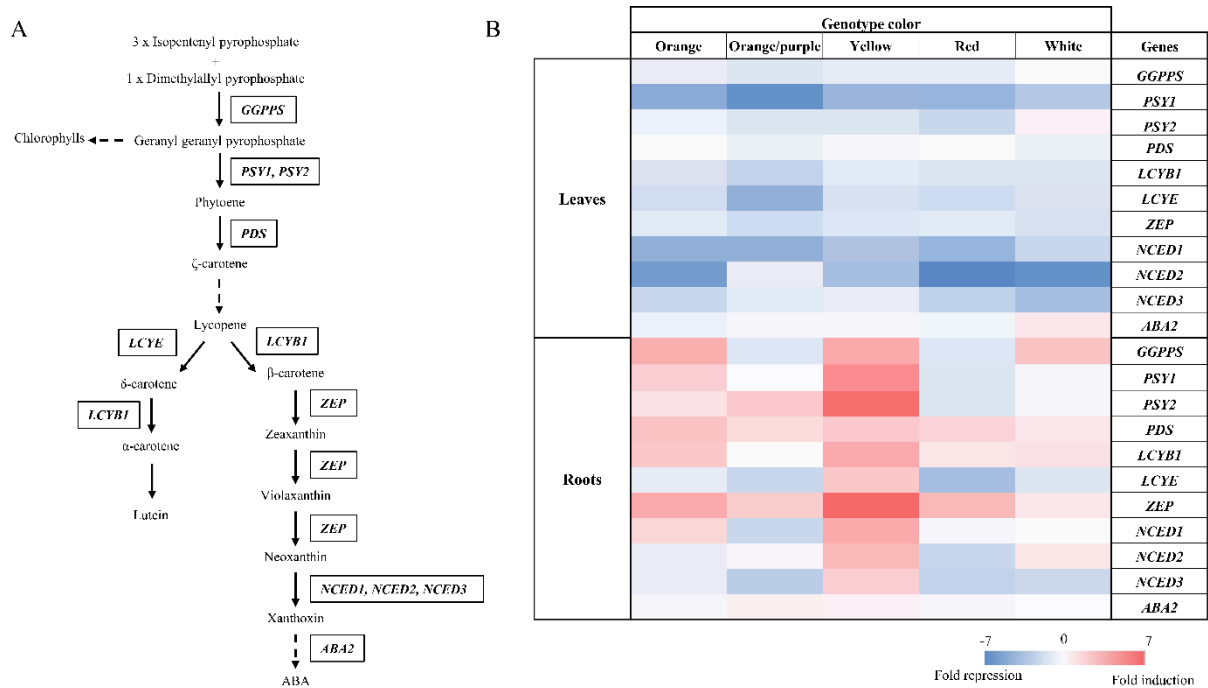


Figure 2.4: Heatmap of relative carotenogenesis gene expression in leaves and roots in the five studied genotypes. (A) Carotenoid biosynthesis pathway adapted from 5. Only studied genes are represented. (B) Heatmap of the relative gene expression (in log₂) in carrot leaves and roots. A blue color represents an under-expression and a red color an overexpression of the gene in the second growing period relative to the first one. A more intense color corresponding to a higher expression difference. GGPPS: geranyl geranyl pyrophosphate synthase, PSY: phytoene synthase, PDS: phytoene desaturase, LCYB: lycopene β-cyclase, LCYE: lycopene ε-cyclase, ZEP: zeaxanthin epoxidase, NCED: 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, ABA: abscisic acid.

(25%). In contrast, β -carotene content was lower in the second growing period compared to the first one (9%) (Figure 2.3D).

The major root pigment correlated to the first dimension of PCA analysis (Figure S2.3, Annexe I) which explained 48.2% of the variability was α -carotene (43.3%). The PCA second dimension, which explained 37.5% of the variability, was correlated to β -carotene (37.6%), lycopene (27.6%) and lutein (27.5%). Contrary to carotenoid content in leaves, the distribution did not separate the two growing periods and the distribution based on the genotype revealed a difference between all studied genotypes. The distribution was based on lycopene, lutein and α -carotene, i.e. compounds that are not accumulated in all genotypes, which explained a higher variability among genotypes compared to growing periods. As observed in leaves, the first growing period has shown a higher variability than the second one.

Relative gene expression of carotenoid biosynthesis pathway in both carrot leaves and roots in the two studied growing periods. To investigate the impact of growing periods on the control of carotenoid accumulation, the expression of *GGPPS*, *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *LCYB1*, *LCYE*, *ZEP*, *NCED1*, *NCED2*, *NCED3*, and *ABA2* genes was measured both in leaves and roots. This set of genes was chosen in order to cover the biosynthetic pathway (Figure 2.4A).

In leaves, genes were either down-regulated or non-affected in the second growing period compared to the first one for all studied genotypes. For all genotypes, the reduction of gene expression was overall more striking for *PSY1* which is upstream in the carotenoid pathway, as well as for *NCED1* and *NCED2* which are involved in the final steps (Figure 2.4B). Interestingly, *PSY1* was more affected by growing periods than *PSY2*.

In contrast, no general trend could be observed in roots for all genes and all genotypes. In opposition to what was observed in leaves, some genes were up regulated in the second growing period compared to the first one for some genotypes. *PDS* and *ZEP* were up-regulated in the second growing period compared to the first one for all genotypes as well as *LCYB1* except for the orange/purple one. *LCYE*, a specific β - ϵ branch gene, was down-regulated in all genotypes except for the yellow one. The yellow genotype was the only one for which all the studied genes were up-regulated in the second growing period compared to the first one.

ABA2 was the only gene not to be differentially expressed between the two growing periods for all genotypes in both leaves and roots.

Discussion

Carotenoids are important secondary plant metabolites involved in crop nutritional quality such as carrots. Although the impact of environmental factors on whole plant metabolism as well as specific metabolites was studied in literature (Gould 2004; Liu et al. 2007; Ramakrishna and Ravishankar 2011; Mierziak et al. 2014), it still remains poorly understood for carotenoid accumulation. If agronomic parameters were already investigated for carotenoid accumulation in carrot root, the impact of environmental variations is still a lack. The objective of our work was to investigate the impact of two contrasted growing periods on carotenoid accumulation in both carrot leaves and roots.

The growing period affects genotype potential in leaves and roots. In our work, the first growing period was performed during a standard growing period and the second one was done latter in order to maximize bioclimatic differences. The second growing period was considered less suitable for carrot growth than the first one as supported by the longer time required to reach the same developmental stage. Our PCA analyses in both leaves and roots, based on pigment accumulation, have revealed that genotype distribution was higher in the first growing period compared to the second one. These results showed that specific compound variability was reduced in the second growing period. These results suggesting that less favorable conditions tend to homogenize genotype variability while more favorable conditions tend to increase genotype specific potential and lead to a higher genotype variability.

In this study, carotenoid accumulation as well as chlorophyll content and gene expression were affected by less favorable conditions but not in the same trend in both leaves and roots, suggesting different regulatory mechanisms.

Carotenoid and chlorophyll relative contents are significantly affected in leaves under less favorable conditions. In leaves, the lower pigment content observed in all genotypes suggests that leaves might be susceptible to environmental changes due to an exposure to various environmental factors (temperature and solar radiation). Despite this decrease in pigment content, the relative contents of each pigment and C/Chl ratio were well conserved between the two growing periods, both for carotenoid and chlorophyll. This result suggests a coordination between chlorophyll and carotenoid relative content in carrot leaves which are actually synthesized from a common precursor, the geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP). In tomato leaves, the overexpression of *SIPSY1* increased carotenoid contents but decreased gibberellin

contents (also synthesized from GGPP), due to a redirection of the GGPP pool from the gibberellin pathway to the carotenoid pathway (Fray et al. 1995). In our results, the expression of *GGPPS*, which is the last common gene between chlorophyll and carotenoid biosynthesis, and *PSY*, which is the first gene of carotenoid synthesis, was lower for all genotypes in the less favorable condition. Similarly, in pepper fruit ripening, *GGPPS* and *PSY* expression was described as important regulatory key (Hugueneu et al. 1996). This result is in favor of a transcriptional level for carotenoid and chlorophyll synthesis, at the level of *GGPPS* and *PSY* genes. One major hypothesis is that carotenoid and chlorophyll proportions in leaves are dependent to GGPP availability regulated at transcriptional scale by environmental factors.

Carotenoids contents in leaves are regulated at transcriptional scale under different environmental conditions. In leaves, all the carotenogenesis genes were down-regulated and all carotenoid contents were lower for all genotypes in the less favorable growing period compared to the first one. Our results suggest a transcriptional regulation of carotenoid accumulation in carrot leaves under environmental constraints. A transcriptional regulation was demonstrated by functional validation in carrot leaves between *LCYB1* overexpression and an increase of β -carotene contents (Moreno et al. 2013). Furthermore, *PSY1*, but not *PSY2*, was highly down-regulated in the five studied genotypes which confirms data from Wang *et al.* (Wang et al. 2014) and Fuentes *et al.* (Fuentes et al. 2012) suggesting that *PSY1* expression may control chloroplast carotenoid synthesis in carrot leaves while *PSY2* is related to carotenoid synthesis in root chromoplasts.

Less favorable conditions induced a switch in carotenoid biosynthesis in roots. In roots, carotenoid contents were in accordance with previous reports showing that there is a differential accumulation of carotenoids, both in terms of content and relative content, depending on the genotype (Clotault et al. 2008)(Nicolle et al. 2004; Surles et al. 2004). Only some carotenoid contents were affected by environmental variations depending on the genotype. Kidmose *et al.* (Kidmose et al. 2004) have shown that α -carotene and β -carotene contents of six carrot genotypes doubled when grown in two different locations (no data about climatic parameters was given) depending on the genotype. Carotenoids in carrot roots are therefore affected by environmental variations depending on the genotype.

In our work, carotenoid contents and relative abundance especially for α -carotene and lutein are affected by environment factors. Under less favorable conditions, the lower level of α -carotene content in the orange and orange/purple genotypes and in lutein content for the yellow one was accompanied by an increase of β -carotene relative content: carotenoid relative content seems to switch between the two branches of carotenoid biosynthesis pathway towards the β -

branch. At transcriptional level, *LCYB1* was overexpressed in the less favorable condition for all genotypes, except for the orange/purple one. Further, *LCYE*, which is specific to β - ϵ branch, was down regulated for all genotypes except for the yellow one which is the only one accumulating high lutein amount. During carrot root development, *LCYB1* expression was also described to be correlated to β -carotene accumulation (Clotault et al. 2008; Fuentes et al. 2012). Previous result of functional validation showed that overexpression of *LCYB1* increased significantly β -carotene content and decreased α -carotene content (Moreno et al. 2013), suggesting an important role of *LCYB* expression for β -carotene accumulation. The antagonist expression of *LCYB* and *LCYE* was described as crucial regulatory element for specific carotenoid (α -carotene, β -carotene, lutein or lycopene) accumulation (Ronen et al. 2000; Bai et al. 2009). In sweet potato, inhibition of *LCYE* decreased lutein content and increased β -carotene, xanthophyll (zeaxanthin, violaxanthin and neoxanthin) and ABA contents, and led to a salt stress resistance phenotype (Kim et al. 2013). Altogether, literature (Fuentes et al. 2012; Arango et al. 2014; Jourdan et al. 2015) and our results support the hypothesis of a possible re-orientation under environmental constraints of carotenoid biosynthesis by *LCYB* and *LCYE* transcript level. In our work, *ZEP*, involved indirectly in β -carotene accumulation (Jourdan et al. 2015), was overexpressed in all genotypes in the less favorable growing condition. In *Arabidopsis* roots, a similar result showed that *ZEP* was overexpressed under drought stress (North et al. 2005). Another work demonstrated that the overexpression of *ZEP* led to a resistant phenotype to osmotic stress in *Arabidopsis* (Park et al. 2008). Both at the central node and the end of the β -branch, these results suggest a switch, regulated at the transcriptional level, toward the β -branch, under less favorable conditions in order to focus synthesis on the final metabolites in relation with their role in stress tolerance (Davison et al. 2002; Van Ha et al. 2014; Danquah et al. 2014). Overall, our results concerning the impact of less favorable growing period on carotenoid accumulation in carrot suggest a stress-like response.

Conclusion

In this study, it was concluded that different growing periods significantly affected carotenoid accumulation in carrot leaves and roots. The decrease of carotenoid content in the less favorable growing period may impact nutritional and organoleptic root qualities. In our work, pigment accumulation was modulated according to environmental conditions but not in the same trend in both leaves and roots. In leaves, all pigment contents and gene expression were lower in the less

favorable condition suggesting a simple regulatory mechanism. In contrary, in roots, carotenoid accumulation in response to environmental constraints depends on the genotype, and involves a more complex regulatory mechanism passing through a switch between the two branches. To a better management of crop production to maintain/optimize nutritional and organoleptic properties, studying the impact of specific environmental stresses would help in identifying the differences in regulation processes.

Aknowledgments

We wish to thank Muriel Bahut, Laurence Hibrand Saint-Oyant and Annie Chastellier from the ANAN platform (Analyze of nucleic acids - UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, France) for their technical help. We thank Rémi Gardet, Jacky Granger and Daniel Sochard from INEM (Mutualized experimental facilities - UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, France) for the experimental installation. Florent Perrin is a PhD student funded by the French Ministry.

SUPPORTING INFORMATION

Daily registration of temperatures and global during the two growing periods. Primer sequences use for gene expression analysis. PCA analysis of pigments in carrot roots and leaves. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- (1) Ramakrishna, A.; Ravishankar, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6*, 1720–1731.
- (2) Gould, K. S. Nature's swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *5*, 314–320.
- (3) Mierziak, J.; Kostyn, K.; Kulma, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **2014**, *19*, 16240–16265.
- (4) Liu, J. H.; Kitashiba, H.; Wang, J.; Ban, Y.; Moriguchi, T. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* **2007**, *24*, 117–126.
- (5) Cazzonelli, C. I.; Pogson, B. J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 266–274.
- (6) Frank, H. A.; Cogdell, R. J. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 257–264.
- (7) Bartley, G. E.; Scolnik, P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1027–1038.
- (8) Parker, R. S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* **1996**, *10*, 542–551.
- (9) El-Agamey, A.; Lowe, G. M.; McGarvey, D. J.; Mortensen, A.; Phillip, D. M.; Truscott, T. G.; Young, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *430*, 37–48.
- (10) Fraser, P. D.; Bramley, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 228–265.
- (11) Just, B. J.; Santos, C. A. F.; Yandell, B. S.; Simon, P. W. Major QTL for carrot color are positionally associated with carotenoid biosynthetic genes and interact epistatically in a domesticated × wild carrot cross. *Theor. Appl. Genet.* **2009**, *119*, 1155–1169.

- (12) Jourdan, M.; Gagné, S.; Dubois-Laurent, C.; Maghraoui, M.; Huet, S.; Suel, A.; Hamama, L.; Briard, M.; Peltier, D.; Geoffriau, E. Carotenoid content and root color of cultivated carrot : a candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PLoS One* **2015**, *10*, e0116674.
- (13) Clotault, J.; Peltier, D.; Berruyer, R.; Thomas, M.; Briard, M.; Geoffriau, E. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 3563–3573.
- (14) Borghesi, E.; González-Miret, M. L.; Escudero-Gilete, M. L.; Malorgio, F.; Heredia, F. J.; Meléndez-Martínez, A. J. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11676–11682.
- (15) Duan, H.; Zhu, Y.; Qi, D.; Li, W.; Hua, X.; Liu, Y.; Deng, X. Comparative study on the expression of genes involved in carotenoid and ABA biosynthetic pathway in response to salt stress in tomato. *J. Integr. Agric.* **2012**, *11*, 1093–1102.
- (16) Bouvier, F.; Backhaus, R. A.; Camara, B. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 30651–30659.
- (17) Kidmose, U.; Hansen, S.; Christensen, L.; Edelenbos, M.; Larsen, E.; Nørbæk, R. Effects of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota* L.). *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 388–394.
- (18) Sandhu, K. S.; Joshi, a. K.; Bajaj, K. L. Effects of nitrogen fertilizer and weed control on nutritive quality of carrots (*Daucus carota* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **1988**, *38*, 67–73.
- (19) Singh, D. P.; Beloy, J.; McInerney, J. K.; Day, L. Impact of boron, calcium and genetic factors on vitamin C, carotenoids, phenolic acids, anthocyanins and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*). *Food Chem.* **2012**, *132*, 1161–1170.
- (20) Zeipina, S.; Alsiņa, I.; Lepse, L. The effect of watering on yield and quality of carrots. *Acta Hort.* **2014**, *1038*, 223–230.
- (21) Ombódi, A.; Daood, H. G.; Helyes, L. Carotenoid and tocopherol composition of an orange-colored carrot as affected by water supply. *HortScience* **2014**, *49*, 729–733.
- (22) De Rosso, V. V.; Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5062–5072.

- (23) Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45.
- (24) Fray, R. G.; Wallace, A.; Fraser, P. D.; Valero, D.; Hedden, P.; Bramley, P. M.; Grierson, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *Plant J.* **1995**, *8*, 693–701.
- (25) Hugueney, P.; Bouvier, F.; Badillo, A.; Quennemet, J.; D’Harlingue, A.; Camara, B. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 619–626.
- (26) Moreno, J. C.; Pizarro, L.; Fuentes, P.; Handford, M.; Cifuentes, V.; Stange, C. Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One* **2013**, *8*, e58144.
- (27) Wang, H.; Ou, C.-G.; Zhuang, F.-Y.; Ma, Z.-G. The dual role of phytoene synthase genes in carotenogenesis in carrot roots and leaves. *Mol. Breed.* **2014**, *34*, 2065–2079.
- (28) Fuentes, P.; Pizarro, L.; Moreno, J. C.; Handford, M.; Rodriguez-Concepcion, M.; Stange, C. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *79*, 47–59.
- (29) Nicolle, C.; Simon, G.; Rock, E.; Amouroux, P.; Rémésy, C. Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *J. Am. Hortic. Sci.* **2004**, *129*, 523–529.
- (30) Surles, R. L.; Weng, N.; Simon, P. W.; Tanumihardjo, S. A. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3417–3421.
- (31) Ronen, G.; Carmel-Goren, L.; Zamir, D.; Hirschberg, J. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of *Beta* and *old-gold* color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11102–11107.
- (32) Bai, L.; Kim, E.-H.; DellaPenna, D.; Brutnell, T. P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J.* **2009**, *59*, 588–599.

- (33) Kim, S. H.; Kim, Y.-H.; Ahn, Y. O.; Ahn, M.-J.; Jeong, J. C.; Lee, H.-S.; Kwak, S.-S. Downregulation of the lycopene ϵ -cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β -branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweetpotato transgenic calli. *Physiol. Plant.* **2013**, *147*, 432–442.
- (34) Arango, J.; Jourdan, M.; Geoffriau, E.; Beyer, P.; Welsch, R. Carotene hydroxylase activity determines the levels of both α -carotene and total carotenoids in orange carrots. *Plant Cell* **2014**, *26*, 2223–2233.
- (35) North, H. M.; Frey, A.; Boutin, J. P.; Sotta, B.; Marion-Poll, A. Analysis of xanthophyll cycle gene expression during the adaptation of *Arabidopsis* to excess light and drought stress: changes in RNA steady-state levels do not contribute to short-term responses. *Plant Sci.* **2005**, *169*, 115–124.
- (36) Park, H.-Y.; Seok, H.-Y.; Park, B.-K.; Kim, S.-H.; Goh, C.-H.; Lee, B.; Lee, C.-H.; Moon, Y.-H. Overexpression of *Arabidopsis ZEP* enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *375*, 80–85.
- (37) Van Ha, C.; Leyva-González, M. A.; Osakabe, Y.; Tran, U. T.; Nishiyama, R.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Seki, M.; Yamaguchi, S.; Van Dong, N.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; Herrera-Estrella, L.; Phan Tran, L.-S. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 851–856.
- (38) Danquah, A.; de Zelicourt, A.; Colcombet, J.; Hirt, H. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 40–52.
- (39) Davison, P. A.; Hunter, C. N.; Horton, P. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **2002**, *418*, 203–206.

CHAPITRE 3

IMPACT D'UN STRESS BIOTIQUE ET D'UN STRESS
ABIOTIQUE SEULS OU EN COMBINAISON SUR
L'ACCUMULATION DES CAROTENOÏDES CHEZ LA
CAROTTE

I. INTRODUCTION

Les résultats du premier axe de recherche ont confirmé que les facteurs environnementaux ont bien un impact sur les teneurs en caroténoïdes des feuilles et racines de carotte. Cette première approche globale a permis de mettre en évidence un impact négatif de facteurs abiotiques (en particulier température et rayonnement global) sans qu'on soit en mesure d'évaluer leurs effets spécifiques ni leur interaction avec d'autres composantes de l'environnement. Ainsi, l'impact de stress particulier, seul ou en combinaison, sur l'accumulation en caroténoïdes en général et chez la carotte en particulier, reste encore méconnu alors que cette information est déterminante pour la connaissance du métabolisme des caroténoïdes d'une part et pour une meilleure maîtrise des pratiques culturales d'autre part.

Si quelques études existent sur l'étude de stress seul, une seule étude est jusqu'à présent disponible concernant l'impact à la fois de stress biotique et abiotique sur l'accumulation des caroténoïdes. En effet, Atkinson et al. (2011) ont mis en évidence que la combinaison d'une restriction hydrique et de l'attaque d'un nématode entraîne une diminution des teneurs en lycopène chez les jeunes fruits de tomate, mais pas chez les fruits âgés. La diminution des teneurs en lycopène dans les jeunes fruits a également été observée en condition de restriction hydrique seule mais pas lors de l'attaque du nématode montrant ainsi le caractère dominant du stress abiotique lors de la combinaison. La combinaison des stress entraîne également une augmentation des teneurs en glucose et fructose dans les fruits âgés. Ce premier travail met donc en avant l'importance de l'étude de stress combinés sur la qualité et donc les teneurs en caroténoïdes des productions végétales. Ils soulignent l'impact en parallèle sur le métabolisme secondaire et primaire. Par contre, les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas été élucidés dans cette étude.

La deuxième étude de ce travail de thèse vise donc à déterminer quel est l'impact d'un stress biotique et d'un stress abiotique appliqués seuls ou en combinaison sur l'accumulation des caroténoïdes dans les feuilles et les racines de carotte. Pour cela, les plantes ont été cultivées en condition de restriction hydrique, en condition d'inoculation par *A. dauci*, en condition de stress combinés ainsi qu'en condition contrôle (apport hydrique non limitant et pas d'infestation par *A. dauci*). L'expérimentation a été réalisée en tunnel, en conditions semi-contrôlées, et répétée lors de deux années successives. Cette étude est basée sur un panel de six géotypes présentant une variabilité phénotypique de coloration de racine contrastée (orange, rouge, violet et blanc) ainsi

que des niveaux de résistance contrasté à *A. dauci*, notamment les variétés Boléro, résistant, et Presto, sensible.

Au-delà de la caractérisation de l'impact des stress, le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ainsi que les teneurs en ABA ont été déterminés par PCRq et UPLC respectivement, afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation en lien avec l'accumulation des caroténoïdes en condition de stress. De plus, les teneurs en sucres, en amidon racinaire et chlorophylle foliaire ont été quantifiées afin de déterminer si le métabolisme primaire est impacté de la même façon que le métabolisme des caroténoïdes.

II. COMBINED BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES IMPACT CAROTENOID CONTENT OF CARROT LEAVES AND ROOTS

Florent Perrin¹, Cécile Dubois-Laurent¹, Yves Gibon^{2, 3}, Sylvie Citerne⁴, Sébastien Huet¹, Anita Suel¹, Valérie Le Clerc¹, Mathilde Briard¹, Didier Peltier¹, Séverine Gagné¹ and Emmanuel Geoffriau¹

¹ IRHS, Agrocampus Ouest, INRA, Université d'Angers, SFR QuaSaV, 49071, Beaucouzé, France

² Institut National de la Recherche Agronomique and Université de Bordeaux, Unité Mixte de Recherche 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, 33883 Villenave-d'Ornon, France

³ Metabolomics Platform–Functional Genomics Centre Bordeaux, INRA Bordeaux, 71 av Edouard Bourlaux, 33140 Villenave-d'Ornon, France

⁴ INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin Centre de Versailles-Grignon, Unité Mixte de Recherche 1318 (INRA-Agro-ParisTech-CNRS), Versailles, France

✉ Emmanuel Geoffriau

emmanuel.geoffriau@agrocampus-ouest.fr

+33 (0)2 41 22 54 31

Abstract

Carotenoids are important secondary metabolites involved in plant photosynthesis, vegetable nutritional quality but also in metabolic prevention in human health. Carrot represents one of the most important carotenoid intakes and is a very interesting model to study carotenoid metabolism. Till now, the knowledge about the impact of stress on carotenoid accumulation is limited. The purpose of this work was to investigate the impact of abiotic and biotic stresses applied separately or in combination on carotenoid accumulation in carrot leaves and roots. Results showed that combined stress decreased dramatically carotenoid content in both organs. In roots, the decrease in carotenoid content could be mostly associated in carrot response to *A. dauci* infection. Moreover, carotenoid and sugar contents were highly correlated, which suggested that stored metabolites are directly or indirectly involved in plant response to pathogen infection. In leaves, in contrast to results observed in roots, stresses impact carotenoid content depending on the genotype and the year. Moreover, carotenoid content variations were correlated to chlorophyll contents suggesting that a common mechanism of regulation for photosynthetic biosynthesis pigment exist.

Keywords: *Alternaria dauci*, *Daucus carota* L., photosynthetic pigment, secondary metabolites, stored metabolites, water stress

Introduction

Carotenoids are important secondary metabolites involved in plant growth but represent also an important nutritional quality trait in fruits and vegetables. Indeed, in chloroplastic organs like leaves, these pigments are associated with chlorophylls for photosynthesis (Yasushi, 1991). Due to their antioxidant properties, they are also involved in photoprotection against high light stress (Davison *et al.*, 2002). In non-green tissues, they are involved in pollinators or disseminators attraction (Howitt and Pogson, 2006). In fruits or roots especially, they are considered as a primary nutritional quality trait for humans, as provitamin A compounds and preventing factors of human diseases (Bartley and Scolnik, 1995). Till now, the carotenoid biosynthetic pathway in plant has been relatively well studied (see review Cazzonelli and Pogson 2010). Gene and enzyme functions have been characterized but new carotenoid compounds are still identified regularly. To date, several regulatory mechanisms passing through genetic determinism, gene expression and storage capacity explain carotenoid accumulation, but could depend on the considered organ and species (Cazzonelli and Pogson, 2010).

In their environment, plants are exposed to a large diversity of biotic and abiotic stresses which potentially affect plant growth. A negative effect can lead to a decrease in yield but also nutritional quality. Over the past decade, the molecular mechanisms underlying plant tolerance to individual stress has intensively been investigated. Important metabolic pathways as well as signaling molecular factors have been also highlighted to be involved in plant tolerance (Singh *et al.*, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2004; Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Till now, few studies have shown that individual stress conditions impact carotenoid accumulation. In tomato, carotenoids represent a primary quality attribute. It has been shown that salinity stress leads to a threefold increase in lycopene content in fruits (Borghesi *et al.*, 2011) but not in leaves (Duan *et al.*, 2012). In pepper, phytoene content increases but β -carotene content decreases under oxidative-induced stress which could be explained by relative gene expression variations (Bouvier *et al.*, 1998). In other cases, it has been shown that carotenoid regulation could lead to stress tolerance phenotypes. In *Arabidopsis* leaves for example, the over expression of *chyB* (encoding the β -carotene hydroxylase) leads to a tolerant phenotype to high light intensity stress (Davison *et al.*, 2002). In sweet potato, the downregulation of *lcyE* (encoding the lycopene ϵ -cyclase) induces an increase of β -branch specific carotenoids and leads to a salt stress tolerance of plants (Kim *et al.*, 2013). These studies show that abiotic stress conditions impact carotenoid content which could be associated to carotenoid gene expression levels.

However, plants are simultaneously confronted to several stresses in culture. In this case, the mechanisms involved in plant tolerance to individual stress cannot be sufficient to understand plant behavior (Fujita *et al.*, 2006; Ramegowda and Senthil-Kumar, 2015). Moreover, the combined stress conditions could differentially affect plant biomass and yield compared to individual ones. For example, it has been shown that combined heat and drought stresses increase respiration rate compared to control and drought stress alone in *Arabidopsis thaliana*. Moreover, the photosynthesis rate was lower under the combined stress condition compared to control and heat stress condition (Rizhsky *et al.*, 2004). In the spring pea, the same stress combination led to a reduction of chlorophyll content but also grain number and weight compared to individual stresses and control (Prasad *et al.*, 2011). In sorghum, the combination of drought and high temperatures decreased by 50% the dry matter, grain yield and number of grains compared to control (Craufurd and Peacock, 1993). The impact of heat and drought stresses in combination was relatively well investigated in crop plants (Prasad *et al.*, 2008). However, to our knowledge, only one study showed that lycopene content in tomato fruits was affected by a combination of drought and nematode infection stresses but the effects depend on the development stage in the plant (Atkinson *et al.*, 2011).

Carrot, which is characterized by an air organ (leaves) and a tuberous underground organ (roots), accumulates carotenoid in leaves but also a large amount of these pigments in roots, and represents one of the most important carotenoid intakes as it is consumed worldwide (Surles *et al.*, 2004). Carrot is also a very interesting model to study carotenoid accumulation due to the high diversity of root color. Indeed, the carotenoid accumulation in carrot root is due to anthropic selection which led to a large panel of root-colored genotypes (Clotault *et al.*, 2010, 2012). Orange genotypes contain mostly α -carotene and β -carotene, yellow genotypes contain lutein, the red ones contain lycopene and white genotypes almost no carotenoid. In purple carrot genotype, carotenoid coloration is masked by anthocyanin accumulation in root. Among carrots with the same color, total carotenoid content can vary greatly (Nicolle *et al.*, 2004; Surles *et al.*, 2004). These differences in carotenoid content in carrot may be due to different regulation mechanisms passing through genetic polymorphism (Bradeen and Simon, 1998; Just *et al.*, 2007; Clotault *et al.*, 2010; Jourdan *et al.*, 2015), gene expression (Clotault *et al.*, 2008; Maass *et al.*, 2009), and cell organization (Kim *et al.*, 2010). If genetic factors are well studied in carrot, the data about the impact of environmental factors on carotenoid accumulation are limited. It has been shown that carotenoid contents in carrot roots are modulated depending on growing locations (Kidmose *et al.*, 2004). Recently, the effect of water supply (drip irrigation, sprinkler and rain fed irrigation) has been investigated. Zeipiņa *et al.* (2014) have shown that drip and sprinkler irrigation systems

did not affect carotenoid accumulation in carrot roots. However Ombódi et al. (2014) have shown that carotenoid accumulation is modulated depending on water quantity supply (sprinkler irrigation system compared to rain supply) but results depended on the year. These works show that agronomic processes affect carotenoid accumulation in carrot root, but such effects were not investigated in leaves for a comprehensive understanding. Recently, we have shown that environmental factors such as temperature and global ray impact carotenoid accumulation in carrot leaves and roots (Perrin *et al.*, 2016). Carotenoid accumulation decreased in leaves independently of the considered genotype in unfavorable period, and could be related to chlorophyll content as well as carotenoid genes expression. In roots, results depended on the genotype and suggested a switch in the biosynthetic pathway toward the β -branch. The results suggested that leaf metabolism was affected and could explain carotenoid and chlorophyll associated-pigment content variations in carrot leaves (Perrin *et al.*, 2016). However, there is a lack of knowledge to generalize this hypothesis to the root organ and studies need to be done in this regards. While individual abiotic stress conditions impact carotenoid content, biotic and combined stress conditions on carotenoid accumulation needs to be more understood.

