HAL
open science

# Analyse multi-espèces de la croissance et du métabolisme des sucres en lien avec la qualité des fruits : approche par modélisation écophysiologique

Coffi Belmys Cakpo

## To cite this version:

Coffi Belmys Cakpo. Analyse multi-espèces de la croissance et du métabolisme des sucres en lien avec la qualité des fruits : approche par modélisation écophysiologique. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2019. Français. NNT : 2019AVIG0717 . tel-02886426

**HAL Id: tel-02886426**

**https://theses.hal.science/tel-02886426**

Submitted on 1 Jul 2020

**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.

**Avignon Université**
***École Doctorale 536***
***Agrosciences & Sciences***

***INRA Centre de recherche PACA***
***UR 1115, Plantes et Systèmes de culture Horticoles***

# THESE

# Analyse multi-espèces de la croissance et du métabolisme des sucres en lien avec la qualité des fruits : approche par modélisation écophysiologique

Présentée à Avignon Université

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences

Spécialité : Sciences Agronomiques

**Par Coffi Belmys CAKPO**

**Soutenue le 17 Décembre 2019 devant un jury composé de :**

| | | |
|---|---|---|
| Christophe BUGAUD | Chercheur (HDR), CIRAD Montpellier | Rapporteur |
| Gerhard BUCK-SORLIN | Professeur, AgroCampus Ouest, Angers | Rapporteur |
| Marion PRUDENT | Chargée de recherche, INRA Dijon | Examinatrice |
| Huguette SALLANON | Professeur, Université d'Avignon | Examinatrice |
| Michel GENARD | Directeur de Recherche, INRA Avignon | Directeur de thèse |
| Gilles VERCAMBRE | Chargé de recherche, INRA Avignon | Co-Directeur de thèse |

**Encadrement de la thèse : Valentina BALDAZZI, Michel GENARD, Gilles VERCAMBRE**

# RESUME

Titre : Analyse multi-espèces de la croissance et du métabolisme des sucres en lien avec la qualité des fruits : approche par modélisation écophysiologique.

Depuis quelques années, la demande de produits de qualité est devenue importante pour les différents acteurs de la filière « fruits », jusqu'aux consommateurs pour des aspects gustatifs et nutritionnels. Le métabolisme des sucres est une cible évidente pour répondre à ces exigences. En effet, le métabolisme des sucres solubles fournit les précurseurs pour la synthèse des composés nécessaires à la croissance et au développement (composés structuraux), mais également à la synthèse des composés qui confèrent les valeurs gustatives comme les sucres solubles et les acides organiques. C'est pourquoi la compréhension des processus impliqués dans leurs accumulations au cours du développement des fruits est nécessaire. Par conséquent, la compréhension de l'élaboration de la croissance et de la qualité des fruits charnus nécessite une approche holistique. La modélisation écophysiologique offre un outil puissant pour appréhender l'interaction entre processus et un cadre unificateur pour étudier la croissance du fruit et le métabolisme des sucres en lien avec la qualité des fruits. L'objectif de cette thèse a été de mettre l'accent sur les traits impliqués dans la croissance et l'accumulation des métabolites, observés chez différentes espèces de fruits charnus.
Dans ce cadre, nous avons sélectionné 10 espèces de fruits charnus (nectarine, pomme, clémentine, concombre, kiwi, fraise, poivron, aubergine, tomate, raisin) et combiné des approches expérimentales et de modélisation pour comprendre les processus majeurs qui pilotent la croissance des fruits et les concentrations en métabolites primaires (en particulier, les sucres solubles et l'amidon).

Une première analyse de ces données expérimentales nous a permis de mettre en évidence une grande variabilité des caractéristiques biophysiques (masses fraîches, sèches, conductance cuticulaires, potentiel hydrique du fruit, pression osmotique, …) en relation avec leurs compositions biochimiques (sucres solubles totaux, acides organiques, amidon).

Par la suite nous avons pu distinguer, au moyen d'un modèle sucres solubles/amidon développé au cours de cette thèse, les processus impliqués dans la dynamique d'accumulation du sucre. Ceci nous a permis d'obtenir des paramètres métaboliques à partir desquels nous avons pu classer les espèces en 6 groupes. La dynamique des processus impliqués dans l'accumulation du sucre a révélé chez ces espèces différentes stratégies d'accumulation et de régulation des teneurs en sucres solubles au cours de leur développement.

Ce modèle a ensuite été couplé au modèle de croissance biophysique du fruit (Fishman and Génard, 1998). Le couplage a été réalisé en intégrant l'effet des sucres solubles sur le potentiel osmotique, permettant de mettre en évidence le lien entre stratégie liée à la dynamique sucres/amidon et les flux d'eau vers le fruit. Ce couplage a également nécessité l'extension du modèle biophysique de croissance en intégrant des connaissances nouvelles, en particulier sur l'évolution de la fonctionnalité des réseaux vasculaires. Le couplage des deux modèles nous a permis de décrire la croissance des fruits et les variations de la concentration des métabolites primaires, notamment les sucres solubles et l'amidon, durant la croissance du fruit. Ce couplage nous a aussi permis d'identifier les points de régulations entre les processus biophysiques et biochimiques. L'estimation des paramètres du modèle a mis en évidence des stratégies de croissance différentes entre les espèces à durée de croissance courtes et longues, stratégies associées à la fois au transport des sucres et aux propriétés hydrauliques.

**Mots-clés** : fruits charnus, qualité, croissance, multi-espèces, métabolisme des sucres, modélisation écophysiologique.

## ABSTRACT

Title: Multi-species analysis of growth and sugar metabolism related to fruit quality: ecophysiological modelling approach.

In recent years, demand for quality products, including taste and nutritional aspects, has become important for both fruit stakeholder and consumers. Sugar metabolism is an obvious target to meet these requirements. Indeed, the metabolism of soluble sugars provides the precursors for the synthesis of compounds necessary for growth and development (structural compounds), but also for the synthesis of compounds involved in fruit tasting value such as soluble sugars, organic acids, anthocyanins and aromatic compounds. In addition to these functions, the metabolism of soluble sugars contributes to the regulation of water import, which is essential for fruit growth. Therefore, understanding the development of fleshy fruit quality requires a holistic approach. Ecophysiological modeling offers a powerful tool to understand the interaction between processes and a unifying framework to study fruit growth and sugar metabolism in relation to fruit quality.

The aim of this thesis was to investigate similarities and differences in fruit growth and sugar accumulation strategies across 10 contrasting species of fleshy fruits (nectarine, apple, clementine, cucumber, kiwi, strawberry, pepper, eggplant, tomato, and grape).

We used a combination of experimental and modelling approaches to understand the major processes that control fruit growth and primary metabolite concentrations (in particular, soluble sugars and starch).

A first analysis of experimental data allowed us to highlight a great variability both in the biophysical characteristics (fresh, dry masses, cuticular conductance, hydric potential of the fruit, osmotic pressure,...) and in the biochemical composition (total soluble sugars, organic acids, starch) of fleshy fruits.

We then developed a generic sugar model and used it to quantify the effects of major physiological and dilution processes that affect sugar concentration in fruits.

Results showed that the ten species of this study can be split up into 6 groups based on their metabolic profiles. Inspection of the dynamics of the processes involved in sugar accumulation revealed the existence of distinct accumulation patterns across species, during fruit development.

The sugar model was then coupled to a biophysical model of fruit growth (Fishman and Génard, 1998). The coupling was carried out by integrating the effect of soluble sugars on osmotic pressure, making it possible to highlight the link between sugar/starch dynamics and water flows to the fruit. This coupling also required the extension of the biophysical growth model, in particular in what concerns the evolution of vessel function

The integrated sugar-growth model allowed us to reproduce differences in fruit growth curves and in the evolution of metabolite concentration, including soluble sugars and starch, during fruit development. The estimation of the model parameters revealed different growth strategies between species with short and long growth durations, strategies associated with both sugar transport and hydraulic properties.

**Key Words**: fleshy fruits, quality, growth, multi-species, sugar metabolism, ecophysiological modeling.

# Dédicace

**A LA MEMOIRE**

**DE MON DEFUNT PERE BARTHELEMY ANANI CAKPO**

# Remerciements

'*Si tu manges le fruit d'un grand arbre, n'oublie pas de remercier le vent'*. C'est à travers ce proverbe béninois que mes premiers remerciements vont aux instigateurs de ce projet de thèse : Michel Génard, Valentina Baldazzi et Gilles Vercambre pour m'avoir choisi de travailler sur ce projet multi-disciplinaire. Merci pour votre disponibilité.

Ma reconnaissance et ma gratitude vont également aux différents partenaires du projet ANR FRIMOUSS, en particulier Léa Roch et l'Unité Mixte de Recherche BFP pour les analyses métabolomiques, le Dr Daniel Plenet et l'Unité de Recherche PSH, le Dr Sylvaine Simon, Solene Borne, Thierry Girard et l'Unité Expérimentale 695, le Dr Olivier Pailly et l'Unité Expériementale CITRUS, le Dr Vincent Truffault et le CTIFL Carquefou, le Dr Zhanwu DAI et l'Unité Mixte de Recherche EGFV pour la culture des fruits.

Je tiens à remercier très chaleureusement Valérie Serra, pour sa bienvellance, sa disponiblilité et son appuit technique régulier tout au long de la période d'expérimentation.
Merci à Cécile Thomas pour sa gentillesse, sa disponibilité et surtout pour son appuit technique décisif avec Gilles Vercambre dans la récolte des fruits de Concombre à Carquefou.
Merci à Guillaume Garcia, Frederic Bouvery, Catherine Coutand, Jiliang Chen, Cynthia Gidoin, Ruoyin Long et Clarisse Auvinet pour leur aide technique, malgré leur emploi du temps.
Merci à Laurent Gomez, Patricia Laugier, Emilie Rubio, Doriane Bancel et Béatrice Brunel pour votre disponibilité et la mise à disposition du materiel technique du labo.
Merci au Dr Olivier Pailly, Isabelle Tur, Emmanuel Bloquel, Laurent Julhia, Antonin lamache et Gilles Costantino pour votre aide technique et pour tous les allers-retours entre Bastia et San-Giuliano.
Merci à Thierry Girard pour les allers-retours entre les arrêts de Bus/trains de Valence au domaine de Gotheron et merci également aux locataires du bâtiment des stagiaires (Esther, Paola, Eric et tous ceux que j'oublie) d'avoir accepté que je squatte le canapé entre deux mesures.
Merci à Frédéric Jean, Arnaud Jouineau et à l'Unité de Recherches en Écologie des Forêts Méditerranéennes pour la mise à disposition des chambres froides et du Licor.
Merci à Françoise Chazey, Delphine Vailhen et Nathalie Allies pour leur appuit administratif.

Merci à Pierre Valsesia pour sa disponibilité et son appuit technique en informatique et à Mohamed M Memmah pour son aide dans la résolution des problèmes d'optimisation numériques.
Merci aux membres de mon comité de thèse, Hendrik Davi, Laurent Urban, Florent Pantin, Zhanwu Dai et Hélène Gautier d'avoir contribué à guider cette thèse.
Merci à Christophe Bugaud et à Gerhard Buck-Sorlin d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également Marion Prudent et Huguette Sallanon pour leur participation au jury.
Merci à Myriam Siegwart et Thomas Delattre pour leur encouragement et merci encore Thomas pour m'avoir dépanné à distance pour le serveur 8 au lendemain des fêtes de noël 2017. Merci à Patrick Signoret, Daniele Bevacqua, Jean-Charles Bouvier, Hélène Gautier, Nadia Bertin, Anne-Laure Fanciullino et Jacques Le Bot pour leur bienveillance.

Merci aux ami(e)s, Blanche, Camille, Caterina, Chiara, Christophe, Dario, Emily, Emna, Enrico, Florent, Francesca, Hazem, Hussein, Imen Soula, José, Julie, Marta, Mathieu, Mohamed, Pietro, Tarek, Yannick et tous les stagiaires pour les moments partagés.
Merci à la team Forêt : Cathleen, Maurane, Valentin et mes chers colocs Maxime, Violette et Hélène qui m'ont toujours répondu présent(e). Merci à Florence, Nicolas Mariotte, Guillaume, Nicolas Martin, Simon, Hendrik, Eric, Sylvie, François Courbet, Bruno, Damien, Olivier, François Lefevre, Anne, Jean-Luc, Marie-Claude, Marion, Valérie, Caroline, Ivan, Laurent, thomas, Didier, William et tous ceux que je n'ai pas cité pour votre bienvellance.
Merci aux frères Ahmed, Honoré, Isidore et la petite communauté Africaine d'Avignon pour les moments partagés.
Merci à Françoise et Michel pour les randonnées.
Merci à Pauline et Stéphanie pour les moments vécus. Merci encore Stéphanie d'avoir été compréhensive durant la période de fin de thèse.

Je tiens à remercier Marie-Solange et Bernard Lathuilière pour m'avoir accueilli chaleureusement et pour avoir guidé mes premiers pas en France. Merci pour tout car sans votre grandeur d'âme, rien de tout ceci n'aurait jamais eu lieu.
Merci à Annie et Roland pour leur générosité et leur soutien sans faille.
Merci à Pierrette et Alain pour leur encouragement et leur bienvellance.
Merci à mes tatas Lidwine et Mathilde pour leur motivation et leur encouragement.
Ma reconnaissance va à ma mère Léopoldine Agassounon.  Merci pour tout Maman.

# Sommaire

## Table des matières

**RESUME** ..... A

**ABSTRACT** ..... B

Liste des Figures ..... H

Chapitre I: ..... H

Chapitre II: ..... H

Chapitre III: ..... K

Liste des Tableaux ..... M

Chapitre I: ..... M

Chapitre II: ..... M

Chapitire III: ..... M

Liste des annexes ..... N

**Introduction et contexte** ..... 1

**Objectifs de la thèse** ..... 5

**Organisation du manuscrit** ..... 7

***Chapitre I : Matériels et Méthodes : Caractérisation Biophysique et Biochimique des Fruits Charnus.*** ..... 8

Introduction ..... 9

Matériel végétal ..... 9

Conditions de culture ..... 10

Récolte des fruits et mesures ..... 14

Suivi des Conditions climatiques ..... 16

Mesures Biophysiques ..... 18

Caractérisation du statut hydrique de la plante ..... 18

Caractérisation du statut hydrique du fruit ..... 20

Mesures de la pression osmotique ..... 20

Estimation de la conductance cuticulaire du fruit ..... 20

Analyses Biochimiques ..... 24

Quantification des métabolites primaires ..... 24

***Chapitre II : comparaison assistée par modèle des dynamiques d'accumulation de sucre dans dix fruits charnus*** ..... 25

Abstract ..... 27

Introduction ..... 28

Materials & Methods ..... 32

Fruit Material and Growth Conditions ..... 32
Fruit Harvest and Sample Processing ..... 32
Metabolite Measurements ..... 33
Description of the model ..... 33
Model inputs ..... 36
Model calibration ..... 36
Parameter data set analysis ..... 40
RESULTS ..... 41
Model catches differences in dynamic patterns of soluble and insoluble carbohydrates across a contrasted panel of fruit species ..... 41
Inter-species comparison: classification based on model parameters ..... 44
Carbon allocation patterns across species agrees with classification based on parameter values ..... 47
Different degree of coordination among processes driving sugar concentration ..... 49
Contribution of the processes involved in sugar concentration. ..... 50
Discussion ..... 53
Inter-species comparison on basis of metabolic rates ..... 53
Inter-species comparison based on the dynamics of physiological fluxes ..... 54
**Chapitre III : Les fruits charnus ont-ils les mêmes mécanismes de croissance ? De l'importance des différents processus dans la croissance des fruits charnus** ..... 64
Introduction ..... 65
Modèles impliquant des processus biophysiques et biochimiques ..... 65
Importance de la prise en compte du métabolisme de l'amidon dans les modèles ..... 65
Flux de sucre et d'eau vers le fruit ..... 66
Déchargement du sucre ..... 66
Flux d'eau entrant dans le fruit ..... 66
Pertes en eau ..... 67
Objectif du travail ..... 67
Matériels et méthodes ..... 69
Matériel végétal et conditions de culture ..... 69
Récolte des fruits et expérimentation ..... 69
Description du modèle ..... 69
Extension du modèle ..... 73
Sous-modèle sucre ..... 73
Entrées du modèle ..... 74
Paramétrisation du modèle ..... 74
Analyse des jeux de paramètres ..... 81

Résultats ..... 82
Le modèle simule correctement la variabilité inter-spécifique de la croissance et de la composition ..... 82
Comparaison inter-espèces basée sur les paramètres biophysiques de croissance du fruit ..... 85
Comparaison inter-espèces des flux d'eau et de carbone durant la croissance des fruits ..... 89
Comparaison inter-espèces des liens entre croissance, pressions osmotiques et de turgescence, et concentration en amidon ..... 91
Discussion ..... 94
Comparaison inter-espèces de stratégie d'import d'eau dans le fruit ..... 94
Comparaison inter-espèces des modes de déchargement du sucre dans le fruit ..... 95
Les changements dans l'accumulation nette de l'amidon et le potentiel osmotique total du fruit n'expliquent pas la croissance en masse fraîche. ..... 97
***Discussion générale et perspectives de recherche*** ..... 103
Bilan des connaissances acquises ..... 104
Hypothèses et limites des modèles écophysiologiques développés ..... 105
La durée de développement et la vitesse de croissance influence fortement le mode de régulation du sucre ainsi que les stratégies de croissance des fruits ..... 106
Perspectives de recherche ..... 107
**Références bibliographiques** ..... 110
**Annexe 1** ..... 128
**Annexe 2** ..... 129
**MODE OPERATOIRE** ..... 129
Mesure de la pression osmotique ..... 129
Objectif : ..... 129
Modifications apportées ..... 129
**2.** Matériels et produits nécessaires ..... 130
**3.** Contenu ..... 131
Référence bibliographiques ..... 131
**Annexe 3** ..... 132
**MODE OPERATOIRE** ..... 132
Mesure de la conductance cuticulaire du fruit ..... 132
Objectif : ..... 132
**9.** Matériels et produits nécessaires ..... 136
Sur terrain ..... 136
Au laboratoire, ..... 137
Référence bibliographiques ..... 137

## Liste des Figures

## Chapitre I:

Figure 1 : Photographie des différentes cultures réalisées au cours de l'année 2010 pour la tomate et 2016 pour toutes les autres cultures. En serre pour la tomate, la fraise, l'aubergine, le raisin et le concombre (INVENIO, INRA de Bordeaux EGFV, CTIFL), en tunnel pour le poivron (INVENIO), et en verger (INRA de Valence, INRA d'Avignon, INRA San Giuliano, et verger commercial près de Sainte Livrade) pour la pomme, la nectarine, la clémentine et le kiwi au cours de l'année 2016. Crédit photos Gilles Vercambre (tomate), Léa Roch (aubergine, poivron, concombre, clémentine, kiwi, raisin). 11