The understanding about the impact of abiotic and biotic factors individually or in combination on carotenoid content is also of interest for a better management of plant growth and nutritional quality value. In the present study, we have investigated, in leaves and roots of 6 carrot genotypes, the impact on carotenoid content of a restricted water condition and an inoculation by *Alternaria dauci* (*A. dauci*), both individually and in combination. To go further in the knowledge of carotenoid metabolism, we were interested in the impact of stress conditions on the plant general metabolism through chlorophyll content as associated pigment for photosynthesis, and through sugar, starch and hormone contents as primary source of carbon and stored compounds in carrot roots.

Material and Methods

Biological material and experimental design

Six genotypes contrasted by their root color have been studied: the three varieties Bolero (orange), Presto (orange) and Deep Purple (purple), and 3 inbred lines derived from Karotan (IKaO, orange), Kintoki (IKiR, red) and Blanche des Vosges (IBvW, white). Plants were grown under a semi-controlled environment in tunnel in three biological replications during two consecutive years (2013 and 2014) at Agrocampus-Ouest (IRHS-Angers, France). Plants were

grown in (i) standard growing conditions (no inoculation, soil potential Pf = 2.5), (ii) water-restricted condition Pf = 3.5), (iii) *A. dauci* inoculation, (iv) water-restricted and *A. dauci* inoculation combined conditions. In order to create a water-restricted condition for carrot growth the soil potential was monitored using steering electronics module (Watermark), a central of acquisition (Tensiomanager) and tensiometric probes (Watermark). One isolate of *A. dauci* collected in France was used for the experiment (P2 from Gironde). *A. dauci* artificial inoculation was done using a solution of 4000 conidia/mL (Le Clerc *et al.*, 2009). The first inoculation was performed when plant showed three true leaves and the second one 15 days later and symptom notations were performed as described in Le Clerc *et al.* (2009). The inoculation part of tunnel was separated from the healthy one by a waterproof tarp. For each sample (genotype, biological replication and year), a bulk of 10 plants has been harvested and pooled. Whole plant weight and specific root and leaves weight were registered. Leaves and three medial parts of each root were taken, and immediately stored in liquid nitrogen. All samples were finely grinded to powder and stored at -80°C.

Carotenoid and chlorophyll analysis

Pigment extraction and quantification from roots and leaves were performed as described in Perrin (2016) with slight modifications for the elution program according to the organ. The analyses for carotenoid quantification were done on a Shimadzu HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) equipped with a thermostated autosampler (SIL-10AD VP), a diode array detector (SPD-M10A VP) and carotenoids were separated along an YMC C30 (YMC, Japan) column (150 x 4.6; 3µm). For leaf carotenoid and chlorophyll analyses, the elution program had the following proportions of solvent A (methanol/acetonitrile/water 84/14/2 (v/v/v) including 0,1 % of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (w/v) and triethylamine (v/v) and solvent B (dichloromethane)): 0-5 min, 95-70%; 5-25 min, 70-45%; 25-30 min, 45-10%; 30-35 min, 10-95%; 35-42 min, 95%. For root carotenoid analyses, the elution program had the following proportions of solvent A and B: 0-12 min, 80-45%; 12-14 min, 45-10%; 14-17 min, 10-80%; 17-23 min, 80%.

Carotenoid compounds were identified and quantified as in de Rosso and Mercadante (2007) and Jourdan *et al.* (2015). Data represent the mean of three assays per sample, and carotenoids are expressed as mg per 100 g of dry matter (DM).

Sugar analysis

Extraction was done on lyophilized powder obtained from 1g of crushed frozen material to which 4mL of hot ethanol at 80% were added. Samples were then placed under agitation in a

thermostated bath during 1 hour and centrifuged 20 min at 9000 g. The supernatant was deposited in a flask of 10 mL and the volume was completed with ethanol at 80%. One milliliter was then evaporated in a Speed-Vac concentrator.

The dry pellet was resuspended in 1 mL of deionized water. After vigorous stirring, the solution was filtered with a 0.45 µm syringe filter (nylon). Dilution at 1/32 was performed in deionized water.

Sugars were separated and assayed by ion chromatography (Dionex chain consisting of a pump, a thermostated autosampler, a conductivity meter). Data analysis was performed using Chromeleon software.

The injection was carried out with a volume of 20 µL in a column CarboPac® PA1 (4 x 250 mm; Thermo Scientific). The mobile phase consisted of deionised water (eluent A) and 1 M sodium hydroxide (eluent B). An isocratic elution with 40 mM of sodium hydroxide for 22 min was performed. The flow rate was 0.5 mL.min⁻¹ and the temperature 80°C (oven maintained).

The compounds were identified by their elution order compared to commercial standards (analyzed under the same conditions). Calibrations were also performed prior to analysis. A mixture of standards was regularly analyzed in parallel of samples.

Starch analysis

Extraction and determination of starch were performed as in Hendriks et al. (2003). Aliquots of about 20 mg fresh weight were extracted twice with 80% ethanol (v/v) and once with 50% ethanol (v/v) to remove hydrosoluble metabolites including sugars. Starch was then determined in the pellet, which was first resuspended in 100 mM NaOH and heated at 95°C for 20 min. After neutralisation, starch was digested overnight by adding amyloglucosidase and alpha-amylase, and the released glucose was measured spectrophotometrically in the presence of ATP, hexokinase, NADP⁺ and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Assays were prepared in 96-well microplates using a Starlet pipetting robot (Hamilton) and absorbance was read at 340 nm in MP96 microplate readers (SAFAS).

Hormone analysis

For each sample, 10 mg of freeze-dried powder were extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v:v:v). Abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and indole-3-acetic acid (IAA) stable labeled isotopes used as internal standards were prepared as described in Le Roux et al. (2014). Two ng of each standard were added to the sample. The extraction was performed as described in Li-Marchetti et al. (2015). Briefly, dry extract was

Table 3.1: Physiological parameters of plant under the four growing conditions. LDM: leaf dry matter; RDM: root dry matter; L L: leaves length; W R: water-restricted. ***: significant difference 1% compared to control.

	1 st year						2 nd year					
	Plant Weight (g)	Leaves Weight (g)	Roots Weight (g)	LDM (%)	RDM (%)	L L (cm)	Plant Weight (g)	Leaves Weight (g)	Roots Weight (g)	LDM (%)	RDM (%)	L L (cm)
Control	100.45 ± 9.32	31.57 ± 4.03	68.87 ± 6.53	19.05 ± 1.66	6.41 ± 0.88	58.08 ± 2.16	99.90 ± 6.04	36.09 ± 3.77	63.80 ± 4.22	12.47 ± 0.48	7.45 ± 0.48	58.44 ± 2.00
W R	57.37 ± 5.89 ***	16.08 ± 1.82 ***	41.28 ± 5.39 ***	23.25 ± 2.19	7.21 ± 1.55	43.83 ± 1.19 ***	66.36 ± 4.26 ***	19.06 ± 1.97 ***	47.3 ± 3.01 ***	17.40 ± 1.06 ***	11.17 ± 0.78 ***	43.38 ± 1.27 ***
A. dauci	76.63 ± 4.33	24.03 ± 1.98	52.59 ± 3.86	20.26 ± 0.43	9.78 ± 0.95	47.92 ± 1.18 ***	88.71 ± 7.30	35.5 ± 3.80	53.21 ± 4.60	12.76 ± 0.68	10.56 ± 0.47 ***	56.50 ± 1.51
Combined	64.96 ± 5.08 ***	16.73 ± 1.65 ***	48.22 ± 4.02	23.82 ± 1.00 ***	12.08 ± 0.77 ***	39.00 ± 1.82 ***	62.88 ± 4.72 ***	19.96 ± 3.40 ***	42.92 ± 3.4	16.26 ± 0.47 ***	12.34 ± 0.64 ***	46.72 ± 2.03 ***

Table 3.2: Symptom notation in the six genotypes under A. dauci and combined stress conditions. In 1st year, values are the mean of two replications and in 2nd value are the mean of three replications.

		A. dauci				Combined			
		Mean	Sd	Mean	SD	Mean	Sd	Mean	SD
				(2 years)	(2 years)			(2 years)	(2 years)
Bolero	1 st	2,5	0,5	2,8	0,3	3,0	1,0	4,0	1,0
	2 nd	3,0	0,0	2,8	0,3	5,0	0,0	4,0	1,0
Presto	1 st	6,0	0,0	6,0	0,0	5,0	0,0	5,2	0,2
	2 nd	6,0	0,0	6,0	0,0	5,3	0,9	5,2	0,2
IKaO	1 st	5,0	2,0	4,7	0,4	4,5	0,5	4,9	0,4
	2 nd	4,3	0,3	4,7	0,4	5,3	0,3	4,9	0,4
Deep Purple	1 st	5,0	1,0	5,2	0,2	5,5	0,5	5,6	0,1
	2 nd	5,3	0,9	5,2	0,2	5,7	0,3	5,6	0,1
IKiR	1 st	4,0	1,0	3,5	0,5	4,5	0,5	4,9	0,4
	2 nd	3,0	0,0	3,5	0,5	5,3	0,3	4,9	0,4
IBvW	1 st	4,5	0,5	5,6	1,1	6,0	0,0	6,0	0,0
	2 nd	6,7	0,3	5,6	1,1	6,0	0,0	6,0	0,0

dissolved in 140 μL of acetonitrile/water (50/50 v/v), filtered and analyzed using a Waters Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3 μm particlesize; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ and a binary gradient: (A) 0.1% acetic acid in water (v/v); and (B) acetonitrile with 0.1% acetic acid. Mass spectrometry was conducted in electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive ion mode for IAA, and in negative ion mode for the other hormones. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were extrapolated for each hormone from calibration curves and samples using the Quantify module of MassLynx software, version 4.1.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using R version 3.1.0 program. Data were described by box-plot analysis and differences were analyzed by an ANOVA test followed by a Tukey test for carotenoid content variations between conditions on three biological replications ($n=3$). Pearson correlations were performed using R version 3.1.0 with the package Rcmdr version 2.1-3.

Results

Physiological response to constraint conditions

In both years, water-restricted and combined constraint conditions reduced significantly (between 30% and 50%) the plant and shoot weight (Table 3.1). But only the water-restricted condition reduced the root weight by 40% and 35% in the 1st and 2nd year respectively. Results based on dry matter showed significantly contrasted levels between the two years. In the 1st year, the combined constraint condition increased significantly shoot and root dry matters. In the 2nd year, the water restricted and combined constraint conditions increased significantly shoot dry matter compared to control, and root dry matter was significantly higher in the three constraint conditions compared to control. Under all constraint conditions, the shoot length decreased significantly compared to the control in the 1st year but only under water restricted and combined constraint conditions in the 2nd year.

The impact of *A. dauci* inoculation was confirmed by the presence of necrosis symptoms on carrot leaves. Results showed that under *A. dauci* inoculation, Bolero was the most resistant (2.8 ± 0.3) and Presto the less one (6.0 ± 0.0) (Table 3.2). IKiR was also resistant to *A. dauci* (3.5 ± 0.5) but in

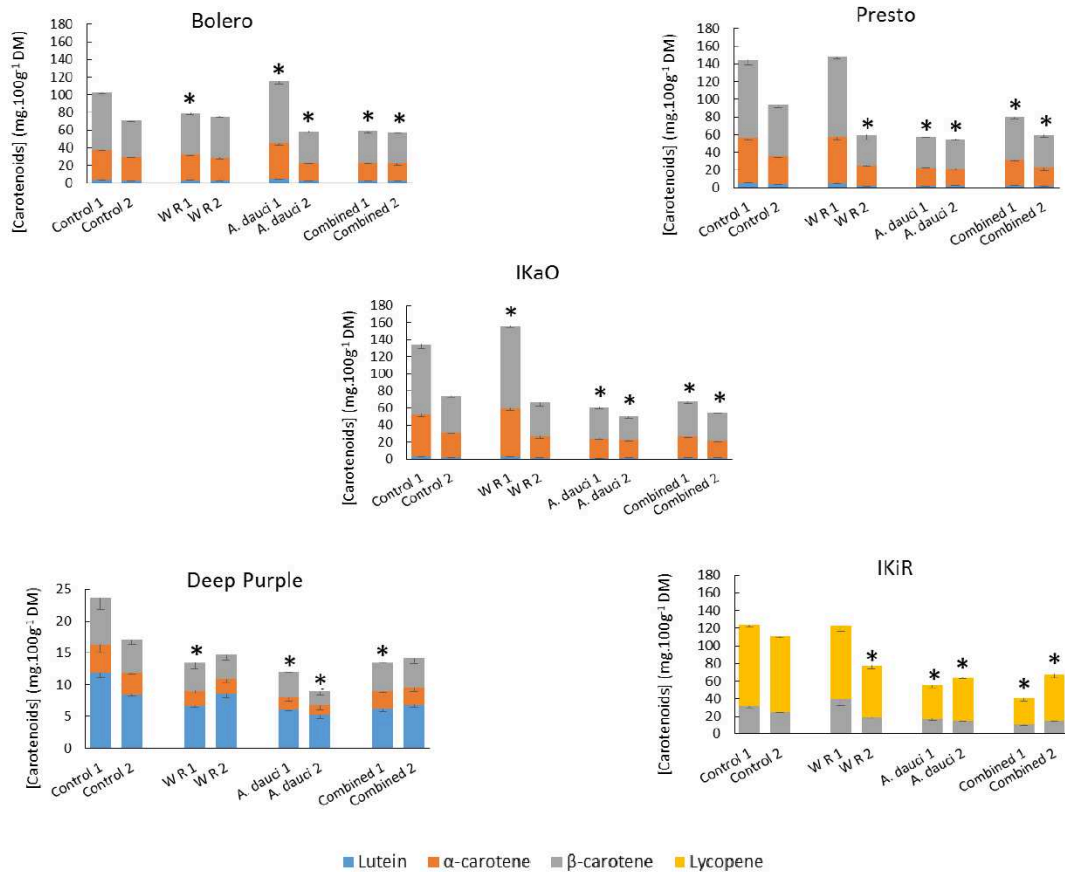


Fig. 3.1: Carotenoid contents in root. Each carotenoid content were quantified in the root of the five studied genotypes in the four growing conditions in both years. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% between total carotenoid content in stress condition and total carotenoid content in the control condition for a given genotype (Tukey test). WR: water-restricted; 1: 1st year; 2: 2nd year.

a lesser extent compared to Bolero. Under combined stress condition, the resistance level was globally more homogeneous among genotypes than *A. dauci* applied alone. Bolero was still the most resistant one (4.0 ± 1.0) but, in this case, IBvW was the susceptible one (6.0 ± 0.0) (Table 3.2).

All these results show a significant impact of the three constraint conditions on plant morphological and resistance parameters, which demonstrates that they acted as stress conditions.

Effect of stress on carotenoid contents in roots

In carrot roots, stress conditions globally led to a decrease in carotenoid contents compared to control for every genotype and all pigments in both studied years. The biotic and combined stress conditions affected most significantly carotenoid amounts in carrot root whatever the genotype. On contrary, the effect of water-restricted condition on carotenoid accumulation was dependent on the genotype and in most case on the year.

In the orange genotypes (Bolero, Presto and IkaO), the combined stress condition reduced significantly carotenoid accumulation in roots for both studied years (Fig. 3.1). For Presto and IkaO, *A. dauci* inoculation led to a reduction of carotenoid contents in both studied years but not for the resistant genotype Bolero for which carotenoid contents were higher and lower compared to control in the 1st and 2nd years respectively. Under water-restricted condition, for Bolero, the carotenoid content was reduced significantly compared to control in the 1st year but not in the 2nd one (Fig. 3.1). For Presto a decrease in carotenoid content was observed in the 2nd year only (Fig. 3.1), whereas for IkaO, carotenoid content increased under water-restricted condition in the 1st year but not in 2nd one (Fig. 3.1).

For the purple genotype Deep Purple, carotenoid contents were lower under all stress conditions compared to control only in the 1st year, whereas only *A. dauci* inoculation led to a decrease in carotenoid content in the 2nd year (Fig. 3.1).

For the red genotype IKiR, the carotenoid variations were globally the same as described for Presto genotype whatever the considered condition and year (Fig. 3.1).

No carotenoid was detected in the white IBvW genotype whatever the growing condition. Overall, the relative proportion of each carotenoid in each genotype was not affected by stress conditions (less than 8% of differences) in both years (Table S3.1, Annexe II).

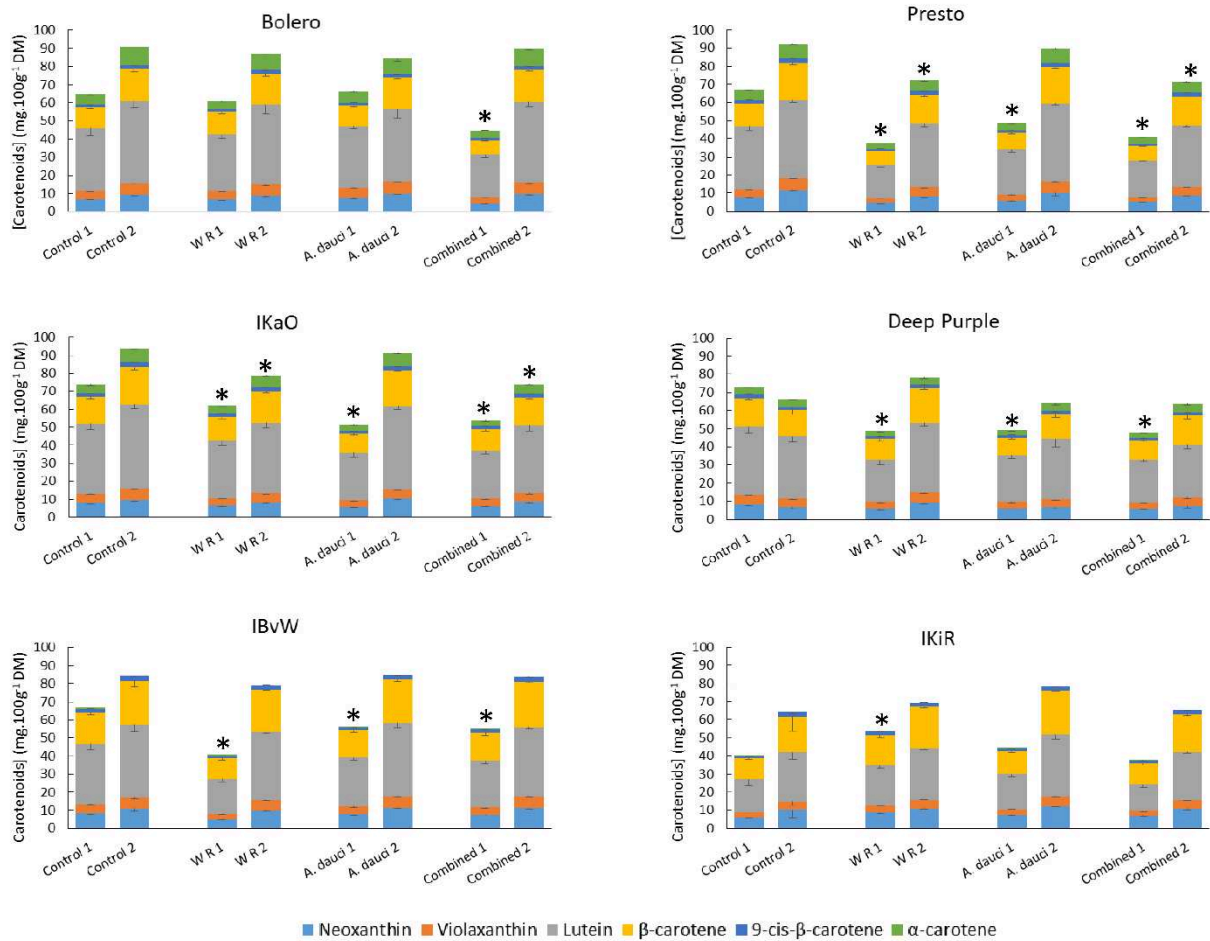


Fig. 3.2: Carotenoid contents in leaves. Each carotenoid content were quantified in the leaves of the six studied genotypes in the four growing conditions in both years. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% between total carotenoid content in stress condition and total carotenoid content in the control condition for a given genotype (Tukey test). W R: water-restricted; 1: 1st year; 2: 2nd year.

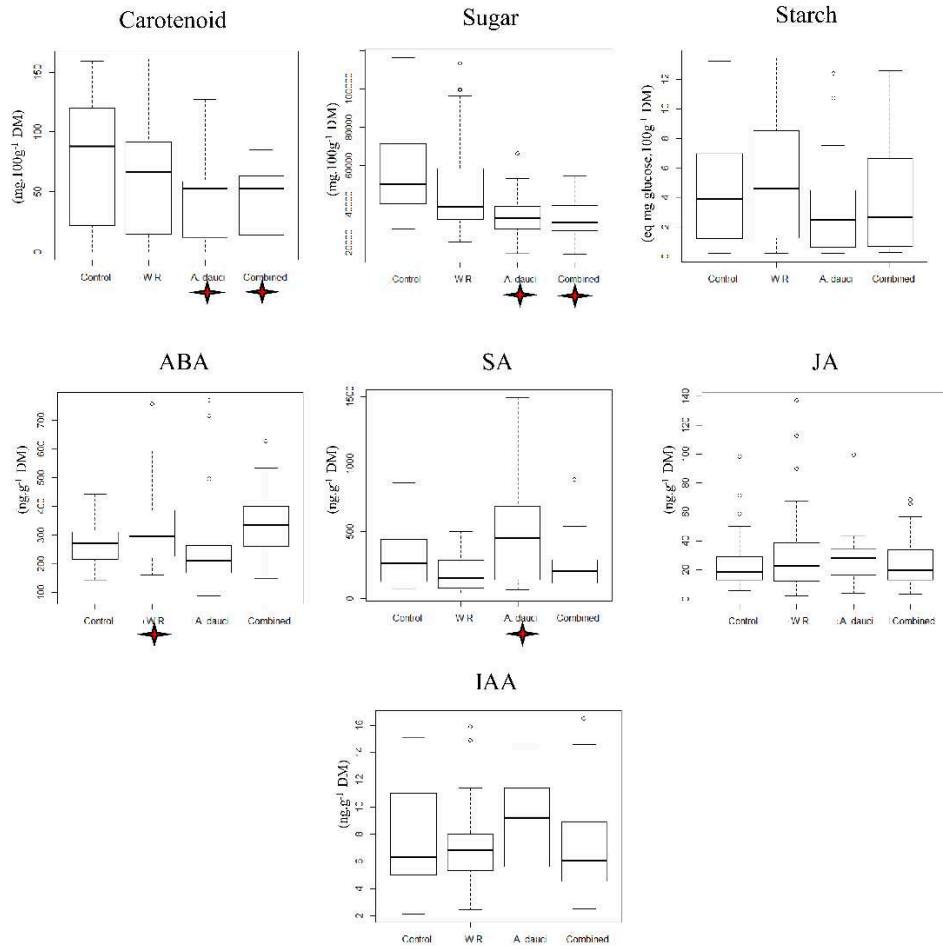


Fig. 3.3: Metabolite contents in roots. Box plot analysis were performed on total carotenoid, total sugar, starch, ABA, SA, JA and IAA contents in the root and in the four growing conditions. For total carotenoid, total sugar and starch contents, values ($n=36$) are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$) for each genotypes ($n=6$) in both years ($n=2$). For hormone contents, values ($n=24$) are the mean \pm S.D. of two biological replications ($n=2$) for each genotypes ($n=6$) in both years ($n=2$). A red star indicates a significant difference at 5% between each stress condition and the control condition (Tukey test). WR: water-restricted; ABA: abscisic acid; SA: salicylic acid; JA: jasmonic acid; IAA: indole-3-acetic acid.

	Lutein	α -carotene	β -carotene	Lycopene	Σ Carotenoids	Glucose	Fructose	Sucrose	Σ Sugars	Starch	ABA	Auxin	JA	SA	Σ Carotenoid / Σ Sugars	Σ Carotenoid / Σ Primary Met	carotene / Σ Carotenoids	carotene / Σ Carotenoids	Σ Sugars / Starch	Glucose / Fructose / Sucrose	Root weight	Plant weight	Root weight / Plant weight	
Lutein	1.00																							
α -carotene	-0.02	1.00																						
β -carotene	-0.05	0.97	1.00																					
Lycopene	0.09	-0.40	-0.30	1.00																				
Σ Carotenoids	0.09	0.77	0.83	0.27	1.00																			
Glucose	0.03	0.73	0.68	-0.40	0.48	1.00																		
Fructose	0.04	0.79	0.78	-0.40	0.55	0.95	1.00																	
Sucrose	0.11	0.31	0.43	0.35	0.60	0.04	0.19	1.00																
Σ Sugars	0.07	0.72	0.77	-0.10	0.71	0.75	0.82	0.67	1.00															
Starch	-0.04	-0.26	-0.21	-0.01	-0.24	-0.55	-0.52	0.20	-0.27	1.00														
ABA	0.38	-0.19	-0.22	-0.21	-0.31	0.01	-0.04	-0.15	-0.10	0.16	1.00													
Auxin	-0.21	0.42	0.40	0.04	0.42	0.30	0.36	0.14	0.30	-0.33	-0.27	1.00												
JA	-0.25	0.42	0.41	-0.25	0.26	0.25	0.34	0.19	0.30	-0.07	-0.01	0.47	1.00											
SA	-0.17	-0.23	-0.28	-0.07	-0.32	-0.11	-0.12	-0.32	-0.25	-0.14	-0.23	0.13	0.09	1.00										
Σ Carotenoid / Σ Sugars	0.16	0.37	0.40	0.50	0.73	0.02	0.04	0.19	0.11	-0.17	-0.35	0.33	-0.02	-0.26	1.00									
Σ Carotenoid / Σ Primary Met	0.16	0.37	0.40	0.50	0.73	0.02	0.04	0.19	0.11	-0.17	-0.35	0.33	-0.02	-0.26	1.00	1.00								
α -carotene / Σ Carotenoids	0.06	0.81	0.78	-0.52	0.47	0.69	0.66	-0.06	0.44	-0.34	-0.04	0.30	0.25	-0.11	0.27	0.27	1.00							
β -carotene / Σ Carotenoids	0.03	0.78	0.78	-0.45	0.52	0.64	0.62	0.06	0.48	-0.31	-0.08	0.28	0.24	-0.19	0.30	0.30	0.96	1.00						
Σ Sugars / Starch	-0.12	0.63	0.58	-0.20	0.48	0.71	0.72	0.13	0.59	-0.56	-0.10	0.55	0.54	0.05	0.11	0.11	0.50	0.46	1.00					
Glucose - Fructose / Sucrose	-0.10	0.42	0.35	-0.36	0.17	0.79	0.66	-0.37	0.32	-0.53	0.09	0.21	0.11	0.00	-0.01	-0.01	0.59	0.52	0.52	1.00				
Root weight	0.43	0.13	0.13	-0.05	0.13	0.15	0.21	0.26	0.31	0.03	-0.08	-0.14	-0.27	-0.13	-0.02	-0.02	0.11	0.10	-0.09	-0.04	1.00			
Plant weight	0.34	-0.01	-0.04	-0.06	-0.04	0.08	0.13	0.14	0.20	0.04	-0.04	-0.07	-0.25	0.10	-0.16	-0.16	-0.01	-0.07	-0.07	-0.02	0.90	1.00		
Root weight / Plant weight	0.17	0.33	0.40	0.03	0.41	0.16	0.18	0.26	0.25	-0.05	-0.12	-0.13	-0.10	-0.52	0.36	0.36	0.31	0.43	-0.03	-0.03	0.25	-0.18	1.00	

Fig. 3.4: Person correlation performed on metabolite contents and physiological parameters quantification in roots. Only significant correlations at 5% were colored. ABA: abscisic acid; SA: salicylic acid; JA: jasmonic acid; IAA: indole-3-acetic acid.

Effect of stress on carotenoid contents in leaves

In contrast with results observed for root organ, stress conditions impacted leaves carotenoid contents in a lesser extent (Fig. 3.2). Moreover, the impact of stress condition led to a decrease of less than 50% of carotenoid contents compared to control.

For the orange genotype Bolero, combined stress condition reduced carotenoid contents in 2013 but not in any other growing condition (Fig. 3.2). For the orange genotypes Presto and IKaO, the evolution of carotenoid content was the same in both studied years. In these two genotypes, the combination of abiotic and biotic stress led to a reduction of carotenoid contents in leaves, as *A. dauci* inoculation did but only in the 1st year (Fig. 3.2). For Presto genotype, water-restricted condition reduced carotenoid content in both years (Fig. 3.2).

For Deep Purple and IBvW genotypes, all stress conditions reduced carotenoid contents in the 1st year only (Fig. 3.2). For the red one, water-restricted condition increased carotenoid content in the 1st year but not in the 2nd one (Fig. 3.2).

However, as observed in roots, the relative proportion of each carotenoid was well conserved independently of the growing conditions and year (less than 5% of differences) (Table S3.2, Annexe II).

Evolution of metabolite contents

In roots, total sugars were affected by stresses similarly to total carotenoids, with a significant reduction due to *A. dauci* inoculation (p-value < 0.001) and combined stress conditions (p-value < 0.001) but not under water-restricted condition (p-value = 0.354) (Fig. 3.3). Actually, α -carotene and β -carotene were significantly correlated together (0.97) and with total carotenoids (0.77 and 0.83 respectively) but also with glucose (0.75 and 0.68), fructose (0.79 and 0.76) and total sugars (0.72 and 0.77) but not with sucrose content (Fig. 3.4). Total sugar contents were significantly correlated with total carotenoids (0.71), α -carotene (0.72), β -carotene (0.77) but also with glucose (0.75), fructose (0.82) contents and, in a lesser extent, with sucrose content (0.67).

Surprisingly, stress conditions did not impact starch and hormones contents in the same way (Fig. 3.3). Starch was not impacted by stress conditions compared to control and no correlation could be observed between starch and carotenoid or sugar contents in root. Water-restricted and combined stress conditions increased significantly ABA content compared to control (p-value < 0.032) but was not affected by *A. dauci* inoculation. Moreover, no correlation could be observed between carotenoid content and ABA content. Under *A. dauci* inoculation SA content was

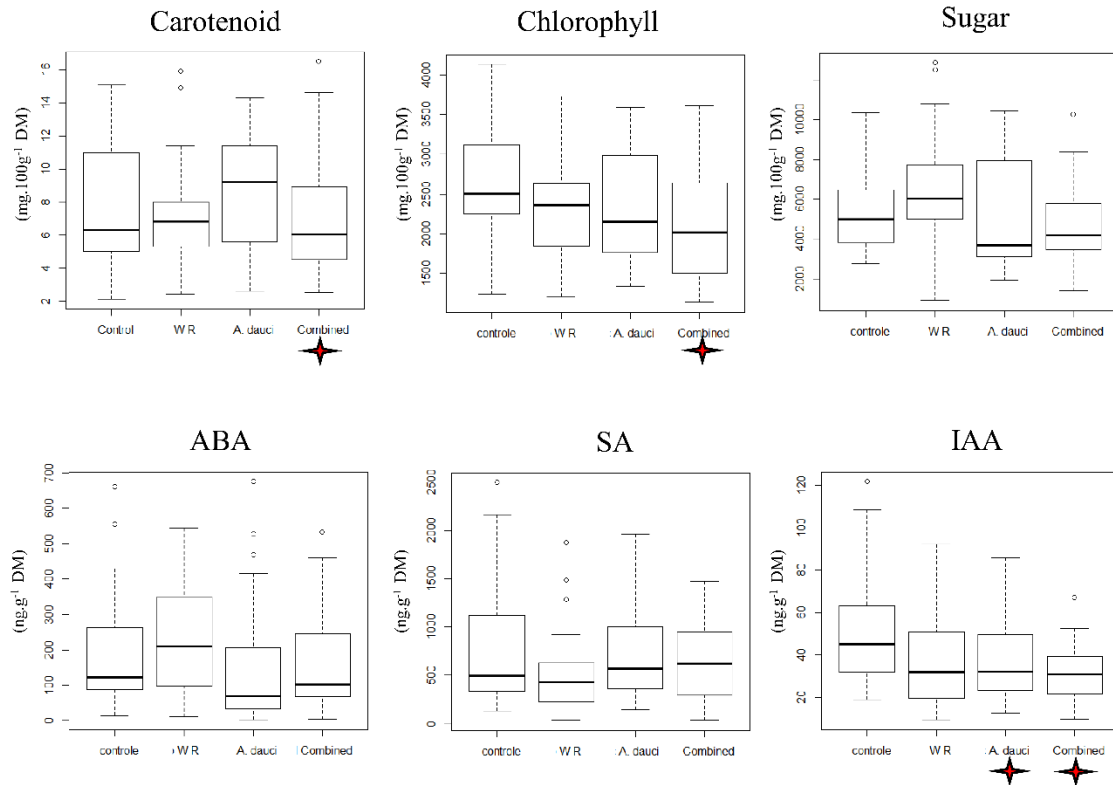


Fig. 3.5: Metabolite contents in leaves. Box plot analysis were performed on total carotenoid, total chlorophyll, total sugar, starch, ABA, SA and IAA contents in the leaves and in the four growing conditions. For total carotenoid, total chlorophyll and total sugar contents, values ($n=36$) are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$) for each genotypes ($n=6$) in both years ($n=2$). For hormone contents, values ($n=24$) are the mean \pm S.D. of two biological replications ($n=2$) for each genotypes ($n=6$) in both years ($n=2$). A red star indicates a significant difference at 5% between each stress condition and the control condition (Tukey test). WR: water-restricted; ABA: abscisic acid; SA: salicylic acid; IAA: indole-3-acetic acid.

	Neoxanthin	Violaxanthin	9-cis- β -carotene	Lutein	zeaxanthin	luteoxanthin	Σ Carotenoids	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Σ Chlorophylls	Glucose	Fructose	Sucrose	Σ Sugars	ABA	Auxine	SA	Σ Carotenoids / Σ Sugars	Σ Carotenoids / Σ chlorophylls	zeaxanthin / Σ Carotenoids	luteoxanthin / Σ Carotenoids	Σ xanthophylls / Σ Carotenoids	Glucose + Fructose / Sucrose	Shoot weight	plant weight	Shoot length	Shoot weight / Plant weight		
Neoxanthin	1.00																												
Violaxanthin	0.74	1.00																											
9-cis- β -carotene	0.78	0.58	1.00																										
Lutein	0.65	0.83	0.62	1.00																									
zeaxanthin	-0.32	-0.08	-0.31	0.04	1.00																								
luteoxanthin	0.88	0.65	0.82	0.61	-0.14	1.00																							
Σ Carotenoids	0.71	0.83	0.62	0.88	0.25	0.76	1.00																						
Chlorophyll a	0.68	0.69	0.55	0.79	0.24	0.70	0.86	1.00																					
Chlorophyll b	0.67	0.76	0.59	0.84	0.29	0.73	0.93	0.94	1.00																				
Σ Chlorophylls	0.67	0.75	0.55	0.82	0.28	0.71	0.91	0.96	0.99	1.00																			
Glucose	0.45	0.30	0.36	0.26	-0.05	0.41	0.40	0.31	0.38	0.37	1.00																		
Fructose	0.37	0.32	0.22	0.24	0.05	0.31	0.38	0.37	0.36	0.38	0.63	1.00																	
Sucrose	0.15	0.12	0.08	0.12	-0.06	0.14	0.11	0.18	0.14	0.17	0.25	0.25	1.00																
Σ Sugars	0.30	0.23	0.20	0.20	-0.05	0.27	0.25	0.29	0.27	0.30	0.56	0.51	0.94	1.00															
ABA	0.21	0.16	0.11	0.09	0.01	0.27	0.17	0.19	0.20	0.20	0.32	0.18	0.36	0.41	1.00														
Auxine	-0.17	0.04	-0.26	0.11	0.55	-0.12	0.21	0.16	0.24	0.22	0.09	0.06	-0.10	-0.05	0.07	1.00													
SA	0.20	0.13	0.30	0.33	0.03	0.21	0.29	0.11	0.24	0.18	0.17	0.06	-0.08	-0.01	0.00	0.08	1.00												
Σ Carotenoids / Σ Sugars	-0.05	0.05	0.00	0.07	0.28	0.09	0.16	0.12	0.13	0.12	-0.28	-0.25	-0.61	-0.62	-0.03	0.19	0.11	1.00											
Σ Carotenoids / Σ chlorophylls	-0.23	-0.16	-0.13	-0.20	0.46	-0.02	0.03	-0.28	-0.20	-0.26	-0.08	-0.12	-0.20	-0.20	-0.07	0.15	0.12	0.28	1.00										
zeaxanthin / Σ Carotenoids	-0.53	-0.42	-0.50	-0.36	0.82	-0.31	-0.15	-0.12	-0.11	-0.12	-0.25	-0.16	-0.13	-0.20	-0.13	0.42	-0.08	0.32	0.58	1.00									
luteoxanthin / Σ Carotenoids	0.44	-0.06	0.45	-0.20	-0.53	0.54	-0.11	-0.03	-0.08	-0.08	0.15	0.01	0.13	0.16	0.24	-0.46	-0.06	-0.13	-0.07	-0.34	1.00								
Σ xanthophylls / Σ Carotenoids	0.44	0.15	0.24	-0.13	-0.78	0.15	-0.24	-0.18	-0.23	-0.22	0.08	0.02	0.09	0.10	0.08	-0.49	-0.14	-0.29	-0.38	-0.64	0.59	1.00							
Glucose + Fructose / Sucrose	0.46	0.34	0.36	0.28	-0.02	0.41	0.45	0.33	0.40	0.38	0.85	0.66	-0.12	0.21	0.17	0.13	0.17	-0.02	-0.03	-0.25	0.10	0.05	1.00						
Shoot weight	0.19	0.15	0.30	0.34	-0.05	0.28	0.30	0.33	0.32	0.33	0.15	0.09	-0.01	0.04	-0.08	-0.02	0.27	0.03	-0.10	-0.10	0.00	-0.16	0.15	1.00					
plant weight	0.02	0.08	0.09	0.23	0.17	0.11	0.25	0.32	0.28	0.30	0.05	0.09	0.02	0.01	-0.14	0.17	0.02	0.07	-0.04	0.15	-0.19	-0.32	0.05	0.83	1.00				
Shoot length	0.02	0.15	-0.07	0.31	0.13	0.03	0.28	0.34	0.30	0.35	0.20	0.00	0.05	0.13	0.00	0.26	0.08	-0.02	-0.17	-0.02	-0.32	-0.33	0.20	0.56	0.55	1.00			
Shoot weight / Plant weight	0.25	0.07	0.36	0.21	-0.26	0.31	0.17	0.14	0.16	0.14	0.20	0.03	-0.05	0.02	0.02	-0.22	0.43	0.01	-0.08	-0.28	0.26	0.06	0.19	0.68	0.18	0.31	1.00		

Fig. 3.6: Person correlation performed on metabolite contents and physiological parameters quantification in leaves. Only significant correlations at 5% were colored. ABA: abscisic acid; SA: salicylic acid; IAA: indole-3-acetic acid.

significantly higher compared to control (p -value = 0.006). Auxin and JA contents were not significantly affected by stress conditions compared to control. For SA, IAA and JA, no correlation was found.

No correlation was also found for morphological parameters and carotenoid contents in roots (Fig. 3.4). However, plant and root weights were correlated between them (0.90).

In leaf organs, the combined stress condition reduced significantly chlorophyll contents (p -value = 0.005) as observed for carotenoid content but not under individual stress conditions as observed for total carotenoid content (Fig. 3.5). Excepted for α -carotene and 9-cis- β -carotene, carotenoid contents were correlated with chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll contents (from 0.67 to 0.93) (Fig. 3.6). Neoxanthin, violaxanthin and lutein (three xanthophylls) were found to be significantly correlated. Noticeably, α -carotene was not correlated with any other compound or trait. Moreover, chlorophyll contents were correlated between them (> 0.9). However, stress conditions did not impact sugar and hormone contents, except for IAA content which increased under combined stress condition (p -value < 0.001), and no correlation could be found between carotenoid or chlorophyll contents and sugars or hormones contents (Fig. 3.6). Surprisingly, glucose, fructose and sucrose contents were not correlated between them. As observed in roots, no correlation between carotenoid contents and morphological parameters were found (Fig. 3.6) but plant and shoot weights were well correlated (0.83).

Discussion

Stress conditions affect plant physiology differentially

In most cases, the water-restricted and the combined stress condition negatively impacted plant physiological parameters. The restriction in water supply in both years impacted dramatically plant morphological parameters but not under *A. dauci* inoculation. It could also be considered that the impact of combined stress condition on plant morphological parameters was the result of the water-restriction effect alone. This result was consistent with those obtained by Atkinson et al. (2011), who showed that combined drought and nematode infection negatively impact fruit yield ripening time and delay flowering. Surprisingly, the effect of combined stress condition was the same as obtained under nematode infection separately for fruit yield and ripening time. In contrast, the negative delay of flowering was equivalent under combined and drought stresses (Atkinson *et al.*, 2011). Results from physiological response in tomato and carrot demonstrated the complexity of plant response to individual and combined stress conditions.

Nevertheless, it appeared that whatever the species, the combination of stresses impact drastically and negatively plant physiological responses.

In our study, *A. dauci* inoculation did not impact significantly plant morphological parameters. However, considering *A. dauci* inoculation, we have shown that some symptoms were observed on leaves of the six carrot genotypes. Results confirmed that Bolero was resistant and Presto susceptible to *A. dauci* infection. This result is concordant to those obtained by our previous work (Le Clerc *et al.*, 2009). However, under combined stress condition, symptom notation was more homogeneous among genotypes. Indeed, the most resistant genotypes (Bolero and IKiR) were more susceptible under combined stress condition which was never investigated before. This result could be explained by a possible interaction between the two stresses or a more important perturbation in plant metabolism and especially plant defense mechanism compared to *A. dauci* alone. Drought stress combined with pathogen infection was well studied. In their recent review Ramegowda and Senthil-Kumar (2015) demonstrated through numerous examples that plant could be either more resistant and more susceptible to pathogen infection under drought stress condition. In this second case, drought stress could cause a loss of cellular nutrients into apoplast which facilitates pathogen infection for example. More globally, the susceptibility could be the result of the incapacity of the plant to exacerbate damage caused by drought stress and obviously the subsequent infection by pathogen (Ramegowda and Senthil-Kumar, 2015). Till now, no data was available considering combined stress condition on carrot growth in culture. Considering results from our work, the combined stress condition impacts plant morphological parameters similarly to what is observed under restricted-water condition, and causes important necrosis on leaves whatever the resistance level of genotypes. It can be concluded that for carrot culture, abiotic and biotic factors need to be considered together for an optimized disease management and a better plant growth.

Combined stress condition and A. dauci infection highly impact carotenoid contents in roots

In our work, we have shown that, in most cases, stress conditions applied in combination, more than individually, impact negatively carotenoid contents in carrot roots.

Till now, no data is available considering combined abiotic and biotic stress conditions on carotenoid accumulation in carrot. In roots, the combined stress condition led to an important decrease in carotenoid contents for most genotypes and both studied years. Interestingly, the variations in carotenoid contents for combined stress were not intermediate between variations observed under individual stresses, but were globally similar to what is observed under *A. dauci* inoculation, contrary to morphological parameters. In tomato fruit, it has been shown that combined abiotic and biotic stress condition reduced lycopene content only in the early stage of

fruit development (Atkinson *et al.*, 2011). However, β -carotene content was not affected by combined stress condition which was a minor compound in tomato fruits (1/10 of total carotenoid content). However, in contrast to our results, it has been shown that the biotic stress did not impact carotenoid accumulation in tomato fruits while drought led to the same trend as observed under combined stress condition (Atkinson *et al.*, 2011). From literature and our own results, the decrease in carotenoid content seems to be the result of one stress with a major effect, which can be different depending on the considered organ.

In our work, we showed that drought stress negatively impact morphological parameters and *A. dauci* infection was the most important factor for the decrease in carotenoid content. Under combined stress condition, morphological parameters as well as carotenoid contents were negatively affected but a significant correlation was observed between morphological parameters and carotenoid contents in roots. Our result suggest that two independent functions of plant were affected by stress conditions: one is related to plant growth and biomass production and the second one is the mechanism related to the plant defense against *A. dauci* infection which could be the direct or indirect cause for a decrease in carotenoid content stored in roots. In this work, it appears that the decrease in carotenoid content would not be a part of plant resistance mechanism to *A. Dauci*. Indeed, the decrease in carotenoid content under *A. dauci* infection alone was globally the same for all genotypes while contrasted resistance levels were observed.

Carotenoid content in leaves is more influenced by climatic variations

In leaves, results showed that stress conditions impacted carotenoid contents depending on the genotype and in most cases depending on the year. Indeed, Presto and IKaO were the most impacted by stress conditions in both years while Bolero and IKiR were the less ones. Moreover, Deep Purple and IBvW presented contrasted results depending on the year. It could also be concluded that in leaves, no general trend could be drawn from the observed variations.

In a previous work, we have shown that global abiotic factors negatively impacted carotenoid contents in leaves whatever the considered genotype (Perrin *et al.*, 2016). In this study, temperatures and global ray differed greatly between the two growing periods. We have suggested that leaf organs could be very susceptible to climatic variations.

In the present work, the experimentation design was performed in order to minimize global abiotic factors. However, the year effect observed in most cases suggests that environmental condition between the two years was not exactly the same. However, no significant differences in temperature or global ray between in the two years considering the whole cycle was observed, but the average and maximal temperature data were actually somehow different during August and September, at a critical stage of root tuberization (Fig. S3.1, Annexe II). This difference in

climatic parameter at a smaller time scale could explain the differences between years. From these two studies, it appears that carotenoid content variations in carrot leaves would be more influenced by global climatic factor variations more than specific stress in culture.

Carotenoid contents and primary metabolism are affected in the same way by stress

In our work, results showed that both sugar and carotenoid contents decreased under *A.dauci* and combined stress conditions in root organ. Moreover, they were positively correlated together whatever the studied condition and the genotype in both years. This result shows that in this swollen root, the two major stored metabolites are affected in the same way by the studied stress conditions. This suggests that a correlated mechanism for carotenoid and sugar accumulation exists in root, maybe in relation with the tuberization process. In tomato fruits, no correlation was found between lycopene content and glucose and fructose contents in response to individual and combined abiotic and biotic stresses (Atkinson *et al.*, 2011). These differences suggest different kind of regulation between root and fruit organ for carotenoid and sugars stored contents in non-green tissues. In fruits, like tomato, taste and color are important attribute for disseminator attraction but not for remobilization while, in root organ, carotenoid and sugar could be remobilized to source organs. These results on fruit and root organs bring to light the importance of the organ function for sugars content variation under biotic stress condition.

In leaves, carotenoid and chlorophyll contents were well correlated whatever the genotype, the stress condition and the year. In a previous study, we already suggested that carotenoid and chlorophyll contents were regulated in the same way in carrot leaves (Perrin *et al.*, 2016).

Surprisingly, in this study, no correlation could be observed between chlorophylls or carotenoid and sugar contents. Photosynthesis metabolism therefore cannot explain differences of sugar content in leaves in the different growing conditions. It could be due to the role of sugar as a precursor for other biosynthetic pathways or as a signal molecule in plant response to environment (Roitsch, 1999).

Conclusion

To conclude, in this work, we have shown that combined stress condition impact highly carotenoid content in carrot root, but similarly to *A. dauci* infection alone. In contrary, contrasting results were observed in leaves depending on the genotype, the year and the considered stress.

For a better understanding of carotenoid regulation mechanism, different regulation scales could be investigated. During this work, the relative expression of 13 carotenoid biosynthetic genes and ABA2 gene was quantified in both leaves and roots but no correlation with carotenoid variation was found (Fig. S3.2 and S3.3, Annexe II), which shows that the regulation is not at the transcriptional level. Proteins, quantifications in leaves and roots, in relation with the carotenoid biosynthetic pathway, or chromoplast differentiation in roots, could be investigated as possible regulation scales to explain carotenoid variation in response to individual or combined stress conditions. Among critical factors, the impact of temperatures and light intensity need to be investigated precisely concerning carotenoid content in leaves.

Acknowledgments

We thank Muriel Bahut, Laurence Hibrand Saint-Oyant, and Annie Chastellier from the ANAN platform (Analyze of nucleic acids – UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, SFR QuaSaV, France) for their technical help. We thank Dorine Laloï, Tricy Oublié, Pascale Satour and Duyen Prodhomme for their technical help. We thank Rémi Gardet, Nicolas Dousset, Jacky Granger, and Daniel Sochard from INEM (Mutualized experimental facilities – UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, SFR QuaSaV, France) for the experimental installation.

References

- Atkinson NJ, Dew TP, Orfila C, Urwin PE.** 2011. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 9673–9682.
- Bartley GE, Scolnik PA.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**, 1027–1038.
- Borghesi E, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Malorgio F, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ.** 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 11676–11682.
- Bouvier F, Backhaus RA, Camara B.** 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30651–30659.
- Bradeen J, Simon P.** 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y_2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 960–967.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ.** 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 266–274.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK.** 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**, 225–236.
- Clotault J, Geoffriau E, Lionneton E, Briard M, Peltier D.** 2010. Carotenoid biosynthesis genes provide evidence of geographical subdivision and extensive linkage disequilibrium in the carrot. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 659–672.
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E.** 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3563–3573.
- Clotault J, Peltier D, Soufflet-Freslon V, Briard M, Geoffriau E.** 2012. Differential selection on carotenoid biosynthesis genes as a function of gene position in the metabolic pathway: a study on the carrot and dicot. *PLoS ONE* **7**, e38724.
- Craufurd PQ, Peacock JM.** 1993. Effect of heat and drought stress on sorghum (*Sorghum bicolor*). II. Grain yield. *Experimental Agriculture* **29**, 77–86.
- Davison PA, Hunter CN, Horton P.** 2002. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **418**, 203–206.
- Duan H, Zhu Y, Qi D, Li W, Hua X, Liu Y, Deng X.** 2012. Comparative study on the expression of genes involved in carotenoid and ABA biosynthetic pathway in response to salt stress in tomato. *Journal of Integrative Agriculture* **11**, 1093–1102.

- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436–42.
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P.** 2003. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiology* **133**, 838–849.
- Howitt CA, Pogson BJ.** 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* **29**, 435–445.
- Jourdan M, Gagné S, Dubois-Laurent C, Maghraoui M, Huet S, Suel A, Hamama L, Briard M, Peltier D, Geoffriau E.** 2015. Carotenoid content and root color of cultivated carrot : a candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PLoS one* **10**, e0116674.
- Just BJ, Santos CAF, Fonseca MEN, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW.** 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 693–704.
- Kidmose U, Hansen S, Christensen L, Edelenbos M, Larsen E, Nørbæk R.** 2004. Effects of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Science* **69**, 388–394.
- Kim SH, Kim Y-H, Ahn YO, Ahn M-J, Jeong JC, Lee H-S, Kwak S-S.** 2013. Downregulation of the lycopene ϵ -cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β -branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweetpotato transgenic calli. *Physiologia Plantarum* **147**, 432–42.
- Kim JE, Rensing KH, Douglas CJ, Cheng KM.** 2010. Chromoplasts ultrastructure and estimated carotene content in root secondary phloem of different carrot varieties. *Planta* **231**, 549–558.
- Le Clerc V, Pawelec A, Birolleau-Touchard C, Suel A, Briard M.** 2009. Genetic architecture of factors underlying partial resistance to *Alternaria* leaf blight in carrot. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 1251–1259.
- Li-Marchetti C, Le Bras C, Relion D, Citerne S, Huché-Thélier L, Sakr S, Morel P, Crespel L.** 2015. Genotypic differences in architectural and physiological responses to water restriction in rose bush. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1–14.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R.** 2009. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS one* **4**, e6373.
- Nicolle C, Simon G, Rock E, Amouroux P, Rémésy C.** 2004. Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *Journal of American Horticulture Science* **129**, 523–529.
- Ombódi A, Daood HG, Helyes L.** 2014. Carotenoid and tocopherol composition of an orange-

colored carrot as affected by water supply. *HortScience* **49**, 729–733.

Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, Huet S, Jourdan M, Geoffriau E, Peltier D, Gagne S. 2016. Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 906–912.

Prasad PVV, Pisipati SR, Momčilović I, Ristic Z. 2011. Independent and combined effects of high temperature and drought stress during grain filling on plant yield and chloroplast EF-Tu expression in spring wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* **197**, 430–441.

Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z. 2008. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants (LH Ahuja and SA Saseendran, Eds.). Madison.

Ramakrishna A, Ravishankar GA. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1720–1731.

Ramegowda V, Senthil-Kumar M. 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology* **176**, 47–54.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, et al. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**, 1683–1696.

Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 198–206.

de Rosso V V, Mercadante AZ. 2007. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 5062–5072.

Le Roux C, Del Prete S, Boutet-Mercey S, Perreau F, Balagué C, Roby D, Fagard M, Gaudin V. 2014. The hnRNP-Q protein LIF2 participates in the plant immune response. *PLoS ONE* **9**.

Singh KB, Foley RC, Oñate-Sánchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 430–436.

Surles RL, Weng N, Simon PW, Tanumihardjo SA. 2004. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3417–3421.

Yasushi K. 1991. New trends in photobiology: Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **9**, 265–280.

Zeipiņa S, Alsina I, Lepse L. 2014. The effect of watering on yield and quality of carrots. *Acta Hort.* **1038**, 223–230.

CHAPITRE 4

**EVOLUTION DE LA TENEUR EN CAROTENOÏDES
DANS LE XYLEME ET LE PHLOEME DE CAROTTE
EN REPONSE AU STRESS HYDRIQUE**

I. INTRODUCTION

Pour la filière carotte, la couleur uniforme du xylème et du phloème de la racine de carotte, représente un critère de qualité et majeur de sélection. Les études menées d'une part par Baranska et al. (2006) d'autre part dans les travaux de thèse de Jourdan (2015) ont permis de mettre en évidence que la couleur de ces deux tissus était liée à l'accumulation plus ou moins importante de caroténoïdes. Les teneurs respectives en caroténoïdes du xylème et du phloème au sein de la racine représentent donc un intérêt particulier dans un objectif de commercialisation, et pourtant ont fait l'objet de très peu d'études.

Actuellement, de nombreux travaux issus de la littérature indiquent des niveaux de régulation en lien avec l'accumulation des caroténoïdes essentiellement basés sur le niveau de transcrite des gènes de la voie de biosynthèse ou bien spécifiquement sur les teneurs en protéines PSY. A travers les deux précédents axes de recherche de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence que les facteurs environnementaux seuls ou en combinaison impactent les teneurs en caroténoïdes de la racine. Cependant ces études ont été réalisées sur la racine de carotte entière, et ne permettent pas de comprendre la contribution et le fonctionnement respectif du phloème et du xylème, aux rôles et constitution pourtant très différents.

La dernière étape de ce travail de thèse vise donc à déterminer comment est régulée l'accumulation différentielle des caroténoïdes dans le xylème et le phloème de la racine de carotte et de déterminer quel est l'impact de stress sur leur accumulation ? Pour cela, les plantes ont été cultivées dans des conditions standards de culture ainsi qu'en condition de restriction hydrique. L'étude de l'impact d'un stress sur le xylème et le phloème de la racine de carotte représente l'originalité principale de ce travail, puisque cela n'a jamais été étudié. Le choix de ce stress a été fait du fait (i) de la fonction du xylème qui est le transport de la sève brute et dont la fonction peut être davantage perturbée par un manque en eau du milieu (ii) de besoin professionnel d'une meilleure gestion des apports en eau en lien avec la qualité du produit. Ce travail a été réalisé dans un premier temps sur un panel de 5 génotypes au couleur de racine contrasté (orange, rouge, violet et blanc) et les deux tissus ont été séparés sur chaque échantillon. Dans un second temps, des génotypes de racine bicolore ont été utilisés

La régulation tissu-spécifique de l'accumulation des caroténoïdes dans la racine de carotte a été réalisée en quantifiant l'expression relative des gènes de la voie de biosynthèse des

caroténoïdes au sein de ces deux tissus séparément. Pour aller plus loin, la quantité de protéine PSY, correspondant à une étape majeure de la voie de biosynthèse, a également été mesurée par immunomarquage en collaboration avec le Dr Ralf Welsch de l'Université de Freiburg. Cette dernière étude a donc pour but (i) de déterminer si le niveau d'expression des gènes ainsi que la teneur en protéines peuvent expliquer les différences de teneurs en caroténoïdes entre le xylème et le phloème de la racine de carotte (ii) de déterminer quel est l'impact d'une restriction hydrique sur les teneurs en caroténoïdes au sein de ces deux tissus ainsi que sur le niveau d'expression des gènes.

II. CAROTENOID GENE EXPRESSION EXPLAIN DIFFERENCE OF CAROTENOID ACCUMULATION IN CARROT ROOT TISSUES

Troisième article de la thèse, accepté dans *Planta*

Florent Perrin¹, Laura Hartmann¹, Cécile Dubois-Laurent¹, Ralf Welsch², Sébastien Huet¹, Latifa Hamama¹, Mathilde Briard¹, Didier Peltier¹, Séverine Gagné¹ and Emmanuel Geoffriau¹

¹ IRHS, Agrocampus Ouest, INRA, Université d'Angers, SFR QuaSaV, 49071, Beaucouzé, France

² University of Freiburg, Faculty of Biology II, Freiburg, Germany

✉ Emmanuel Geoffriau

emmanuel.geoffriau@agrocampus-ouest.fr

+33 (0)2 41 22 54 31

Abstract

The carrot root is well divided into two different tissues separated by vascular cambium: the secondary phloem and xylem. The equilibrium between these two tissues represents an important issue for carrot quality but the knowledge about the respective carotenoid accumulation is sparse. The aim of this work was (i) to investigate if variation in carotenoid biosynthesis gene expression could explain differences in carotenoid content in phloem and xylem tissues and (ii) to investigate if this regulation is differentially modulated in the respective tissues by water-restricted growing conditions. In this work, five carrot genotypes contrasting by their root color were studied in control and water-restricted conditions. Carotenoid content and the relative expression of 13 genes along the carotenoid biosynthesis pathway were measured in the respective tissues. Results showed that in orange genotypes and the purple one, carotenoid content was higher in phloem compared to xylem. For the red one, no differences were observed. Moreover, in control condition, variations in gene expression explained different carotenoid accumulation in both tissues while in water-restricted condition, no clear association between gene expression pattern and variations in carotenoid content could be detected except in orange-rooted genotypes. This work shows that the structural aspect of carrot root is more important for carotenoid accumulation in relation with gene expression levels than the consequences of expression changes upon water restriction.

Main conclusion

Variations in gene expression can partially explain the difference of carotenoid accumulation in secondary phloem and xylem of fleshy carrot roots

Keywords: *Daucus carota*, Pigment, Phloem, Transcriptional regulation, Xylem

Introduction

The over-production of secondary metabolites (shikonin, nicotine, phenylheptatriyne, thiarubrine A for example) from plant roots is important for human health (Flores et al. 1987). However, the accumulation of secondary metabolites in dedicated underground organs like tubers or roots still remains poorly understood. As metabolites involved in metabolic diseases prevention for human health and provitamin A precursors, carotenoids represent an important metabolic family (Bartley and Scolnik 1995). In carrot root, anthropic selection led to a particularly high carotenoid accumulation (Surles et al. 2004; Clotault et al. 2012). Quantitative analysis showed that root color depends on different carotenoid content. Orange genotypes contain mostly α -carotene and β -carotene, yellow genotypes contain lutein, the red ones contain lycopene and white genotypes contain almost no carotenoid. Among carrots with the same color, total carotenoid content can vary greatly (Nicolle et al. 2004; Surles et al. 2004). Carrot root is consumed worldwide and represents one of the most important carotenoid sources. As a carrot root quality attribute, carotenoid accumulation in root therefore represents a research challenge.