Figure 2 : Suivi des variables climatiques température (°C en rouge) et humidité relative (% en bleu) pour les espèces cultivées en serre (fraise, tomate, poivron, concombre, aubergine et raisin) et en verger (clémentine, kiwi, pomme et nectarine) au cours de la culture. ID est l'indice de développement et représente le temps de développement normalisé par rapport à la durée de croissance entre l'anthèse et la récolte finale du fruit mûr. 17

Figure 3 : mesures de potentiel hydrique minimal des feuilles (A) et mesures de potentiel hydrique des fruits (B). 20

Figure 4 : mesures de perte de masse de la pomme (A) et des fruits de poivrons et d'aubergines (B) 21

Figure 5 : Fruits épluchés pour le concombre (A), l'aubergine (B), le poivron (C) et la fraise (D). 22

Figure 6 : Estimation de la surface ($cm^2$) du fruit en fonction de sa masse fraîche (g). 23

## Chapitre II:

Figure 1: Model representation showing the net carbon inflows (ΔCI), the reversible reaction between sugar (Msol) and starch (Msta) and the conversion of sugar into compounds other than sugar and starch (Moc). 34

Figure 2: Developmental profiles of soluble sugar content (A-J) and starch content (K-T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. The soluble sugar

and starch contents are expressed in g.100gDM-1. The black points represent the experimental data. All curves are adjustments to the soluble sugar and starch content data obtained by using the sugar model developed. Each coloured curve of a given species comes from one of the best 100 optimal solutions selected. The developmental index is developmental time normalised against the total time from anthesis to ripe fruit (36 days for strawberry, 29 days for cucumber, 55 days for tomato, 59 days for eggplant, 222 days for kiwi, 76 days for pepper, 157 days for apple, 133 days for nectarine, 105 days for grape and 253 days for clementine). 42

Figure 3: Boxplot of normalized root mean square error (NRMSE) for soluble sugar and starch content optimization in the ten fruit species. Each boxplot is composed of the 100 best NRMSE selected for a given species. 44

Figure 4: Clustering tree diagram of ten fruit species separated on the basis of the 100 best estimated parameters for given species. 45

Figure 5: Principal component analysis (PCA) of the ten fruit species (PC1xPC2). The six parameters of synthesis compounds other than sugar and starch, of starch synthesis and of starch hydrolysis were used (B). The synthesis functions of other compounds than sugar and starch (KSoc) and of starch synthesis (KSsta) computed from 30% to 100% of maturity were projected as non-active variables on the first two PCs (A). Each point of a given species represents one of the 100 best parameter sets selected. 46

Figure 6: Principal component analysis (PCA) of the ten fruit species (PC2xPC3). The parameters of synthesis compounds other than sugar and starch, of starch synthesis and of starch hydrolysis were used (B). The synthesis functions of other compounds than sugar and starch (KSoc) and of starch synthesis (KSsta) computed from 30% to 100% of maturity were projected as non-active variables on the second and third PCs (A). Each point of a given species represents one of the 100 best parameter sets. 47

Figure 7: The ratio between the absolute mean hourly contributions of the different metabolic processes (synthesis compounds other than sugar and starch (A), starch synthesis (B) and starch hydrolysis (C)) and sugar import. The absolute mean hourly contributions were calculated over the period from 30% to 100% maturity. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best solutions. 48

Figure 8: The dynamic contribution of sugar importation (IMP, green), synthesis of compounds other than sugar and starch (Soc, red), water dilution (DIL,blue), and, on the second axis, starch synthesis (Ssta, dark grey) and starch hydrolysis (Hsta, light grey) to sugar accumulation in ten fruit species. To make the developmental profiles comparable among fruits, fruit development stages were normalized with flowering to be 0 and maturity to be 1. Each curve of a given species comes from one of the 100 best solutions. 49

Figure 9: The mean hourly contribution of sugar importation (IMP; black), synthesis of other compounds than sugar and starch (Soc; blue), water dilution (DIL; green), starch synthesis (Ssta; purple) and starch hydrolysis (Hsta; grey) on sugar accumulation in strawberry, cucumber, tomato, eggplant, kiwi, pepper, apple, nectarine, grape and clementine during fruit development stages. SUG (cyan) represents the mean increment of sugar concentration computed from the processe balance during the targeted period. The mean hourly contribution were calculated over the period from 30% to 100% maturity. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best solutions. 51

Supplementary Figure 1: Developmental profiles of Fresh mass (blue; A–j), dry mass (red; K–T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. All curves are smoothed fits of the observed data points using the cobs function (Ng and Maechler, 2007) of the “cobs” package (developed for R). 60

Supplementary Figure 2: Distribution of parameters of synthesis of other compounds than sugar and starch ($\lambda$ and $\eta$), starch hydrolysis (KHsta) and starch synthesis (as, bs and cs) for each species. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best parameter sets selected. 61

Supplementary Figure 3: Developmental profiles of soluble sugar concentration (AJ) and starch concentration (K-T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. The soluble sugar and starch concentrations are expressed in $g.100gFM^{-1}$. The black points represent the experimental data. All curves are adjustments to the soluble sugar and starch concentrations data obtained by using the sugar model developed. Each coloured curve of a given species comes from one of the best 100 optimal solutions selected. 62

Supplementary Figure 4: The relation between the absolute mean hourly contributions of sugar import (IMP) and absolute mean hourly contributions of synthesis of other compounds than sugar and starch (A), and dilution (B). Each colour represents a given species. 63

## Chapitre III:

Fig. 1 : Représentation schématique du couplage du modèle croissance – sucre. Les flèches bleues indiquent les flux d'eau, les flèches rouges indiquent les flux métaboliques liés aux sucres et les flèches noires indiquent les flux d'information. Les flux d'eau et de sucre provenant du xylème et du phloème, influent sur le potentiel hydrique des fruits (ψf) en modifiant le potentiel osmotique (ψπ) et hydrostatique (ψP), et par conséquent influencent l'expansion du fruit. 72

Fig. 2 : Evolution de la masse fraîche (A-J) et de la masse sèche (K-T) des fruits au cours de leur développement ; fraise (A,K), tomate (B,L), poivron (C,M), concombre (D,N), aubergine (E,O), raisin (F,P), clémentine (G,Q), kiwi (H,R), pomme (I,S) et nectarine (J,T). Les masses fraîches et sèches sont exprimées en g. Les points représentent les données expérimentales. Les courbes sont les simulations en masse fraiche, sèche et les concentrations en sucre soluble et en amidon obtenues à l'aide du modèle couplé sucre croissance, avec les 100 meilleures combinaisons de paramètres. L'indice de développement est le temps de développement normalisé par rapport au temps total entre l'anthèse et le fruit mûr (36 jours pour la fraise, 55 jours pour la tomate, 76 jours pour le poivron, 29 jours pour le concombre, 59 jours pour l'aubergine, 105 jours pour la grappe, 253 jours pour la clémentine, 222 jours pour le kiwi, 157 jours pour la pomme et 133 jours pour la nectarine). 83

Fig. 3 : Distribution de l'erreur quadratique moyenne normalisée entre les mesures et les simulations (NRMSE) pour la masse fraîche (A), la mase sèche (B), et les concentrations en sucres solubles et en amidon (C) pour chaque espèce. Les simulations ont été sélectionnées sur la base des plus faibles valeurs de NRMSE. 84

Fig. 4 : Analyse en composantes principales (ACP) des dix espèces de fruits (PC1xPC2). Les fonctions de conductivité hydraulique du xylème (lx) et du transport actif du sucre (ua) ont été projetées comme variables non actives sur les deux premiers axes de l'ACP (A). Les paramètres de conductivité hydraulique, d'expansion cellulaire et de l'accumulation du sucre

ont été utilisés pour discriminer les dix espèces de fruits (B). Chaque point représente la projection de l'une des 100 meilleures combinaisons de paramètres. 86

Fig. 5 : Variation au cours du temps de la différence entre la pression de turgescence du fruit (Pf) et la valeur seuil (Y) au-delà de laquelle il y a croissance irréversible. En deçà de cette valeur, il n'y a pas de croissance. 87

Fig. 6 : dynamiques des flux d'eau xylémien (bleu), phloèmien (vert) et de la transpiration (noir) pour les 10 espèces de fruits au cours de leur développement, en fonction de l'index de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de l'une des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées. 88

Fig. 7 : dynamiques des flux de sucre phloémien vers le fruit par la voie apoplasmique (bleu), et par la voie symplasmique (mass-flow, aigue marine) en fonction de l'index de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de l'une des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées. 90

Fig. 8 : dynamiques de la masse fraîche, de la pression osmotique et de la pression de turgescence, de l'amidon en fonction de l'index de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de la meilleure des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées. 91

Figure 9 : Distribution des paramètres de transport actif du sucre (t*, Ta, Vm), de l'expansion cellulaire (ϕ, Y), de conductivité hydraulique du phloème (Lp), de conductivité hydraulique du xylème (LxAsy, Kx, Tx) et de transport du sucre par voie symplasmique (Ts) pour chaque espèce. Chaque boxplot est composé des 100 meilleures combinaisons de paramètres pour chaque espèce. 93

Figure S1 supplémentaire : Teneur en matière sèche des fruits. Les points représentent les données expérimentales. Toutes les courbes sont les simulations des poids secs et frais, avec les 100 meilleures combinaisons de paramètres pour chaque espèce. 102

# Liste des Tableaux

## Chapitre I:

Tableau 1 : Condition de culture 12 -13

Tableau 2 : Mesures réalisées pour caractériser la croissance, ainsi que des variables et traits gouvernant les flux et la croissance des fruits. 14

Tableau 3 : Nombre de dates de mesures réalisées pour caractériser le potentiel hydrique de la plante (Plante Ψmin/Ψmax) et du fruit (Ψ fruit), la pression osmotique du fruit (∏ fruit) et la conductance cuticulaire (g) des fruits. * à une date de mesure donnée, une ou plusieurs cohortes de fruits ont été récoltée (s) selon l'espèce pour l'estimation de la conductance cuticulaire du fruit (g). 15

Tableau 4 : période de récolte des fruits. 16

## Chapitre II:

Table 1. Description of the estimated parameters and calibration boundaries for the ten fruit species. 38 -39

Supplementary table 1. Culture conditions for the ten fruit species. 57-58

Supplementary table 2. Literature data used for carbon content. 59

## Chapitire III:

Tableau 1 : Description des paramètres. 75 – 76

Tableau 2 : Description des paramètres estimés et des bornes des paramètres pour les dix espèces de fruits. 77-78

Tableau S1: Provenance des entrées du modèle Coulpé sucre-croissance. 99

Tableau S2 : Données de la littérature utilisées pour définir les paramètres de la respiration des fruits. 100

Tableau S3 : pression osmotique dans le fruit. pif0 est la pression osmotique due aux autres solutés autres que les sucres. La pression osmotique totale du fruit est mesurée. La pression osmotique du fruit due au sucre est calculée à partir du modèle sucre-amidon développé dans le chapitre 2. 101

# Liste des annexes

Annexe 1: Revue “Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits” 128

Annexe 2 : protocole de mesure de la pressin osmotique 129

Annexe 4 : protocol de mesure de la conductance cuticulaire 132

## Introduction et contexte

Aujourd'hui, la production de fruits, qui est essentielle à la nutrition humaine, est soumise à de fortes pressions. Cette pression est d'une part associée à l'incertitude qui pèse sur la production en lien avec les changements climatiques et d'autre part à la consommation des fruits, avec une certaine désaffection de leur consommation. Cette baisse est également associée à des changements dans la préférence des consommateurs pour le goût et la valeur nutritionnelle, d'où un besoin constamment renouvelé de variétés améliorées pour répondre à cette demande (Beauvoit *et al.* 2018). Mais, malgré les améliorations significatives apportées pour la sélection de certains traits (rendement, taille, couleurs, résistance aux stress biotiques et abiotiques, durée de conservation, ...) et le grand nombre de cultivars de fruit nouvellement commercialisés, force est de constater que la qualité gustative de nombreux fruits a considérablement diminué au cours des dernières décennies (Klee 2010), occasionnant ainsi une diminution de la consommation de certains fruits et légumes, le rejet de certaines nouvelles variétés et une exigence du consommateur pour des fruits de bonne qualité (Giovannoni 2006; Cantín *et al.* 2009; Bugaud *et al.* 2011; Mezzetti 2014; Cirilli *et al.* 2016). Pour le maintien de la filière des fruits et légumes, ***il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes impliqués dans l'élaboration de la croissance et de la qualité des fruits*** afin de pouvoir proposer des cultivars répondant aux exigences des consommateurs.

Le métabolisme est une cible évidente pour l'amélioration de la production fruitière, en particulier pour les fruits charnus, et la compréhension des mécanismes qui le lient aux phénotypes des fruits aidera à orienter les stratégies de sélection (Giovannoni 2006). En effet, des caractéristiques telles que la saveur, la valeur nutritive et les bienfaits pour la santé humaine ainsi que la résistance aux agents pathogènes et au stress pendant la croissance, sont toutes affectées par la composition en métabolites dans les tissus des fruits (Beauvoit *et al.* 2018). L'un des principaux objectifs de la biologie des fruits est donc de ***comprendre les facteurs qui affectent la croissance et la concentration en métabolites dans les cellules et les tissus et la façon dont la production de ces métabolites s'ajustent avec la croissance*** (Beauvoit *et al.* 2018). Le métabolisme peut être subdivisé en métabolisme primaire et secondaire, selon les besoins absolus de survie et de croissance des cellules (Verpoorte, 2000). Le métabolisme primaire inclut la synthèse des composés sucres et acides. La concentration de ces composés affecte largement la qualité gustative des fruits (Chapman and Horvat 1990; Albertini *et al.* 2006). ***Le métabolisme primaire est un élément majeur de la qualité des fruits et représente une cible prioritaire d'amélioration de leur qualité*** (Beauvoit

*et al.* 2018), ***d'autant que les réactions impliquées dans le métabolisme primaire sont hautement conservées entre les espèces de fruits*** (Beauvoit *et al.* 2018), comparativement à celles impliquées dans les voies secondaires qui présentent une diversité beaucoup plus grande (Verpoorte R. 2000; Beauvoit *et al.* 2018).

Le métabolisme primaire des fruits varie selon les espèces et les stades de développement (Roch *et al.* 2019). Par exemple, les dynamiques des profils métaboliques au cours du développement de plusieurs fruits comme le kiwi (Nardozza *et al.* 2013), la pêche (Desnoues et al,2014), la tomate (Carrari *et al.* 2006), le raisin (Dai *et al.* 2013), le melon (Dai *et al.* 2011), la fraise (Fait *et al.* 2008), la pomme (Zhang *et al.* 2010) et les citrus (Albertini *et al.* 2006) diffèrent les uns des autres au niveau du métabolisme primaire. Aussi, des comparaisons faites par Nardozza et al. (2010) pour des fruits botaniquement similaires ont montré que le kiwi accumule de grandes quantités d'amidon sur une longue période de croissance, ne stocke que des quantités limitées de sucres solubles et que sa pression osmotique est principalement déterminée par l'accumulation des acides organiques. A contrario, la tomate stocke peu d'amidon et seulement pendant une courte période de sa croissance pour accumuler progressivement des sucres solubles tout au long de son développement. Le raisin, le melon, la pêche, la fraise et les citrus accumulent la quasi-totalité du carbone sous forme de sucres solubles et d'acide organiques (Albertini *et al.* 2006; Deluc *et al.* 2007; Fait *et al.* 2008; Dai *et al.* 2011; Lombardo *et al.* 2011; M Li *et al.* 2012) au cours de leur première phase de développement pour les uns ou durant tous leurs stades de développement pour les autres. ***Ainsi***, ***pour mieux appréhender comment la qualité s'élabore chez les fruits charnus, il serait intéressant de comparer au cours du développement du fruit les processus impliqués dans le métabolisme primaires d'espèces biologiquement différentes***. De telles comparaisons devraient aider à identifier les principaux points de régulations, par exemple en ce qui concerne les compromis possibles entre croissance et qualité gustative des fruits, dans la perspective d'améliorer la qualité des fruits.

Bien que le rapport entre les sucres et les acides organiques soit très important pour le goût (Beauvoit *et al.* 2018), il est frappant de constater que pour une grande diversité d'espèces, les consommateurs préfèrent des fruits avec une concentration élevée en solides solubles totaux principalement riche en sucres solubles (Kader 1999; Crisosto *et al.* 2003; Crisosto and Crisosto 2005; Crisosto *et al.* 2006, 2007; Grechi *et al.* 2008). Les sucres solubles occupent une position centrale dans le métabolisme primaire des fruits (Beauvoit *et al.* 2018). Ils représentent un groupe de composés majeur (Coombe 1976) de la pulpe et fournissent les

précurseurs métaboliques essentiels à la synthèse d'autres composés liés à la qualité du fruit (acides organiques, anthocyanes, composés aromatiques ; Dai et al. 2016). De ce fait, ***la compréhension de l'élaboration de la qualité gustative des fruits passe par l'étude des mécanismes impliqués dans l'accumulation des sucres solubles.***

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont rapporté que les concentrations en sucres solubles dans les fruits charnus dépendent de trois processus majeurs à savoir l'importation de sucre, le métabolisme des sucres et la dilution par l'eau (Génard *et al.*, 2003; Quilot *et al.*, 2004; Dorey *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2016). Cependant, le métabolisme des sucres considéré par ces auteurs n'individualise pas le métabolisme de l'amidon qui pour certaines espèces de fruits charnus s'avère être le déterminant majeur de leur concentration en sucre et donc de leur qualité.
En effet, la dégradation de l'amidon au début de la maturation est une source majeure de sucres et d'énergie (Hill and Rees 1994; Nardozza *et al.* 2010; Jourda *et al.* 2016). Le stockage transitoire de l'amidon pendant le développement de certains fruits comme la pomme (Stevenson *et al.* 2006), la banane (Gibert *et al.* 2009) et le kiwi (Nardozza *et al.* 2010), est une stratégie qui permet d'augmenter la concentration en sucre et donc la qualité du fruit à maturité (Davies and Cocking 1965; Ho and Hewitt 1986; Ho 1988; Robinson *et al.* 1988; Bertin *et al.* 2009; Bertin and Génard 2018). ***Dans ces conditions, pour comprendre le mécanisme d'accumulation des sucres solubles chez les fruits charnus, il convient de prendre aussi en compte le métabolisme de l'amidon.*** Néanmoins, l'accumulation de l'amidon est très variable selon les espèces et certaines espèces de fruits comme la pastèque, les agrumes (El-Otmani *et al.* 2011), le melon (Rosa 1928), l'ananas (Moyle *et al.* 2005) et le raisin (Hunter *et al.* 1995) ne stockent quasiment pas d'amidon (Hubbard *et al.* 1990), ce qui soulève la question de savoir quelles sont les autres sources de carbone qui peuvent être à l'origine de l'augmentation de la concentration en sucre chez ces dernières.