Xylem and phloem are conducting tissues of vascular plant system. Xylem conducts raw sap (water) and phloem conducts elaborate sap (amino acids and sucrose; Zhao et al. 2005). In contrast to most edible plant species, carrot root is visually well separated in two parts separated by vascular cambium: secondary phloem (liber) which corresponds to the cortex and the secondary xylem (wood) which corresponds to the core. Their fleshy nature is due to massive development of storage parenchyma. Actually, most studies on carrot quality focus on the whole carrot root. However, secondary xylem and phloem represent an important selection trait for carrot breeders, since market demand and consumers are searching for small xylem and a uniform color between xylem and phloem. But till now, our knowledge about the mechanisms underlying the accumulation of secondary metabolites in xylem and phloem is sparse. Carrot is therefore a good model to study pigment accumulation in phloem and xylem, respectively. Different approaches were implemented in order to highlight specific carotenoid accumulation in both xylem and phloem of carrot root. Baranska et al. (2006) showed by Fourier transformed based (FT)-Raman spectroscopy that carotenoids are differentially accumulated along a cross section of carrot root, also depending on the considered color genotype. However, they showed that carotenoids are mostly accumulated in carrot phloem. The color difference between xylem and phloem has been shown to be under genetic control. A first study identified *Y* gene as the major gene controlling xylem and phloem color (Buishand and Gabelman 1979), in co-expression with isoprenoid biosynthetic genes (Iorizzo et al. 2016). Jourdan et al. (2015) showed significant associations between carotenoid genes SNPs and color components, specifically related to phloem and xylem tissues. Overall, carotenoid accumulation was shown to be controlled in a specific manner in carrot between xylem and phloem. Although several genetic factors have been already

investigated, no regulation mechanism was investigated so far focusing on carotenoid formation in secondary xylem and phloem of carrot root.

The exceptional high carotenoid accumulation in cultivated carrot from wild white carrot, due to anthropic selection, highlights an important genotype diversity in terms of carotenoid accumulation mechanisms. Transcriptional regulation is a major mechanism of carotenoid accumulation in fruits and vegetables and specifically carrot. During root development, carotenoid gene expression was partially related to carotenoid accumulation with *phytoene synthase (PSY)* expression being crucial for carotenoid accumulation (Clotault et al. 2008). Maass et al. (2009) showed that *PSY* over-expression lead to an orange phenotype and a carotenoid over accumulation in a white genotype and suggested that *PSY* is the rate limited enzyme for carotenoid accumulation in carrots. Two other studies have shown that environmental factors (light, temperatures and global rays) impact carotenoid gene expression and carotenoid accumulation in carrot root and suggested a induced switch toward the β -branch of the carotenoid pathway (Fuentes et al. 2012; Perrin et al. 2016). Since transcriptional variation was shown to be involved in carotenoid accumulation in carrot root, it could potentially explain differences in carotenoid accumulation between secondary xylem and phloem and allow new insights of conducting tissue operation.

This study aims, firstly to know if carotenoid accumulation in phloem and xylem is regulated by carotenoid gene expression. Secondly, as water deficiency can act as a stress factor affecting root metabolism, the purpose is to investigate the impact of water-restricted condition on carotenoid accumulation in xylem and phloem and to determine if gene expression regulation is differentially or in the same way modulated in these respective tissues. Five carrot genotypes contrasting by their overall root color and more specifically their xylem and phloem color intensity were studied in standard and water-restricted conditions. The carotenoid content and the relative expression of a set of 13 genes along the carotenoid biosynthesis pathway were measured in the respective tissues.

Materiel and methods

Biological material and experimental design

Five genotypes contrasted by their root color have been studied: the two varieties Bolero (orange) and Deep Purple (purple), supplied by Vilmorin and Bejo seed companies, respectively, and 3 inbred lines derived from Karotan (IKaO, orange), Kintoki (IKiR, red) and Blanche des Vosges

(IBvW, white), supplied by the Center of biological resources “Carrot and other Apiceae” at Agrocampus Ouest IRHS. Plants were grown under a semi-controlled environment in tunnels in three biological replications during two consecutive years (2013 and 2014) at Agrocampus-Ouest (IRHS-Angers, France) in standard growing conditions. In order to create a water-restricted condition for carrot growth, genotypes were also grown in 2014 under hydric restriction (soil potential of $P_f = 3.5$). The soil potential was monitored using steering electronics module (Watermark), a central of acquisition (Tensiomanager) and tensiometric probes (Watermark). The hydric restriction resulted in a significant reduction (20-50%) of shoot, root and whole plant biomass compared to standard condition which highlights the negative effect of this condition. For each sample (genotype, biological replication and year), a bulk of 10 roots has been harvested and pooled. The secondary xylem has been manually separated from the secondary phloem, and both tissues were finely grinded to powder in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Carotenoid analysis

Carotenoid extraction and quantification from root xylem and phloem were performed as described in Perrin et al. (2016). Carotenoid detection and quantification were carried out using a Shimadzu HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) equipped with a thermostated autosampler (SIL-10AD VP), a diode array detector (SPD-M10A VP) and carotenoids were separated along an YMC C30 column (YMC, Kyoto Japan; $150 \times 4.6; 3\mu\text{m}$). For carotenoid analyses, the elution program had the following proportions of solvent A [methanol/acetonitrile/water 84/14/2 (by vol.) including 0,1 % of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (w/v) and triethylamine (v/v)] and solvent B (dichloromethane): 0-12 min, 80-45%; 12-14 min, 45-10%; 14-17 min, 10-80%; 17-23 min, 80%.

Carotenoid compounds were identified and quantified as in de Rosso and Mercadante (2007) and Jourdan et al. (2015). Data represent the mean of three assays per sample, and carotenoids are expressed as mg per 100 g of dry matter (DM).

Gene expression analysis

Total RNA were extracted using the NucleoSpin® RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), with slight modifications in the supplier’s specifications (described in Perrin et al. 2016). Retro-transcription was performed using MLV-Reverse transcriptase (Promega, USA) and oligo(dT)₁₅ (Promega, USA). The absence of gDNA contamination was checked by PCR by using EF1 α primers bordering an intron to discriminate the size of the amplicons.

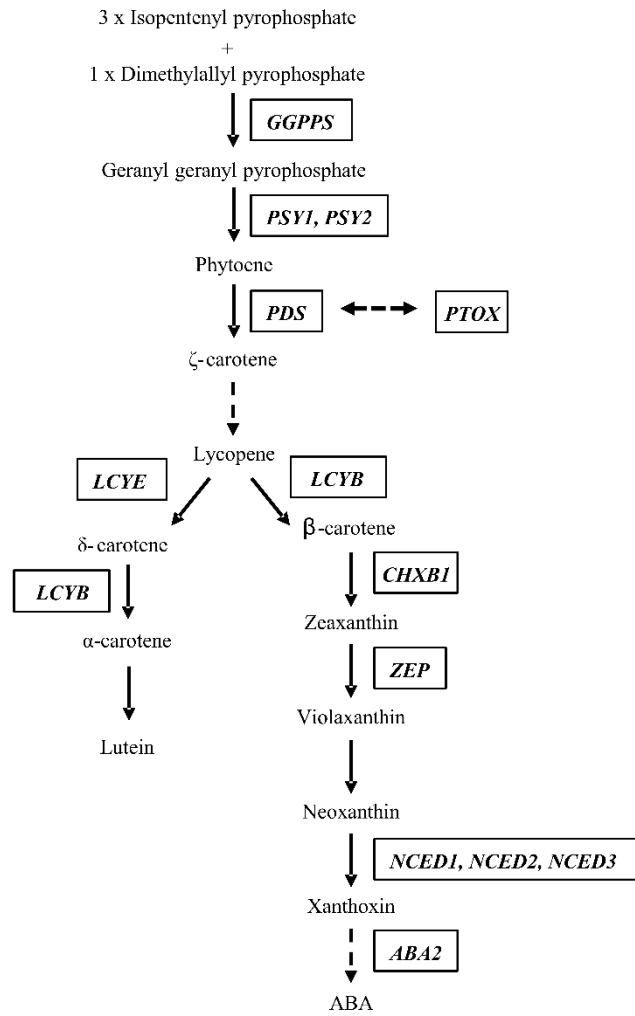


Fig 4.1: Carotenoid biosynthesis pathway. Only studied genes are represented. GGPPS: geranylgeranyl pyrophosphate, PSY: phytoene synthase, PDS: phytoene desaturase, PTOX: plastid terminal oxidase, LCYE: lycopene ϵ -cyclase, LCYB: lycopene β -cyclase, CHXB: carotene ϵ -hydroxylase, ZEP: zeaxanthin epoxidase, NCED: 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, ABA: abscissic acid (adapted from Perrin et al. 2016)

Quantitative real-time PCR was performed by using GoTaq® qPCR Master Mix 1X (Promega, USA), 0.3 µM of each primer, 2.5 µg of cDNA, and sterile water in a final volume of 10 µL. The thermal cycling conditions (CFX384 Touch Real-Time PCR, BioRad, USA) were the following: pre-incubation at 95°C for 10 min, 15 s at 95° and 1 min at 60°C for 40 cycles. Relative gene expression was calculated using the $E^{-\Delta Ct}$ method (efficiency^{- ΔCt}) with ΔCt (threshold cycle) being the difference between firstly three Ct from three biological replications in phloem and the mean of Ct of three biological replications in xylem (phloem/xylem) and the Ct from three biological replications of hydric restriction condition and the mean of Ct of three biological replications in control condition secondly (hydric restriction/control) (Pfaffl 2001). The data were normalized by using the housekeeping genes *actin* and *tubulin β* . PCR efficiency was determined by a range of 5 points (a cascade dilution ¼ of total cDNA) (BioRad CFX Manager software). Negative controls were prepared by replacing cDNA by sterile water.

Eight genes from the carotenoid biosynthesis pathway (*GGPPS*, *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *LCYE*, *LCYB1*, *LCYB2*, *CHXB1* and *ZEP*), one gene associated with *PDS* activity (*PTOX*, Josse et al. 2000), which all represent genes involved in carotenoid synthesis, and three genes from the apocarotenoid pathway (*NCED1*, *NCED2* and *NCED3*) representing genes involved in carotenoid cleavage and ABA formation, have been investigated. All genes, except *LCYB1* and *LCYB2* (therefore mentioned as *LCYB* thereafter), were amplified specifically. The relative position of these genes in the biosynthetic pathway is shown in the Fig 4.1. Gene expression was quantified in samples from both standard and hydric restriction conditions. Relative gene expressions were calculated for phloem/xylem and were represented by heatmap and hierarchical clustering analysis was also performed in order to highlight possible common expression patterns.

Immunoblot analysis

Proteins were extracted from carrot roots with phenol as described in Welsch et al. (2007). After SDS- PAGE, blotting onto polyvinylidene fluoride membranes (Carl Roth), and treatment with blocking solution (TBS containing 5% [w/v] milk powder), membranes were incubated with antibodies in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 1% (w/v) milk powder. For detection, the ECL system (GE Healthcare) was used. Monoclonal antibodies against PSY were obtained from Abmart (Shanghai, China) and used in a final concentration of 12 µg mL⁻¹. After inactivation of peroxidase (Sennepin et al. 2009) blots were reprobated with anti-actin antibodies (Sigma-Aldrich).

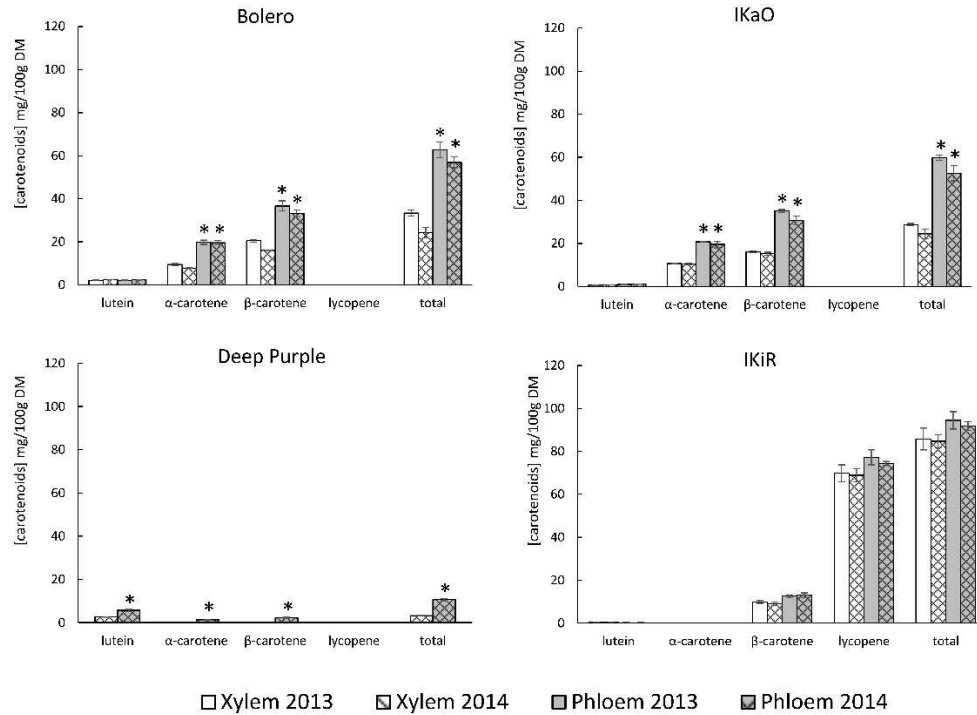


Fig. 4.2: Carotenoid content in xylem and phloem tissues. Carotenoid content (mg/100g DM) in carrot xylem in 2013 (white square) and in 2014 (white striped square), in carrot phloem in 2013 (grey square) and in 2014 (grey striped square) for each genotype. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% level between phloem and xylem for a given compound and each year (Tukey test). DM: dry matter

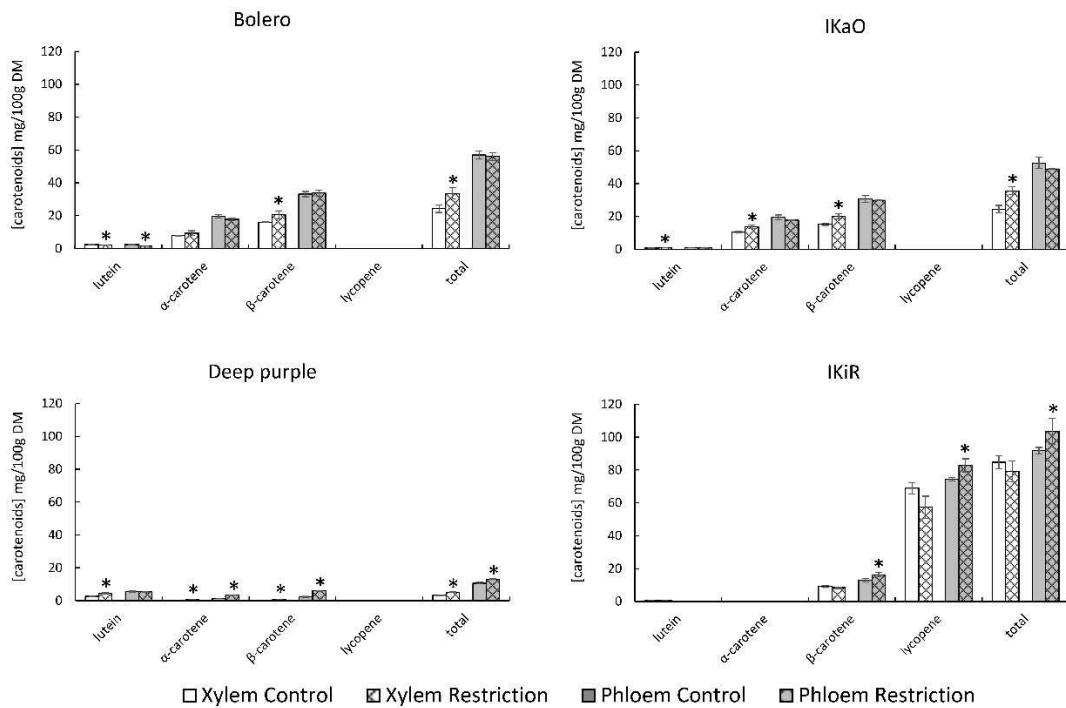


Fig. 4.3: Impact of water-restricted condition on carotenoid content in xylem and phloem tissues. Carotenoid content (mg/100g DM) in carrot xylem in control condition (white square) and in hydric restriction (white striped square), in carrot phloem in control condition (grey square) and in restriction condition (grey striped square) for each genotype. Values are the mean \pm S.D. of three biological replications ($n=3$). * indicates a significant difference at 5% level between control and hydric restriction condition for a given compound and each genotype (Tukey test). DM: dry matter

Statistical analysis

Statistical analyses were performed by using R version 3.1.0 program. Differences were analyzed by an ANOVA test followed by a Tukey test for pigment contents. Variance analyses were performed by an ANOVA test on three biological replications ($n=3$). Clustering of gene expression was done with Ward method on Euclidian distances.

Results

Carotenoid accumulation in secondary phloem and xylem

In both orange genotypes, the main carotenoids were β -carotene, then α -carotene, and in a lesser extend lutein. In the purple genotype, the main carotenoid was lutein but the carotenoid content was much lower compared to all other studied genotypes. The purple color was due to the high levels of anthocyanins (Nicolle et al. 2004; Surles et al. 2004). In the red one, lycopene was mainly accumulated, then β -carotene. A similar relative composition between compounds was found in both secondary phloem and xylem for all genotypes but with different content level (Fig 4.2). In phloem of orange genotypes, total carotenoids including β -carotene and α -carotene were significantly more accumulated in phloem compared to xylem. In contrast, there was no difference for lutein in harvests of both years. In the phloem of the purple genotype, all carotenoids were significantly more accumulated compared to xylem in both years. In the red genotype, no difference between pigment accumulations in both tissues was observed (Fig 4.2).

In order to evaluate if the respective carotenoid accumulation in carrot xylem and phloem is modified by the environment, plants were also grown under hydric restriction conditions. In both orange genotypes, only carotenoid content in xylem was affected by the water-restricted conditions. Total carotenoid and β -carotene contents in xylem were higher under hydric restriction compared to control, whereas α -carotene content was not affected in Bolero but higher in xylem of inbred IKaO under restriction condition (Fig 4.3). Carotenoid contents were largely affected by hydric restriction condition in both xylem and phloem of the purple genotype, with a significant increase, except for lutein in phloem (Fig 4.3). Contrary to the other genotypes, an increase of carotenoid content was observed only in the phloem of the red genotype (Fig 4.3).

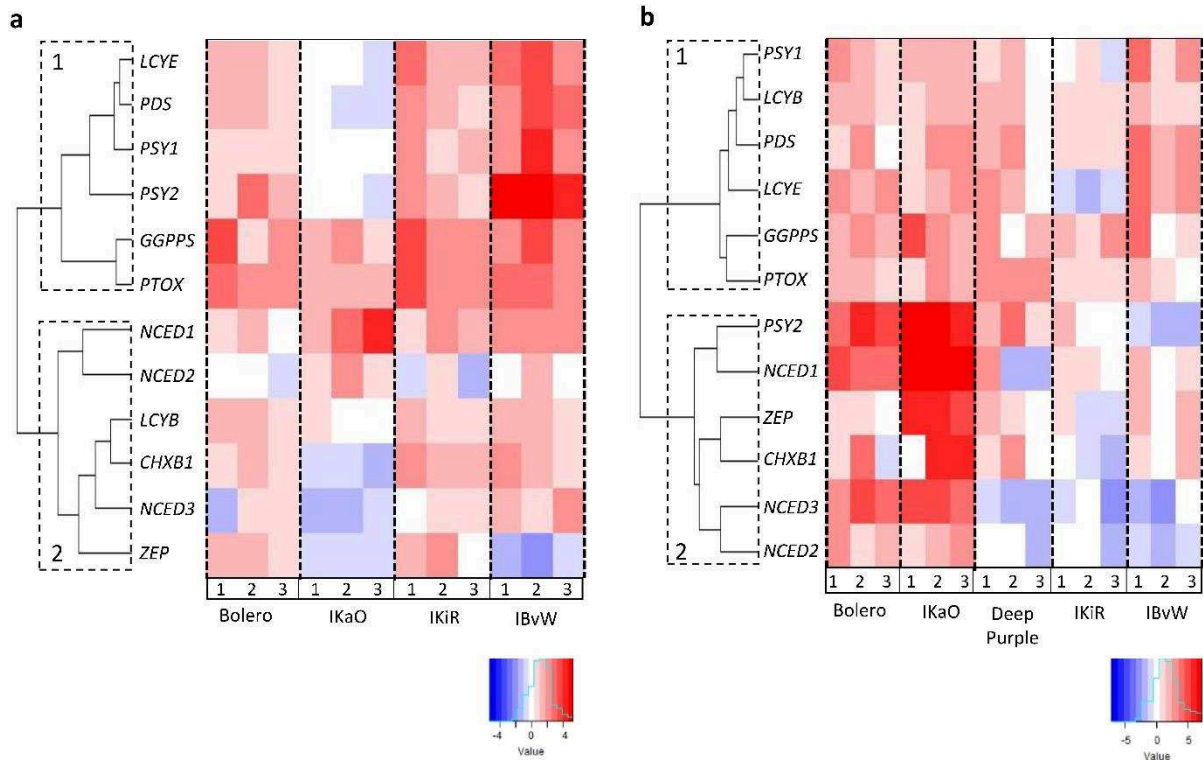


Fig. 4.4: Heatmap of relative carotenogenesis gene expression (in log₂) in the five studied genotypes in 2013 (a) and in 2014 (b). A blue color represents an under-expression and a red color an over-expression of the gene in phloem relative to xylem. A more intense color corresponds to a higher level of expression difference. Clustering of gene expression was done with Ward method on Euclidian distances. GGPPS, geranyl geranyl pyrophosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; LCYB, lycopene β-cyclase; LCYE, lycopene ε-cyclase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; PTOX, plastid terminal oxidase; CHXB1, carotene ε-hydroxylase. 1,2 and 3 represent the three biological replications

Gene expression in secondary phloem and xylem

In standard conditions, genes from the carotenoid biosynthesis pathway were globally more expressed (*GGPPS*, *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *PTOX*, *LCYB*, *LCYE*, *CHXB1*, *NCED1*, *NCED3* and *ZEP*) in phloem compared to xylem for all genotypes and both years (Fig. 4.4a and 4.4b). In contrast, no general trend could be observed for relative expressions of genes involved in apocarotenoid synthesis. The cluster analysis of carotenoid biosynthesis gene expression showed that *GGPPS*, *PSY1*, *PDS*, *PTOX* and *LCYE* were grouped in the cluster 1 while *CHXB1*, *ZEP*, *NCED1*, *NCED2* and *NCED3* were grouped in the cluster 2 in 2013 (Fig. 4.4a) and 2014 (Fig. 4.4b). Only *PSY2* and *LCYB* and were not grouped in the same cluster in both years.

In phloem of the orange genotype Bolero, carotenoid gene expressions were higher compared to xylem in both years along the biosynthetic pathway (Fig.4.4a and 4.4b). Comparing both studied years, genes were differentially expressed for the orange genotype IKaO. In phloem of the harvest 2013, expression levels of *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *LCYE*, *LCYB*, *CHXB1*, *ZEP* and *NCED3* (Fig. 4.4a) did not differ between phloem and xylem but in 2014, all genes were higher expressed in the phloem compared to the xylem (Fig. 4.4b). In this genotype for both years, *GGPPS*, *PTOX*, *NCED1* and *NCED2* were more expressed in phloem compared to xylem. For Deep Purple, the relative gene expression based on only one year was globally higher in the phloem tissue compared to the xylem one, as 9 genes out of 12 (*GGPPS*, *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *PTOX*, *LCYB*, *LCYE*, *CHXB1* and *ZEP*) were overexpressed (two biological replications out of three) (Fig.4.4b). In the phloem of the red genotype, relative gene expression levels from enzymes positioned in the beginning of the biosynthetic pathway (*GGPPS*, *PDS* and its associated gene *PTOX*) were higher compared to the xylem in both years. However, relative genes expression levels from enzymes downstream to the synthesis of lycopene, *LCYE*, *CHXB1*, *ZEP*, *NCED1*, *NCED2* and *NCED3*, were conflicting between both studied years (Fig. 4.4a and 4.4b). In the phloem of the white genotype gene expression was globally higher compared to the xylem, except for *PSY2*, *ZEP*, *NCED2* and *NCED3* genes which expression was either lower or higher depending on the year.

In order to investigate the impact of water restriction condition on gene expression, the relative expression was studied in water restriction versus control samples for all genotypes in xylem and phloem (Fig. 4.5). Grouped in cluster 1, *GGPPS* but more significantly *NCED1* and *NCED2* genes had their expression mostly affected, positively or negatively, for all genotypes and both tissues under water restriction compared to control. The cluster 2 regrouped all other genes which were globally less affected by water-restricted condition. Remarkably, *PSY2* and *CHXB1* exhibited a

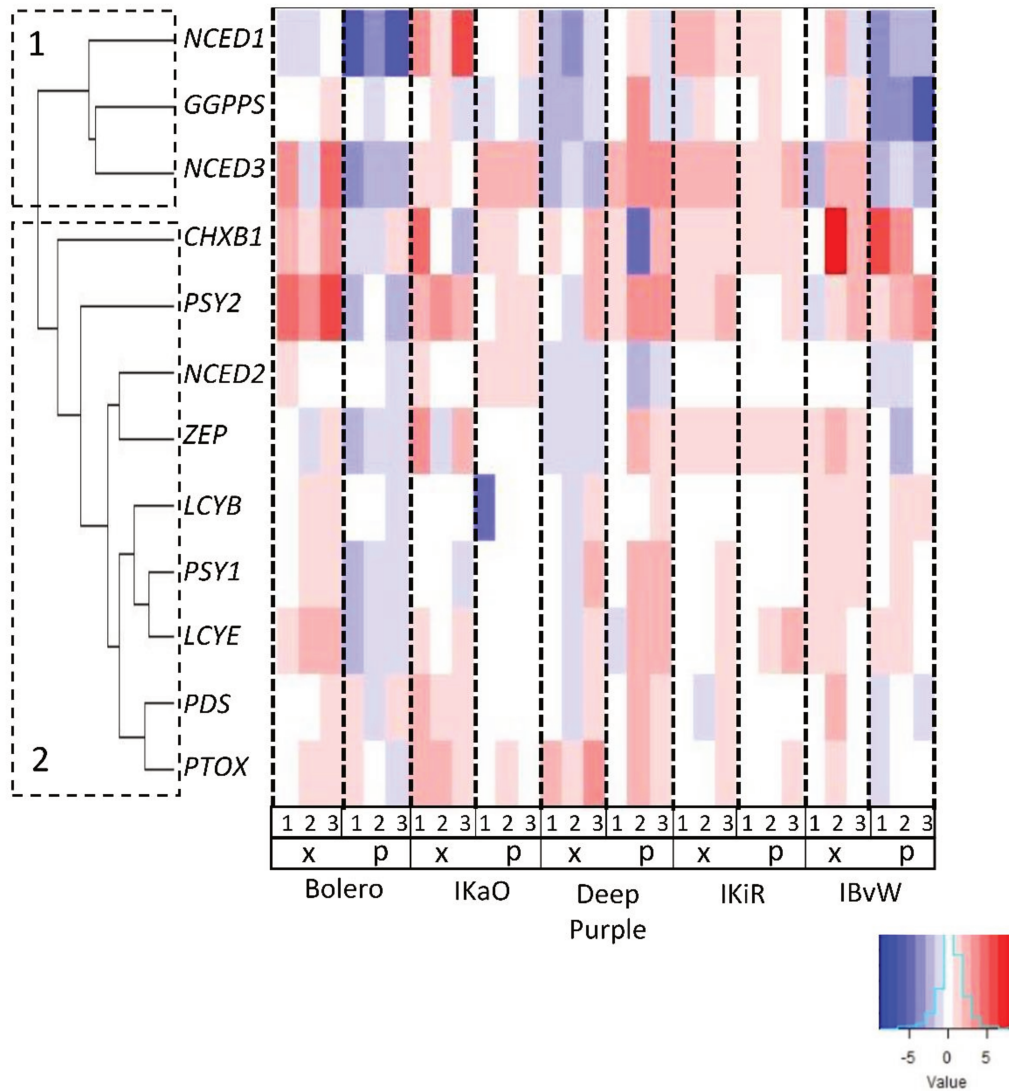


Fig. 4.5: Heatmap of relative carotenogenesis gene expression (in log2) in the five studied genotypes. A blue color represents an under-expression and a red color an overexpression of the gene in the hydric restriction condition relative to the standard condition. A more intense color corresponds to a higher level of expression difference. Clustering of gene expression was done with Ward method on Euclidian distances. GGPPS, geranyl geranyl pyrophosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; LCYB, lycopene β -cyclase; LCYE, lycopene ϵ -cyclase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; PTOX, plastid terminal oxidase; CHXB, carotene ϵ -hydroxylase. x: xylem and p: phloem. 1,2 and 3 represent the three biological replications

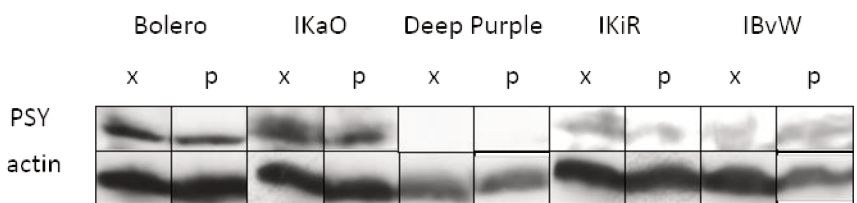


Fig. 4.6: Immunoblot analysis of PSY protein in xylem (x) and phloem (p). Analysis was performed in the five genotypes grown under control condition. Actin was used as loading control. 60 μ g total protein extracts were loaded each

different pattern from other cluster 2 genes and cluster 1 genes, as shown by the cluster branching, as only the relative expression of *PSY2* and *CHXB1* were globally higher under hydric restriction compared to control for all genotypes.

In xylem of orange genotypes under hydric restriction condition, gene expression levels were globally higher compared to the control. However, in phloem, contrasted results were observed for both orange genotypes under hydric restriction: gene expressions were globally lower for Bolero but not differentially expressed for IKaO compared to control (Fig. 4.5). In phloem of the purple genotype, carotenoid biosynthesis gene expression was globally higher under hydric restriction condition compared to control whereas lower in xylem tissue (Fig. 4.5). In both tissues of the red genotype, genes were globally not differentially expressed (Fig. 4.5). In xylem of the white genotype under hydric restriction, gene expression was higher whereas no general trend could be observed in the phloem tissue (Fig. 4.5).

PSY protein levels in xylem and phloem

In order to correlate gene expression and carotenoid levels with PSY protein levels, PSY was analyzed by immunoblotting in both xylem and phloem tissues from the controls of the five studied genotypes (Fig. 4.6). Accordingly, the two cultivars with high levels of β - and α -carotene included in this study, Bolero and IKaO, showed similarly high PSY protein levels and the two cultivars with low carotenoid levels, Deep Purple and IBvW had no or low PSY protein levels, respectively. Surprisingly, however, in the red-colored cultivar IKiR which accumulated similarly high carotenoid levels as Bolero and IKaO, PSY levels were low.