De plus, l'amidon est un composé non osmotiquement actif, qui s'accumule dans de nombreuses espèces à des niveaux élevés pendant la croissance des fruits (Nardozza *et al.* 2010; Jourda *et al.* 2016). La croissance du fruit étant dépendante de l'accumulation des composés osmotiquement actifs (Coombe 1976), ***on peut se demander quelles sont les stratégies suivies par les espèces qui accumulent beaucoup d'amidon (banane, kiwi, pomme), peu d'amidon (tomate, nectarine) et très peu ou quasiment pas d'amidon (raisin, pastèque, agrumes) pour croître en taille.***

C'est pourquoi nous nous sommes également intéressés au processus de croissance. Celle-ci est très différente selon les espèces, certaines produisant des petits fruits comme les myrtilles, framboises, fraises, …, d'autres de gros fruits comme les ananas, citrouilles, … Les courbes de croissance sont également très variées, elles peuvent être assez continues, ou présenter des croissances de type exponentielle, linéaire ou mixant les deux (Lakso *et al.* 1995), logistiques simple ou double, … La croissance peut durer longtemps comme chez les citrus ou le kiwi ou bien être très courte comme chez la fraise. La croissance dépend de l'accumulation d'eau ainsi que des sucres. D'une part, les sucres sont des substrats importants pour la construction et la maintenance des cellules, mais aussi pour leur rôle comme osmoticum. Par ailleurs, vu sous l'angle de la qualité, la croissance détermine le poids final du fruit, critère commercial important, et influe sur la concentration en sucres par son action de dilution.

***La croissance du fruit résulte des bilans de carbone et d'eau qui dépendent fortement des caractéristiques biophysiques du fruit*** (conductances pour les transports, plasticité des tissus pour la croissance, respiration, transpiration, …). ***Il faut donc bien comprendre comment ces caractéristiques varient selon les espèces et comment cela agit sur les flux de carbone et d'eau entrant ou sortant du fruit.*** C'est un domaine assez complexe car selon les périodes du cycle de développement et les espèces, on peut avoir différent modes d'alimentation en carbone du fruit (par la voie symplastique ou apoplastique ; Zhang *et al.* 2006), différentes contributions du xylème et du phloème au flux d'eau entrant (Morandi *et al.* 2012; Brüggenwirth *et al.* 2016), des intensités de pertes d'eau transpiratoire très variable, ainsi que la possibilité d'un flux inverse du fruit vers la plante via le xylème (backflow ; Lang 1990).

Nous avons fait le choix d'analyser cette complexité en utilisant la modélisation écophysiologique. Celle-ci est basée sur une représentation mécaniste des processus et décrit comment les composantes du système interagissent les unes avec les autres de façon causale pour produire un résultat donné. Les simulations peuvent être considérées comme la création d'un monde possible construit *in silico* à l'aide de modèles mathématiques pour représenter formellement les aspects pertinents du système réel à l'étude. Au cours des dernières décennies, la modélisation de la croissance de la masse sèche a reçu une attention particulière dans le domaine de l'écophysiologie des fruits (Gary *et al.* 1998; Marcelis *et al.* 1998). Par contre, à ce jour, seuls quelques modèles simulent l'accumulation d'eau en considérant (i) l'absorption d'eau et la transpiration par unité de surface de fruit comme constante (Lee 1990) ou comme variable (Génard and Huguet 1996), (ii) la force motrice résultant de la différence

du potentiel hydrique entre la tige et le fruit, et (iii) le rôle de l'anatomie des fruits (Bussières 1994). Un modèle de croissance des fruits intégrant à la fois l'accumulation de matière sèche et d'eau dans le fruit a été développé par Fishman and Génard, (1998) et affiné pour la croissance de plusieurs espèces de fruits (Liu *et al.* 2007; Hall *et al.* 2013; De Swaef *et al.* 2014). Certains modèles permettent également de prédire la douceur et l'acidité des fruits (Génard and Soulty 1996; Etienne *et al.* 2014). Cependant, à de rares exceptions près, la composition des fruits est encore absente de la plupart des modèles. Notre choix a été d'utiliser le modèle SUGAR de Génard and Soulty, (1996) qui simule la variation des concentrations en sucres dans les fruits et le modèle de croissance de Fishman and Génard, (1998) comme points de départ de notre travail de modélisation.

Les avancées faites dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans l'accumulation des métabolites primaires au cours de la croissance du fruit ont fait l'objet d'une publication à laquelle j'ai participé dans le Journal Annals of Botany sous la forme d'une revue intitulée «Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits». Cette revue présentée en annexe1, détaille et étaye les points mentionnés ci-dessus.

## Objectifs de la thèse

**La problématique de ma thèse est de mettre l'accent sur les traits impliqués dans la diversité de croissance et d'accumulation des métabolites en particuliers les sucres solubles et l'amidon, observés chez différentes espèces de fruits charnus.**

Pour atteindre cet objectif, nous avons dans un premier temps déterminé les grands types de traits impliqués dans les processus de croissance et d'accumulation des métabolites qu'il conviendra de mesurer ou de rechercher dans la littérature scientifique. Ces traits concernent à la fois les pertes en eau (avec la conductance cuticulaire du fruit), les pertes en carbone associées à la respiration (coefficients de respiration de croissance et de maintenance), la masse fraîche et sèche du fruit, la dynamique d'accumulation des composés biochimiques (sucres, amidon et acides) etc... Afin de prendre en compte la variabilité interspécifique, dix

espèces biologiquement différentes présentant des quantités contrastées en amidon, en sucres solubles, en masse sèche et fraîche ainsi que des durées de croissance différentes ont été récoltées de l'anthèse à la maturité.

Dans un deuxième temps, nous avons modifié le modèle SUGAR développé par Génard et Soulty (1996) afin de prédire les concentrations en sucres solubles et en amidon des dix espèces suivies. Le modèle est ensuite utilisé pour faire une analyse (1) des différences inter-spécifiques des paramètres métaboliques et (2) des différents processus impliqués dans la construction de la concentration en sucres solubles (incluant l'importation de sucre et la dilution par l'eau). Ceci nous a permis de proposer des profils de traits métaboliques des espèces, de les comparer et de proposer sur cette base des hypothèses sur les différences de fonctionnement métabolique des espèces.

Par la suite, nous avons couplé ce modèle générique de sucre et amidon au modèle biophysique de croissance de fruit développé par Fishman and Génard (1998). Le couplage de ces deux modèles nous a permis de prédire la croissance en masse fraîche et sèche des dix espèces suivies tout en prenant en compte les variations des concentrations en sucres et en amidon tout au long du développement des fruits. Le modèle couplé est ensuite utilisé pour faire une analyse (1) des différences inter-spécifiques des paramètres biophysiques liés à la croissance et (2) des différents processus impliqués dans la croissance (mode de déchargement des sucres, flux d'eau, rôle de l'amidon).

Cette approche de modélisation nous a permis d'estimer des traits difficiles à mesurer expérimentalement (plasticité des tissus par exemple) et de quantifier les différents flux (transpiration, flux xylémien et phloémien, flux de synthèse et dégradation de l'amidon, …) afin de pouvoir comparer les processus temporels liés aux stratégies de croissance et d'accumulation des métabolites primaires (sucres / amidon) des espèces.

La finalité de cette thèse est d'apporter des éléments de compréhension sur la contribution du métabolisme primaire à la croissance et à la qualité des fruits, ainsi que les différences de fonctionnement rencontrées chez les dix espèces de fruits charnus étudiées.

## Organisation du manuscrit

Ce manuscrit est organisé en 3 chapitres principaux.

Le chapitre I décrit les aspects expérimentaux avec la présentation de l'ensemble des mesures qui ont été réalisées (traits biophysiques et biochimiques). L'ensemble de ces données recueillies à servir de base pour les travaux de modélisations des chapitres II et III.

Le chapitre II présente sous la forme d'un article (soumis) le modèle de sucre générique développé au cours de cette thèse et permettant de prédire la teneur en sucres solubles et en amidon de 10 espèces de fruit contrastées.

Le chapitre III présente sous la forme d'un article (à soumettre) le modèle couplé sucre-croissance permettant de prédire la croissance en masse fraîche et sèche de 10 espèces de fruit contrastées tout en prenant en compte les variations des concentrations en sucres et en amidon au cours du développement des fruits.

Enfin, la conclusion générale des travaux et les perspectives de ce travail sont présentées.

*Chapitre I : Matériels et Méthodes : Caractérisation Biophysique et Biochimique des Fruits Charnus.*

## Introduction

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet ANR FRIMOUSS dont l'objectif a été de comparer et modéliser la croissance et le métabolisme primaire des fruits charnus, afin d'identifier les points de contrôle et les leviers possibles pour l'amélioration de leur qualité organoleptique.

Dans ce cadre, 10 espèces de fruits charnus contrastées ont été choisies afin de fournir un large spectre de traits de fruit, qui incluent la dynamique de croissance (simple ou double sigmoïde), l'endoreduplication (absence/présence), la crise climatérique (absence/présence), le stockage transitoire de l'amidon (quantités remarquables ou traces), la durée de croissance du fruit (de quelques semaines à plusieurs mois), la douceur, l'acidité, ….

L'objectif du phénotypage a été de caractériser, au cours du temps, 1) la croissance et le développement du fruit, 2) l'évolution de son métabolisme primaire en terme de concentration en métabolites (sucres, acides organiques, amidon,…) et 3) les traits biophysiques impliqués dans la croissance et l'élaboration de la qualité du fruit. Les analyses biochimiques relatives à la caractérisation du métabolisme primaire ont été conduites à l'INRA de Bordeaux (plateforme Metabolomes).

## Matériel végétal

Cette étude a été menée sur 10 espèces de fruits charnus : fraise (*Fragaria* × *ananassa*. cv Gariguette), concombre (*Cucumis sativus* L. cv Aljona), tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker), aubergine (*Solanum melongena* L. cv Monarca RZ), kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. cv Hayward), poivron (*Capsicum annuum* L. cv Gonto Clause), pomme (*Malus x domestica* Borkh. cv Golden), nectarine (*Prunus persica* L. cv Nectarlove), raisin (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon) et clémentine (*Citrus clementina* hort. cv SRA 63). Les expérimentations et les récoltes ont été menées sur toutes les espèces en 2016 à l'exception de la tomate, cultivée en 2010 (Biais *et al.* 2014). Le choix des différentes variétés a été fait soit en raison de leur intérêt commercial, soit en raison des études exhaustives déjà réalisées sur certaines d'entre elles (Biais *et al.* 2014; Colombié *et al.* 2015, 2017).

## Conditions de culture

Les expérimentations ont été réalisées en France sur des vergers de nectarine (INRA Avignon), de pomme (INRA Gotheron), de kiwi (verger commercial près de Sainte Livrade) et de clémentine (INRA San Giuliano), en serre pour le raisin (INRA Bordeaux), le concombre (CTIFL Carquefou), la tomate, l'aubergine et la fraise (INVENIO Sainte Livrade) et en tunnel pour le poivron (INVENIO Sainte Livrade) (voir Figure 1). Toutes les espèces ont été cultivées selon des pratiques commerciales, à l'exception du raisin (Ollat *et al.* 1998), cultivé comme boutures fruitières (voir le Tableau 1 pour les conditions de culture). Selon les espèces, la durée de croissance peut nécessiter moins de 100 jours après l'anthèse (fraise, tomate, poivron, concombre, aubergine) à plus de 100 jours après l'anthèse (raisin, clémentine, kiwi, pomme, nectarine) pour atteindre la maturité.

Figure 1 : Photographie des différentes cultures réalisées au cours de l'année 2010 pour la tomate et 2016 pour toutes les autres cultures. En serre pour la tomate, la fraise, l'aubergine, le raisin et le concombre (INVENIO, INRA de Bordeaux EGFV, CTIFL), en tunnel pour le poivron (INVENIO), et en verger (INRA de Valence, INRA d'Avignon, INRA San Giuliano, et verger commercial près de Sainte Livrade) pour la pomme, la nectarine, la clémentine et le kiwi au cours de l'année 2016. Crédit photos Gilles Vercambre (tomate), Léa Roch (aubergine, poivron, concombre, clémentine, kiwi, raisin).

**Tableau 1 : Condition de culture**

| Espèce | Variété | Site | Type de serre/verger | Densité de plantation | Age des arbres | Date de plantation | Type de sol/Substrat | Irrigation | Fertilisation | Date de Floraison |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tomate** | Moneymaker | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Serre en verre | 2 plants/m² | - | 30/04/2010 germination, transfert de plantules le 4 juin 2010 | Laine de roche | Goutte à goutte, alimentation en eau adaptée au climat | Solutions nutritives comme pour la production commerciale | Première semaine de juin 2010 |
| **Fraise** | Gariguette | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Serre en verre | 10 plants/m² | - | 9/12/2015 (trayplants) | Tourbe/écorce 60/40 | Goutte à goutte avec 2 goutteurs par sac de 6 plantes. Déclenché par différents modes selon la période : - cyclique (toutes les 60 à 120 min de 8h30 à 18h environ) et par solarimètre (qui rajoute des irrigations supplémentaires selon un seuil et une accumulation de rayonnement) temps d'irrigation de 5 min avec débit goutteur de 2 l/h. | Fertilisation à chaque irrigation avec une conductivité EC de 1,5 mS pendant la période de développement végétatif et de 1,3 mS pendant la période de fructification et de production. | Semaine 5 en 2016 |
| **Poivron** | Gonto (Clause) | INVENIO Ste Livrade (Lot et Garonne) | Tunnel plastique 8m | 1.8 plant/m² | - | Semis 09/02/2016 Plantation 20/04/2016 | Sol limono-sableux | Goutte à goutte : 2-3 irrigations par jour de 15-20 min à 4,5 mm/h/m². | Fertilisation des sols et par irrigation goutte à goutte (90 kg/ha N) | 15/05/2016 |
| **Clémentine** | SRA 63 | INRA Corsica | Verger | 6 m x 4 m | 35 ans | 19/03/1981 Porte-greffe de Poncirus trifoliata | Sol fersialitique à texture sablo-limoneuse | Arrosage par aspersion sous feuillage selon les pratiques culturales commerciales en utilisant le bilan hydrique. 397 mm fournis entre le 30/05/2016 et le 13/09/2016, espacés d'environ 2 semaines, 20 mm à 47 mm chacun | Ammonitrate 33% Avril : 270 kg Juillet : 140 kg Août : 140 kg | 03/05/2016 |
| **Concombre** | Aljona | CTIFL Nantes (Loire Atlantique) | Serre en verre, chauffée | 1.25 plant/m² | - | 15/06/2016 | Laine de roche | Irrigation au goutte-à-goutte sur le contrôle du solarimètre, environ 15 fois par jour | Dans le circuit d'irrigation avec une conductivité EC de 2,5-3,0 mS/cm (2,8-3,2 dans le drainage) et un pH de 5,5 (5,8-6,0 dans le drainage). Concentrations (meq/L) : NO3 18, NH4 0,1, P 0,9, K 8, Ca 13, plus micronutriments | Semaine 27 en 2016 |

**Tableau 1 : Condition suite**

| Espèce | Variété | Site | Type de serre/verger | Densité de plantation | Age des arbres | Date de plantation | Type de sol/Substrat | Irrigation | Fertilisation | Date de Floraison |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **kiwi** | Hayward | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Verger | 500 plants/ha (5 m entre lignes et 4 m entre les arbres sur la ligne) | 18 ans | 2000 | Sol limono-sableux | Aspersion sur frondaison pour lute anti-gel si besoin - Brumisseurs sous frondaison pour irrigation : pilotage par sondes enterrées | Février 2018 : 2 t/ha d'engrais organique (2-0,5-1, N-P-K) Printemps/Eté : 6 apports de 50 kg/ha/semaine de nitrate de potassium (13-0-46, N-P-K) par ferti rrigation | Semaine 20-21 en 2016 |
| **Nectarine** | Nectarlove | INRA Avignon (Vaucluse) | Verger | 571 arbres/ha (distance de plantation 5 m x 3.5 m) | 4 ans | 2013 porte-greffe GF677 | Sol homogène, limono-argilo-sableux Profondeur d'enracinement 75-90 cm | Irrigation par micro-aspersion : 0, 1 ou 2 par semaine au printemps et 3 fois par semaine en été. Irrigation pendant 6-7 h au printemps et 4 h en été | 120 kg N/ha, 22,5 kg P2O5/ha, 45 kg K2O/ha. | 15/03/2016 |
| **Aubergine** | Monarca RZ F1 (Rijk Zwaan) | INVENIO Ste Livrade (Lot et Garonne) | Serre en plastique | 1.2 plant/m² | - | 10/03/2016 Greffé à 80 jours, porte-greffe KNVF | Fibre de coco | Irrigation goutte à goutte déclenchement cyclique (toutes les 60 à 80 min de 08:30 à 17:30 environ) et par solarimètre pour des irrigations supplémentaires en cas de fort rayonnement ou un temps d'irrigation plus court (25 min) en cas de faible rayonnement Durée d'irrigation de 6 à 7 min avec débit goutteur de 2 l/h et 5 goutteurs pour 3 plantes | Dans le circuit d'irrigation, avec une conductivité EC de 2,5 mS/cm au début de la culture et de 2 mS pendant la production de fruits. Concentrations de la solution nutritive (meq/L) : NO3 11,8, Mg 3,46, K 7,1, Ca 6,5, SO4 3,36, H2PO4 1,31, Cl 0,55, Na 0,2, plus micronutriments | 05/04/2016 |
| **Pomme** | Golden delicious | INRA Valence (Drôme) | Verger | 1000 arbres /ha (distance de plantation 5 m x 2 m) | 11 ans | Plantation en janvier 2005 de scions d'un an | Sol homogène sablo-limoneux, peu profond et caillouteux provenant d'anciens sédiments érodés Profondeur d'enracinement 40 cm | Irrigation par micro-aspersion | 45 kg N/ha; 50 kg P2O5/ha, 65 kg K2O/ha | 18/04/2016 |
| **Raisin** | Cabernet Sauvignon | INRA Bordeaux Villenave d'Ornon (Gironde) | Serre en verre | Boutures de racines en pots de 1 l (10cm x 10 cm) | - | 09/02/2016 | Sable : perlite : vermiculite (1:1:1 ; v:v:v) | Irrigation goutte à goutte avec une solution nutritive 5 fois par jour pendant 2 min. Pleinement irrigué | Concentrations de la solution nutritive (mM) : 1,20 N, 0,57 P, 1,75 K, 1,23 Ca, 0,69 Mg, 1,27 Cl, 0,99 S, plus micronutriments | 05/05/2016 |

## Récolte des fruits et mesures

Les prèlévements des fruits au cours de leur croissance ont été répartis selon les espèces entre 3 laboratoires de l'INRA : UR 1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles (nectarine, pomme, clémentine et concombre), UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (aubergine, fraise, kiwi et poivron) et UMR 1287 Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne (raisin).