Discussion

Phloem as a carotenoid accumulating tissue

In this work, carotenoid quantification in both phloem and xylem was performed on a panel of five carrot genotypes with different root color and thus carotenoid contents. Our results showed that in both orange genotypes and the purple one, carotenoids were mainly accumulated in phloem. A previous study based on one orange genotype only (cv. Imperator) showed that total carotenoid content was higher in phloem compared to xylem with an average ratio phloem/xylem of 2 (Phan and Hsu 1973) which is in accordance with our results based on a larger color panel.

These results are also concordant with FT-Raman profiles obtained by Baranska et al. (2006) who showed that β -carotene and α -carotene were highly detected in the secondary phloem compared to secondary xylem in orange and purple genotypes. This higher carotenoid amount in phloem compared to xylem could be related to microscopic analysis performed by Kim et al. (2010) who observed that carotenoid crystal forms are mostly present in chromoplasts of phloem compared to xylem, suggesting a different kind of cell organization. Similarly, Maass et al. (2009) showed that overexpression of *PSY* led to increased carotenoid synthesis to levels sufficiently high to form crystalline β -carotene. The higher carotenoid levels in phloem versus xylem correlated with higher relative expression of carotenoid biosynthesis genes in the orange genotypes and particularly Bolero. In the orange genotype IKaO, a few genes were overexpressed in phloem in 2013 but all in 2014 whereas the carotenoid content was similarly significantly higher compared to xylem. This result suggests that IKaO could be more susceptible to agroclimatic variation and environmental interaction at the transcriptional scale compared to Bolero.

This suggests that carotenoid amounts in xylem and phloem in orange genotypes is primarily controlled by overall abundance of transcripts of carotenogenic genes. In a previous study, *PSY* protein levels were shown to correlate with low and high carotenoid amounts in roots of four other carrot cultivars, the two white cultivars Queen Anne's Lace and Kuttinger and the orange cultivars Chantenay Red Cored and Nantaise, respectively (Maass et al. 2009). Surprisingly, in the present study, *PSY* protein levels were similarly high, at least in xylem and phloem of Bolero and IKaO, while carotenoids levels in xylem were about half as those in the phloem. *PSY* catalyzes the rate-limiting step of carotenoid biosynthesis and determines also carotenoid levels in carrots (Maass et al. 2009), thus suggesting similar pathway flux in both tissues. The reduction in carotenoid content in xylem might be due to increased oxidative destruction of carotenoids caused by a reduced abundance of ROS scavenging systems, e.g. through phenolic compounds which were shown to be by far lower in xylem compared to phloem (Zhang and Hamazu 2004).

In our work, we observed no difference in carotenoid content between phloem and xylem for IKiR, whereas those obtained by Baranska et al. (2006) for "Penipat Special" genotype showed that lycopene was mainly accumulated in secondary phloem. In contrast, the results for orange or purple genotypes, considering carotenoid content in both phloem and xylem were concordant with those of Baranska et al. (2011) and Phan et al. (1973). Altogether, the data suggest that no general trend for carotenoid accumulation in red genotypes in secondary phloem and xylem could be drawn. In our study, the gene expression in phloem of the red genotype was higher compared to xylem whereas no difference in carotenoid content was observed. Till now, few data are available about carotenoid and especially lycopene regulation mechanism in red carrot root genotypes. Clotault et al. (2008) showed that relative expression of carotenoid biosynthesis genes in the red

genotype “Nutrired” was different compared to orange and yellow genotypes and could partially explain in whole root the higher lycopene accumulation. In our work, the expression of genes encoding enzymes involved in the synthesis of lycopene were higher in phloem compared to xylem in both years (*PSY2*, *PDS* and *PTOX*) but those genes encoding enzymes metabolizing lycopene (*LCYE*, *ZEP*, *NCED2* and *NCED3*) were conflicting between both studied years. Carotenoid distribution in xylem and phloem of the red genotype and relative gene expression were therefore not associated and suggest that (i) lycopene downstream genes expression may be not directly or indirectly (feed back regulation) the regulation step for lycopene accumulation in carrot root (ii) lycopene upstream gene expression is not the main regulation scale to explain lycopene accumulation in secondary phloem and xylem of red root genotypes.

In the white genotype, no carotenoid was accumulated but transcripts were present. During carrot root development (Clotault et al. 2008) and in response to environmental constraints (Perrin et al. 2016) relative expression of carotenoid biosynthesis genes was not different compared to all other colored genotypes. In our work, we showed that carotenoid gene expression were globally higher in phloem compared to xylem in both years. This result demonstrates that independently from the root color, the pattern of carotenoid gene expression found in whole root mirrors that in different root tissues. This confirms that in carrot root, there is a specific pattern of phloem as a metabolite accumulating tissue compared to xylem. This conclusion is concordant with previous works of Kim et al. (2010) who observed difference in crystal formation between secondary xylem and phloem of carrot root.

In this work, we showed therefore that in high accumulating genotypes, the carotenoid gene expression pattern explains a more important carotenoid accumulation in the phloem compared to the xylem mainly for orange genotypes but not for the red one.

Considering the clustering based on relative gene expression in phloem compared to xylem in standard condition, upstream carotenoid biosynthesis genes *GGPPS*, *PSY1*, *PDS*, and *PTOX* were grouped in the same cluster in both studied years 2013 and 2014. The second cluster was formed by downstream genes *ZEP*, *NCED1*, *NCED2* and *NCED3*. This interesting result demonstrates that a conserved pattern of expression for carotenoid accumulation in phloem and xylem exist. The first group formed by upstream genes were shown to be important for carotenoid synthesis in carrot as demonstrated for *GGPPS*, which is an important key precursor gene for hormone (gibberellin, ABA and strigolactone) (Cazzonelli and Pogson 2010) or secondary metabolites synthesis (tocopherols, quinones, carotenoid and apocarotenoid) (Ruiz-Sola et al. 2014) or *PSY* (Clotault et al. 2008; Maass et al. 2009; Jourdan et al. 2015). Interestingly, *PDS* and *PTOX* were grouped into the same cluster which confirmed at a transcriptional scale their associated role in carotenoid desaturation (Josse et al. 2000). The second cluster was formed by

ZEP and *NCED* genes showing the same common expression pattern in phloem and xylem. These genes are involved in ABA synthesis. *ZEP* and *NCED* family genes were expressed in a convergent and maybe in a synergic way. According to literature and the present work, we propose the existence of common promoting elements in the nucleotide sequence but more investigations are needed in this regard.

An evidence for carotenoid metabolism in both xylem and phloem

In our work, we showed that transcripts of the carotenoid biosynthetic genes were present in both phloem and xylem. Moreover results from immunoblot analysis revealed the presence of PSY protein in both xylem and phloem. These results show that an active carotenoid metabolism and biosynthesis exist in these two tissues, even in the xylem which was never highlighted before. In the purple genotype, the absence of PSY protein signal could be related to the carotenoid content in this genotype which was very low compared to other colored genotypes. This result is concordant with those observed for the white genotype. In contrast, the low level of PSY in red-colored carrots is very surprising as pathway flux is considered to be as high as in the orange-colored cultivars. As a monoclonal anti-PSY antibody was used it is possible that single amino acid changes in the epitope sequence present in PSY of the red-colored cultivar might have prohibited antibody binding. Accordingly, these results need to be treated with caution and needs additional information from PSY cDNA sequence information.

Effect of hydric restriction on xylem phloem differences

In our previous study, which was based on 5 carrot genotypes contrasted by their root color, we showed that environmental factors impact carotenoid accumulation in whole carrot root but with a genotype-dependent effect (Perrin et al. 2016). In red beet, a hydric restriction condition led to a higher level of pigment (betacyanin and betaxanthin) and total phenolic contents (Stagnari et al. 2014) as observed for lycopene and β -carotene contents in tomato fruits (Favati et al. 2009). This increase in pigment content could be linked to their role as antioxidant which was largely demonstrated to be involved in response to stress condition in plants. To date, few data regarding the differential effect of hydric stress on metabolite accumulation in phloem and/or xylem are available. It has been shown that proline concentration increased in Alfalfa phloem sap (Girousse et al. 1996) and abscisic acid levels in white lupin phloem was higher under hydric stress condition (Hoad 1978).

Abiotic stress conditions like water or salt stress are known to induce increased synthesis of ABA primarily in the organ which perceives changes in water potential, the root. While there are plenty of data on perception and response in hairy root systems, response towards abiotic stress conditions are scarce for taproots like carrots. Moreover, many taxa forming hairy roots with low carotenoid levels show increased levels of PSY upon salt and drought stress which is thought to supply sufficient xanthophyll substrate amounts to allow ABA formation, e.g. in *Arabidopsis* and rice (Welsch et al. 2008; Ruiz-Sola et al. 2014). However, an interesting question is how carotenoid biosynthesis responds to hydric stress in taproots, especially in orange carrots in which ABA substrate levels should not be considered as limiting considering the high levels of xanthophylls precursor.

Our present results show that hydric restriction condition impacts carotenoid accumulation independently from a high carotenoid content in orange and red carrot varieties, but differentially depending on the tissue type and the genotype. Under hydric restriction condition, three different profiles can be highlighted: (i) carotenoid contents are higher compared to control in xylem tissue only (orange genotypes), (ii) carotenoid contents are higher in both phloem and xylem (purple genotype), (iii) carotenoid content is higher in phloem tissue only (red genotype). Again, the red genotype exhibits a specific pattern. Our results showed therefore that environmental factors could impact pigments or more largely metabolites accumulation in specific tissues such as phloem and xylem.

At the transcriptional scale, the differences between growth conditions are more attenuated than between phloem and xylem under standard condition. An association between carotenoid accumulation and gene expression patterns could be detected for the orange genotypes only. The difference of gene expression between xylem and phloem under hydric restriction can explain the higher level of carotenoid content in xylem. In our study, *PSY2* and *NCED3* relative expressions were globally higher under hydric restriction compared to the control. In rice (Welsch et al. 2008) and in Poaceae (Li et al. 2008) a phytoene synthase was shown to be induced under abiotic stresses. In *Nicotiana plumbaginifolia* (Qin and Zeevaart 2002) or *Arabidopsis thaliana* (Iuchi et al. 2001) *NCED* genes were shown to be involved in abiotic stresses tolerance. Moreover, expression of *NCED3* (promoter::GUS in *Arabidopsis thaliana*) were shown to be located in root, vascular tissues, base of lateral roots and cortex cells (Tan et al. 2003) which is in accordance with our results, suggesting that *NCED* gene expression pattern and location could be common in numerous plant species. Our results considering *PSY2* and *NCED3* expressions highlight the potential implication of these genes in response to environment in secondary tissues of underground organs. Considering the clustering analyse from gene expression pattern in the hydric restriction condition compared to the standard one, it was shown that the two clusters

were not the same as found for the comparison of secondary phloem and xylem. This may be due to the water-restricted condition which led to lower variations in carotenoid content compared to the difference in carotenoid between phloem and xylem. The most part of genes was not differentially expressed between the two conditions. It is therefore difficult to highlight hypothesis about carotenoid accumulation mechanism along the biosynthetic pathway in phloem and xylem tissues in response to hydric restriction condition.

Our results showed therefore that structural aspect of carrot root was more important for carotenoid accumulation related to carotenogenesis gene expressions compared to the impact of a water-restricted condition. This suggest that the mechanisms underlying carotenoid accumulation in carrot root in standard condition is simpler compared to the influence of environmental variations which could involved other synergic/antagonist pathways passing through many signaling pathways.

Conclusion

Our work demonstrated that carotenoids are differentially accumulated in phloem and xylem carrot root depending on the genotype. This difference in carotenoid content in specific tissues could be associated under conditions with carotenoid biosynthesis gene expression patterns. The association was particularly obvious for the orange genotypes both in standard and water-restricted conditions. Moreover, immunoblot analysis of PSY in both xylem and phloem revealed that carotenoid biosynthesis exists in both tissues. The abundance and/or activity of PSY partially explained differences in total carotenoid levels observed in the different genotypes. These results aid in a better understanding of carotenoid accumulation in specific tissues which is an important breeding trait in fruit and root organs, and underlines a genotype-dependent effect of the environment. The comparison with other stress conditions and structural analyses would be needed to allow a more in-depth understanding of the contribution of the respective tissues in stress response.

Acknowledgments

Author contribution statement: FP, DP, EG and SG conceived and design research. FP, SH, LH, EG and SG conducted experimental installation and plant production. FP, LH, CDL and RW conducted

experiments. FP, LH, SG, RW and EG analyzed data. FP, RW and EG wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

We thank Muriel Bahut, Laurence Hibrand Saint-Oyant, and Annie Chastellier from the ANAN platform (Analyze of nucleic acids – UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, France) for their technical help. We thank Marie-Noëlle Brisset and Matthieu Gaucher for the discussions about gene expressions and clustering analysis. We thank Rémi Gardet, Nicolas Dousset, Jacky Granger, and Daniel Sochard from INEM (Mutualized experimental facilities – UMR1345 Institut de Recherche en Horticulture et Semences IRHS, France) for the experimental installation.

References

- Baranska M, Baranski R, Grzebelus E, Roman M (2011) In situ detection of a single carotenoid crystal in a plant cell using Raman microspectroscopy. *Vib Spectrosc* 56:166–169
- Baranska M, Baranski R, Schulz H, Nothnagel T (2006) Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* 224:1028–1037
- Bartley GE, Scolnik PA (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* 7:1027–1038
- Buishand JG, Gabelman WH (1979) Investigations on the inheritance of color and carotenoid content in phloem and xylem of carrot roots (*Daucus carota* L.). *Euphytica* 28:611–632
- Cazzonelli CI, Pogson BJ (2010) Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 15:266–274
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, et al (2008) Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* 59:3563–3573
- Clotault J, Peltier D, Soufflet-Freslon V, et al (2012) Differential selection on carotenoid biosynthesis genes as a function of gene position in the metabolic pathway: a study on the carrot and dicots. *PLoS One* 7:e38724
- de Rosso VV, Mercadante AZ (2007) Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *J Agric Food Chem* 55:5062–5072
- Favati F, Lovelli S, Galgano F, et al (2009) Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Sci Hortic* 122:562–571
- Flores HE, Hoy MW, Pickard JJ (1987) Secondary metabolites from root cultures. *Trends Biotechnol* 5:64–69
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, et al (2012) Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* 79:47–59
- Girousse C, Bournoville R, Bonnemain JL (1996) Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of Alfalfa. *Plant Physiol* 111:109–113
- Hoad GV (1978) Effect of water stress on abscisic acid levels in white lupin (*Lupinus albus* L.) fruit,

- leaves and phloem exudate. *Planta* 142:287–290
- Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, et al (2016) A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nat Genet advance on*:657–666
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, et al (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27:325–333
- Josse EM, Simkin AJ, Gaffé J, et al (2000) A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* 123:1427–1436
- Jourdan M, Gagné S, Dubois-Laurent C, et al (2015) Carotenoid content and root color of cultivated carrot : a candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PLoS One* 10:e0116674
- Kim JE, Rensing KH, Douglas CJ, Cheng KM (2010) Chromoplasts ultrastructure and estimated carotene content in root secondary phloem of different carrot varieties. *Planta* 231:549–558
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel E (2008) *PSY3*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol* 146:1333–1345
- Maass D, Arango J, Wüst F, et al (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One* 4:e6373
- Nicolle C, Simon G, Rock E, et al (2004) Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *J Am Hortic Sci* 129:523–529
- Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, et al (2016) Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *J Agric Food Chem* 64:906–912
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
- Phan CT, Hsu H (1973) Physical and chemical changes occurring in the carrot root during storage. *Can J Plant Sci* 53:629–634
- Qin X, Zeevaart JAD (2002) Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* 128:544–551

- Ruiz-Sola MÁ, Arbona V, Gomez-Cadenas A, et al (2014) A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis*. PLoS One 9:e90765
- Sennepin AD, Charpentier S, Normand T, et al (2009) Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide. Anal Biochem 393:129–131
- Stagnari F, Galieni A, Specca S, Pisante M (2014) Water stress effects on growth, yield and quality traits of red beet. Sci Hortic 165:13–22
- Surles RL, Weng N, Simon PW, Tanumihardjo SA (2004) Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. J Agric Food Chem 52:3417–3421
- Tan B-C, Joseph LM, Deng W-T, et al (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. Plant J 35:44–56
- Welsch R, Maass D, Voegel T, et al (2007) Transcription factor RAP2.2 and its interacting partner SINAT2: Stable elements in the carotenogenesis of Arabidopsis leaves. Plant Physiol 145:1073–1085
- Welsch R, Wüst F, Bär C, et al (2008) A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. Plant Physiol 147:367–380
- Zhang D, Hamazu Y (2004) Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (*Daucus carota* L.). Food, Agric Environ 2:95–100
- Zhao C, Craig JC, Petzold EH, et al (2005) The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl^{1[w]}. Plant Physiol 138:803–818

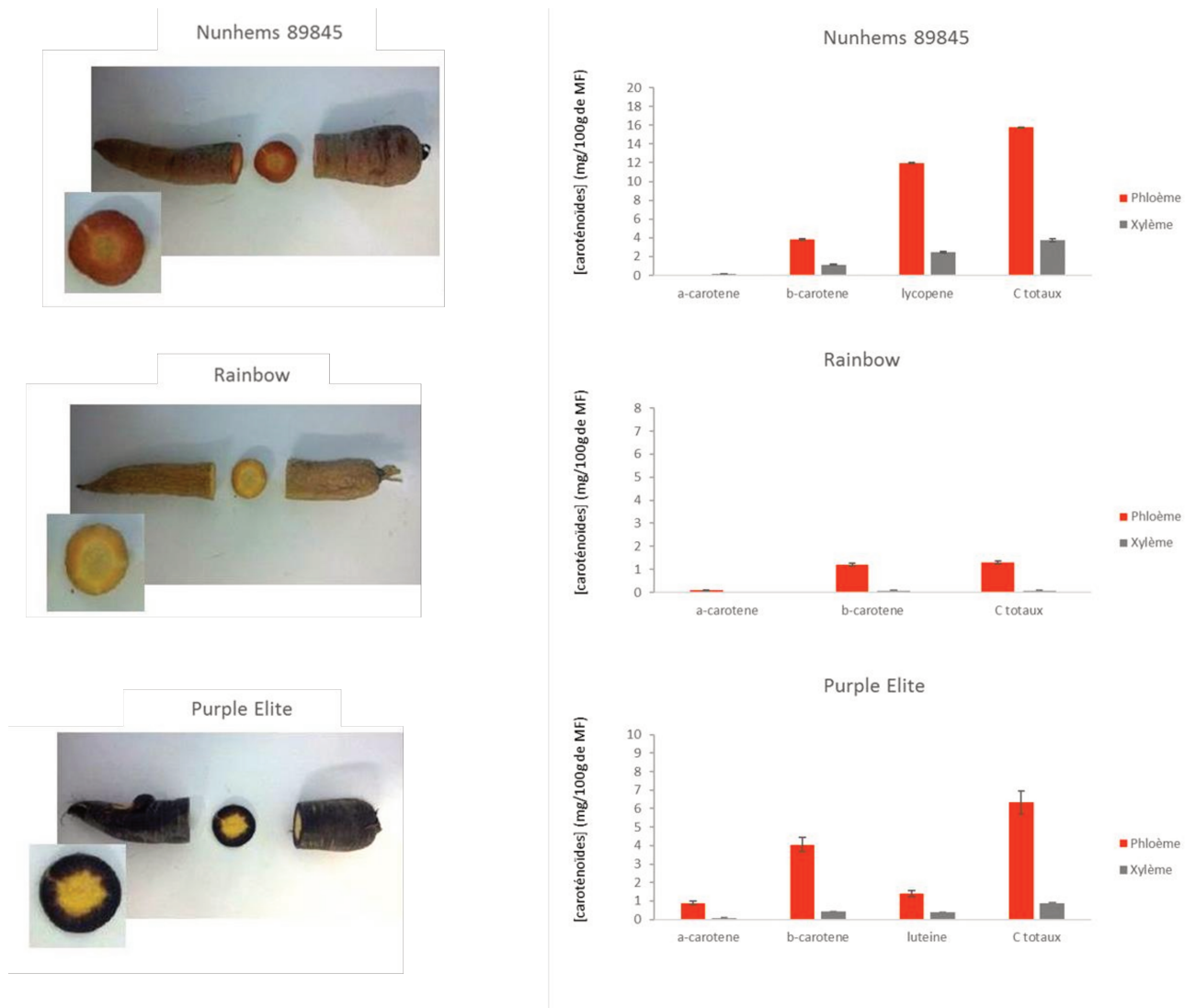


Figure 4.7 : A gauche : phénotype du xylème et du phloème chez les trois génotypes bicolores Nunhems 89845, Rainbow et Purple Elite. A droite : teneurs en caroténoïdes dans le xylème et le phloème des trois génotypes bicolores. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois réplicats techniques.

III. PERSPECTIVES DE RECHERCHE : ETUDE DE GENOTYPES BICOLORES

III.1. Objectif et matériel végétal utilisé pour l'étude

Dans l'étude précédente, nous avons pu voir que dans des conditions de culture standard, le niveau d'expression des gènes pouvait être lié aux différences de teneurs en caroténoïdes dans le xylème et phloème de racines de carotte. Les faibles variations de teneurs en caroténoïdes observées en condition de restriction hydrique par rapport au témoin ne pouvaient cependant pas s'expliquer facilement par le niveau d'expression des gènes. Pour aller plus loin dans l'explication des mécanismes de régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans le xylème et le phloème de la racine de carotte, l'étude de mutants affectés spécifiquement dans l'accumulation des caroténoïdes dans l'un ou l'autre de ces tissus est une piste d'étude intéressante. En effet obtenir des mutants n'accumulant des caroténoïdes que dans l'un des tissus ou bien des caroténoïdes différents pourrait permettre d'apporter des éléments pertinents en réponse à une régulation tissu-spécifique possible de l'accumulation de ces pigments. Cependant l'obtention de tels mutants est relativement complexe et peut mettre plusieurs années avant leur obtention. N'ayant pas de telles ressources disponibles, il était par contre possible de rechercher dans la diversité génétique existante des génotypes montrant un phénotype très contrasté du point de vue de la couleur du xylème et du phloème. Au sein d'un essai regroupant une grande partie de la diversité existante, trois génotypes en particulier ont été retenus : Nunhems89845 (phloème rouge clair et un xylème jaune), Rainbow (phloème jaune et un xylème blanc) et Purple Elite (phloème violet et xylème jaune) (figure 4.7).

A partir de ces génotypes, l'objectif est de déterminer quel était le niveau d'accumulation des caroténoïdes dans le xylème et phloème de racine de carotte présentant une forte différence de couleur.

III.2. Résultats & Perspectives

Les résultats obtenus à partir de la quantification des caroténoïdes montrent que les teneurs sont nettement supérieures dans le phloème par rapport au xylème où les teneurs sont quasi nulles pour l'ensemble des génotypes. Plus précisément, pour le génotype Nunhems89845,

les teneurs en lycopène et β -carotène dans le phloème sont de 12 et 4 mg.100g⁻¹ de MF respectivement. Dans le xylème elles ne sont que de 2 et 1 mg.100g⁻¹ de MF (figure 4.7). Pour le génotype Rainbow, un seul caroténoïde est majoritairement représenté. En effet dans le phloème la teneur en β -carotène est de 4 mg.100g⁻¹ de MF alors que la teneur en α -carotène est inférieure à 1 mg.100g⁻¹ de MF. Dans le xylème la teneur en β -carotène est inférieure à 1 mg.100g⁻¹ de MF et l' α -carotène n'est pas présent dans ce tissu (figure 4.7). Pour le génotype Purple Elite, la teneur en β -carotène est de 4 mg.100g⁻¹ de MF, en α -carotène de 1 mg.100g⁻¹ de MF et en lutéine de 1,5 mg.100g⁻¹ de MF dans le phloème. Dans le xylème les teneurs en β -carotène, en α -carotène et en lutéine sont inférieures à 1 mg.100g⁻¹ de MF (figure 4.7).

Ces différences de profils sont donc intéressantes et concordantes avec notre premier objectif qui était de rechercher, dans les ressources génétiques de carotte déjà existante, des génotypes présentant des teneurs en caroténoïdes très contrastées entre le xylème et le phloème.

Dans l'objectif de mieux comprendre la régulation de l'accumulation des caroténoïdes dans le xylème et le phloème de la racine de carotte, il serait maintenant intéressant de déterminer le niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Au-delà du niveau d'expression des gènes qui pourra être mesuré relativement facilement ainsi que les teneurs en protéines PSY, d'autres analyses et études pourraient être envisagées : teneurs des protéines tout au long de la voie de biosynthèse, réponse au stress oxydatif, régulation par les microARN ou transposons par exemple.

CHAPITRE 5
DISCUSSION GENERALE

I. LA RACINE : UN MODELE ORIGINAL ET MECONNU POUR L'ACCUMULATION DES CAROTENOÏDES

I.1. Une accumulation qui se déroule tout au long du cycle de développement

La racine de carotte, organe non chlorophyllien, constitue un modèle intéressant d'étude pour l'accumulation des caroténoïdes. En effet, si l'accumulation des caroténoïdes dans les fruits se fait en quelques jours, et peut être caractérisée par un mécanisme de type switch on/off, elle augmente progressivement dans la racine de carotte pendant le cycle de développement. Dans les différents axes abordés dans ce travail de thèse, les échantillons de carotte ont été récoltés à maturité biochimique, c'est-à-dire lorsque l'accumulation des caroténoïdes dans la racine a atteint son maximum. Cependant, dans la racine, certains stades du développement peuvent être déterminants pour l'accumulation des caroténoïdes. Par exemple, le développement des premières feuilles peut avoir un impact dès le début de la tubérisation pour l'accumulation des réserves. On peut également se demander si des variations de facteurs environnementaux n'entraînent pas des modifications métaboliques irréversibles lorsqu'ils ont lieu à des moments clés du développement de la racine.

A travers ce travail de thèse, il ressort des éléments importants pouvant aller dans ce sens. Dans le deuxième axe de recherche, l'inoculation par l'agent pathogène *A. dauci* a été réalisée au début de la tubérisation (6 semaines après semis) et l'effet du stress a été relativement fort tout au long du développement de la carotte et donc celui de la racine par rapport à la condition contrôle. Dans cette même étude, la restriction hydrique a été appliquée 9 semaines après semis, stade supposé de début de la tubérisation et donc de l'accumulation des caroténoïdes, et l'effet était relativement fort par rapport à la condition contrôle.

Or, les effets de l'inoculation par *A. dauci* et des stress combinés ne dépendent pas de l'année et entraînent une forte diminution des teneurs en caroténoïdes, alors qu'un fort effet année est observé dans le cas de la condition de restriction hydrique. Pour expliquer cet effet année, nous avons regardé les données des températures journalières pendant les deux années. Il apparaît que, sur l'ensemble du cycle, les différences entre les deux années ne sont pas significatives. Cependant des différences peuvent être observées pendant de courtes périodes. Par exemple en août 2013, les températures moyenne et maximale journalières sont supérieures à celles de 2014. L'effet inverse est observé pour le mois de septembre. Cela permet de mettre en avant deux hypothèses majeures : (i) le stress biotique impacte de façon importante les teneurs en caroténoïdes dans la racine quelles que soient les variations agroclimatiques, (ii) il y aurait une interaction sur le court terme (semaine) entre les variations de températures et la restriction

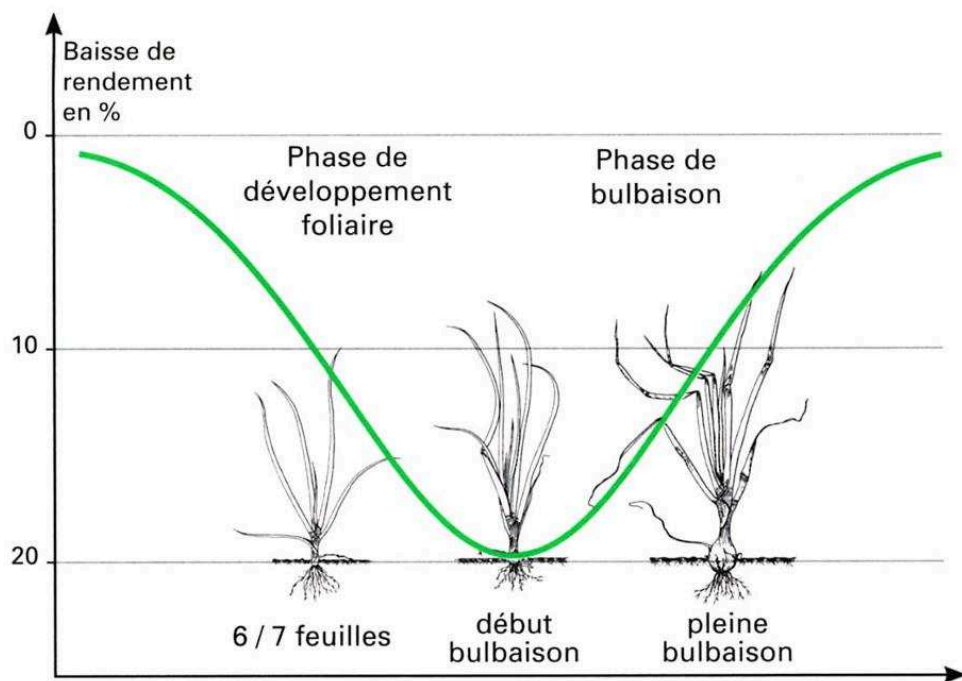


Figure 5.1 : Impact sur le rendement final d'une restriction hydrique appliquée à différents stades du développement chez l'oignon (Moreau 1996).

hydrique appliquée. Cette deuxième hypothèse suggère donc bien, en lien avec nos résultats, que « l'image métabolique » de la racine de carotte à maturité pourrait être la conséquence d'évènements successifs (variations de l'environnement) pouvant intervenir à différents stades au cours du développement. Chez la tomate, par exemple, il a été montré que la combinaison d'un stress biotique et abiotique entraînait une diminution des teneurs en lycopène dans un jeune fruit mais pas dans les fruits matures (Atkinson *et al.*, 2011). A notre connaissance, peu de données sont disponibles quant à l'effet de stress sur l'accumulation de métabolites à différents stades de développement de la plante. Or certains stades peuvent être critiques par rapport à la réponse au stress. Il a été montré chez l'oignon qu'une restriction hydrique impactait fortement les rendements lorsqu'elle était appliquée en début de bulbaison mais pas au stade 6/7 feuilles et au stade de pleine bulbaison (figure 5.1) (Moreau, 1996).

L'effet génotype observé est plus difficile à expliquer. Il pourrait s'expliquer par la durée du cycle, c'est-à-dire par le fait que certains génotypes soient plus précoces ou plus tardifs que d'autres. Par exemple, Presto est un génotype précoce. On pourrait donc penser qu'il subit moins les effets d'un stress tandis que Boléro, qui est un génotype dont le cycle de développement est plus long pourrait plus subir un stress. Si cette hypothèse était vérifiée, alors il y aurait là encore un élément suggérant un lien étroit entre les interactions possibles des facteurs agroclimatiques entre eux et le stade de développement de la racine.