J'ai été en charge du suivi de la croissance, ainsi que de la récolte et du conditionnement des échantillons de pomme, nectarine, clémentine et concombre destinés aux analyses biochimiques. Des mesures de traits écophysiologiques caractérisant les processus liés à la croissance et à l'accumulation des métabolites ont également été réalisées (voir Tableau 2).

Tableau 2 : Mesures réalisées pour caractériser la croissance, ainsi que des variables et traits gouvernant les flux et la croissance des fruits.

| | |
|---|---|
| Date d'anthèse | |
| Dimension fruit | [mm] |
| Masse fraîche | [g] |
| Masse sèche | [g] |
| Surface du fruit | [cm²] |
| Potentiel hydrique de base | [bar] |
| Potentiel hydrique minimal de tige | [bar] |
| Potentiel hydrique du fruit | [bar] |
| Pression osmotique du fruit | [bar] |
| Conductance cuticulaire du fruit | [cm/h] |

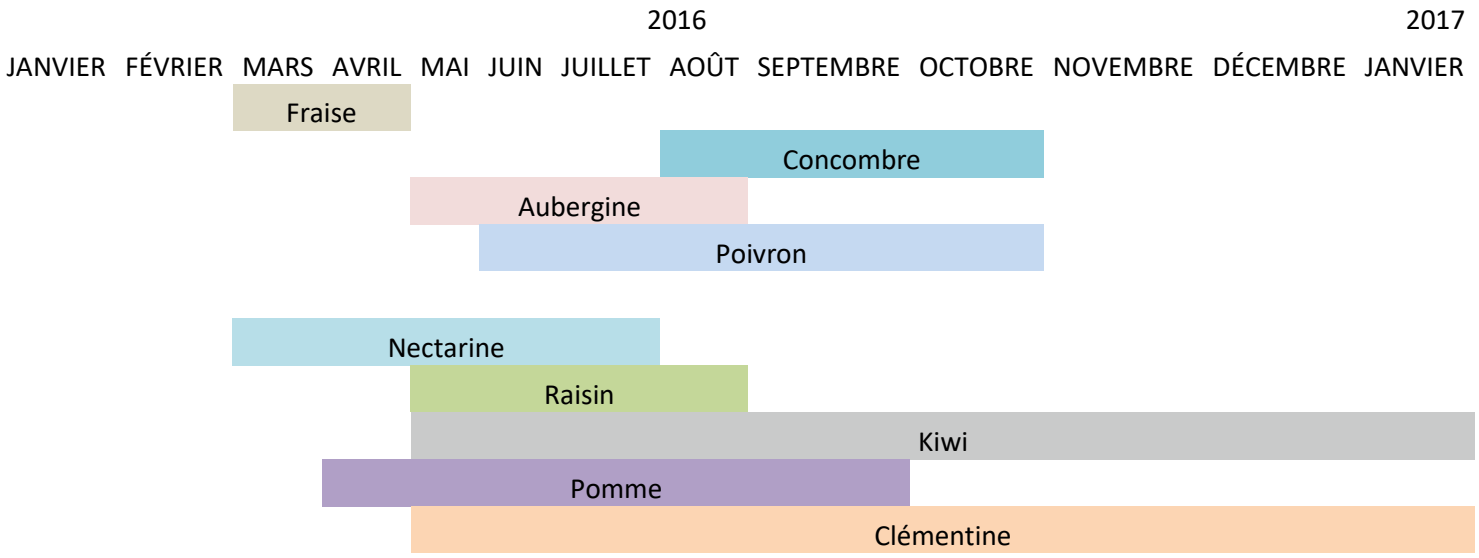
Selon l'espèce, 9 à 16 dates de prélèvement au cours du développement des fruits ont été effectuées pour les mesures de croissance et les analyses métabolomiques. La tomate (Biais *et al.* 2014), la fraise, le concombre, l'aubergine, le kiwi, le poivron, la pomme, le raisin, la clémentine et la nectarine ont été récoltés à partir de l'anthèse ou pendant leur jeune âge jusqu'à leur maturité. Pour chaque espèce, le stade de développement a été identifié comme étant le nombre de jours après l'anthèse (DAA). A chaque date de récolte, cinq réplicats biologiques ont été préparés, avec un minimum de 4 fruits par réplicat (sauf pour le

concombre qui a au moins 2 fruits par réplicat) et un maximum de 100 fruits par réplicat selon l'âge du fruit. Les fruits des plantes situés en bordure des vergers/placettes ont été exclus lors de l'échantillonnage des fruits. Lors des prélèvements d'échantillons de pulpes pour les analyses métabolomiques, des mesures physiques (**masse fraîche**, **hauteur et diamètre**) ont été prises rapidement sur chacun des fruits. Les péricarpes ont ensuite été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant cryobroyage, lyophilisation et analyses biochimiques. La lyophilisation a permis de mesurer la teneur en matière sèche. **La masse sèche** des fruits a été calculée à partir de la teneur en matière sèche et de la masse fraîche mesurée. Parallèlement à ces récoltes, des fruits de différents âges ou de différentes masses ont été prélevés soit à la même date ou à des dates de croissance différentes chez toutes les espèces sauf le kiwi pour l'estimation de la conductance cuticulaire (voir Tableau 3). Sur les fruits de pomme, nectarine, clémentine, concombre et raisin, des mesures de potentiel hydrique et de pression osmotique (WP4C, Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, USA et Löser OM-815) ont également été réalisées (sur au moins 5 fruits par espèce) (voir Tableau 3).

Tableau 3 : Nombre de dates de mesures réalisées pour caractériser le potentiel hydrique de la plante (Plante Ψmin/Ψmax) et du fruit (Ψ fruit), la pression osmotique du fruit (∏ fruit) et la conductance cuticulaire (g) des fruits. * à une date de mesure donnée, une ou plusieurs cohortes de fruits ont été récoltée (s) selon l'espèce pour l'estimation de la conductance cuticulaire du fruit (g).

| Espèce | Plante Ψmin/Ψmax | ∏ fruit | Ψ fruit | g* |
|---|---|---|---|---|
| Pomme | 8 | 9 | 7 | 9 |
| Nectarine | 4 | 4 | 2 | 7 |
| Clémentine | 8 | 10 | 7 | 8 |
| Concombre | 1 | 9 | NA | 2 |
| Raisin | Thèse Dai, ZhanWu 2009 | 11 | NA | 15 |
| Fraise | NA | NA | NA | 1 |
| Tomate | NA | NA | NA | 3 |
| Aubergine | NA | NA | NA | 10 |
| Poivron | NA | NA | NA | 14 |
| Kiwi | NA | NA | NA | NA |

Tableau 4 : période de récolte des fruits.




## Suivi des Conditions climatiques

Les conditions environnementales ont un effet important sur la croissance des plantes et des fruits (Wang and Camp 2000). La température de l'air est en particulier un facteur déterminant dans l'émergence des organes (phyllochrone) et dans les processus métaboliques (Mittler *et al.* 2012). L'humidité relative de l'air et le rayonnement sont des variables clés affectant la transpiration de la plante, du fait de la demande climatique et du bilan d'énergie. La photosynthèse est également fortement affectée par le rayonnement ainsi que par la température.

La température et l'hygrométrie ont été mesurées dans les vergers par les différentes stations du réseau INRA et dans les serres ou tunnel par les stations d'expérimentation (INVENIO, INRA de Bordeaux EGFV, CTIFL) de façon continue, au cours du développement des espèces. Les fruits cultivés dans des serres ou tunnel sont sous conditions environnementales semi-contrôlées tandis que les fruits cultivés dans des vergers sont soumis aux aléas climatiques (faible/forte températures, faible humidité relative, fort rayonnement global). De fortes variations de la température et de l'humidité relative ont été observées entres espèces au cours de la journée et durant leur développement (Figure 2).

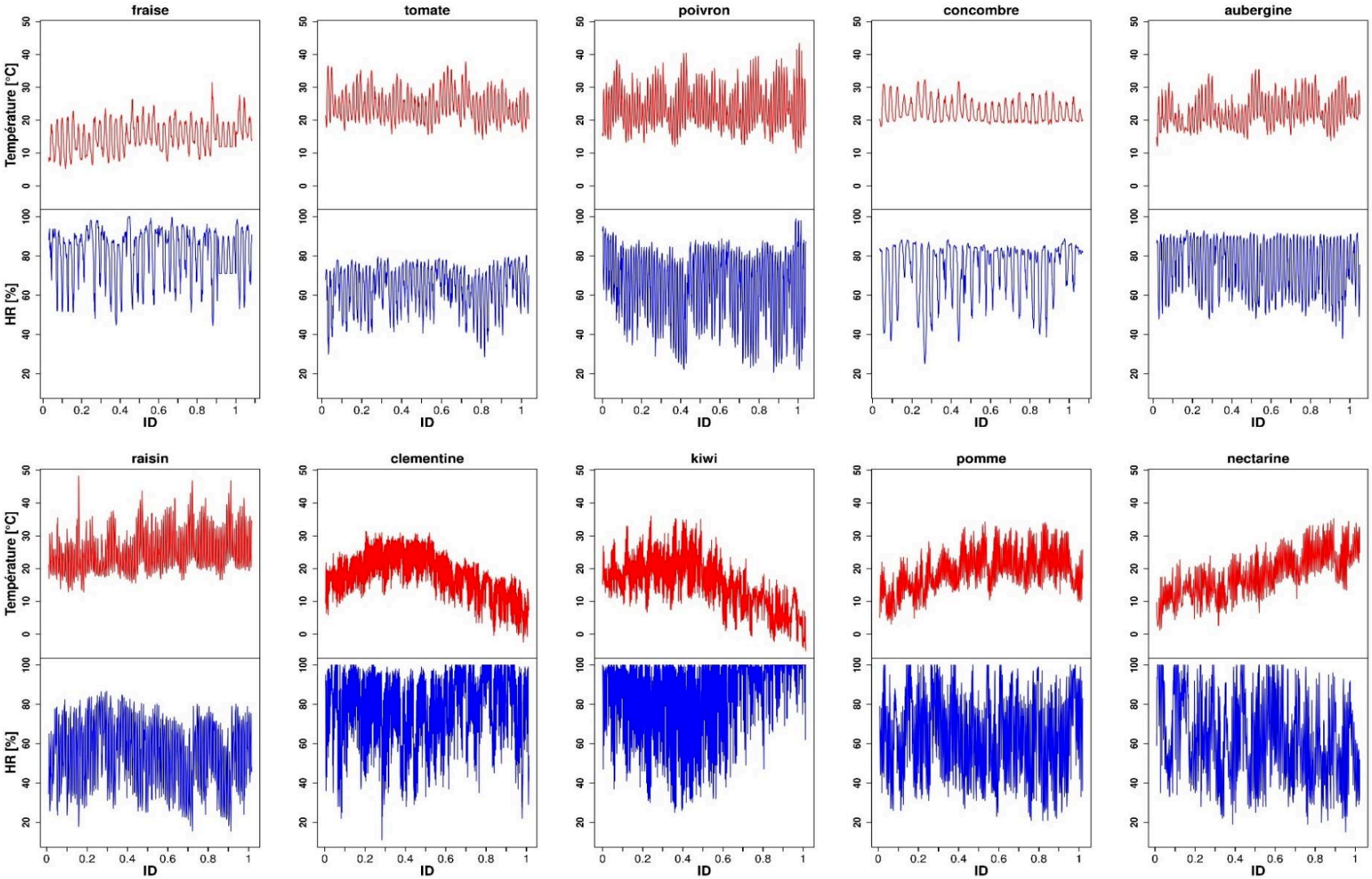



Figure 2 : Suivi des variables climatiques température (°C en rouge) et humidité relative (% en bleu) pour les espèces cultivées en serre (fraise, tomate, poivron, concombre, aubergine et raisin) et en verger (clémentine, kiwi, pomme et nectarine) au cours de la culture. ID est l'indice de développement et représente le temps de développement normalisé par rapport à la durée de croissance entre l'anthèse et la récolte finale du fruit mûr.

Les variables climatiques sont plus stables dans le temps pour les espèces cultivées sous serres ou tunnel (fraise, tomate, poivron, concombre, aubergine et raisin) que pour les espèces cultivées dans les vergers (clémentine, kiwi, pomme et nectarine) (Figure 2). Ceci est dû d'une part au mode de culture sous serre, avec la possibilité de réguler au moins partiellement le climat. D'autre part, les espèces qui ont été cultivées à l'extérieur sont des espèces à durée de croissance longue, qui subissent donc des fortes variations de températures avec les saisons selon leur stade de développement. Hormis les espèces dont les stades de développement peuvent s'étaler jusqu'à la période hivernale (kiwi et clémentine, voir Tableau 4), la température chez les espèces cultivées sous serres ou tunnel à respectivement varié entre (5.3 - 31.4°C) pour la fraise, (14.2 – 37.9°C) pour la tomate, (10 – 43.5°C) pour le poivron, (18 – 32.4°C) pour le concombre, (12.1 - 35.5°C) pour l'aubergine et (12.9– 48.2°C) pour le raisin, contre (3.1 – 34.2°C) pour la pomme et (1.2 - 35.3 °C) pour la nectarine cultivées dans les vergers. La température des espèces se développant durant la période hivernale a varié entre (-2.4 – 31.4°C) pour la clémentine contre (-5.1– 36°C) pour le kiwi. Quelque soit l'espèce, les valeurs d'humidé relative observées sont très variables suivant les conditions climatiques.

Pour la clémentine et le kiwi, la température a progressivement augmenté à 31.4°C pour la clémentine et 36°C pour le kiwi autour de 40% de leur indice de développement, pour ensuite descendre jusqu'à en dessous de 0°C à la récolte (100% de maturité) (voir Figure 2), en période hivernale. Chez la pomme et la nectarine, en revanche, la température a augmenté tout au long du développement du fruit avec juste une faible baisse pour la pomme à 90% de sa maturité (Figure 2). Les températures à la récolte pour la nectarine et la pomme correspondent respectivement aux températures estivales et de fin de période estivale (voir Tableaux 3). Chez les autres espèces, à durée de croissance courte, des fluctuations de température et humidité ont été observées au cours de la journée, mais les valeurs sont restées globalement stables au cours de la période de culture (voir Figure 2).

## Mesures Biophysiques

### Caractérisation du statut hydrique de la plante

L'importation d'eau dans le fruit à partir du xylème de la plante est due à la différence des potentiels hydriques entre le fruit et la plante. Le potentiel hydrique est un indicateur biologique largement utilisé pour déterminer le statut hydrique de la plante (Turner 1981). Plus le potentiel

hydrique des feuilles ou tiges de la plante est négatif, plus la plante est soumise à un déficit hydrique important (Carrière *et al.* 2019) et donc moins l'eau est disponible pour le fruit. Le potentiel hydrique de la plante dépend fortement des conditions environnementales, telles que la teneur en eau du sol, le rayonnement, la température et l'hygrométrie ambiante. Le potentiel hydrique à l'aube (potentiel de base) est généralement considéré comme représentatif du potentiel en eau du sol dans la rhizosphère (Tardieu *et al.* 1990). Le potentiel hydrique foliaire mesurée au midi solaire (potentiel minimal) dépend non seulement du potentiel hydrique du sol mais aussi de la conductance hydraulique des plantes et de la demande évaporative (Martiınez-Vilalta *et al.* 2014).

Dans notre étude, l'irrigation a toujours été gérée de façon à ne pas avoir de déficit hydrique. L'état hydrique de la plante a été évalué à l'aide d'une bombe de Scholander (Scholander et al. 1965) tout au long du développement de la pomme, la clémentine, le concombre et la nectarine. Le principe consiste à placer la feuille détachée aussitôt récoltée dans une enceinte. La pression dans la chambre est augmentée jusqu'à voir la sève revenir à la base du pétiole de la feuille. A ce moment, la pression exercée correspond au potentiel hydrique de la feuille. Les mesures ont été réalisées avant le lever du soleil (potentiel de base) et au midi solaire quand la demande climatique pour la plante est la plus forte. Pour les mesures au midi solaire, les feuilles ont été ensachées dans un sac plastique recouvert d'une feuille d'aluminium avant le lever du soleil ou au moins 90 minutes avant la prise de la mesure (Naor et al. 2008), de manière à ce que le potentiel hydrique de la feuille soit en équilibre avec le potentiel hydrique de la tige qui porte le fruit. Au moins deux feuilles sur 5 arbres choisis aléatoirement ont été prélevées lors de chaque mesure de potentiel hydrique (Voir Figures 3A).

Figure 3 : mesures de potentiel hydrique minimal des feuilles (A) et mesures de potentiel hydrique des fruits (B).

### Caractérisation du statut hydrique du fruit

Des mesures de potentiel hydrique ont été également réalisées sur les fruits de pomme, clémentine, tout au long de leur développement et sur les derniers stades de développement de la nectarine (voir Tableau 3). Le potentiel hydrique des fruits a été mesuré sur des morceaux de pulpe fraîche à l'aide d'un appareil mesurant le point de rosée (WP4C, Decagon Devices, Inc. Pullman, Washington, USA) (Figure 3B). Les mesures de potentiel hydrique du fruit ont été faites sur des fruits récoltés dans la matinée.

### Mesures de la pression osmotique

La pression osmotique est l'une des composantes du potentiel hydrique. Elle est principalement déterminée par l'accumulation des composés solubles en particulier sucres, acide organiques et ions qui sont des déterminants majeurs de la qualité du fruit. Elle influence la pression de turgescence du fruit, et impacte fortement les flux d'eau et donc le taux de croissance du fruit.

Les mesures de pression osmotique ont été réalisées pour la pomme, la clémentine, le concombre, le raisin et la nectarine à l'aide d'un osmomètre à point de congélation (Cf. protocole de mesure à l'annexe 2).

### Estimation de la conductance cuticulaire du fruit

La conductance cuticulaire des fruits joue un rôle majeur dans les pertes d'eau par transpiration du fruit qui est une composante majeure du bilan hydrique des fruits et donc de leur croissance

et de leur concentration en composés solubles (Crisosto et al. 1994; Rebucci et al. 1998; Lescourret et al. 2001; Li et al. 2002).

Nous avons estimé pour chacune des espèces sauf le kiwi, la conductance cuticulaire du fruit (voir protocole à l'annexe 3) par perte de masse. Les mesures ont été réalisées sur des fruits détachés en suivant la méthode de Jones and Higgs (1982) et Lang (1990) selon laquelle il n'y a pas de différence significative de la transpiration du fruit observée entre des fruits attachés à l'arbre et des fruits détachés de l'arbre.

Pendant l'expérience, les fruits détachés ont été soumis à un mouvement d'air suffisamment fort pour pouvoir négliger la résistance de la couche limite (Gibert et al. 2005) (voir Figure 4). A la fin de l'expérience, la peau de chaque fruit a été pelée (voir Figure 5) pour mesurer sa surface. Les mesures de perte de masse, d'humidité relative de l'atmosphère ambiante, de la température ambiante et la surface du fruit, nous ont permis alors d'estimer la conductance cuticulaire (Ben-Yehoshua *et al.* 1985; Lescourret *et al.* 2001; Gibert *et al.* 2005) selon l'équation suivante (Cf protocole de mesure à l'annexe 3) :

$$g = \frac{J}{A_f * \frac{M_W}{RT} * VPD} \; [cm.h^{-1}] \quad (1)$$

avec $J$ (g.h$^{-1}$) la transpiration du fruit, $Af$ la surface du fruit (cm$^2$), $Mw$ la masse molaire moléculaire de l'eau (18.02 g.mol$^{-1}$), $R$ la constant des gaz parfaits (83.14 cm$^3$.bar.mol$^{-1}$.K$^{-1}$), $T$ la température (K), $VPD$ (bar) représente le déficit de pression de vapeur d'eau entre le fruit et l'atmosphère, et g (cm.h$^{-1}$) la conductance du fruit (pour un gradient de concentration exprimé en vapeur d'eau).

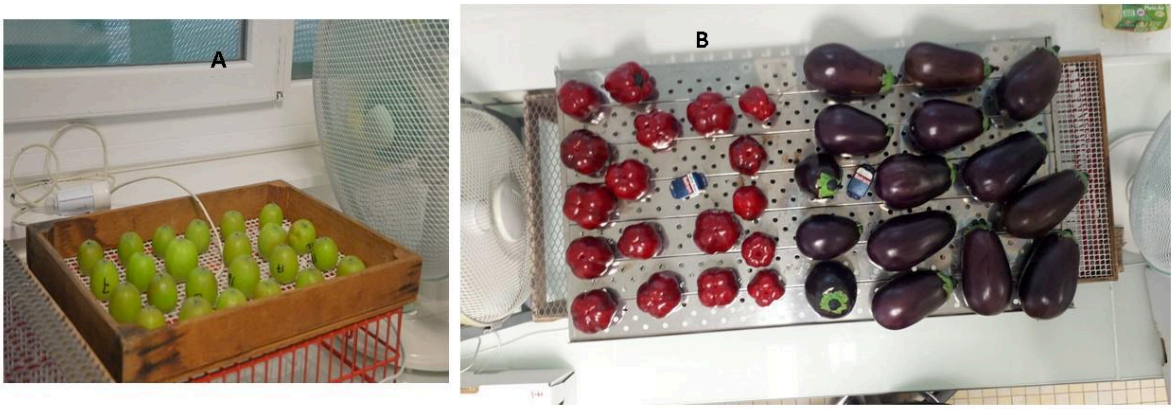



Figure 4 : mesures de perte de masse de la pomme (A) et des fruits de poivrons et d'aubergines (B)

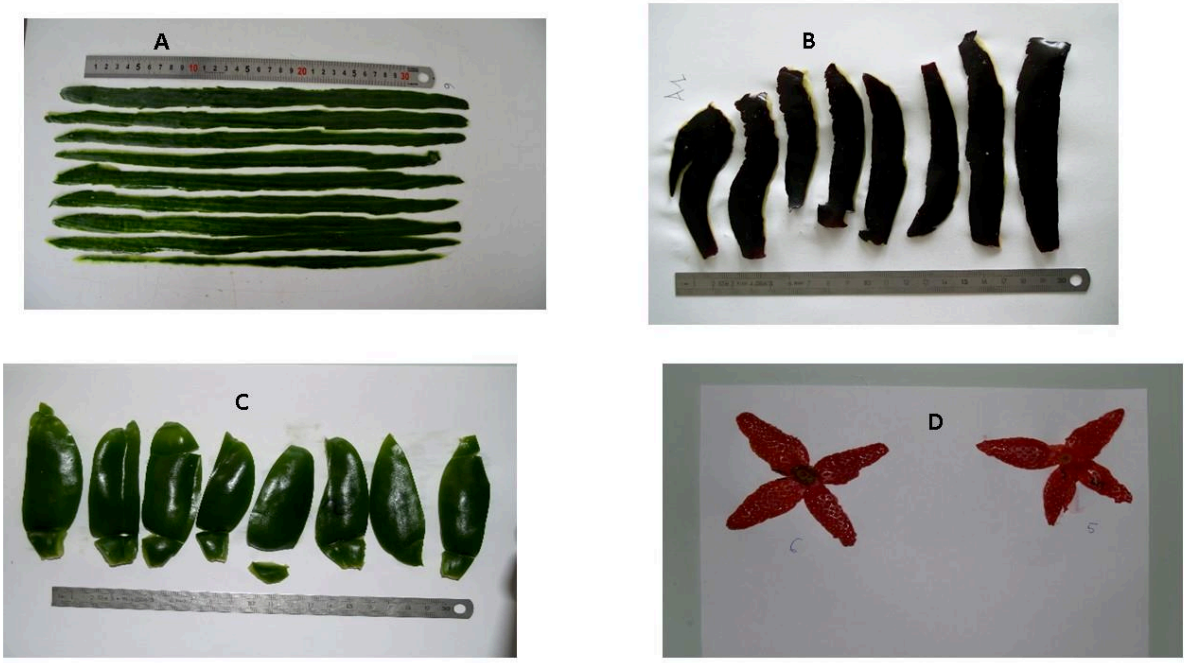



Figure 5 : Fruits épluchés pour le concombre (A), l'aubergine (B), le poivron (C) et la fraise (D).

Des relations allométriques entre différentes grandeurs du fruit (diamètre, hauteur, masse, volume) ont été testées pour estimer la surface du fruit. C'est le cas par exemple de la relation allométrique qui existe entre la surface du fruit et sa masse fraîche (Fishman and Génard 1998)

$$Af = \gamma * Mf^{\eta} \qquad (2)$$

Ainsi à partir des données de masse fraîche récoltée, nous avons pu estimer **la surface du fruit** tout au long de son développement en ayant estimé au préalable les paramètres $\gamma$ $et$ $\eta$ (Figure 6) grâce à la fonction (nls) implémentée dans R.

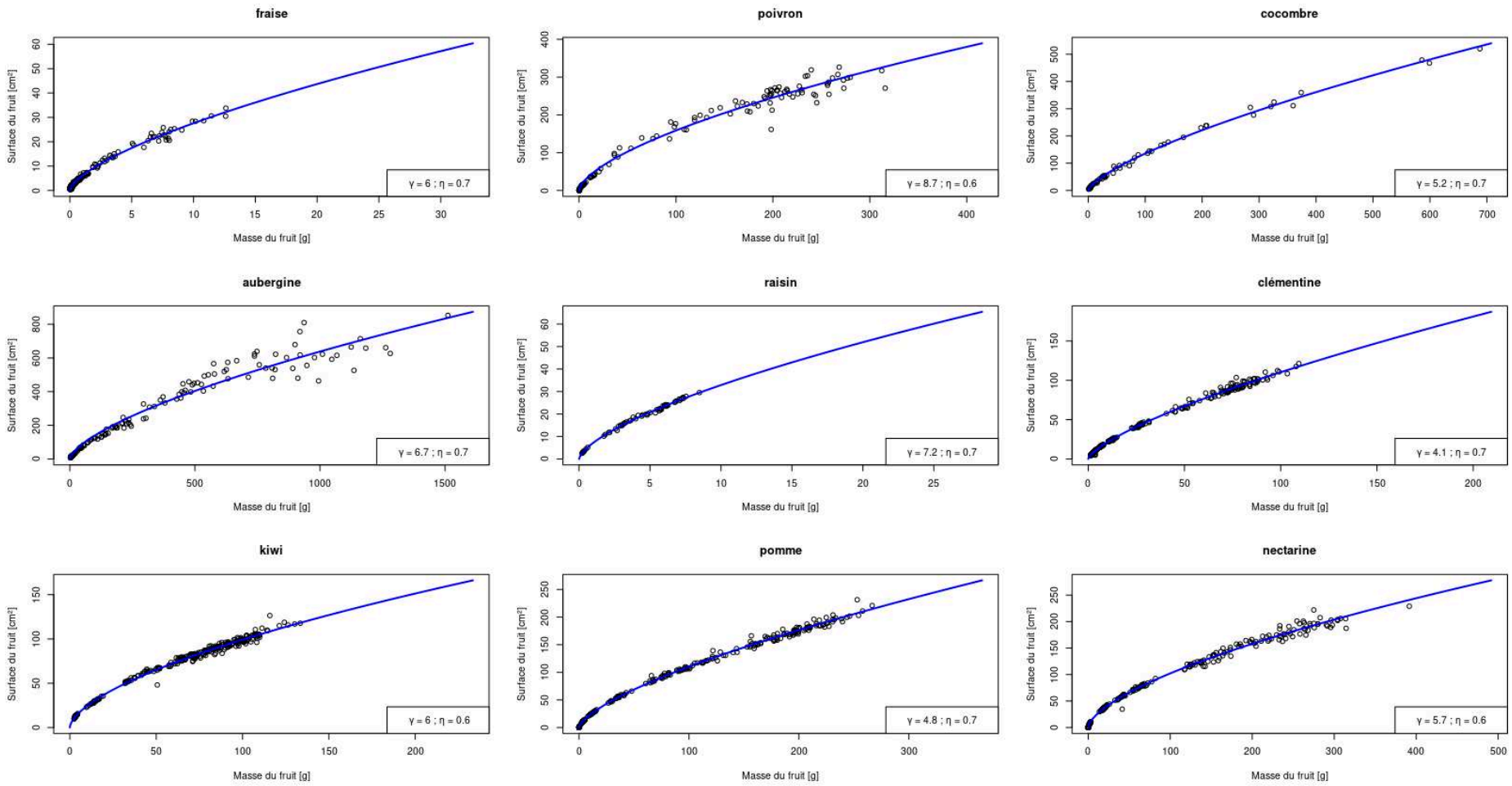



Figure 6 : Estimation de la surface ($cm^2$) du fruit en fonction de sa masse fraîche (g).

## Analyses Biochimiques

### Quantification des métabolites primaires

Parallèlement aux traits biophysiques, la concentration des métabolites primaire a été aussi quantifiée tout au long du développement des10 espèces de fruit. Les mesures ont été conduites à la plateforme de métabolomique (https://metabolome.cgfb.u-bordeaux.fr/) de l'INRA de Bordeaux.

Les métabolites ont été mesurés selon le protocole présenté dans Biais *et al.* (2014). Brièvement, les métabolites ont été extraits à partir d'aliquotes de 20 mg de poids frais à l'aide d'un protocole de fractionnement à base d'éthanol. Les essais ont été réalisés avec des microplaques à l'aide d'un robot de pipetage (Star 96 ML 6649 Hamilton, Villebon sur Yvette, France) pour quantifier les principaux traits métaboliques. Le glucose, le fructose et le saccharose ont été déterminés dans les surnageants selon Stitt *et al.* (1989), le sorbitol selon Desnoues *et al.* (2014). L'amidon a été déterminé dans les granulés après solubilisation du NaOH et hydrolyse enzymatique (Hendriks *et al.* 2003).

Toutes ces mesures relatives aux caractéristiques biophysiques et biochimiques des fruits ont servi de base d'une part pour la construction d'un modèle générique Sucres solubles – Amidon développé dans le chapitre II et d'autre part à l'extension du modèle biophysique de croissance de Fishman and Génard (1998) couplé avec le modèle Sucres solubles – Amidon détaillé dans le chapitre III.

# *Chapitre II : comparaison assistée par modèle des dynamiques d'accumulation de sucre dans dix fruits charnus*

*Chapitre II* **: Comparaison entre espèces des dynamiques d'accumulation du sucre et de l'amidon**

Le chapitre II présente une comparaison assistée par modèle des dynamiques d'accumulation de sucre dans dix fruits charnus. Cette partie a été soumise au journal Annals of Botanny.

Dans cette partie, nous avions examiné si la comparaison des principaux processus physiologiques impliqués dans l'élaboration de la qualité des fruits pourrait expliquer les variations des profils de concentration en sucre et en amidon chez les espèces climactériques et non climactériques. Pour ce faire, nous avons proposé un modèle simple d'accumulation de sucre dans les fruits, de l'apport en carbone des végétaux au métabolisme interne des fruits (synthèse et dégradation de l'amidon et synthèse de composés autres que le sucre et l'amidon). Le modèle a été appliqué avec succès à 10 espèces contrastées et utilisé pour les comparer en fonction de leur profil métabolique. Les espèces herbacées (concombre, tomate, poivron, aubergine et fraise) ont été caractérisées par des taux de synthèse élevés alors que les espèces ligneuses (pomme, nectarine, clémentine) et les lianes (raisin et kiwi) ont des taux de synthèse faibles.

L'inspection de la dynamique des processus impliqués dans l'accumulation du sucre a révélé que les processus nets d'importation, de métabolisme et de dilution du sucre étaient remarquablement synchrones dans les plantes annuelles, alors que dans le kiwi, la pomme et la nectarine, les processus liés au métabolisme de l'amidon étaient temporairement séparés des autres processus. La fraise, la clémentine et le raisin ont montré une dynamique distincte par rapport à toutes les autres espèces. Dans l'ensemble, ces résultats permettent de mieux comprendre les stratégies de régulation propres à chaque espèce et le rôle du métabolisme de l'amidon dans l'accumulation des sucres solubles dans les fruits charnus.

**Title: Model-assisted comparison of sugar accumulation patterns in ten fleshy fruits highlights differences between annual and perennial species**

**Running title: Inter-species comparison of sugar and starch accumulation patterns**

**Authors**: Coffi Belmys CAKPO[1], Gilles VERCAMBRE[1], Valentina BALDAZZI[1,2,3], Léa ROCH[4], Pierre VALSESIA[1], Mohamed-Mahmoud MEMAH[1], Sophie COLOMBIÉ[4], Annick MOING[4,5], Yves GIBON[4], Michel GENARD[1,*]

[1] *INRA, UR1115, Unité Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Avignon, France*

[2] *Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, Institut Sophia Agrobiotech, Sophia-Antipolis, France*

[3] *Université Côte d'Azur, Inria, INRA, Sorbonne Université, BIOCORE, Sophia-Antipolis, France*

[4] *INRA, Univ. Bordeaux, UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, Villenave d'Ornon, France*

[5] *Bordeaux Metabolome Facility– MetaboHUB, Villenave d'Ornon, France*

* corresponding author: michel.genard@inra.fr

## Abstract

Background and Aims

Sugar composition is a key determinant of fruit quality. Soluble sugars and starch concentrations in fruits vary greatly from one species to another. The aim of this paper was to investigate similarities and differences in sugar accumulation strategies across ten contrasting fruit species using a modeling approach.

Methods

We developed a coarse-grained model of primary metabolism based on the description of the main metabolic and hydraulic processes (synthesis of other compounds than sugar and starch, synthesis and hydrolysis of starch, water dilution) involved in the accumulation of soluble sugars during fruit development.

Key Results

Statistical analyses based on metabolic rates separated the species into six groups accordingly to the rate of synthesis of compounds other than sugar and starch. Herbaceous species (cucumber, tomato, eggplant, pepper and strawberry) were characterizes by a high synthesis rate whereas woody (apple, nectarine, clementine) and vine (grape and kiwi) species plants had low synthesis rate. Inspection of the dynamics of the processes involved in sugar accumulation revealed that net sugar importation, metabolism and dilution processes were remarkable synchronous in annual plants, whereas in kiwi, apple and nectarine, processes related to starch metabolism were temporally separated from other processes. Strawberry, clementine and grape showed a distinct dynamic compared to all other species.

Conclusions

Overall, these results provide new insights into species-specific regulatory strategies and on the role of starch metabolism in the accumulation of soluble sugars in fleshy fruits. In particular, inter-specific differences in development time shape the coordination among metabolic processes and affect priorities for carbon allocation across species. The six metabolic groups identified by our analysis do not show a clear separation into climacteric and non-climacteric species, possibly suggesting that the metabolic processes related to sugar concentration are not tightly affected by ethylene-associated events.

Key words: sugar metabolism, starch metabolism, sugar uptake, water dilution, inter-species, model, fleshy fruit, cross-species

## Introduction

Soluble sugars are one of the major components of fruit pulp (Coombe, 1976) that provide essential precursors for the synthesis of many other compounds including organic acids, amino acids and structural components. In fleshy fruits, sugar content is most important in terms of fruit taste (Yin et al. 2010) as it largely determines their sweetness at harvest (Vizzotto *et al.* 1996; Kobashi *et al.* 2002; Li *et al.* 2012). For a wide diversity of species, consumers prefer fruits with high concentrations of total soluble solids, which mainly consist of soluble sugars (Kader 1999; Crisosto *et al.* 2003, 2006, 2007; Grechi *et al.* 2008)

The amount of total soluble sugars usually changes with fruit development, peaking at ripening (Schaffer *et al.* 1999; Bertin *et al.* 2009; Dai *et al.* 2016). However, sugar accumulation patterns and concentrations differ among species (Coombe 1976; Bertin *et al.* 2009; Nardozza *et al.* 2010; Dai *et al.* 2016). For example, Dai et al., (2016) observed a continuous and exponential increase in the concentration of soluble sugar in cherry tomato until maturity, while in peach, the concentration of soluble sugar fluctuated much less, and decreased during fruit development. At maturity, grape can attain elevated soluble sugar concentration (~1.16 mmol/gFW; Coombe 1976), while peach and tomato have, respectively, moderate (~0.5 mmol/gFW; Quilot et al. 2004) and low (~0.12 mmol/gFW) soluble sugar concentrations (Biais *et al.* 2014).

In order to understand species differences in sugar concentrations, we must first understand the processes involved in the build-up of fruit composition and their variations across species. In recent years, numerous studies have reported that sugar concentrations vary throughout fruit development according to three major processes (Génard *et al.* 2003; Quilot *et al.* 2004; Dorey *et al.* 2015; Dai *et al.* 2016).

First, photoassimilates are imported into the fruit, following different phloem unloading mechanisms (Lalonde et al., 2003; Ma et al., 2018). The nature of photoassimilates itself as well as their concentration can vary across species (Zimmermann and Milburn 1975), although sucrose remains the main form of carbon found in the phloem of most species (Walker and Ho 1978; Jensen *et al.* 2013; Zanon *et al.* 2015).