La possibilité de tels évènements critiques pour l'élaboration de la qualité et donc des teneurs en caroténoïdes dans la racine de carotte permettrait de mieux comprendre pourquoi il est si difficile de réaliser un schéma général quel que soit le type de variation environnementale considérée et quel que soit le génotype. Il serait donc intéressant de déterminer quel est l'impact de facteurs environnementaux sur les teneurs en caroténoïdes tout au long du développement de la racine de carotte. Pour cela, il pourrait être intéressant (i) d'appliquer un stress tout au long du développement puis de réaliser des prélèvements à des stades spécifiques du développement (figure 5.2) ou bien, (ii) d'appliquer un stress à des moments précis du cycle et de réaliser les prélèvements à maturité (figure 5.3). Ces deux études complémentaires permettraient dans un premier temps de déterminer des stades du développement qui seraient plus sensibles aux stress et d'autre part de déterminer si des stress auraient un impact plus important s'ils ont lieu à certaines périodes du développement.

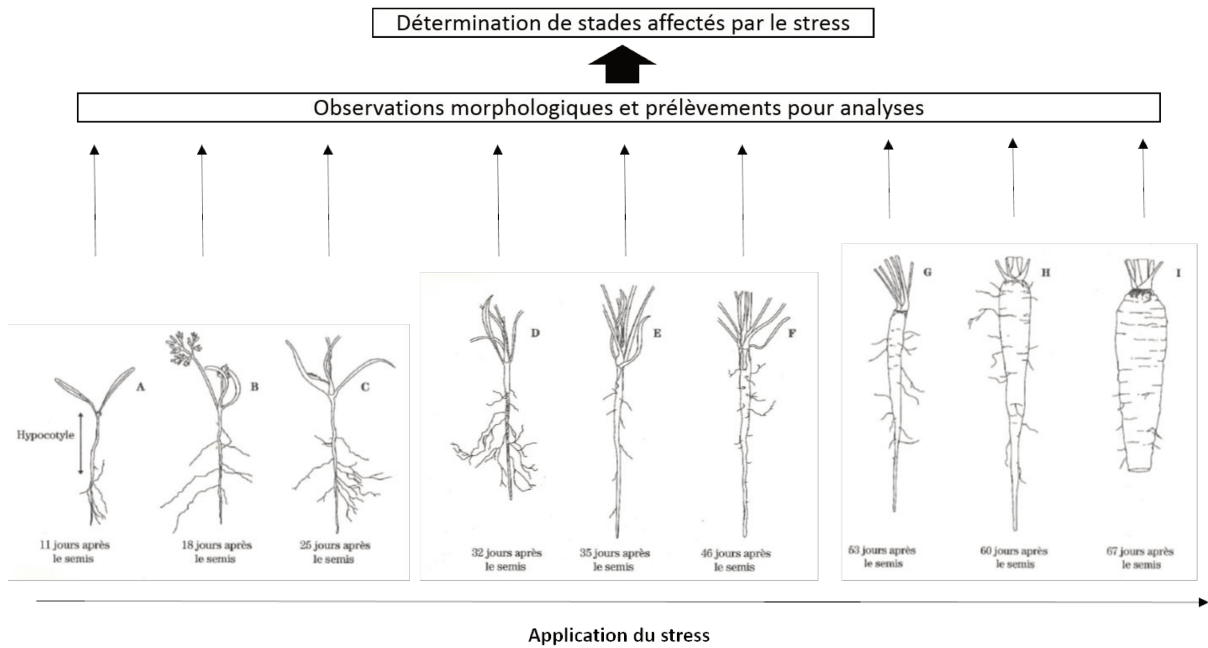


Figure 5.2 : Démarche expérimentale visant à déterminer les stades particulièrement impactés par un stress appliqué tout au long du cycle cultural chez la carotte.

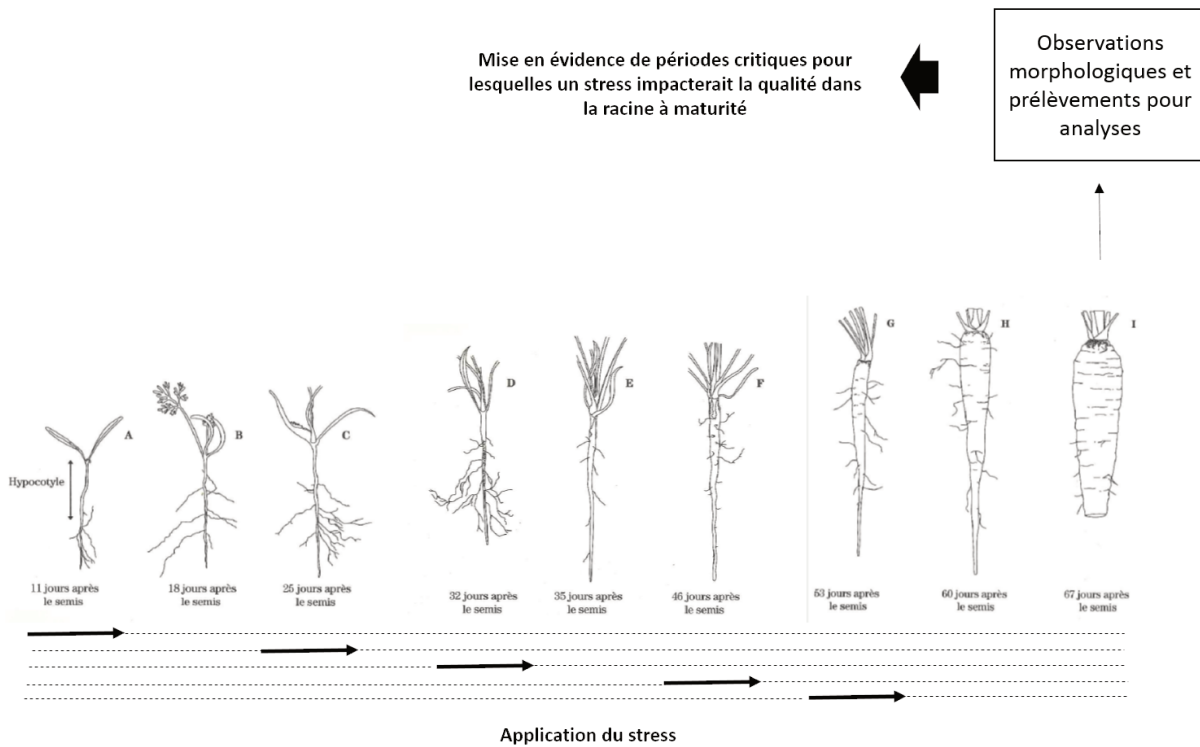


Figure 5.3 : Démarche expérimentale visant à déterminer les périodes précises du développement pour lesquelles l'application ponctuelle d'un stress impacterait la qualité de la carotte à maturité.

I.2. Intérêt de la racine de carotte pour l'étude du xylème et du phloème

L'étude du fonctionnement du xylème et du phloème dans les racines des plantes est relativement laborieuse. En effet il est très difficile de faire la distinction entre ces deux compartiments cellulaires et de les séparer pour une étude tissu-spécifique. Dans les analyses du troisième axe de ce travail, nous avons pu voir qu'il était possible, dans la racine de carotte, de faire des analyses biochimiques (dosage de caroténoïdes), des quantifications de transcrits (PCR quantitative) et de réaliser des dosages de protéines par immunomarquage. En effet chez la carotte, les tissus xylémien et phloémien peuvent être séparés relativement facilement. Les deux compartiments cellulaires sont bien distincts et le cambium est bien visible. La racine de carotte représente donc un excellent modèle d'étude pour le fonctionnement du xylème et du phloème chez les plantes.

Les résultats obtenus sur ces deux tissus chez la carotte montrent qu'il existe une activité du métabolisme des caroténoïdes relativement forte, y compris dans le xylème. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'étude transcriptomique du xylème et du phloème met en évidence que les gènes les plus représentés sont des gènes de synthèse de la paroi cellulaire (plus représentés dans le xylème), de transduction de signal/communication cellulaire (plus représentés dans le phloème) et de transport (plus représenté dans le xylème). Ces résultats sont concordants avec le rôle de ces deux tissus au sein de la plante (Zhao *et al.*, 2005). L'activité métabolique de la voie de biosynthèse des caroténoïdes à l'échelle transcriptionnelle et traductionnelle dans ces deux tissus est surprenante et caractéristique de la carotte du fait de la spécificité d'accumuler des caroténoïdes dans la racine. Cette forte accumulation de caroténoïdes a été en effet un critère de sélection lié à la couleur mais également au diamètre de la racine qui est certainement lié à une forte différenciation des proplastés en chromoplastes dans ces deux tissus, ce qui reste méconnu. Ainsi, l'accumulation particulièrement forte des caroténoïdes dans la racine de carotte aurait été possible par sélection de plantes qui potentiellement surexprimeraient un gène lié à la différenciation des proplastés en chromoplastes dans le xylème et le phloème. Depuis maintenant quelques années, une sélection forte pour des génotypes présentant une coloration identique entre le xylème et phloème est mise en œuvre. Les mécanismes sous-jacents peuvent alors supposer une différenciation plus importante des proplastés en chromoplaste dans le xylème comparé aux génotypes actuels.

De manière intéressante, cette fonction supplémentaire de ces deux tissus au sein de la racine permet malgré tout à la plante de se développer normalement. Cette observation suggère que la

différenciation des proplastes en chromoplaste ainsi que l'accumulation des caroténoïdes dans les deux tissus ne représente pas un coup énergétique important pour la plante.

I.3. La carotte à lycopène : un cas particulier

La racine de carotte de couleur rouge, caractérisée par une forte accumulation en lycopène, présentait dans ce travail de thèse un profil particulier de réponse aux facteurs environnementaux par rapport aux autres génotypes. La période de culture contraignante (décalée dans le temps par rapport à cycle cultural classique) entraînait une augmentation des teneurs en caroténoïdes (plus particulièrement en lycopène) chez le génotype rouge alors que pour les génotypes orange, orange/violet et jaune, les teneurs en caroténoïdes étaient, au contraire, diminuées (Perrin *et al.*, 2016). Nous avons aussi pu voir que, à l'échelle des tissus, la teneur en caroténoïdes dans le xylème n'était pas différente de celle du phloème en condition contrôle chez le génotype rouge. Au contraire, la teneur en caroténoïdes des autres génotypes était deux fois moins importante dans le xylème par rapport au phloème. De plus la quantité de protéine PSY était difficilement liée aux fortes teneurs en caroténoïdes comparé aux génotypes orange. Ces résultats suggèrent donc des mécanismes particuliers pour l'accumulation du lycopène dans la racine rouge à la fois au cours du développement et en réponse aux contraintes environnementales. L'étude menée par Cloutault *et al.* (2008) a permis de mettre en évidence que l'expression des gènes en amont et en aval du lycopène, chez le génotype rouge Nutrired, était relativement bien corrélée aux teneurs en lycopène dans la racine au cours du développement. Au contraire, cette relation était plus difficile à mettre en évidence chez les autres génotypes de cette étude. Il semblerait donc que l'accumulation des caroténoïdes et plus particulièrement du lycopène chez les génotypes rouges ne dépendent pas des mêmes mécanismes de régulation que les autres génotypes. Si pendant le développement de la racine, l'expression des gènes semble relativement bien expliquer les teneurs en lycopène, il est difficile de généraliser cela à l'échelle du xylème et du phloème ainsi qu'en réponse à des variations de l'environnement.

Cependant, de façon intéressante, les résultats obtenus lors d'un stress biotique (appliqué seul ou en combinaison), mettent en évidence que les teneurs en caroténoïdes sont affectées de la même façon dans la racine du génotype rouge comparé aux autres génotypes. L'hypothèse que l'on pourrait émettre est que lors d'un stress biotique, la synthèse des caroténoïdes peut être limitée afin de favoriser des voies de défense ou bien sont fortement remobilisées pour la résistance de la plante.

	R - Σ Carotenoids	R - Σ sugars	Root weight	L - Σ Carotenoids	L - Σ Chlorophylls	L - Σ sugars	Shoot weight	Shoot lenght
R - Σ Carotenoids	1,00							
R - Σ sugars	0,69	1,00						
Root weight	0,03	0,23	1,00					
L - Σ Carotenoids	-0,10	-0,18	0,22	1,00				
L - Σ Chlorophylls	-0,01	-0,07	0,27	0,92	1,00			
L - Σ sugars	0,01	-0,11	-0,08	0,27	0,30	1,00		
Shoot weight	-0,34	-0,01	0,51	0,37	0,37	0,08	1,00	
Shoot lenght	-0,10	0,04	0,46	0,35	0,40	0,16	0,59	1,00

Figure 5.4 : Corrélations de Pearson réalisées entre les teneurs totales en caroténoïdes, sucres et chlorophylles ainsi que des paramètres morphologiques dans les feuilles (L) et la racine (R) chez la carotte. Les corrélations ont été réalisées à partir des données du Chapitre 3. Seules les corrélations significatives au seuil de 5% sont colorées.

II. ORGANES SOURCES *VERSUS* ORGANES PUIITS CHEZ LA CAROTTE : DEUX MODES DE FONCTIONNEMENT BIEN DISTINCTS POUR L'ACCUMULATION DES CAROTENOÏDES

Les caroténoïdes sont des pigments jouant des rôles multiples dépendant de l'organe considéré. Nous avons vu que dans les feuilles, ils participent à la photosynthèse et à la photoprotection. Dans les organes non photosynthétiques leur rôle est d'attirer les pollinisateurs et disséminateurs. Suite aux résultats issus de la bibliographie, chez les fruits plus particulièrement, il est possible que les caroténoïdes soient également impliqués dans la réponse aux stress dans les organes non chlorophylliens.

Nous avons vu, qu'une forte corrélation existait entre les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylles dans les feuilles d'une part, et les teneurs en caroténoïdes et en sucres dans les racines d'autre part, quelles que soient les variations de conditions de cultures. Pour aller plus loin dans le fonctionnement à l'échelle de la plante entière, nous avons voulu tester l'hypothèse suivante : si les teneurs en caroténoïdes et en chlorophylles dans les feuilles sont diminuées par un stress, alors il y aurait une diminution des teneurs en sucres foliaires et par conséquent une diminution des apports en sucres vers les racines. En condition de croissance optimale, les relations source-puits sont régies d'une part par la « force » puits mais également par la disponibilité des assimilats au niveau des organes sources (Ho, 1988). Les analyses statistiques de corrélation entre métabolites des deux organes ont été réalisées à partir des données du deuxième axe d'étude de ce travail (figure 5.4). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en pigments ou sucres des feuilles et les teneurs en caroténoïdes ou sucres des racines dans les différentes conditions de stress étudiées. Comment expliquer qu'aucune corrélation ne soit retrouvée entre ces deux organes, contrairement à notre hypothèse ?

Ceci peut s'expliquer par le fait que, dans notre étude, les échantillons ont été prélevés à maturité et qu'il n'existerait pas ou dans une moindre mesure d'échanges des parties aériennes vers les parties souterraines. De plus, on aurait pu s'attendre à ce qu'une part de l'énergie stockée dans la racine puisse être utilisée au niveau des feuilles pour (i) l'activation de voies de défense et/ou (ii) la reviviscence qui aboutit à la synthèse d'un nouveau feuillage sain. Dans ce second cas, nous aurions observé des corrélations fortes et négatives entre métabolites stockés (caroténoïdes et sucres) et caroténoïdes et chlorophylles au niveau des feuilles. Il existe donc une réponse différente aux stress au sein de ces deux organes.

A travers cette étude, il semblerait que l'impact des stress sur l'accumulation des caroténoïdes mais également sur l'accumulation des sucres et des chlorophylles soit spécifique à chacun des

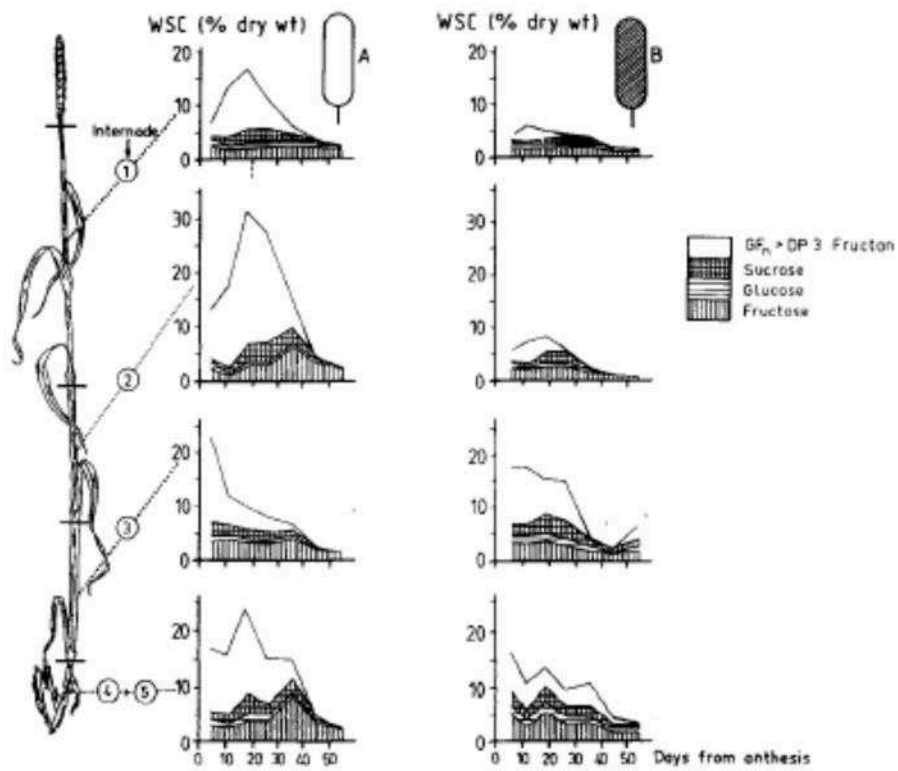


Figure 5.5 : Concentration et composition en sucres solubles (WSC) dans les entre-nœuds de la tige chez le blé exposé à la lumière (à gauche) et à l'obscurité (à droite) (Kühbauch et Thome, 1989).

deux organes et que les échanges sources-puits seraient négligeables au stade maturité de la racine chez la carotte.

Dans une poursuite de recherche, il serait intéressant de réaliser des corrélations entre les deux organes à différents stades du développement de la carotte en condition de stress. Par exemple, il a été montré chez le blé que lors du développement, lorsque les feuilles sont à l'obscurité les teneurs en sucres solubles sont de plus en plus faibles au niveau des entrenœuds de la tige et à mesure que l'on se rapproche des grains (figure 5.5) (Kühbauch et Thome, 1989). Cette étude met en avant l'importance de l'impact de stress sur les échanges sources-puits lors du développement, ce qui serait à approfondir dans le cas de la carotte.

III. LES TENEURS TOTALES EN CAROTENOÏDES : UN BON INDICATEUR DU FONCTIONNEMENT DE LA VOIE ?

A travers les différents axes d'étude de ce travail de thèse, les teneurs en caroténoïdes individuels et totaux ont été quantifiées. On peut se poser la question suivante : les teneurs en caroténoïdes totaux reflètent-elles bien le fonctionnement global de la voie, et les variations au niveau des caroténoïdes individuels ?

Nous avons pu voir que dans la majorité des cas, les variations en teneurs en caroténoïdes totaux représentaient bien les variations des teneurs en métabolites individuels observées au niveau des feuilles et des racines en réponse aux variations environnementales. En effet, lorsqu'une diminution significative des teneurs en caroténoïdes individuels était observée, alors une diminution significative était également observée pour les teneurs en caroténoïdes totaux.

Cependant, pour répondre à la question ci-dessus, il ne faut pas oublier que la voie de biosynthèse des caroténoïdes est structurée en deux branches et qu'elle se trouve à l'interface avec d'autres voies métabolites. La voie de biosynthèse des caroténoïdes est constituée de deux embranchements dont l'une n'aboutit qu'à la synthèse de l' α -carotène et de la lutéine, tandis que la seconde permet la synthèse de l'ABA et des strigolactones. De plus, lors de variations de la période de culture, un changement de proportion au niveau de la racine a pu être mis en évidence, ce qui suggérerait un switch en faveur de l'embranchement β - β dans la voie de biosynthèse pour la synthèse d'apocaroténoïdes par exemple. Cette hypothèse de switch a également été suggérée par Fuentes et al. (2012) dans la racine de carotte au cours du développement. Pour mieux comprendre les possibles changements métaboliques au sein de la plante, il est nécessaire

d'étudier les teneurs et proportions de chacun des caroténoïdes. En effet, même s'il apparaît qu'un switch en faveur de l'embranchement β - β dépend de la condition de stress, ce basculement métabolique peut avoir des conséquences importantes pour la plante. En effet, l'ABA est connu pour être impliqué dans les mécanismes de défense de la plante face aux stress biotiques mais particulièrement aux stress abiotiques. Un switch vers la synthèse d'ABA pourrait alors indiquer l'induction de mécanismes de défense pour la résistance de la plante face aux stress, phénomène que nous n'avons pas pu vérifier avec les analyses insuffisantes de teneurs en ABA. La simple étude des teneurs totales en caroténoïdes ne peut pas renseigner sur le possible switch de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

IV. QUEL NIVEAU DE REGULATION PEUT EXPLIQUER LES VARIATIONS DE TENEURS EN CAROTENOÏDES EN REPONSE AUX STRESS ?

A travers les différentes études réalisées dans ce travail de thèse, nous avons pu voir que l'expression relative des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes n'expliquait pas toujours les variations de teneurs en caroténoïdes. En effet, nous avons montré que l'expression relative des gènes pouvait être reliée aux teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et les racines dans le cas de comparaison des cycles de culture mais également dans le xylème et le phloème de la racine mais seulement en condition standard de culture. Par contre, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'expression relative des gènes et les variations de teneurs en caroténoïdes lors de l'application de stress simples ou en combinaison, que ce soit au niveau du feuillage ou de la racine. Dans la littérature, on retrouve également des résultats contrastés concernant l'importance la régulation transcriptionnelle. Certaines études montrent que l'expression de certains gènes peut être liée avec les teneurs en caroténoïdes dans la racine pendant le développement (Fuentes *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014) tandis que d'autres montrent que cela dépend du génotype (Clotault *et al.*, 2008) ou de l'organe (Wang *et al.*, 2014). Avant ce travail, aucune étude n'a porté sur les variations du niveau d'expression des gènes en condition de stress dans les racines et feuilles de carotte. Nos résultats, ainsi que ceux issus de la littérature, montrent qu'il n'est pas toujours possible de relier les variations de teneur en caroténoïdes avec celles du niveau d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes dans des conditions de stress.

Plusieurs questions d'ordre méthodologique peuvent aussi être mises en avant quant à l'étude de la régulation transcriptionnelle réalisée.

Dans les études menées à travers ce travail de thèse, l'échantillonnage a eu lieu à maturité, comme cité précédemment, alors que les variations de l'environnement ou bien les stress étudiés ont été appliqués beaucoup plus précocement. Il serait donc intéressant dans de futurs travaux de réaliser des corrélations entre niveaux de transcrits et teneurs en caroténoïdes dans les différentes conditions de stress étudiées à différents moments du développement de la carotte.

De plus, le choix a été fait dans ce travail de thèse, de réaliser des quantifications de transcrits de la voie de biosynthèse des caroténoïdes de façon relative. Il aurait été cependant intéressant de faire des dosages en absolu. Cela aurait permis de déterminer des seuils de transcrits qui pourraient expliquer des différences entre génotypes colorés (notamment par rapport au génotype blanc avec absence d'accumulation) et entre effets de stress. Cependant, la quantification absolue exige une technicité particulière par rapport à la quantification relative. Une première approche pour valider l'intérêt de la méthode serait de réaliser ce type de quantification en comparant simplement un génotype orange ou rouge avec le génotype blanc qui présente des teneurs relatives en transcrits équivalentes aux génotypes colorés. Plus largement, il serait intéressant de réaliser des quantifications absolues des transcrits des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, couplées à des quantifications de protéines (seulement PSY disponible pour l'instant), pour expliquer les variations de teneurs en caroténoïdes en réponse aux stress. Ces quantifications absolues permettraient potentiellement de mettre en avant un seuil quantitatif permettant ou non l'accumulation de certains caroténoïdes alors que la quantification relative ne le permet pas.

Une autre échelle de régulation très intéressante en lien avec les variations de teneurs en caroténoïdes est la différenciation des chromoplastes. Il a été montré, chez le chou-fleur ou la pomme de terre par exemple, qu'une plus importante différenciation des proplastides en chromoplaste permettait d'augmenter les teneurs en caroténoïdes. Chez la carotte, il a été montré que l'accumulation des caroténoïdes chez les génotypes orange pouvait être liée au nombre de chromoplastes mais également au nombre de cristaux de caroténoïdes au sein des chromoplastes en comparaison avec les génotypes blancs (Kim *et al.*, 2010). L'impact des stress sur la différenciation des proplastides en chromoplastes pourrait alors constituer un axe de recherche relativement intéressant qui n'a, à notre connaissance pas été étudié jusqu'à présent. Pour cela, deux approches pourraient être envisagées. La première étant de réaliser des observations microscopiques comme réalisé dans les travaux de Kim *et al.* (2010). Il serait alors possible de quantifier les chromoplastes dans les racines de carotte ainsi que le nombre de cristaux de

caroténoïdes en corrélation avec les variations de teneurs en caroténoïdes en condition de stress par rapport à la condition témoin. L'autre expérimentation possible pourrait être de quantifier le niveau d'expression du gène *Or* qui est impliqué dans la différenciation des proplastides en chromoplastes. Cependant, les annotations du génome de la carotte ainsi que les homologies de séquences entre le gène *Or* chez le chou-fleur ou chez la pomme de terre et le transcriptome de la carotte n'ont pas permis d'identifier ce gène. Il pourrait s'agir d'un gène avec une forte variabilité nucléotidique ou alors d'un autre gène non encore identifié chez la carotte. Bien sûr, ce type d'étude ne pourrait être pertinent qu'au niveau de la racine de carotte puisque dans les organes chlorophylliens, les caroténoïdes sont associés aux photosystèmes dans la membrane des thylakoïdes au niveau des chloroplastes. Il serait cependant intéressant par analogie de quantifier le nombre de chloroplastes et de déterminer s'il existe des corrélations entre teneurs en caroténoïdes et quantité de chloroplastes au niveau des feuilles en condition de stress.

V. IMPACT DES STRESS COMBINÉS : RESULTANTE D'UN STRESS MAJEUR CHEZ LA CAROTTE

Avant ce travail, une seule étude était disponible montrant l'impact de stress combinés sur l'accumulation des caroténoïdes. Il a été montré que la combinaison d'une restriction hydrique ainsi que l'infection par un nématode entraînaient une diminution des teneurs en lycopène mais seulement chez les jeunes fruits de tomate. Cette diminution en lycopène était également observée en condition de restriction hydrique seule. Dans cette même étude, il a également été montré que la combinaison des stress entraînait une augmentation de la teneur en glucose et fructose chez les fruits plus âgés seulement (Atkinson *et al.*, 2011). Les résultats obtenus sur racine de carotte montrent que la combinaison de stress entraîne également une diminution de teneurs en caroténoïdes en condition de stress combinés. Cependant, chez la carotte, la diminution des teneurs en caroténoïdes était liée à l'infection par l'agent pathogène et non au stress hydrique. Au début de ce travail, nos hypothèses étaient que le stress hydrique aurait un impact relativement fort sur les teneurs en caroténoïdes au niveau de la racine puisque la fonction de cet organe est le transport de l'eau du sol vers les organes aériens et l'accumulation via la tubérisation, tandis que l'infection par *A. dauci* impacterait davantage les teneurs en caroténoïdes au niveau des feuilles. Le résultat obtenu sur racines, contraire à nos hypothèses, avec un effet du stress hydrique mitigé et un effet marqué de *A. dauci* est donc particulièrement surprenant. De plus la combinaison de *A. dauci* et de stress hydrique se traduit par un effet équivalent voire renforcé par rapport à celui de

A. dauci seul. Les résultats obtenus suggèrent donc d'une part que l'agent pathogène est non seulement problématique pour la récolte par préhension du fait d'un feuillage affaibli, mais également pour la qualité nutritionnelle de la carotte. Une connaissance plus approfondie sur la cause de cette diminution en caroténoïdes dans la racine serait une piste de recherche très intéressante. En effet on peut penser qu'il existerait un « trade-off » entre la mise en place des défenses de la plante pour résister à *A. dauci* et l'accumulation des caroténoïdes et sucres au niveau de la racine. Il pourrait, par exemple, être envisagé des études sans *a priori* au niveau des feuilles et des racines comme par exemple des approches de type microarray ou RNAseq qui permettraient de mettre en évidence l'induction ou la répression de voies métaboliques dans la réponse de la plante à *A. dauci*. Il pourrait également être intéressant de réaliser des approches de type métabolomiques qui permettrait de mettre en évidence des métabolites présents de façon constitutive, synthétisés *de novo* ou bien accumulés en plus grande quantité, et d'autres au contraire moins présents ou complètement absents toujours en réponse à *A. dauci*. Pour aller plus loin, des validations fonctionnelles des gènes mis en évidence par RNAi ou surexpression pourraient être envisagées. De plus, des corrélations éventuelles entre niveau d'expression des gènes impliqués dans la défense de la plante à *A. dauci* et les teneurs en caroténoïdes racinaires pourrait être étudiées afin de confirmer si un « trade-off » défense-qualité existe.