Second, once imported, photoassimilates are metabolized into others types of compounds to fuel fruit growth and development (Walker and Ho 1978; Sturm 1999; Dai *et al.* 2016). Although the metabolism of the photoassimilates shares similar reaction pathways associated with common enzymes, such as sucrose synthase, invertase or hexokinases, variations exist among species depending on the nature of the imported soluble sugars (e.g., sorbitol in Rosacea fruit) (Dai et al., 2016). In addition, the evolution of enzymatic activities during fruit development may differ significantly from one species to another (Hawker 1969; Moriguchi *et al.* 1990, 1992; Gao *et al.* 1999; Dai *et al.* 2013; Nardozza *et al.* 2013; Desnoues *et al.* 2014; Wang *et al.* 2018). The metabolism of photoassimilates imported from the phloem is in fact a complex process that is generally characterized by three steps interrelated by feedback loops. The first step converts imported sugars from the phloem into hexoses and UDP-glucose in different compartments of the fruit such as apoplasm, symplasm or vacuole (Yamaki 2010). The second step consists in the synthesis of many different metabolic

compounds, such as starch, organic acids, cell walls and secondary metabolic compounds from previously formed hexoses (Walker and Ho 1978; Sturm 1999; Dai *et al.* 2016). The third step consists in the remobilization of certain metabolic compounds such as starch (Nardozza et al., 2010), organic acids (Matsui *et al.* 1979) and lipids (Wind *et al.* 2010) during fruit development. Although the remobilization of organic acids (Matsui et al., 1979) and lipids (Wind et al., 2010) may influence the concentration of soluble sugars during fruit development, starch remobilization represents by far the main source of soluble sugars re-synthesis, particularly during the last developmental stages (Beaudry *et al.* 1989; Knee 1993; Defilippi *et al.* 2004; Saraiva *et al.* 2013). For example, numerous studies on tomato have found a positive correlation between the maximum starch content accumulated at the beginning of fruit development and the final content of soluble sugars during fruit ripening (Davies and Cocking, 1965; Ho and Hewitt, 1986; Ho, 1988; Robinson et al., 1988; Bertin et al., 2009; Bertin and Génard, 2018). In bananas, the total soluble sugar content increased from 1.8 to 18.6% between the beginning of development and fruit maturity, with a concomitant decrease in starch content during ripening (Prabha and Bhagyalakshmi, 1998). Thus, increasing the starch pool in immature fruits, could be a strategy to increase sugar levels in mature fruits (Petreikov et al., 2009). It is important to note that the accumulation of starch varies greatly depending on the species. For some species, such as citrus fruit (El-Otmani et al. 2011), grape (Hunter et al. 1995), pineapple (Moyle et al. 2005), melon (Rosa 1928) or muskmelon (Hubbard et al. 1990), starch accumulation is almost absent or limited to the very early developmental stages. In these species the synthesis of soluble sugars is mainly driven by the import of external photoassimilats (Hubbard et al. 1990). On the opposite, large amounts of starch could be accumulated during fruit development, up to more than 85% of the dry mass for banana (Gibert et al. 2009). Between these extremes, large variations occur, in term of content and pattern (Stevenson et al. 2006; Gibert et al. 2009; Bertin et al. 2009; Nardozza et al. 2010; Bertin and Génard 2018).

The third and last mechanism that contributes to sugar concentration is water dilution, which results from an increase of the fruit volume (Génard et al., 2003, 2014). Many studies showed that sugar concentration in fruit usually decreases in proportion to water supply (Blanco et al., 1989; Li et al., 1989; Crisosto et al., 1994; Wei et al., 2017) but the importance of water dilution depends on the dynamics of the fruit growth and thus varies with the species and environmental conditions.

Understanding the differences and similarities of sugar accumulation strategies across fruit species can help to identify key physiological processes, common regulatory mechanisms as well as possible trade-offs, in the perspective of improving fruit quality (Roch et al. 2019). In spite of such a potential, only few works have addressed the issue of species comparison to date. One reason for this resides in the difficulty of resuming differences both in the nature of the physiological process involved (diversity of the molecules and enzymes) as well as in their duration, across different species. In Klie et al. (2014), the temporal evolution of 16 common metabolites (including soluble sugars, organic acids and amino acids) were compared across 4 different species using a statistic approach. In Dai et al. (2016), process-based modelling was applied to different varieties of peach, tomato and grape and used to dissect the accumulation of soluble sugars into 3 elementary processes (sugar importation, metabolism and water dilution). In addition to these interspecific comparison work, intra-specific comparisons have been carried out in several species (peach: Quilot et al., 2004; grape: Sadras et al., 2008; tomato: Prudent et al., 2011) using an ecophysiological modelling approach.

Genotype and species-specific strategies were highlighted corresponding to different contributions of the various processes along fruit development. However, none of these works has taken into account the role of starch metabolism in the build-up of sugar concentration. The aim of this study was to extend the work of Dai et al (2016) to account for the role of starch metabolism in sugar accumulation in fruits. For this aim, we proposed a generic sugar model explicitly describing the variation in sugar and starch concentration over time. The model was successfully calibrated on 10 contrasting species of fleshy fruits and the estimated parameters used to group or separate species according to their metabolic profile.

Finally the model was used to determine the relative contribution of five potential drivers to the observed inter-species variability in soluble sugar and starch concentrations. These five potential drivers are: (1) sugar importation, (2) synthesis of compounds other than sugar and starch, (3) synthesis of starch, (4) degradation of starch and (5) dilution.

# Materials & Methods

## Fruit Material and Growth Conditions

This study was conducted on strawberry (*Fragaria* × *ananassa*. cv Gariguette), cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Aljona), tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Moneymaker), eggplant (*Solanum melongena* L. cv Monarca RZ), kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. cv Hayward), pepper (*Capsicum annuum* L. cv Gonto Clause), apple (*Malus x domestica* Borkh. cv Golden), nectarine (*Prunus persica* L. cv Nectarlove), grape (*Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon) and clementine (*Citrus clementina* hort. cv SRA 63). The choice of the variety was made either because of their commercial interest or of the exhaustive studies already carried out on them (Biais et al., 2014; Colombié et al., 2015, 2017). Experiments were performed in France on orchard for nectarine (INRA Avignon), apple (INRA Gotheron), kiwifruit (at a commercial orchard near INVENIO Sainte Livrade) and clementine (INRA San Giuliano), in plastic tunnel for pepper (INVENIO Sainte Livrade) and in greenhouse for grape (INRA Bordeaux), cucumber (CTIFL Carquefou) and tomato, eggplant and strawberry (all three of them in INVENIO Sainte Livrade). All species have been grown according to commercial practices except for grapes (Ollat et al. 1998), cultivated as fruiting cuttings (see Supplementary table 1 for culture conditions). These species are representative of different types of fleshy fruit, such as non-climacteric (pepper, eggplant, cucumber, grape, clementine) and climacteric fruits (apple, kiwifruit, tomato, nectarine), making them biologically significant for comparison.

## Fruit Harvest and Sample Processing

Depending on the species, 9 to 16 sampling dates were monitored along fruit development. Tomato (Biais et al. 2014), strawberry, cucumber, eggplant, kiwi, pepper, apple, clementine, grape and nectarine fruits were collected from anthesis or during their young age after flowering to their physiological stage of maturity. For each species, the developmental stage was identified as the number of days after anthesis (DAA). At each harvesting date, five biological replicates were prepared, with a minimum of four fruits per replicate except for cucumber which has at least 2 fruits per replicate. During sample preparation, physical measurements (fresh mass, height and diameters) were quickly taken on each of the fruits. Pericarps were then deep frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before cryogrinding, lyophilisation and biochemical analyses. Lyophilisation allowed measuring the dry matter

content. Sample dry matter was calculated from the dry matter content and measured fresh mass.

## Metabolite Measurements

Metabolite were measured as in Biais et al. (2014). Briefly, the metabolites were extracted from 20 mg fresh weight aliquots using an ethanol-based fractionation protocol. Assays were performed with microplates using a pipetting robot (Star 96 ML 6649 Hamilton, Villebon sur Yvette, France) to quantify major metabolic traits. Glucose, fructose and sucrose were determined in the supernatants according to Stitt et al. (1989), sorbitol according to Desnoues et al. (2014). Starch was determined in the pellets after NaOH solubilization and enzymatic hydrolysis (Hendriks et al. 2003).

## Description of the model

The proposed generic model (see Fig.1) is a modification of the SUGAR model previously developed on peach by Génard and Souty (1996). The fruit pericarp is described as a single compartment connected to the mother plant, from which it receives carbon and water. The net carbon inflow (ΔCI) to the fruit is defined as the difference between the carbon flow from the mother plant minus the fruit respiration. It can be computed from the experimentally measured fruit dry mass (DW) as:

$$\Delta CI = \gamma_{DM} * \frac{dDM}{dt} \qquad (1)$$

where $\gamma_{DM}$ is the pericarp carbon concentration [$\gamma_{DM}$ = 0.45 gC gDM-1; mean value calculated from literature data (Supplementary table 2)], and dDM/dt (in gDM h-1) is the pericarp growth rate.

The net carbon inflow to the fruit is then used as substrate for (i) the synthesis of soluble sugars (Msol, in gC), ii) the synthesis of starch (Msta, in gC) and iii) for the metabolic pathways involved in the synthesis of compounds other than soluble sugars and starch (Moc in gC, e.g., acids, structural carbohydrates, and proteins) . Moreover, the starch in the fruit could be degraded to provide carbon back in the form of soluble sugars (see Fig. 1, for a schematic representation of the model)

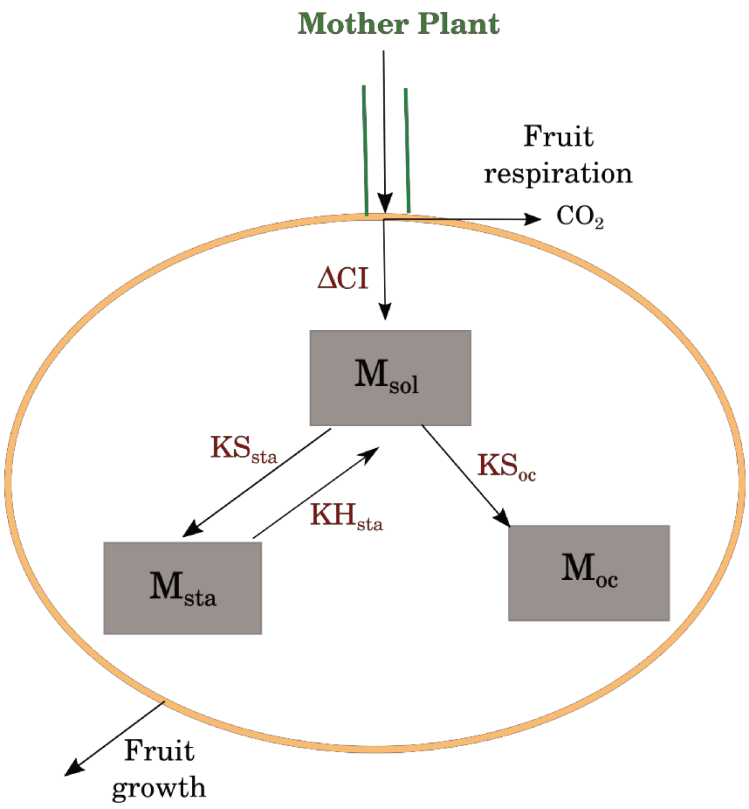



Figure 1: Model representation showing the net carbon inflows (ΔCI), the reversible reaction between sugar (Msol) and starch (Msta) and the conversion of sugar into compounds other than sugar and starch (Moc).

Accordingly, the rates of change of Msol, Msta and Moc are given by:

$$\frac{dM_{sol}}{dt} = \Delta CI + KH_{sta} * M_{sta} - \left(KS_{oc}(t) + KS_{sta}(t)\right) * M_{sol} \qquad (2)$$

$$\frac{dM_{sta}}{dt} = KS_{sta}(t) * M_{sol} - KH_{sta} * M_{sta} \qquad (3)$$

$$\frac{dM_{oc}}{dt} = KS_{oc}(t) * M_{sol} \qquad (4)$$

where t is the time [in hours after anthesis], KHsta (g.g-1.h-1 ) is the starch hydrolysis rate defined as a constant according to Hall et al., (2006) , KSsta (t) (in g.g-1.h-1) is the starch synthesis rate, and KSoc (t) (in g.g-1.h-1) is the rate of consumption of sugars for synthesis of compounds other than sugar and starch.

Following Prudent et al. (2011), KSoc (t) was assumed to depend on the fruit relative growth rate as:

$$KS_{oc}(t)=\lambda.\left(\frac{dDM}{dt}.\frac{1}{DM}\right)^{\eta} \qquad (5)$$

where $\lambda$ and η (both dimensionless) are species-dependent parameters.

Following Hall et al. (2006), we assumed that $KS_{sta}(t)$ varied according to the fruit age as:

$$KS_{sta}(t) = \frac{1}{as-bs*t+cs*t^2} \qquad (6)$$

For any compound x ( x= soluble sugars, starch or other compounds), we can define its content CxDM and its concentration CxFM as

$$C_{xDM} = \frac{100.M_x}{\sigma_x.DM} \qquad (7)$$

$$C_{xFM} = \frac{100.M_x}{\sigma_x.FM} \qquad (8)$$

where $\sigma_x$is the carbon content of the compound x and FM is the fresh mass of the fruit. In particular, $\sigma_{sol} = 0.4$ gC g-1, and $\sigma_{sta} = 0.444$gC g-1 (Figueroa-Torres et al., 2017).

Accordingly, the rate of variation of starch and soluble sugar concentrations can be decomposed into the contribution of five physiological processes as:

$$\frac{dC_{solFM}}{dt}=i(t)+h_{sta}(t) - s_{sta}(t) - s_{oc}(t) - \mu(t)C_{solFM} \qquad (9)$$

$$\frac{dC_{staFM}}{dt} = \frac{\sigma_{sol}}{\sigma_{sta}} s_{sta}(t) - \frac{\sigma_{sol}}{\sigma_{sta}} h_{sta}(t) - \mu(t)C_{staFM} \qquad (10)$$

where

$i(t) = \frac{100}{\sigma_{sol}}\frac{\gamma DM}{FM}\frac{dDM}{dt}$ is the net carbon uptake (g gFW-1 h-1)

$h_{sta}(t) = \frac{100}{\sigma_{sol}}\frac{KH_{sta}}{FM}M_{sta}(t)$is the starch hydrolysis

$s_{sta}(t) = \frac{100}{\sigma_{sol}}\frac{KS_{sta}(t)}{FM}M_{sol}(t)$ is the starch synthesis,

$s_{oc}(t) = \frac{100}{\sigma_{sol}}\frac{KS_{oc}(t)}{FM}M_{sol}(t)$ is the synthesis of compounds other than soluble sugars and starch and

$\mu(t) = \frac{1}{FM(t)}\frac{dFM}{dt}$ is the relative fruit growth rate in fresh mass.

From the above equations, we can define the mean process contribution to sugar soluble accumulation as:

$$\text{IMP}=\frac{1}{T_m}\int_0^{T_m} i\,(t)\text{dt},\text{H}_{\text{sta}}=\frac{1}{T_m}\int_0^{T_m} h_{\text{sta}}\,(t)\text{dt},\text{S}_{\text{sta}}=\frac{1}{T_m}\int_0^{T_m} s_{\text{sta}}\,(t)\text{dt},$$

$$S_{\text{oc}}=\frac{1}{T_m}\int_0^{T_m} s_{\text{oc}}\,(t)\text{dt},\text{DIL}=\frac{1}{T_m}\int_0^{T_m}\mu\,(t)C_{\text{solFM}}\text{dt} \qquad (11)$$

where Tm is the maturity date [hours after anthesis] and DIL is the dilution of sugars by water of the considered species.

## Model inputs

For each species, the dynamics of fruit dry and fresh mass were smoothed (Supplementary figure 1) from the experimental measurements using the constrained B-splines nonparametric regression quantiles (COBS), implemented by the cobs function in the R package “cobs” (Ng and Maechler 2007). In the case of grape and clementine, data smoothing started respectively shortly before veraison and at the formation of vesicles. Depending on the species, we varied the lambda and nknots parameters of the cobs function between the intervals [0 - 2] and [2- 7] respectively and the degree of the splines was set at 2.

## Model calibration

On the basis of the estimated values of dry mass and fresh mass along the fruit growth, the model calibration for a given species consisted in the estimation of six parameters$(\lambda,\eta,\text{KH}_{\text{sta}},\text{as},\text{bs},\text{cs})$. The performance index used in the model calibration is the Normalized Root Mean Squared Error (NRMSE), a dimensionless indicator. As defined by Wallach et al. (2014), Normalized Root Mean Squared Error can be computed as:

$$\text{NRMSE}(\%)=\frac{100*\sqrt{\frac{1}{n}*\sum(\text{Oi}-\text{Si})^2}}{\frac{1}{n}*\sum\text{Oi}} \qquad (12)$$

with Oi and Si being respectively the observed and simulated values of fruit flesh soluble sugars or starch content, and n the number of observations. Two objective functions were related to the soluble sugars (NRMSESSC) and to the starch content (NRMSESTC) of the fruit.

They are defined as follows:

$$f_1(X)=\mathrm{NRMSE}_{\mathrm{SSC}}(X)$$

$$f_2(X)=\mathrm{NRMSE}_{\mathrm{STC}}(X)$$

where $X=(\lambda,\eta,KH_{sta},as,bs,cs)^T$ is the vector of parameters to be estimated. The model calibration was therefore formulated as a multi-objective minimization problem as follows:

$$\min_{X\in D}\left(f_1(X),\mathrm{f}_2(X)\right)^T$$

Where D is the possible research space defined by the boundaries of the parameters set according to experts' declarations and/or the literature (see Table 1).

This is a difficult multi-objective optimization problem that resists classical optimization algorithms. The Non-dominated Sorting Genetic Algorithm II (NSGA-II) developed by Deb et al. (2002) has proven to be an effective and efficient multiobjective optimization algorithm. This algorithm is considered as a reference in the multi-objective optimization community. Therefore, we used this algorithm for sugar model calibration. NSGA-II algorithm was applied through the Java package jMetal with a population size set at 200 and a number of generations set at 300. As the NSGA-II algorithm is stochastic, the optimization process was repeated 200 times in the calibration phase. All solutions resulting from the calibration of the model were first pooled together and then filtered thanks to the is_dominated function of the “emoa” package (developed for R) in order to identify the Pareto-optimal set i.e. solutions allowing the best tradeoffs between calibration objectives. Then, from the Pareto-optimal set, we selected 100 solutions i.e. parameters’ combinations that minimize the sum of the objectives functions (NRMSESSC + NRMSESTC).

**Table 1.** Description of the estimated parameters and calibration boundaries for the ten fruit species.

| | | strawberry | | cucumber | | tomato | | eggplant | | kiwi | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Parameter name | description | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper |
| λ<br>dimensionless | Involved in the synthesis compounds other than sugar and starch calculus. The higher is λ, the higher synthesis compounds other than sugar and starch | 1 | 100 | 1 | 500 | 1E-05 | 200 | 1 | 500 | 1 | 500 |
| η<br>dimensionless | Involved in the synthesis compounds other than sugar and starch calculus. | 1E-08 | 1E-06 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 |
| Khsta<br>$g.g^{-1}.h^{-1}$ | Starch hydrolysis | 1E-04 | 1E-01 | 1E-08 | 1 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1 | 1E-05 | 1E-01 |
| as<br>h | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is as, the lower the starch synthesis | 4 | 10000 | 1E-08 | 1E+10 | 1E-08 | 1E+10 | 4 | 10000 | 7 | 2 000 |
| bs<br>dimensionless | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is bs, the higher the starch synthesis | -100 | -1E-01 | -500 | -1E-08 | -500 | -1E-08 | -10 | -1E-07 | -6 | -1E-06 |
| cs<br>$h^{-1}$ | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is as, the lower the starch synthesis | 1E-07 | 2 | 1E-08 | 2 | 1E-08 | 2 | 1E-07 | 2 | 1E-07 | 1E-02 |

Table 1. Continued

| | | pepper | | apple | | nectarine | | grape | | clementine | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Parameter name | description | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper | Lower | Upper |
| λ<br>dimensionless | Involved in the synthesis compounds other than sugar and starch calculus. The higher is λ, the higher synthesis compounds other than sugar and starch | 1 | 1000 | 1 | 10000 | 1 | 1000 | 1 | 10000 | 1 | 10000 |
| η<br>dimensionless | Involved in the synthesis compounds other than sugar and starch calculus. | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 | 1E-08 | 3 |
| KHsta<br>$g.g^{-1}.h^{-1}$ | Starch hydrolysis | 1E-10 | 1E-01 | 1E-07 | 1E-01 | 1E-04 | 1E-01 | 1E-07 | 1E-01 | 1E-07 | 1E-01 |
| as<br>h | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is as, the lower the starch synthesis | 1E-08 | 1E+10 | 4 | 10000 | 4 | 2000 | 4 | 10000 | 4 | 10000 |
| bs<br>dimensionless | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is bs, the higher the starch synthesis | -500 | -1E-08 | -10 | -1E-06 | -10 | -1E-01 | -100 | -1E-07 | -100 | -1E-06 |
| cs<br>$h^{-1}$ | Involved in the starch synthesis calculus.<br>The higher is as, the lower the starch synthesis | 1E-08 | 2 | 1E-07 | 2 | 1E-07 | 1E-01 | 1E-07 | 2 | 1E-07 | 2 |

### Parameter data set analysis

Due to the differences in order of magnitude between species for five parameters ($\lambda$, $KH_{sta}$, as, bs and cs), a log transformation on the values of these parameters was performed for the 100 solutions selected as explained above. A hierarchical cluster analysis (HCA) was performed on parameter data set using an Euclidean distance matrix as processed with Ward's clustering method (Murtagh and Legendre, 2014) to identify groups of species with similar parameter combinations. Principal Component Analysis using normalized and centered data ("ade4" package developed for R, Dray and Dufour, 2007) was also performed on parameter data sets in order to group or separate species according to their metabolic function.

The values of the different processes involved in the concentration of soluble sugars, namely IMP, Hsta, Ssta, Soc and DIL, were computed for each species according to Equation 11.

# RESULTS

## Model catches differences in dynamic patterns of soluble and insoluble carbohydrates across a contrasted panel of fruit species

The temporal evolution of sugar and starch content was monitored on ten fruit species during fruit development (Fig. 2). The duration and dynamic patterns were strikingly different from species to species. For most of the species, the sugar content reached a plateau during the growth period, with the exception of strawberry, apple and nectarine whose sugar content increased almost linearly until fruit maturity (Fig. 2). The sugar content of cucumber and eggplant stabilized very early (before 30% of their development) compared to tomato, kiwifruit, pepper, grape and clementine, which stabilized around or after 50% of fruit development. At maturity, a large difference in sugar content was observed across species, with a decreasing content ranging from nectarine, (78.8 g/100g DM ± 11.4), followed by clementine (65.3 g/100g DM ± 5.5), grape (63.8.1 g/100g DM ± 0), apple (55.7 g/100g DM ± 5.7), pepper (49 g/100g DM ± 1.4) strawberry (48.8 g/100g DM ± 4.2), cucumber (42.9 g/100gDM ± 7.7), eggplant (42.2 g/100gDM ± 3.5), tomato (38.3 g/100gDM ± 5.4) and kiwifruit (35.6 g/100gDM ± 1.2). Analogous variations were also observed in fruit sugar concentration but the ranking among species was modified: grape moved to the first place with a sugar concentration of (15.6 g/100gFM ± 0) whereas cucumber ranked last with only (1.3g/100gFM ± 0.2) of sugar (Supplementary figure 3).

As for soluble sugars, the dynamics of starch also showed inter-species variations, especially in the onset of starch degradation. In tomato, kiwi, apple, eggplant and nectarine, starch content showed a clear increase up to a maximum value, followed by a progressive decrease until fruit maturity (Fig.2 M, N, O, Q, R). However, for the other species net starch degradation started very early, so that the maximum starch content was reached before 30% of their development. As a consequence, for these species, the period of starch synthesis could

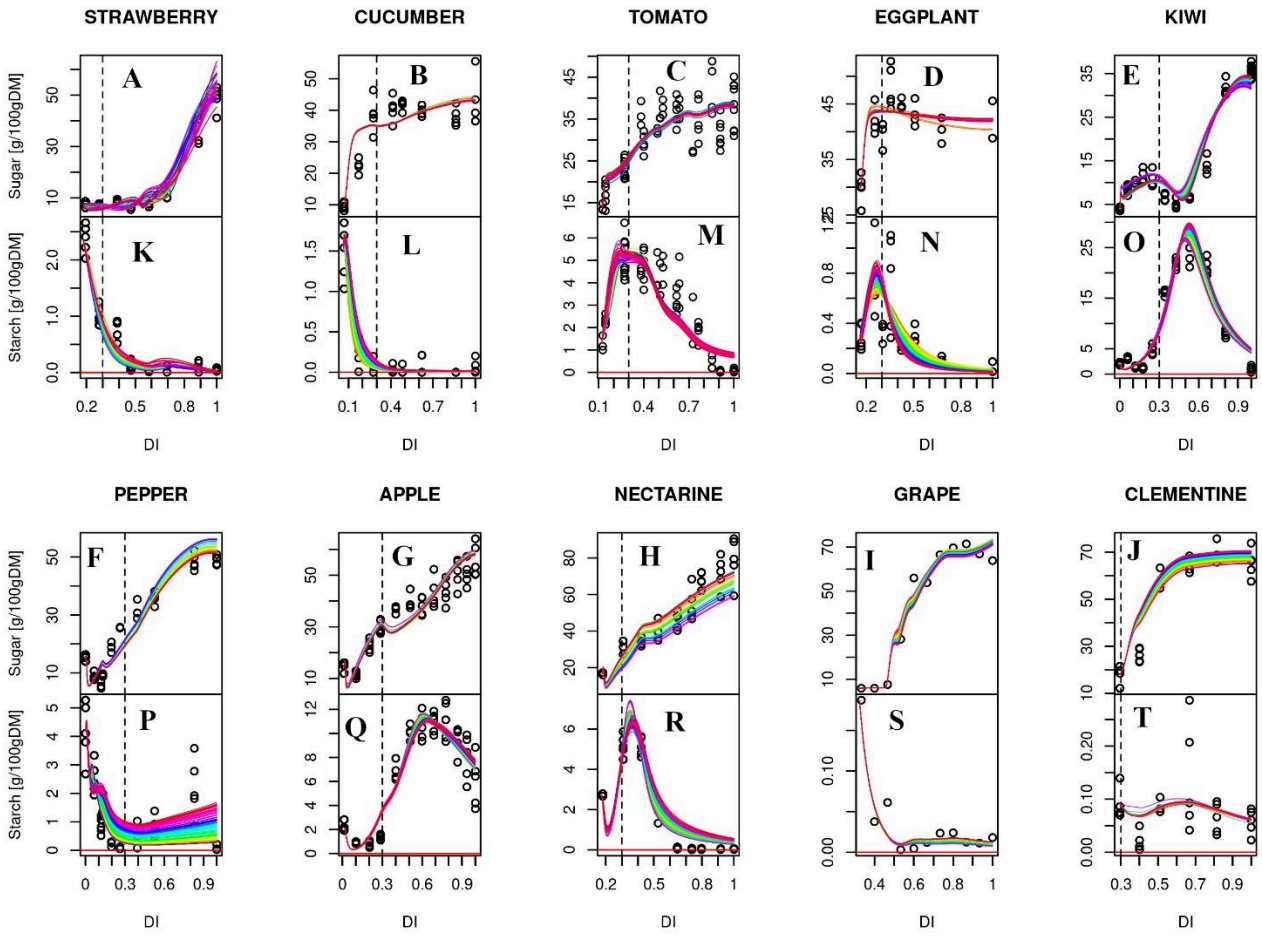



Figure 2: Developmental profiles of soluble sugar content (A-J) and starch content (K-T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. The soluble sugar and starch contents are expressed in g.100gDM-1. The black points represent the experimental data. All curves are adjustments to the soluble sugar and starch content data obtained by using the sugar model developed. Each coloured curve of a given species comes from one of the best 100 optimal solutions selected. The developmental index is developmental time normalised against the total time from anthesis to ripe fruit (36 days for strawberry, 29 days for cucumber, 55 days for tomato, 59 days for eggplant, 222 days for kiwi, 76 days for pepper, 157 days for apple, 133 days for nectarine, 105 days for grape and 253 days for clementine)

not be fully observed in our dataset (Fig. 2 K, L, P, S, and T). Nonetheless, a large difference in the maximum measured starch content was observed for kiwifruit having the highest value (23.4 g/100g DM ± 1.6 ), followed by apple (11.1 g/100g DM ± 1.4), nectarine (5.2 g/100g DM ± 0.5), tomato (5.1 g/100g DM ± 0.9), pepper (4.2 g/100g DM ± 0.9), strawberry (2.4 g/100g DM ± 0.2), cucumber (1.5 g/100g DM ± 0.3), eggplant (0.7 g/100g DM ± 0.3), grape (0.2 g/100g DM 0) and clementine (0.1 g/100g DM ± 0.1). At maturity, the starch content of most species was close to zero, except for apple that kept a substantial starch content, close to half of its maximum value.

A generic dynamic model of sugar and starch metabolism was built based on previous works on individual species (Génard et al., 2003; Quilot et al., 2004; Dai et al., 2009; Prudent et al., 2011; Wu et al., 2012) and calibrated for the ten fruit species. The proposed model is coarse-grained enough to bypass existing differences among the underlying metabolic pathways of various fruit species, but yet able to catch a large variety of dynamical patterns. Regardless of the species, indeed, the simulations of soluble sugars and starch contents matched the experimental results fairly well (Fig.2). However, the quality of the fit to sugar content was generally better for soluble sugars (median NRMSE between 9 - 21%) than for starch (median NRMSE between 20 - 66%) (Fig. 3). The NRMSE values of starch were especially high for cucumber, eggplant, grape and clementine (Fig. 3-B). For these species, the maximum measured starch content was always very low (less than 2g/100gMS) giving rise to large NRMSE value even for a small deviation from the measured data (Fig. 2).

To ensure a good exploration of the parameter space, model calibration was repeated 200 times for each species. The best 100 estimates are presented in Supplementary figure 2. The range of estimated values for parameters related to the synthesis of other compounds than sugar and starch ($\lambda$ and $\eta$), was narrow for a given species but large differences appeared between species. The values of these two parameters were high for clementine, grape, apple, nectarine and pepper species compared to kiwifruit, tomato, cucumber, eggplant and strawberry. Concerning starch metabolism, all species except pepper had starch hydrolysis parameter values (KHsta) in the same order of magnitude and with low variability between the different estimations. For a given starch synthesis parameter (as, bs and cs), the estimated values presented a large variation between and within species.

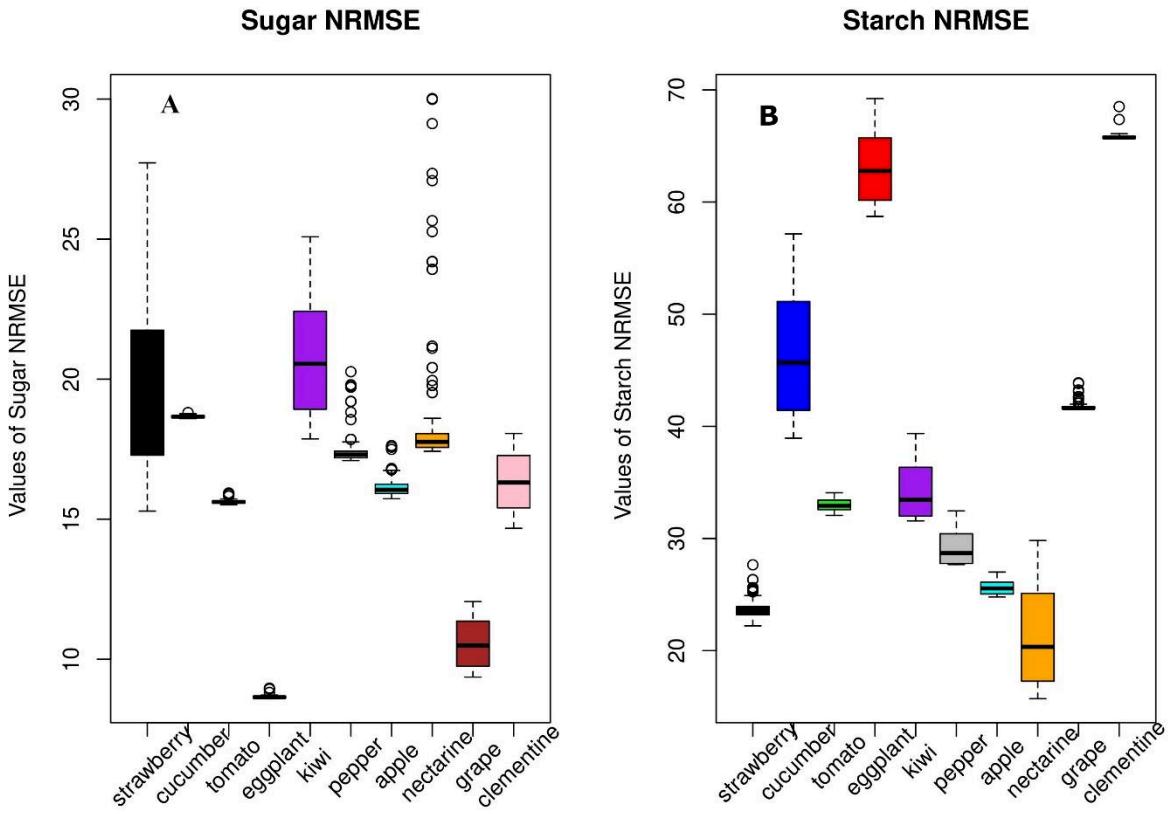



Figure 3: Boxplot of normalized root mean square error (NRMSE) for soluble sugar and starch content optimization in the ten fruit species. Each boxplot is composed of the 100 best NRMSE selected for a given species.

## Inter-species comparison: classification based on model parameters

A hierarchical cluster analysis (HCA) was applied to the estimated parameter sets, in order to quantify the distance among species (Fig. 4). Six clusters were identified. The first one includes tomato, eggplant and strawberry, the second one apple and nectarine, the third one clementine and grape and the three last ones cucumber, kiwifruit and pepper, respectively (one species by cluster).

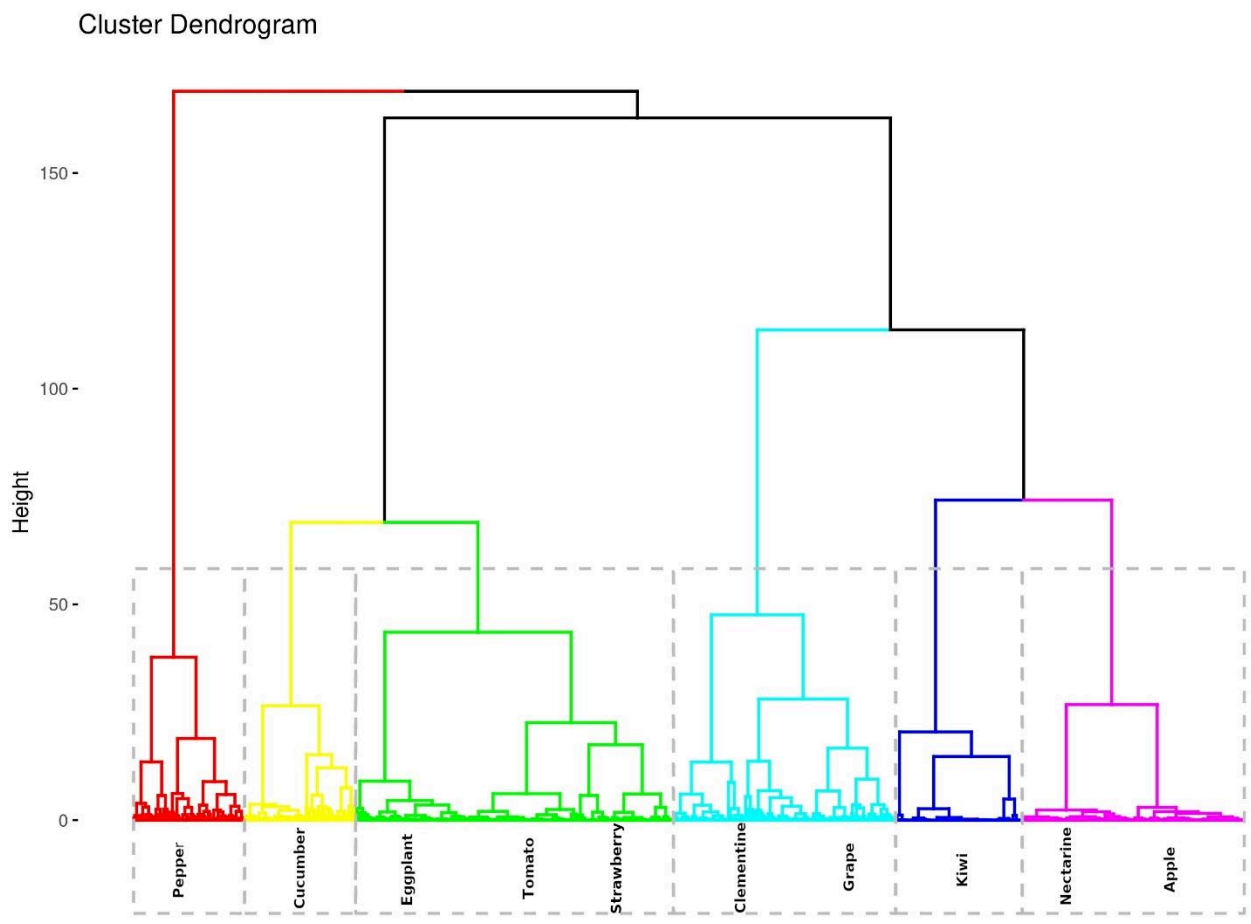



Figure 4: Clustering tree diagram of ten fruit species separated on the basis of the 100 best estimated parameters for given species.