VI. INTERACTION GENOTYPE-ENVIRONNEMENT : QUELLES SONT CONSEQUENCES POUR L'OPTIMISATION DES CONDUITES CULTURALES

Dans les différents axes d'étude de ce travail, un fort effet génotype a pu être observé. Un décalage de la période de culture a entraîné une diminution des teneurs en caroténoïdes dans les feuilles quel que soit le génotype et avec la même amplitude. Par contre, dans les racines, un effet génotype a pu être mis en évidence. En effet, pour trois génotypes sur quatre étudiés, les teneurs en caroténoïdes étaient diminuées dans la période moins favorable mais pas pour le génotype rouge dont les teneurs étaient augmentées. En condition de restriction hydrique, nous avons également vu que les teneurs en caroténoïdes n'étaient pas toujours impactées de la même façon chez tous les génotypes. Plus globalement dans les feuilles aucune tendance pour l'ensemble des génotypes n'a pu être observée tant l'effet de ce facteur était important. De plus, dans le xylème ou le

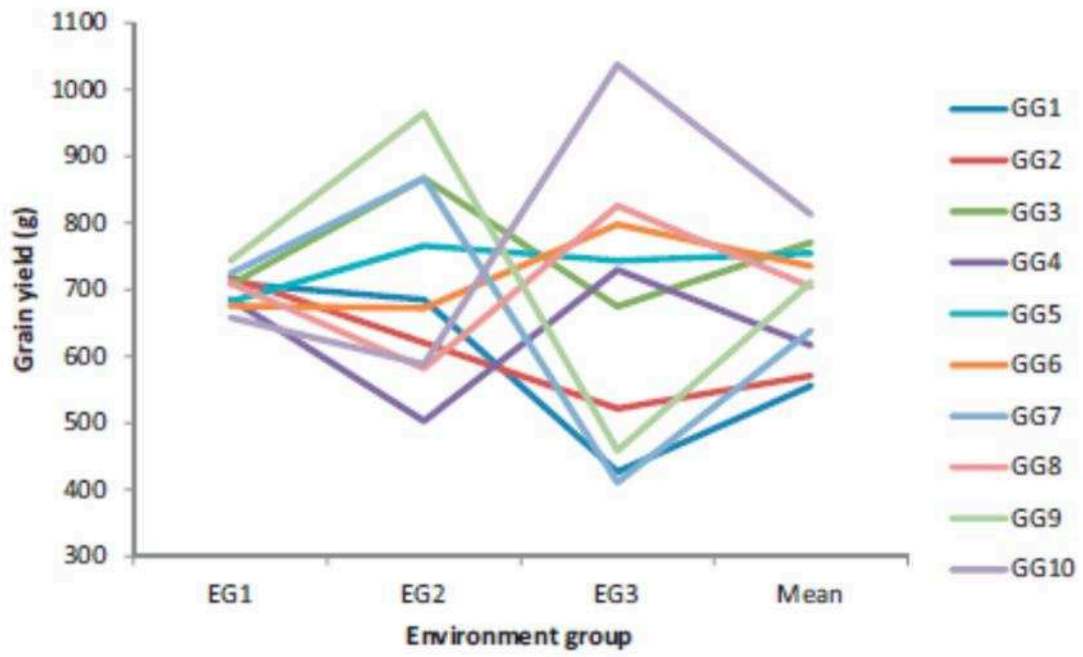


Figure 5.6 : Variation du rendement en grains de 10 groupes de génotypes de riz selon 3 groupes d'environnements (Liang et al., 2015).

phloème, l'impact d'une restriction entraîne une diminution des teneurs en caroténoïdes soit dans le xylème, soit dans le phloème ou les deux tissus en fonction du génotype.

Cependant l'effet génotype observé était très dépendant de la condition étudiée montrant une interaction génotype x environnement (GxE). Dans des conditions de décalage de période de culture, l'effet de facteurs globaux en culture met en évidence au niveau des feuilles un effet de l'environnement alors que dans les racines un effet de l'interaction GxE est observé. Ces premiers résultats mettent en évidence que l'interaction GxE peut dépendre de l'organe considéré. La plus forte interaction GxE a été observée lors de l'étude de l'impact des stress biotique et abiotique, appliqués seuls ou en combinaison, sur les teneurs en caroténoïdes, mais également en sucres et chlorophylles à la fois dans les feuilles et les racines. Cet effet fort de l'interaction GxE est déjà mis en évidence sur des composantes du rendement, comme c'est le cas du rendement en grain chez le riz, ce qui a conduit à l'identification de 10 groupes de génotypes et trois groupes d'environnement (créés à partir d'analyses de cluster basées sur 303 génotypes dans 8 environnements différents) (figure 5.6) (Liang *et al.*, 2015). Etant donné leur nature, les métabolites secondaires peuvent être fortement sensibles aux effets GxE, mais cela est moins étudié que le rendement par exemple. Dans nos expériences, nous avons systématiquement mis en évidence un effet de l'interaction GxE par analyse de variance.

Ces résultats soulignent la difficulté d'étudier l'accumulation en caroténoïdes et montrent donc la nécessité d'une approche intégrative sur différents environnements et un grand nombre de génotypes, plutôt que des approches réalisées sur un unique génotype et/ou un unique stress, qui apportent certes des connaissances liées à une situation particulière mais ne pouvant pas être facilement généralisées du fait des interactions GxE possibles. Dans notre étude, nous avons remarqué qu'il n'y a pas un génotype particulièrement stable, quels que soient les environnements étudiés, d'où le besoin d'élargir nos travaux à un panel de variétés représentatives du marché. Cela sera en effet étudié dans la cadre du projet Caroqual qui vise, en partie à étudier l'impact d'environnements contrastés (réseau de parcelles dans des zones de culture différents) sur un large panel de variétés. L'objectif à long terme sera donc soit (i) adapter les itinéraires culturaux à la variété ou bien, (ii) s'il n'est pas possible de changer l'itinéraire cultural, aider au choix variétal ou à l'orientation de la création variétale dans le but d'optimiser les qualités nutritionnelle et organoleptique de la carotte.

VII. QUEL IMPACT EN SANTE HUMAINE ?

VII.1 Projet « Impact des Nutriments sur les Maladies Métaboliques (INUMAMET) » : objectifs et contexte d'étude





L'expérimentation menée sur l'effet de stress sur la composition en métabolites d'intérêt, en particulier les caroténoïdes, s'intègre dans le cadre du projet INUMAMET. Il s'agit d'un projet collaboratif regroupant deux laboratoires de la thématique santé : « Interactions Cellulaires et Applications Thérapeutiques » de l'Université d'Angers et « Le centre de recherche en Nutrition Humaine » de Nantes ainsi que notre laboratoire IRHS dans le domaine végétal. Ce projet réunit donc des équipes spécialisées en santé humaine et en production végétale.

Le projet commun à l'ensemble des équipes santé-végétal visait donc à identifier et optimiser l'impact de nutriments contre les maladies métaboliques et cardiovasculaires (principalement le développement de l'athérosclérose et ses conséquences).

Pour cela trois objectifs sous-jacents ont été mis en place :

- i) **Etudier la variation de la qualité nutritionnelle du matériel végétal** en fonction de l'origine génétique et des conditions de production et de conservation post-récolte.
- ii) **Caractériser les activités des extraits végétaux sur des modèles cellulaires** pertinents (hépatocytes, adipocytes, cardiomyocytes, macrophages, cellules endothéliales et musculaires lisses) ; identifier les effets métaboliques, anti-oxydants, anti-inflammatoires et sur la prolifération cellulaire ; décoder les mécanismes impliqués. Cette approche permettra de mettre en place des protocoles expérimentaux adéquats pour le criblage des nutriments les plus efficaces.
- iii) **Evaluer l'impact des extraits végétaux sur des modèles animaux** soumis à des perturbations métaboliques liées à un syndrome d'insulino-résistance afin d'évaluer leurs effets sur le développement de l'athérosclérose (stéatose hépatique et musculaire, dysmétabolisme glucidique et lipidique, dysfonctions vasculaires).

Tableau 5.1 : Types de cellules utilisées pour évaluer l'effet santé d'extraits de carotte dans le cadre du projet Inumamet. Pour chaque phénomène physiologique associé, l'orientation des flèches indique l'effet favorable recherché suite à l'ajout d'extraits (Source : C. Dourguia, SOPAM, Université d'Angers).

	Adipocytes (3T3-L1) 	Hépatocytes (HepG2) 	Cellules endothéliales (HUVECs) 	Cellules musculaires lisses (HASMCs) 
Différenciation	↗			
Accumulation des lipides	↗	↘		
Apoptose		↘	↘	↘
Prolifération		↗	↗	↘
Stress oxydant	↘	↘	↘	↘

Echantillons	Classement
SB KE HC	9
SB BO HC	8
SB PR HC	7
SB BV HC	7
SB DP HC	6
SB BV LC	6
C BO HC	5
SB KA HC	5
C BO LC	4
SH BV LC	4
SB BO LC	4
SB PR LC	4
SB KE LC	4
C DP HC	3
SH+SB KA HC	3

Figure 5.7 : Classement des combinaisons génotypes/condition de culture en fonction de la somme de tous les effets bénéfiques (+1) et négatifs (-1) issus des tests réalisés sur cellules animales suite à l'ajout d'extraits de carotte. (C : contrôle ; SB : stress biotique ; SH : stress hydrique ; SH+SB : stress combinés ; KE : lignée Kintoki ; BO : variété Boléro ; PR : variété Presto ; BV : lignée Blanche des Vosges ; DP : variété Deep Purple ; KA : ligne Karotan ; HC : haute concentration d'extrait ; LC : basse concentration d'extrait) Résultats du projet Inumamet, équipe SOPAM, Université d'Angers.

Le travail sur l'effet de stress seuls ou en combinaison était donc plus particulièrement relatif au premier objectif, et a trouvé un prolongement avec les deux suivants. Des échantillons représentant les différents traitements (6 géotypes cultivés dans les 4 conditions de culture : contrôle, restriction hydrique, inoculation par *A. dauci*, stress combinés) ont été préparés, broyés puis donnés aux différentes équipes de santé. Deux échantillons choisis sur la base des analyses biochimiques et des premiers résultats des tests cellulaires ont été fournis en plus grandes quantités dans le cadre de l'objectif 3.

Pour une mise en perspective de l'intérêt dans le domaine santé de nos travaux, portant sur l'effet de stress sur l'accumulation de métabolites en particulier et sur la qualité nutritionnelle de la carotte en général, nous allons évoquer les premiers résultats qui ont été obtenus dans le cadre du second objectif de ce projet collaboratif.

VII.2 Principaux résultats et discussion

Des extraits (par éthanol ou DMSO) issus des échantillons de racine de carotte ont été ajoutés au milieu de culture de cellules animales de différents types. Le tableau 5.1 regroupe l'ensemble des phénomènes physiologiques pour chaque type cellulaire. Le sens des flèches indique l'effet recherché et donc bénéfique quant au développement des cellules.

Les résultats des extraits de carotte sur les cellules ont été compilés et classés en fonction du nombre d'effets positifs permettant ainsi d'obtenir un classement des combinaisons géotype/condition les plus intéressantes pour le développement des cellules (figure 5.7).

Les résultats montrent que les échantillons ayant l'effet le plus bénéfique sont ceux qui ont été cultivés en condition d'infection par *A. dauci* (figure 5.7). Ce résultat est très intéressant et notre hypothèse sous-jacente est qu'en condition d'inoculation par *A. dauci*, la plante peut synthétiser des molécules impliquées dans la résistance en stress et qui pourraient avoir un effet bénéfique sur cellules animales.

Nous avons réalisé des quantifications de métabolites d'intérêts tels que les caroténoïdes, sucres et polyphénols sur les extraits utilisés en tests cellulaires, mais les résultats ne permettent pas de mettre en évidence un lien direct avec les effets observés en tests cellulaires et donc de déterminer des métabolites santé candidats. Des analyses plus profondes de type métabolomique

sont alors envisagées pour la suite de l'étude en fonction des échantillons et conditions les plus contrastées pour leur effet santé.

A partir des résultats de cette première étude sur cellules, deux échantillons ont été choisis pour réaliser le troisième objectif de ce projet. Le choix s'est porté sur le génotype Boléro cultivé en condition contrôle et en condition d'infection par *A. dauci*. Actuellement, les résultats de cet axe sont en cours d'obtention. Ce projet, intégratif végétal-santé, permettra dans un premier temps d'identifier des nutriments impactant la santé et dont la production est optimisée en fonction des conditions de production des carottes, et dans un second temps à la création d'allégations nutritionnelles et de santé sur le produit carotte. Basé sur les deux produits, carotte et pomme, il permettra une comparaison des modèles d'étude et une mise en perspective de la qualité des fruits et légumes vis-à-vis de la santé humaine.

CONCLUSION GENERALE

L'impact des variations environnementales sur la qualité nutritionnelle et organoleptique des productions végétales représente actuellement un enjeu important mais reste relativement méconnu et difficile à étudier. De ce fait, cette qualité est insuffisamment travaillée, que ce soit au niveau de la création variétale ou de la production.

Les caroténoïdes constituent un critère de qualité des productions végétales, en particulier pour la carotte, en lien étroit avec la santé humaine. L'hypothèse d'un effet négatif de facteurs de l'environnement sur l'accumulation de ces pigments est alors primordiale. A travers ce travail de thèse, l'objectif était donc de mieux comprendre l'impact de stress biotique et abiotique sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte et d'en comprendre la régulation sous-jacente.

Pour répondre à cet objectif, une approche intégrative a été mise en place. Les facteurs de l'environnement ont été étudiés à différentes échelles : des environnements de culture contrastés lié à des variations de facteurs globaux puis des stress particuliers et maîtrisés appliqués seuls ou en combinaison. L'effet de ces facteurs ont été étudiés à l'échelle de la population (panel de géotypes aux caractéristiques contrastées) de la plante (organes feuilles et racines) et du tissu (xylème et phloème de la racine). Cette approche intégrative constitue donc un point original et déterminant pour répondre aux objectifs de ce travail.

Contrairement à ce qui peut être observé pour d'autres métabolites secondaires, les contraintes environnementales étudiées ont conduit à des réductions significatives de la teneur en caroténoïdes, quelles que soient les échelles d'étude. Par contre, la régulation semble au niveau transcriptionnelle concernant les facteurs globaux de l'environnement, mais d'autres niveaux restent à identifier quant aux stress spécifiques. Cependant, un mécanisme commun de régulation de différents métabolites en réponse aux stress semble exister à l'échelle de l'organe.

L'analyse intégrative menée sur de multiples échelles met cependant en évidence à quel point il est finalement difficile de généraliser les résultats, d'autant plus que l'effet année peut être important. Cela pose la question des conditions d'expérience permettant d'isoler plus les facteurs étudiés afin d'approfondir les mécanismes impliqués.

Ce travail de thèse s'achève en ouvrant de multiples perspectives. Les modifications de teneurs en caroténoïdes à la récolte résultent des effets de stress que la plante subit au cours de son cycle de développement. Au vu du manque de connaissances, il serait pertinent d'évaluer l'impact de stress à différents stades du développement. Une telle étude permettrait de mettre en évidence des moments clés du développement pour une meilleure optimisation des itinéraires techniques. Cette étude permettrait également de mieux comprendre comment la mobilisation

des ressources à partir des organes sources se fait jusqu'aux organes puits, et dans quelle mesure l'effet de stress peut affecter ce processus et donc le métabolisme de la plante.

En tant que tels, ou en interaction avec le stade de développement, il serait également intéressant de mieux comprendre plus particulièrement l'impact de la température ainsi que de la lumière sur les teneurs en caroténoïdes des feuilles. La qualité de la lumière et pas seulement l'intensité lumineuse, l'alternance de températures et pas seulement la température moyenne, sont susceptibles d'avoir un effet particulier sur les métabolites secondaires tels que les caroténoïdes.

D'autres échelles de régulation pour l'accumulation des caroténoïdes doivent être mises en évidence. Premièrement, il serait intéressant de quantifier plus largement la protéine PSY qui semble être relativement bien corrélée aux teneurs en caroténoïdes. La différenciation des chromoplastes peut constituer une échelle de régulation importante. Des analyses microscopiques pourraient être réalisées pour déterminer le nombre de chromoplastes et de cristaux de caroténoïdes dans la racine de carotte. Des approches plus larges de transcriptomique permettraient une démarche sans a priori, afin d'identifier des voies de biosynthèse liées à l'accumulation des caroténoïdes et des facteurs de régulation potentiels en dehors de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Couplée à une approche de métabolomique cela permettrait de disséquer les mécanismes moléculaires pouvant expliquer les variations de teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et racines de carotte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott JA.** 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* **15**, 207–225.
- Alasarvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC, Shahidi F.** 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugar, antioxidant vitamins and sensor quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 1410–1416.
- Alden J, Hermann RK.** 1971. Aspect of the cold-hardiness mechanism in plants. *The Botanical Review* **37**, 37–142.
- Alegria C, Pinheiro J, Duthoit M, Gonçalves EM, Moldão-Martins M, Abreu M.** 2012. Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress (heat shock and UV-C irradiation) pre-treatments. *LWT - Food Science and Technology* **48**, 197–203.
- Alquézar B, Zacarías L, Rodrigo MJ.** 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1783–1797.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K.** 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 3460–3479.
- Anekonda TS, Adams WT.** 2000. Cold hardiness testing for Douglas-Fir tree improvement programs: guidelines for a simple, robust, and inexpensive screening method. *Western Journal of Applied Forestry* **15**, 129–136.
- Arango J, Jourdan M, Geoffriau E, Beyer P, Welsch R.** 2014. Carotene hydroxylase activity determines the Levels of both α -carotene and total carotenoids in orange carrots. *The Plant cell* **26**, 2223–2233.
- Atkinson NJ, Dew TP, Orfila C, Urwin PE.** 2011. Influence of combined biotic and abiotic stress on nutritional quality parameters in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 9673–9682.
- Atkinson NJ, Urwin PE.** 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3523–3543.
- Audenaert K, De Meyer GB, Höfte MM.** 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant physiology* **128**, 491–501.

- Auldridge ME, McCarty DR, Klee HJ.** 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 315–321.
- Bahuguna RN, Jagadish KSV.** 2015. Temperature regulation of plant phenological development. *Environmental and Experimental Botany* **111**, 83–90.
- Banga O.** 1963. Main types of the western carotene carrot and their origin. Zwolle, W.E.J. Tjeenk, 153p.
- Bang H, Kim S, Leskovar D, King S.** 2007. Development of a codominant CAPS marker for allelic selection between canary yellow and red watermelon based on SNP in lycopene β -cyclase (*LCYB*) gene. *Molecular Breeding* **20**, 63–72.
- Baranska M, Baranski R, Schulz H, Nothnagel T.** 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta* **224**, 1028–1037.
- Bartley GE, Scolnik PA.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**, 1027–1038.
- Ben-Gal A, Shani U.** 2002. Yield, transpiration and growth of tomatoes under combined excess boron and salinity stress. *Plant and Soil* **247**, 211–221.
- Bennett RN, Wallsgrove RM.** 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* **127**, 617–633.
- Bitá CE, Gerats T.** 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* **4**, 273.
- Borghesi E, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Malorgio F, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ.** 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 11676–11682.
- Bouvier F, Backhaus RA, Camara B.** 1998. Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 30651–30659.
- Bowman MJ, Willis DK, Simon PW.** 2014. Transcript abundance of phytoene synthase 1 and phytoene synthase 2 is associated with natural variation of storage root carotenoid pigmentation in carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **139**, 63–68.
- Buishand JG, Gabelman WH.** 1979. Investigations on the inheritance of color and carotenoid content in phloem and xylem of carrot roots (*Daucus carota* L.). *Euphytica* **28**, 611–632.

- Camejo D, Rodriguez P, Morales MA, Dell'Amico JM, Torrecillas A, Alarcon JJ.** 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* **162**, 281–289.
- Carter AH, Chen XM, Garland-Campbell K, Kidwell KK.** 2009. Identifying QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) in the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar 'Louise'. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 1119–1128.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ.** 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 266–274.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS.** 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239–264.
- Chaves MM, Oliveira MM.** 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2365–2384.
- Chen Y, Guo Q, Liu L, Liao L, Zhu Z.** 2011. Influence of fertilization and drought stress on the growth and production of secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *J. Med. Plant. Res.* **5**, 1749–1755.
- Chernys JT, Zeevaart J a.** 2000. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* **124**, 343–353.
- Clément-Mullet JJ.** 1866. *Le livre de l'agriculture d'Ibn-al-Awam*. A Franck, Ed. Paris.
- Clotault J.** 2009. Impact de la sélection sur l'expression et la variabilité de séquence de gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez la carotte cultivée. Thèse de doctorat de l'Université d'Angers, 183p.
- Clotault J, Geoffriau E, Lionneton E, Briard M, Peltier D.** 2010. Carotenoid biosynthesis genes provide evidence of geographical subdivision and extensive linkage disequilibrium in the carrot. *Theoretical and Applied Genetics* **121**, 659–672.
- Clotault J, Peltier D, Berruyer R, Thomas M, Briard M, Geoffriau E.** 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3563–3573.
- Craufurd PQ, Peacock JM.** 1993. Effect of heat and drought stress on sorghum (*Sorghum bicolor*). II. grain yield. *Experimental Agriculture* **29**, 77–86.
- Crescenzi P.** 1548. *De omnibus agriculturae partibus & de plantarum & animalium generibus*. Henrichum Basiliae.

- Dall'Osto L, Fiore A, Cazzaniga S, Giuliano G, Bassi R.** 2007. Different roles of α - and β -branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35056–35068.
- Davison PA, Hunter CN, Horton P.** 2002. Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **418**, 203–206.
- Demmig-Adams B, Adams WW.** 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* **198**, 460–470.
- Demmig-Adams B, Adams WW.** 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science (New York, N.Y.)* **298**, 2149–53.
- Diretto G, Tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G.** 2006. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biology* **6**, 13.
- Dong X, Braun EL, Grotewold E.** 2001. Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology* **127**, 46–57.
- Duan H, Zhu Y, Qi D, Li W, Hua X, Liu Y, Deng X.** 2012. Comparative study on the expression of genes involved in carotenoid and ABA biosynthetic pathway in response to salt stress in tomato. *Journal of Integrative Agriculture* **11**, 1093–1102.
- Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P.** 2001. 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 22901–22909.
- Evers AM.** 1989. Effects of different fertilisation practices on the carotene content of carrot. *Journal of Agricultural Science in Finland* **61**, 7–14.
- Fang S, Cammarano D, Zhou G, Tan K, Ren S.** 2015. Effects of increased day and night temperature with supplemental infrared heating on winter wheat growth in North China. *European Journal of Agronomy* **64**, 67–77.
- FAOStat.** 2016. Food and agriculture organization of the United Nations.
- Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D.** 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* **8**, 693–701.

- Freeman JA, Harris GH.** 1951. The effect of nitrogen, phosphorus, potassium and chlorine on the carotene content of the carrot. *Scientific Agriculture* **31**, 207–211.
- Fritig B, Legrand M, Hirth L.** 1972. Changes in the metabolism of phenolic compounds during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. *Virology* **47**, 845—848.
- Fuentes P, Pizarro L, Moreno JC, Handford M, Rodriguez-Concepcion M, Stange C.** 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology* **79**, 47–59.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436–42.
- García-Limones C, Schnäbele K, Blanco-Portales R, Bellido ML, Caballero JL, Schwab W, Muñoz-Blanco J.** 2008. Functional characterization of *FaCCD1*: A carotenoid cleavage dioxygenase from strawberry involved in lutein degradation during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 9277–9285.
- Garrett KA, Dendy SP, Frank EE, Rouse MN, Travers SE.** 2006. Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 489–509.
- Gibault G.** 1912. Histoire des légumes. Edition Menu Fretin.
- Gould KS.** 2004. Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **5**, 314–320.
- Grime J.** 1991. Nutrition, environment and plant ecology: an overview. *Plant growth: interactions with nutrition and environment*. Cambridge.
- Hahlbrock K, Scheel D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 347–369.
- Hanci F, Cebeci E.** 2014. Investigation of proline, chlorophyll and carotenoids changes under drought stress in some onion (*Allium Cepa* L.) cultivars. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 1499–1504.
- Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Bemudez Kandianis C, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhanena R, Williams M, Wurtzel ET, Yan J, Bucklet ES.** 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* **319**, 330–334.

- Hassan MAL, Fuertes MM, Ramos FJ, Vicente O, Boscaiu M.** 2015. Effects of salt and water stress on plant growth and on accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in cherry tomato. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **43**.
- Havaux M, Tardy F, Lemoine Y.** 1998. Photosynthetic light-harvesting function of carotenoids in higher-plant leaves exposed to high light irradiances. *Planta* **205**, 242–250.
- Van Heerden PDR, Laurie R.** 2008. Effects of prolonged restriction in water supply on photosynthesis, shoot development and storage root yield in sweet potato. *Physiologia Plantarum* **134**, 99–109.
- Hirschberg J.** 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology* **4**, 210–218.
- Ho LC.** 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 355–378.
- Hochmuth GJ, Brecht JK, Bassett MJ.** 2006. Fresh-market carrot yield and quality did not respond to potassium fertilization on a sandy soil validated by mehlich-1 soil test. *HortTechnology* **16**, 270–276.
- Horns F, Hood ME.** 2012. The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecology and Evolution* **2**, 1705–1711.
- Howitt CA, Pogson BJ.** 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* **29**, 435–445.
- Hurtado-Hernandez H, Smith PG.** 1985. Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annum* L. *Journal of Heredity* **76**, 211–213.
- Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, et al.** 2016. A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature Genetics*, 657–666.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **27**, 325–333.
- Jaakola L, Määttä K, Pirttilä AM, Törrönen R, Kärenlampi S, Hohtola A.** 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology* **130**, 729–739.

- Jahns P, Holzwarth AR.** 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1817**, 182–193.
- Jourdan M.** 2013. Impact de la variation nucléotidique de gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes sur leur accumulation dans la racine de carotte cultivée. Thèse de doctorat de l'Université d'Angers. 144p.
- Jourdan M, Gagné S, Dubois-Laurent C, Maghraoui M, Huet S, Suel A, Hamama L, Briard M, Peltier D, Geoffriau E.** 2015. Carotenoid content and root color of cultivated carrot : A candidate-gene association study using an original broad unstructured population. *PloS one* **10**, e0116674.
- Just BJ, Santos CAF, Fonseca MEN, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW.** 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 693–704.
- Just BJ, Santos CAF, Yandell BS, Simon PW.** 2009. Major QTL for carrot color are positionally associated with carotenoid biosynthetic genes and interact epistatically in a domesticated × wild carrot cross. *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 1155–1169.
- Kang B, Zhao W en, Hou Y, Tian P.** 2010. Expression of carotenogenic genes during the development and ripening of watermelon fruit. *Scientia Horticulturae* **124**, 368–375.
- Kato M, Matsumoto H, Ikoma Y, Okuda H, Yano M.** 2006. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *Journal of Experimental Botany* **57**, 2153–2164.
- Kidmose U, Hansen S, Christensen L, Edelenbos M, Larsen E, Nørbæk R.** 2004. Effects of genotype, root size, storage, and processing on bioactive compounds in organically grown carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Food Science* **69**, 388–394.
- Kim SH, Kim Y-H, Ahn YO, Ahn M-J, Jeong JC, Lee H-S, Kwak S-S.** 2013. Downregulation of the lycopene ϵ -cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β -branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweetpotato transgenic calli. *Physiologia Plantarum* **147**, 432–42.
- Kim JE, Rensing KH, Douglas CJ, Cheng KM.** 2010. Chromoplasts ultrastructure and estimated carotene content in root secondary phloem of different carrot varieties. *Planta* **231**, 549–558.

- Király L, Hafez YM, Fodor J, Király Z.** 2008. Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *Journal of General Virology* **89**, 799–808.
- Koskela T, Puustinen S, Salonen V, Mutikainen P.** 2002. Resistance and tolerance in a host plant–holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. *Evolution* **56**, 899–908.
- Krinsky NI, Johnson EJ.** 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 459–516.
- Kühbauch W, Thome U.** 1989. Nonstructural carbohydrates of wheat stems as influenced by sink-source manipulations. *Journal of Plant Physiology* **134**, 243–250.
- Larcher W.** 1987. Stress bei pflanzen. *Naturwissenschaften* **74**, 158–167.
- Laufer B.** 1919. In: *Sino-Iranica: Chinese contributions to the History of civilization in Ancient Iran with special reference to the History of cultivated plants and products*. Chicago.
- Leng P, Yuan B, Guo Y.** 2014. The role of abscisic acid in fruit ripening and responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **65**, 4577–88.
- Lepoivre P.** 2003. *Phytopathologie - Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*.
- Li L, Van Eck J.** 2007. Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Research* **16**, 581–585.
- Liang S, Ren G, Liu J, Zhao X, Zhou M, McNeil D, Ye G.** 2015. Genotype-by-environment interaction is important for grain yield in irrigated lowland rice. *Field Crops Research* **180**, 90–99.
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel E.** . 2008. *PSY3*, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology* **146**, 1333–1345.
- Liu Y-S, Gur A, Ronen G, Causse M, Damidaux R, Buret M, Hirschberg J, Zamir D.** 2003. There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 195–207.
- Liu L, Shao Z, Zhang M, Wang Q.** 2015. Regulation of carotenoid metabolism in tomato. *Molecular Plant* **8**, 28–39.

- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A.** 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant Journal* **22**, 503–513.
- Lopez-Obando M, Ligerot Y, Bonhomme S, Boyer FD, Rameau C.** 2015. Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development* **142**, 3615–3619.
- Lu S, Van Eck J, Zhou X, et al.** 2006. The cauliflower *Or* gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *The Plant Cell* **18**, 3594–3605.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R.** 2009. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PloS One* **4**, e6373.
- Mackevic VI.** 1929. The carrot of Afghanistan. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding* **20**, 517–562.
- Mahjoub A, Hernould M, Joubès J, Decendit A, Mars M, Barrieu F, Hamdi S, Delrot S.** 2009. Overexpression of a grapevine *R2R3-MYB* factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 551–561.
- Martel C, Vrebalov J, Tafelmeyer P, Giovannoni JJ.** 2011. The tomato MADS-Box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiology* **157**, 1568–1579.
- Mauch-Mani B, Mauch F.** 2005. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 409–414.
- Maurya VK, Srinivasan R, Ramesh N, Anbalagan M, Gothandam KM.** 2015. Expression of carotenoid pathway genes in three capsicum varieties under salt stress. *Asian Journal of Crop Science* **7**, 286–294.
- McGarvey D, Croteau R.** 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015–1026.
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R.** 2003. The *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1* gene encodes an *R2R3MYB* transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**, 2551–2565.
- Moreau B.** 1996. *L'oignon de garde*. Ctifl. 320p.

- Moreno JC, Pizarro L, Fuentes P, Handford M, Cifuentes V, Stange C.** 2013. Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PloS one* **8**, e58144.
- Moury B, Selassie KG, Marchoux G, Daubeze AM, Palloix A.** 1998. High-temperature effects on hypersensitive resistance to tomato spotted wilt tospovirus (Tswv) in pepper (*Capsicum-Chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology* **104**, 489–498.
- Munné-Bosch S, Alegre L.** 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* **210**, 925–931.
- Nebeling LC, Forman MR, Graubard BI, Snyder RA.** 1997. Changes in carotenoid intake in the United States: The 1987 and 1992 National Health Interview Surveys. *Journal of the American Dietetic Association* **97**, 991–996.
- Nicolle C.** 2003. Evaluation de la qualité nutritionnelle des légumes : la carotte et la salade. Intérêt dans la prévention du risque cardio-vasculaire. Thèse de doctorat de l'Université de Clermont-Ferrand 2, 113p.
- Nicolle C, Simon G, Rock E, Amouroux P, Rémésy C.** 2004. Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic, and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *Journal of American Horticulture Science* **129**, 523–529.
- Ombódi A, Daood HG, Helyes L.** 2014. Carotenoid and tocopherol composition of an orange-colored carrot as affected by water supply. *HortScience* **49**, 729–733.
- Painter RH.** 1951. *Insect resistance in crop plants*. New York.
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham Jr. F, Hirschberg J.** 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* **30**, 807–819.
- Perrin F, Brahem M, Dubois-Laurent C, Huet S, Jourdan M, Geoffriau E, Peltier D, Gagne S.** 2016. Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 906–912.
- Peterson CE, Simon PW.** 1986. Carrot breeding. *Breeding Vegetable Crops* **9**, 322–356.
- Phan CT, Hsu H.** 1973. Physical and chemical changes occurring in the carrot root during storage. *Canadian Journal of Plant Science* **53**, 629–634.
- Platenius H.** 1932. Chemical changes in carrots during growth. *Plant Physiology* **2**, 671–680.

- Pogson BJ, Rissler HM.** 2000. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **355**, 1395–403.
- Prasad PVV, Staggenborg SA, Ristic Z.** 2008. Impacts of drought and/or heat stress on physiological, developmental, growth, and yield processes of crop plants. LH Ahuja and SA Saseendran, Eds. Madison.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E.** 2010. ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* **15**, 395–401.
- Ramegowda V, Senthil-Kumar M.** 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology* **176**, 47–54.
- Ravel C, Dardevet M, Leenhardt F, Bordes J, Joseph JL, Perretant MR, Exbrayat F, Poncet C, Balfourier F, Chanliaud E, Charmet G.** 2013. Improving the yellow pigment content of bread wheat flour by selecting the three homoeologous copies of *Psy1*. *Molecular Breeding* **31**, 87–99.
- Reduron J-P.** 2007. Ombellifères de France: monographie des Ombellifères ('Apiaceae') et plantes alliées, indigènes, naturalisées, subspontanées, adventices ou cultivées de la flore française. Société Botanique du Centre-Ouest.
- Ritchie JT, NeSmith DS.** 1991. Temperature and crop development. *Modeling Plant and Soil Systems* **31** 5–29.
- Robinson T.** 2012. *The Biochemistry of Alkaloids*. SS& B Media, Eds. Springer Berlin Heidelberg.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J.** 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* **17**, 341–51.
- Rubatzky VE, Quiros CF, Simon PW.** 1999. *Carrots and related vegetable umbelliferae*. Wallingford: CAB International.
- Ruiz-Sola MÁ, Arbona V, Gomez-Cadenas A, Rodriguez-Concepcion M, Rodriguez-Villalon A.** 2014. A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **9**, e90765.
- Sakamoto M, Suzuki T.** 2015. Elevated root-zone temperature modulates growth and quality of hydroponically grown carrots. *Agricultural Sciences* **6**, 749–757.

- Sangers WJ.** 1952. De ontwikkeling van de Nederlandse tuinbouw.
- Scandella D.** 2010. Carotte, analyse du marché, offre et demande. Paris.
- Seigler DS.** 1998. Plant secondary metabolism. Boston, MA, U.S.A.
- Sharma DB, Swarup A.** 1988. Effects of short-term flooding on growth, yield and mineral composition of wheat on sodic soil under field conditions. *Plant and Soil* **107**, 137–143.
- Shirley B.** 1996. Flavonoid biosynthesis: ‘new’ functions for an ‘old’ pathway. *Trends in Plant Science* **11**, 377–382.
- Simms EL.** 2000. Defining tolerance as a norm of reaction. *Evolutionary Ecology* **14**, 563–570.
- Simon PW, Freeman RE, Vieira J V, Boiteux LS, Briard M, Nothnagel T, Michalik B, Kwon Y-S.** 2008. Carrot. *Handbook of Plant Breeding*. Springer **2**, 327–357.
- Singh DP, Beloy J, McInerney JK, Day L.** 2012. Impact of boron, calcium and genetic factors on vitamin C, carotenoids, phenolic acids, anthocyanins and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry* **132**, 1161–1170.
- Sørensen JN, Jørgensen U, Kühn BF.** 1997. Drought effects on the marketable and nutritional quality of carrots. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 379–391.
- Surles RL, Weng N, Simon PW, Tanumihardjo SA.** 2004. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3417–3421.
- Tanguy J, Martin C.** 1972. Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* **11**, 19–28.
- Toennisessen GH.** 1991. Potentially useful genes for rice genetic engineering. G.S. Khush and G.H. Wallingford, UK.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M.** 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11626–11631.
- Villeneuve F, Leteinturier J.** 1992. La carotte. Tome 2. Etat des connaissances. 227p.
- Wang G, Ellendorff U, Kemp B, et al.** 2008. A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-Like Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **147**, 503–517.

- Wang Y, Li J, Yang J, Xia R.** 2011. Expression of lycopene cyclase genes and their regulation on downstream carotenoids during fruit maturation of Guoqing No. 1 Satsuma mandarin and Cara Cara navel orange. *Scientia Horticulturae* **127**, 267–274.
- Wang H, Ou CG, Zhuang FY, Ma ZG.** 2014. The dual role of phytoene synthase genes in carotenogenesis in carrot roots and leaves. *Molecular Breeding* **34**, 2065–2079.
- Wareing PF, Jennings AMV.** 1980. The hormonal control of tuberisation in potato. Berlin-Heidelberg-New York.
- Welsch R, Maass D, Voegel T, DellaPenna D, Beyer P.** 2007. Transcription factor *RAP2.2* and its interacting partner *SINAT2*: stable elements in the carotenogenesis of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **145**, 1073–85.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J.** 2003. Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 523–34.
- Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili S, Beyer P.** 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* **147**, 367–80.
- Wiese J, Kranz T, Schubert S.** 2004. Induction of pathogen resistance in barley by abiotic stress. *Plant Biology* **6**, 529–536.
- Winkel-Shirley B.** 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 218–223.
- Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, Rocheford TR.** 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and zeta-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetics*. **108**, 349–59.
- Xu ZS, Tan HW, Wang F, Hou XL, Xiong AS.** 2014. CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* **2014**, 1–8.
- Yermiyahu U, Ben-Gal A, Keren R, Reid RJ.** 2008. Combined effect of salinity and excess boron on plant growth and yield. *Plant and Soil* **304**, 73–87.
- Yoneyama K, Xie X, Yoneyama K, Takeuchi Y.** 2009. Strigolactones: Structures and biological activities. *Pest Management Science* **65**, 467–470.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T.** 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* **38**, 171–186.

- Yu B, Lydiate DJ, Young LW, Schäfer UA, Hannoufa A.** 2008. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Research* **17**, 573–585.
- Zeevaart JAD, Creelman RA.** 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 439–473.
- Zeipina S, Alsina I, Lapse L.** 2014. The effect of watering on yield and quality of carrots. *Acta Hort.* **1038**, 223–230.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM.** 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* **97**, 111–119.
- Zhao C, Craig JC, Petzold EH, Dickerman AW, Beers EP.** 2005. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl^{1[w]}. *Plant Physiology* **138**, 803–818.
- Zude M, Birlouez-Aragon I, Paschold PJ, Rutledge DN.** 2007. Non-invasive spectrophotometric sensing of carrot quality from harvest to consumption. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 30–37.

ANNEXES

ANNEXE I : FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU PREMIER ARTICLE

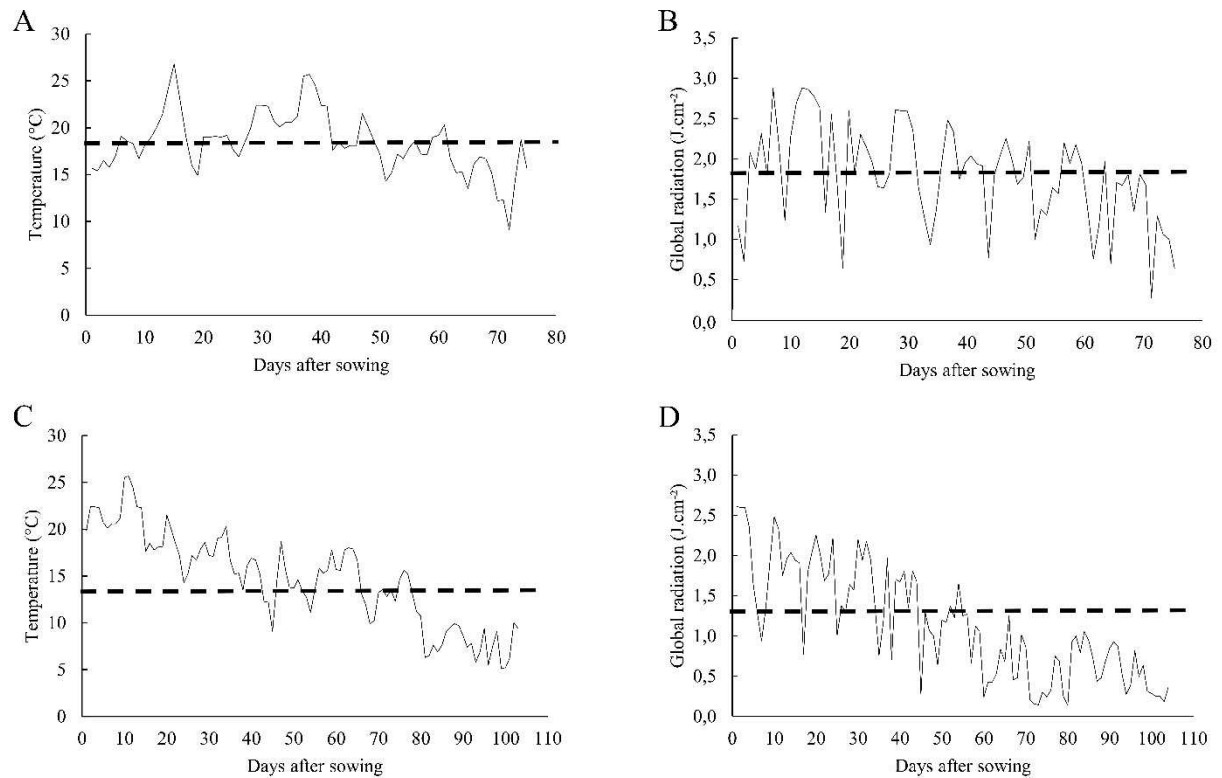


Figure S2.1: Changes in climatic parameters during the two growing periods. Temperature (A) and global radiation (B) during the first growing period. Temperature (C) and global radiation (D) during the second growing period. The dotted lines correspond to the period mean of each parameter.

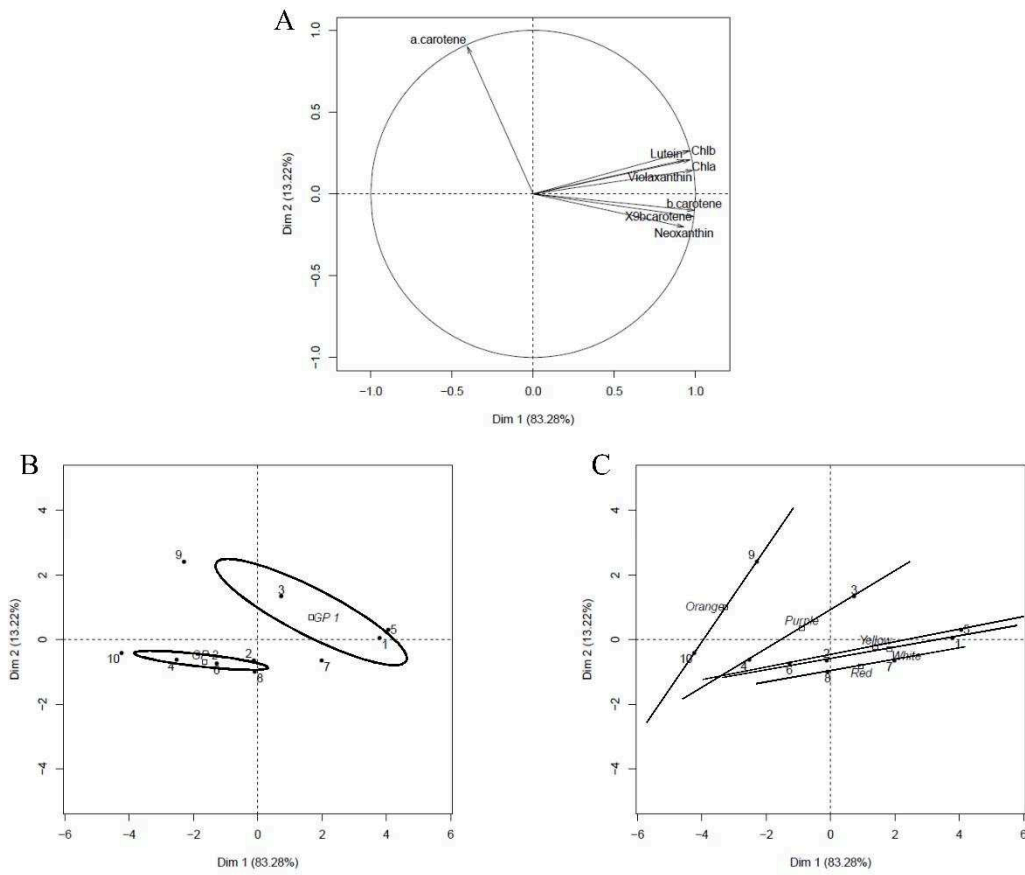


Figure 2.2: Principal component analysis factor map based on pigment compounds in carrot leaves. (A) Individual contribution of each variable to the first and the second dimensions. Sample distribution is shown by (B) growing period and (C) by genotype. Each dot is the mean of three biological replications ($n=3$). GP 1: growing period 1, GP 2: growing period 2, chl a : chlorophyll a, chl b : chlorophyll b, X9bcarotene: 9-cis- β -carotene, a.carotene: α -carotene, b.carotene: β -carotene.

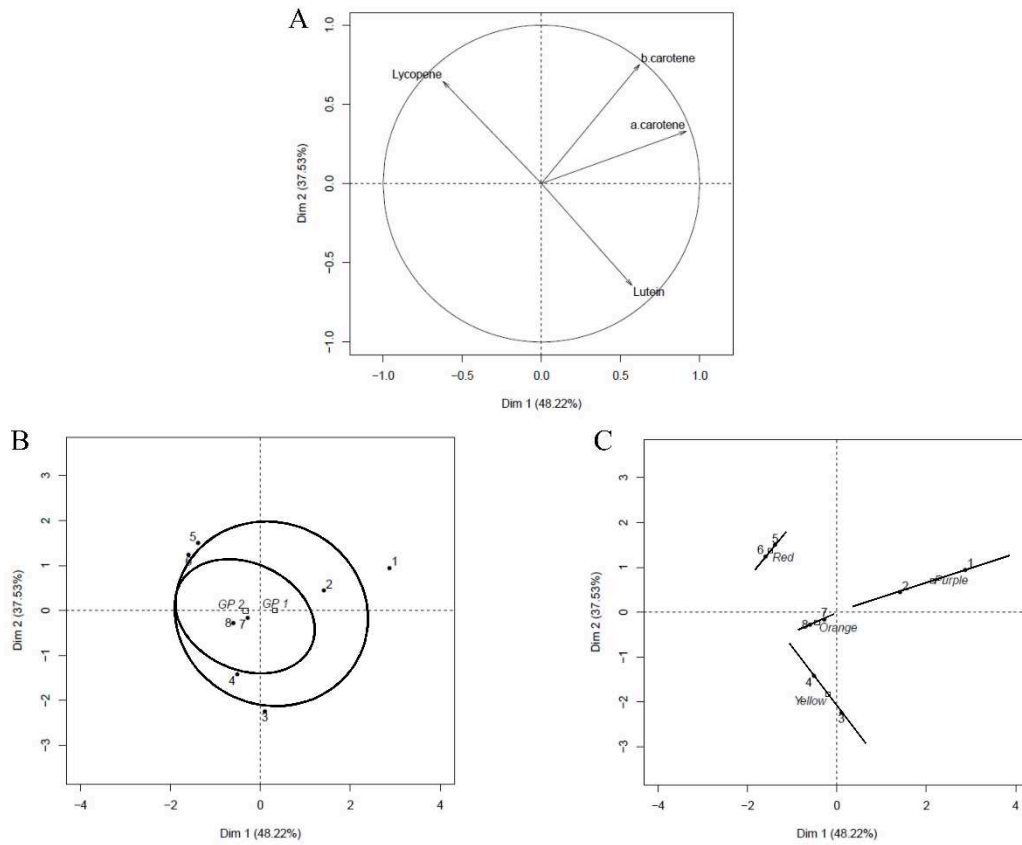


Figure S2.3: Principal component analysis factor map based on carotenoid contents in carrot roots. (A) Individual contribution of each variable to the first and the second dimensions. Sample distribution is shown by (B) growing period and (C) by genotype. Each dot is the mean of three biological replications ($n=3$). GP 1: growing period 1, GP 2: growing period 2, a.carotene: α -carotene, b.carotene: β -carotene.

ANNEXE II : FIGURES SUPPLEMENTAIRES DU DEUXIEME ARTICLE

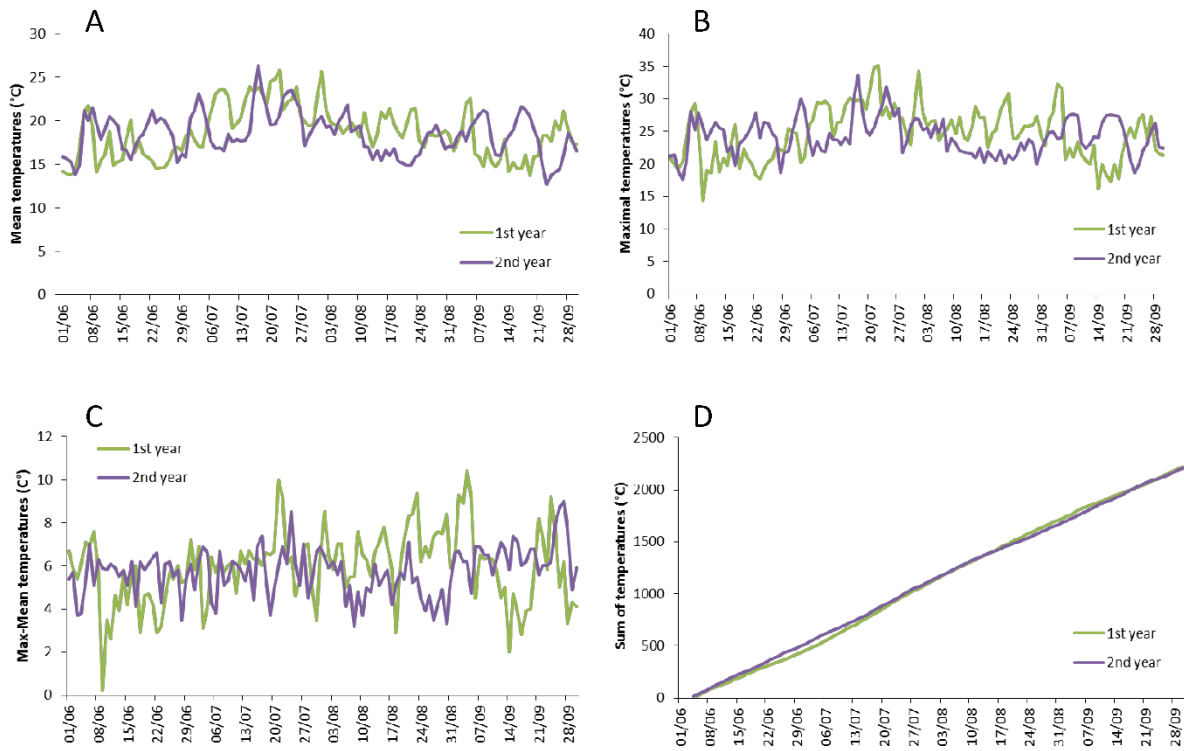


Fig. S3.1: Variations of mean temperatures (A), maximal temperatures (B), difference between maximal and mean temperatures (C) and sum of temperature (D) during carrot development in the two years of experiment.

Table S3.1: Relative proportions of each carotenoid in the root of the five studied genotypes under the four growing conditions. C: control; WR: water-restricted.

		Lutein				α -carotene				β -carotene				Lycopene			
		C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS
Bolero	1 st	4	4	4	4	33	36	34	35	63	60	62	61				
	2 nd	4	4	4	5	37	34	34	34	59	62	61	61				
Presto	1 st	4	3	3	3	35	35	35	35	61	62	61	62				
	2 nd	4	3	4	3	34	38	35	35	62	58	62	62				
IKaO	1 st	2	2	2	2	37	36	38	37	61	62	60	61				
	2 nd	2	2	3	3	39	38	40	36	59	60	57	61				
Deep	1 st	50	49	51	46	18	18	16	20	31	33	34	34				
Purple	2 nd	49	58	58	48	19	16	17	19	31	26	26	33				
IKiR	1 st									26	32	30	27	74	68	70	73
	2 nd									22	24	23	21	78	76	77	79

Table S3.2: Relative proportions of each carotenoid in the leaves of the six studied genotypes under the four growing conditions. C: control; WR: water-restricted

		Neoxanthin				Violaxanthin				Lutein				β -carotene				9-cis- β -carotene				α -carotene			
		C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS	C	WR	Ad	CS
Bolero	1st	10	11	12	10	7	8	8	7	54	51	51	53	18	20	17	18	2	3	2	2	9	8	10	9
	2nd	10	10	11	11	7	7	8	7	50	50	48	50	19	20	20	19	2	2	2	2	11	10	10	11
Presto	1st	12	12	12	12	6	7	7	7	52	48	51	49	19	22	19	20	3	3	3	3	8	9	8	9
	2nd	13	11	11	12	7	7	7	7	47	49	48	47	22	22	22	23	3	3	3	3	8	9	9	9
IKaO	1st	11	11	11	12	7	6	7	8	53	51	51	49	20	21	21	22	3	3	3	3	7	8	7	6
	2nd	10	10	11	12	7	7	5	7	50	50	51	51	22	22	22	21	3	3	3	3	8	8	8	7
DP	1st	11	12	12	11	7	7	7	7	51	48	52	51	22	24	20	22	3	3	3	3	6	6	6	6
	2nd	10	11	11	12	7	8	7	7	52	49	52	45	22	25	21	25	3	3	3	3	6	5	7	7
IKiR	1st	15	16	17	19	7	8	7	7	45	41	43	38	28	31	28	31	3	3	4	4	1	1	1	1
	2nd	16	16	15	17	7	7	7	7	42	41	43	41	31	33	31	32	4	4	3	4	0	0	0	0
IBvW	1st	13	13	14	14	7	7	8	8	50	47	47	47	26	28	27	28	3	3	3	3	1	2	1	1
	2nd	13	12	13	13	7	7	7	8	48	47	48	46	29	30	28	30	3	3	3	3	0	0	0	0

	lutein	α -carotene	β -carotene	lycopene	Σ Carotenoids	ABA	GGPPS	PSY1	PSY2	PDS	LCYB	LCYE	ZEP	NCED1	NCED2	NCED3	ABA2
lutein	1.00																
α -carotene	0.29	1.00															
β -carotene	0.29	0.92	1.00														
lycopene	0.08	-0.28	-0.03	1.00													
Σ Carotenoids	0.41	0.60	0.76	0.54	1.00												
ABA	-0.04	0.19	0.22	0.06	0.18	1.00											
GGPPS	0.04	0.09	0.14	-0.03	0.07	0.06	1.00										
PSY1	0.10	0.05	0.11	0.07	0.11	-0.11	0.40	1.00									
PSY2	0.03	0.02	0.13	0.08	0.10	-0.23	0.19	0.50	1.00								
PDS	0.04	0.22	0.33	0.00	0.20	0.00	0.66	0.63	0.45	1.00							
LCYB	-0.08	0.19	0.24	0.04	0.16	0.11	0.06	0.22	0.36	0.26	1.00						
LCYE	-0.17	-0.18	-0.07	0.07	-0.09	-0.15	0.36	0.65	0.68	0.56	0.25	1.00					
ZEP	-0.02	0.13	0.17	0.08	0.14	0.02	0.40	0.44	0.60	0.44	0.34	0.51	1.00				
NCED1	0.15	0.10	0.18	0.05	0.14	0.00	0.53	0.59	0.63	0.71	0.31	0.65	0.71	1.00			
NCED2	0.11	-0.04	-0.01	0.00	-0.04	-0.08	0.42	0.40	0.59	0.53	0.27	0.59	0.64	0.88	1.00		
NCED3	0.18	0.04	0.10	0.06	0.08	0.07	0.42	0.37	0.49	0.56	0.24	0.51	0.57	0.80	0.83	1.00	
ABA2	-0.09	0.06	0.21	0.17	0.23	0.05	0.33	0.26	0.53	0.36	0.34	0.38	0.42	0.39	0.36	0.26	1.00

Fig. S3.2: Person correlation performed on metabolite contents and gene expression in roots. Only significant correlations at 5% were colored. ABA: abscisic acid; GGPPS, geranyl geranyl pyrophosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; LCYB, lycopene β -cyclase; LCYE, lycopene ϵ -cyclase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase.

	neoxanthin	violaxanthin	9-cis- β -carotene	lutein	α -carotene	β -carotene	Σ carotenoids	ABA	GGPPS	PSY1	PSY2	PDS	LCYB	LCYE	ZEP	NCED1	NCED2	NCED3	ABA2
neoxanthin	1.00																		
violaxanthin	0.82	1.00																	
9-cis- β -carotene	0.76	0.65	1.00																
lutein	0.83	0.85	0.65	1.00															
α -carotene	-0.51	-0.48	-0.35	-0.49	1.00														
β -carotene	0.59	0.58	0.54	0.56	0.24	1.00													
Σ carotenoids	0.57	0.61	0.51	0.59	0.29	0.91	1.00												
ABA	-0.16	-0.11	-0.28	-0.09	0.06	-0.01	-0.07	1.00											
GGPPS	0.14	0.17	0.16	0.22	-0.46	-0.22	-0.24	-0.12	1.00										
PSY1	-0.13	-0.01	0.10	-0.06	0.01	-0.03	-0.09	-0.03	0.48	1.00									
PSY2	0.04	0.03	0.17	0.03	-0.26	-0.16	-0.24	0.01	0.48	0.67	1.00								
PDS	0.02	0.09	0.14	0.07	-0.16	-0.05	-0.11	0.02	0.65	0.79	0.75	1.00							
LCYB	-0.20	-0.04	0.02	-0.05	0.08	-0.02	-0.07	-0.06	0.34	0.74	0.40	0.50	1.00						
LCYE	0.12	0.03	0.13	0.07	-0.09	0.05	-0.04	-0.02	0.36	0.07	0.39	0.41	0.05	1.00					
ZEP	-0.04	-0.01	0.14	-0.01	-0.09	-0.09	-0.08	-0.02	0.28	0.64	0.76	0.61	0.49	0.06	1.00				
NCED1	0.38	0.34	0.44	0.42	-0.39	0.10	0.05	-0.04	0.31	0.23	0.47	0.35	0.21	0.35	0.49	1.00			
NCED2	0.13	0.15	0.20	0.20	-0.32	-0.22	-0.12	-0.19	0.51	-0.13	-0.02	0.10	-0.06	0.29	0.04	0.36	1.00		
NCED3	0.18	0.16	0.10	0.24	-0.22	-0.06	-0.03	-0.06	0.36	-0.09	-0.01	0.17	-0.02	0.32	0.02	0.32	0.55	1.00	
ABA2	0.25	0.30	0.19	0.30	-0.50	-0.13	-0.14	-0.04	0.43	0.17	0.52	0.19	0.20	0.18	0.43	0.39	0.24	0.17	1.00

Fig. S3.3: Person correlation performed on metabolite contents and gene expression in leaves. Only significant correlations at 5% were colored. ABA: abscisic acid; GGPPS, geranyl geranyl pyrophosphate synthase; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; LCYB, lycopene β -cyclase; LCYE, lycopene ϵ -cyclase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; NCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase.

Thèse de Doctorat

Florent PERRIN

Modification du métabolisme des caroténoïdes en réponse aux stress biotique et abiotique chez la carotte

Modification of carotenoid metabolism in response to biotic and abiotic stresses in carrot

Résumé

La carotte présente un grand intérêt nutritionnel comme source alimentaire en caroténoïdes. Pourtant, la connaissance des mécanismes d'accumulation de ces composés est un enjeu majeur. Si le déterminisme génétique a été relativement bien étudié, l'impact de stress sur l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte reste méconnu. Ce travail de thèse vise donc à déterminer (i) l'impact de stress biotique et abiotique appliqués individuellement ou en combinaison sur les teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et racines de carotte, (ii) les mécanismes de régulation pouvant expliquer ces variations (iii) si le métabolisme secondaire est affecté spécifiquement, indépendamment du métabolisme primaire. Les résultats mettent en évidence un effet négatif des différentes conditions de stress, en particulier appliquées en combinaison, sur les teneurs en caroténoïdes dans les feuilles et les racines de carotte, mais dépendent du génotype. La régulation transcriptionnelle au niveau de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ne peut expliquer qu'en partie les variations de teneurs. Les variations de teneurs en chlorophylles des feuilles et sucres des racines sont corrélées à celles des teneurs en caroténoïdes, suggérant des mécanismes communs de régulation.

Ce travail montre que l'impact de stress en culture, et en particulier leur combinaison, est une composante importante de l'élaboration de la qualité nutritionnelle. Les travaux doivent être poursuivis afin d'établir un schéma plus précis de la régulation de l'accumulation des caroténoïdes chez la carotte.

Mots clés

Daucus carota L., facteurs environnementaux, stress combinés, métabolisme secondaire, régulation, restriction hydrique, *Alternaria dauci*, qualité nutritionnelle

Abstract

Carrot presents a high nutritional interest as a carotenoid intake source. However, knowledge about accumulation mechanisms of these compounds is a major issue. While genetic determinism was relatively well studied, the impact of stresses on carotenoid accumulation in carrot remains unknown. This thesis work aims to determine (i) the impact of biotic and abiotic stresses applied individually or in combination on carotenoid contents in carrot leaves and roots, (ii) the regulation mechanisms which could explain these variations and (iii) if secondary metabolism is specifically affected independently from primary metabolism.

Results bring to light a negative effect of the different stress conditions, particularly applied in combination, on carotenoid contents in carrot leaves and roots but depend on genotypes. Transcriptional regulation based on carotenoid biosynthetic genes can only partially explain content variations. Chlorophyll content variations in leaves and sugar content variations in roots are correlated to those of carotenoids suggesting common regulation mechanisms.

This work shows that the impact of stress on culture, and particularly in combination, is an important determinism of nutritional quality. Further works need to be performed to establish a more precise regulation network pattern of carotenoid accumulation in carrot.

Key Words

Daucus carota L., environmental factors, combined stresses, secondary metabolism, regulation, water restriction, *Alternaria dauci*, nutritional quality