To better investigate the link between parameters and sugar accumulation patterns, a principal component analysis (PCA) was performed on parameter values estimated for all species. The first three principal components accounted for 85.5% of the total variance (44.7% PC1, 23.5% PC2 and 17.3% PC3). The inter-species variability of parameter values was generally higher than the intra-species variability. Fig. 5 shows the first two principal components (PC1 and PC2). The parameters related to the synthesis of the other compounds were strongly negatively correlated ($\lambda$ and $\eta$) with PC1, while parameters related to starch metabolism (KHsta, as, bs, cs) spanned the whole PC1-PC2 plane. The projections of the synthesis rate functions as supplemental variables indicated that PC1 mainly describes the synthesis of the other compounds, while PC2 deals with starch synthesis and hydrolysis.

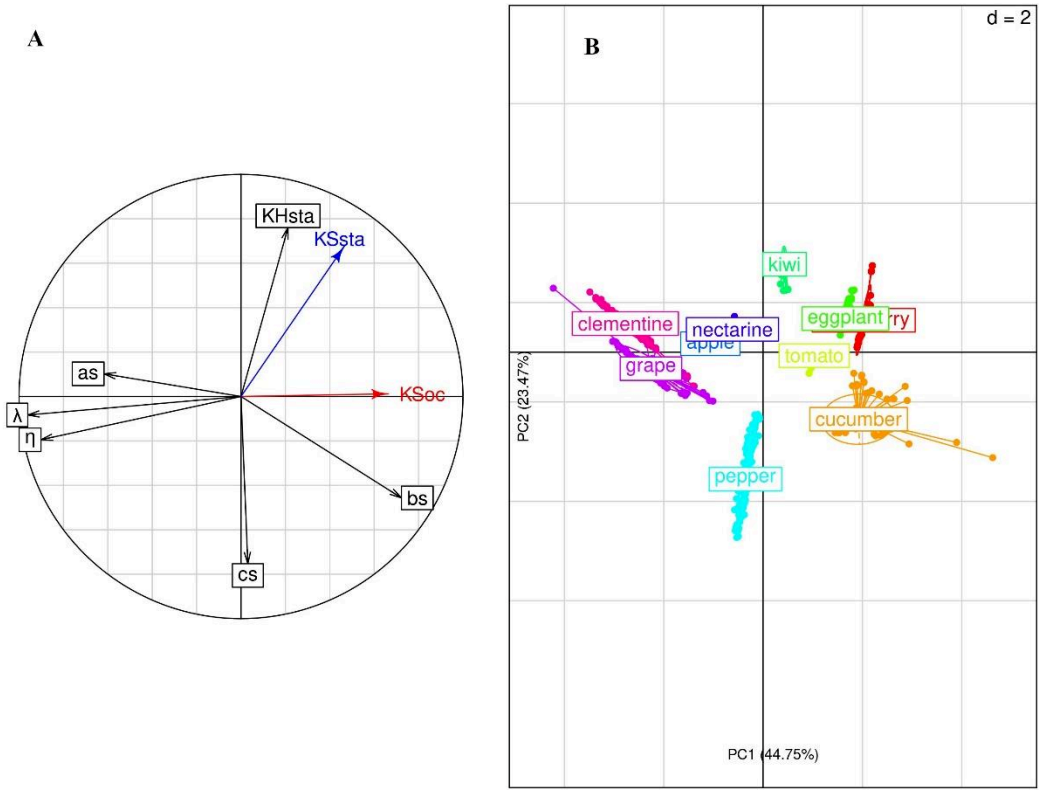



Figure 5: Principal component analysis (PCA) of the ten fruit species (PC1xPC2). The six parameters of synthesis compounds other than sugar and starch, of starch synthesis and of starch hydrolysis were used (B). The synthesis functions of other compounds than sugar and starch (KSoc) and of starch synthesis (KSsta) computed from 30% to 100% of maturity were projected as non-active variables on the first two PCs (A). Each point of a given species represents one of the 100 best parameter sets selected.

Interestingly, the PC1-PC2 plane separates species into six groups similar to those observed by the clustering analysis (Fig. 4). On PC1, cucumber, strawberry, eggplant and tomato, have a high synthesis rate for compounds other than sugar and starch, followed by kiwi, pepper, nectarine and apple, and next by grape and clementine which have very low synthesis rate. PC2 mainly opposes kiwi to pepper on the basis of starch metabolism (Synthesis/Hydrolysis). Starch synthesis and hydrolysis were further separated on the PC2xPC3 plan which clearly separate kiwi, cucumber and pepper, as shown in Fig. 6. Projection of individual species (Fig. 6-B) on PC2xPC3 plan shows that kiwifruit has both high starch synthesis and hydrolysis rates when pepper is characterized by a very low rate of starch hydrolysis. Cucumber is characterized by a low starch synthesis. All other species were close together and showed an intermediate starch synthesis.

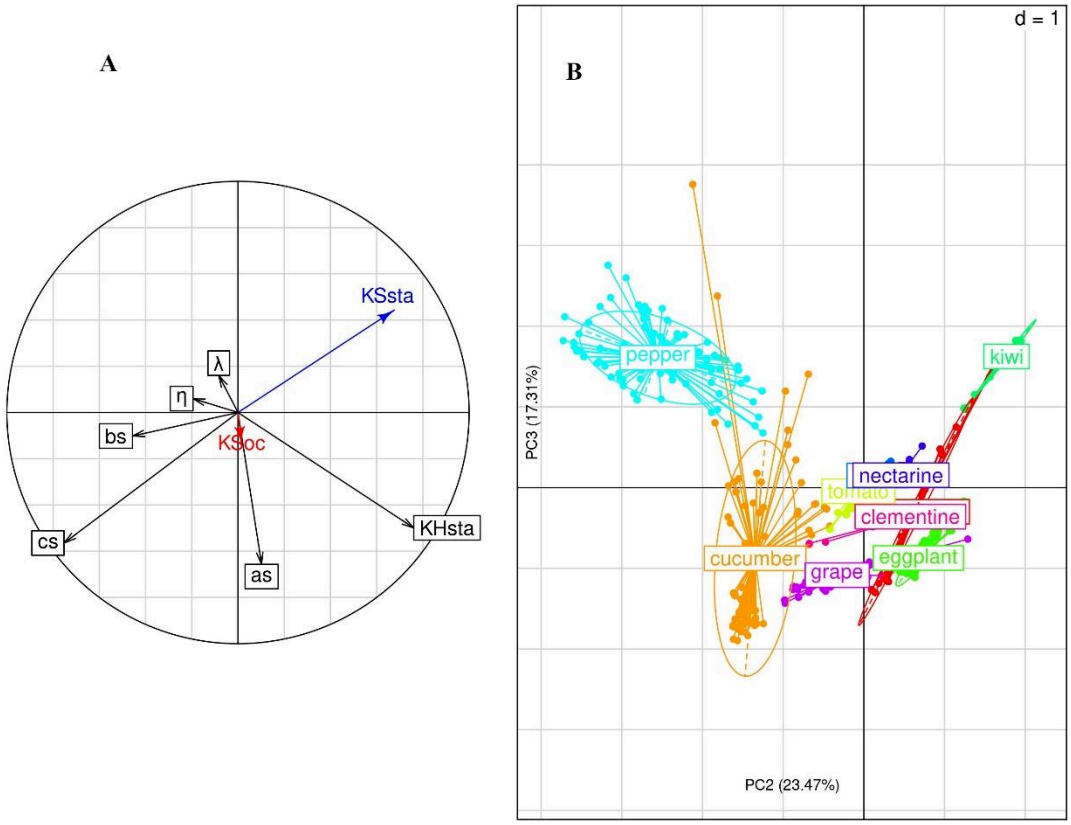



Figure 6: Principal component analysis (PCA) of the ten fruit species (PC2xPC3). The parameters of synthesis compounds other than sugar and starch, of starch synthesis and of starch hydrolysis were used (B). The synthesis functions of other compounds than sugar and starch (KSoc) and of starch synthesis (KSsta) computed from 30% to 100% of maturity were projected as non-active variables on the second and third PCs (A). Each point of a given species represents one of the 100 best parameter sets.

Carbon allocation patterns across species agrees with classification based on parameter values HCA and PCA were based on kinetics parameters, but metabolic fluxes also depend on substrates and network structure.

In order to better understand the functional consequences of the observed difference in parameter values, we estimated the carbon allocation pattern to each metabolic flux as a percentage of the net carbon uptake. Fig.7 shows that the synthesis of other compounds is a major metabolic process in all species, accounting for 25 to 75% of the imported carbon. In particular, strawberry, cucumber, tomato and eggplant species were characterized by a high allocation to synthesis of other compounds (> 60% of imported carbon) compared to grape and clementine species characterized by a low allocation value (< 30%). Kiwi, pepper, apple and

nectarine were intermediate species, with an allocation about half of the imported sugar. It is interesting to notice that the distribution of species on PC1 axis (Fig. 5 B) was strongly correlated (r=0.95) to the inter-specific variation of the allocation for the synthesis of other compounds.

Carbon allocation to starch synthesis was much smaller for all species except kiwifruit. In tomato, eggplant, apple and nectarine, the allocation of carbon to starch metabolism was 100 times lower than in kiwi, whereas in strawberry, cucumber, pepper, grape and clementine, the difference was even stronger, with allocation values about 10,000 times lower than that for kiwifruit (Fig. 7).

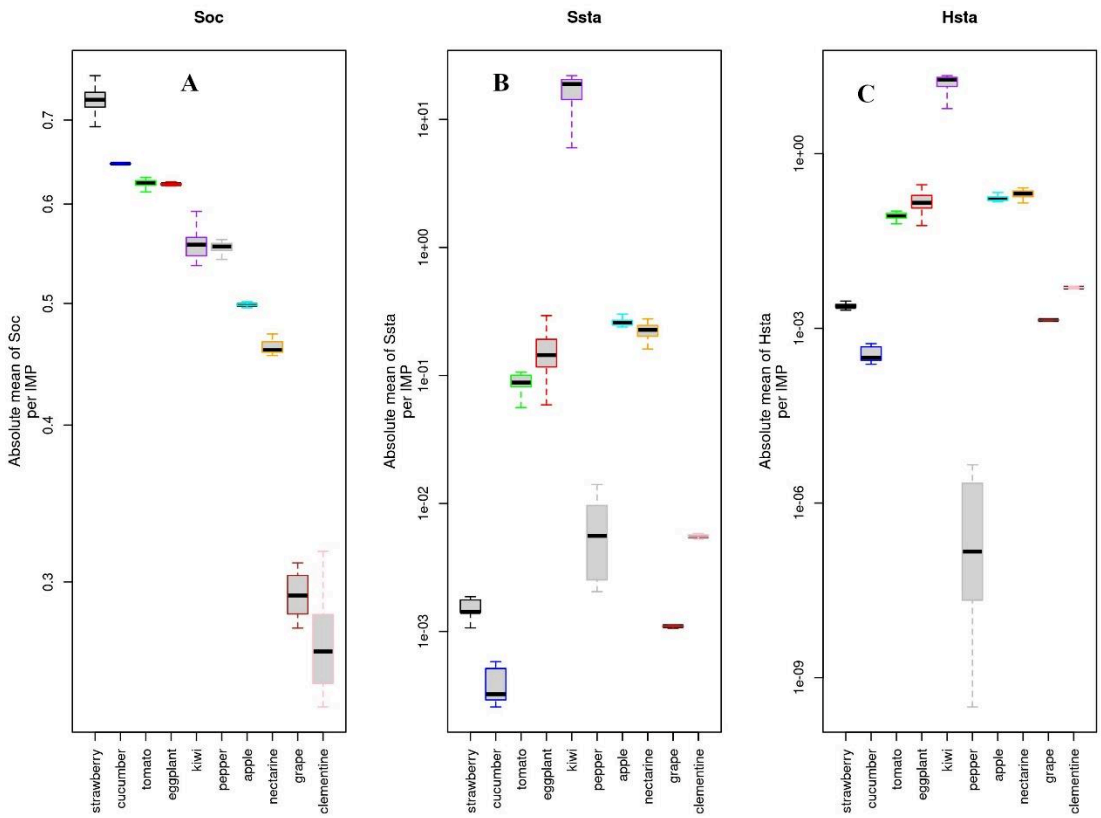



Figure 7: The ratio between the absolute mean hourly contributions of the different metabolic processes (synthesis compounds other than sugar and starch (A), starch synthesis (B) and starch hydrolysis (C)) and sugar import. The absolute mean hourly contributions were calculated over the period from 30% to 100% maturity. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best solutions.

## Different degree of coordination among processes driving sugar concentration

Fruit taste is mainly determined by sugar concentrations and depends not only on metabolism but also on water import and fruit transpiration. Moreover, both physiological and hydraulic processes are dynamic so that their importance may vary over time, depending on the species and the developmental stage.

Equation 8 was used to decompose the hourly variation of soluble sugar concentration into five physiological processes: net sugar importation to the fruit, synthesis of other compounds than sugar and starch, starch synthesis, starch degradation and dilution by water uptake (Fig. 8). Among the five physiological processes, net sugar importation and starch hydrolysis contribute to the gain in sugar, while synthesis of other compounds, starch synthesis and dilution by water lead to a decrease in sugar concentration. An interesting point is that synthesis of other compounds and dilution were both negatively correlated to net sugar importation and that all the species followed the same curve (Supplementary figure 4) which means that these processes are highly coordinated.

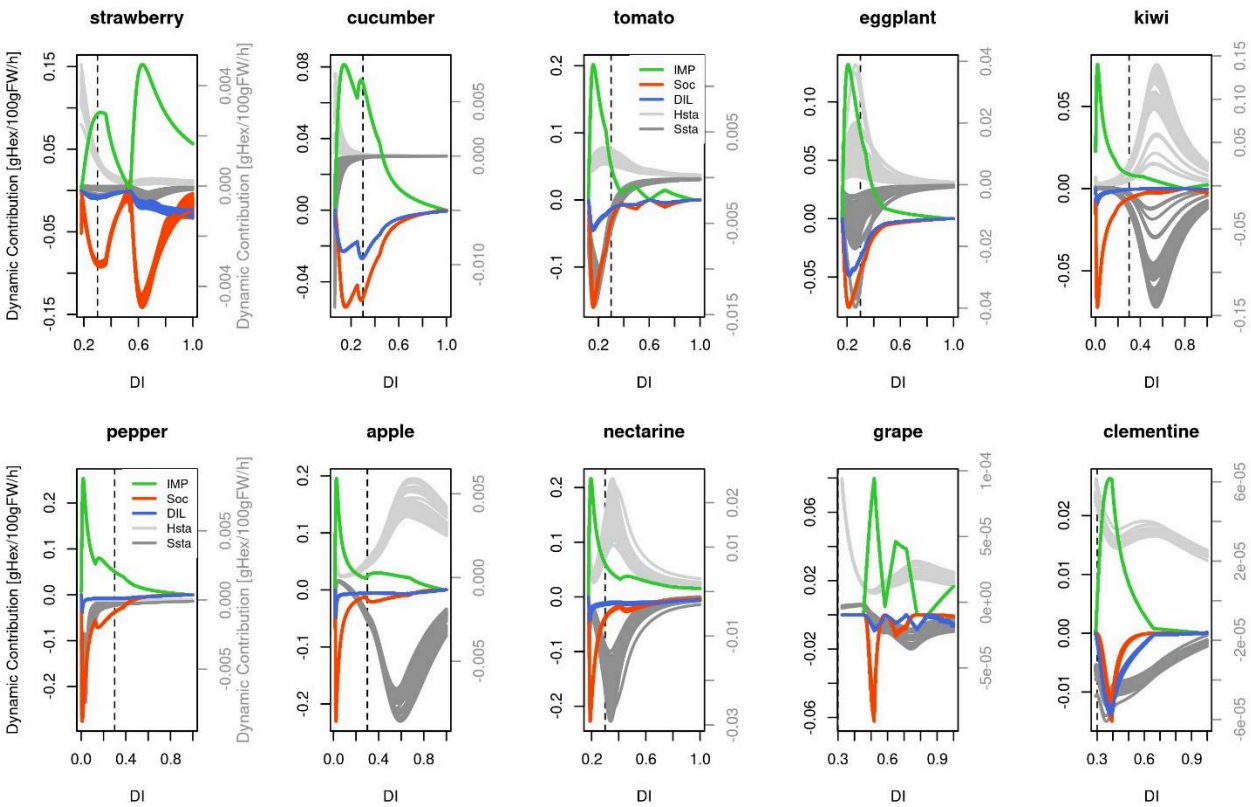



Figure 8: The dynamic contribution of sugar importation (IMP, green), synthesis of compounds other than sugar and starch (Soc, red), water dilution (DIL,blue), and, on the second axis, starch

synthesis (Ssta, dark grey) and starch hydrolysis (Hsta, light grey) to sugar accumulation in ten fruit species. To make the developmental profiles comparable among fruits, fruit development stages were normalized with flowering to be 0 and maturity to be 1. Each curve of a given species comes from one of the 100 best solutions.

When looking at the dynamic patterns, different degrees of coordination among processes can be observed. In cucumber, tomato, eggplant and pepper net sugar importation, metabolic and dilution processes showed a remarkable synchrony. Sugar importation, water dilution, synthesis of other compounds and starch -related processes all increased early and reached a peak before 30% of development time except for starch hydrolysis in pepper, which remained close to zero during the whole fruit development.

In contrast, in kiwifruit, apple and nectarine, processes related to starch metabolism were temporally separated from other processes. In early developmental phases, fruits essentially invested the imported carbon into other compounds (cell walls, organic acids, protein…) whereas starch synthesis was low. It is only when net carbon uptake started to slow down that starch metabolism began, peaking between 35% and 70% of developmental period, depending on the species. During the last developmental phase, all processes eventually decreased to zero except for starch degradation in apple, which remained active until fruit maturity.

Strawberry, clementine and grape showed a dynamic that was different from that of the other species. Indeed, in these three species, observed starch dynamics were mainly led by starch degradation whereas starch synthesis was fairly stable over time. In addition, strawberry and grape showed clear biphasic dynamics for both net sugar importation and the synthesis of other compounds with two distinct peaks after 30% of developmental period.

### Contribution of the processes involved in sugar concentration.

Mean hourly contribution of the five processes (Fig. 9) were calculated over the period encompassed between 30% of the development time to maturity in order to identify, for each species, the processes that most influenced the final sugar concentration.

In most species, except kiwifruit, sugar import was the dominant process involved in sugar concentration, followed by synthesis of other compounds. The contribution of starch

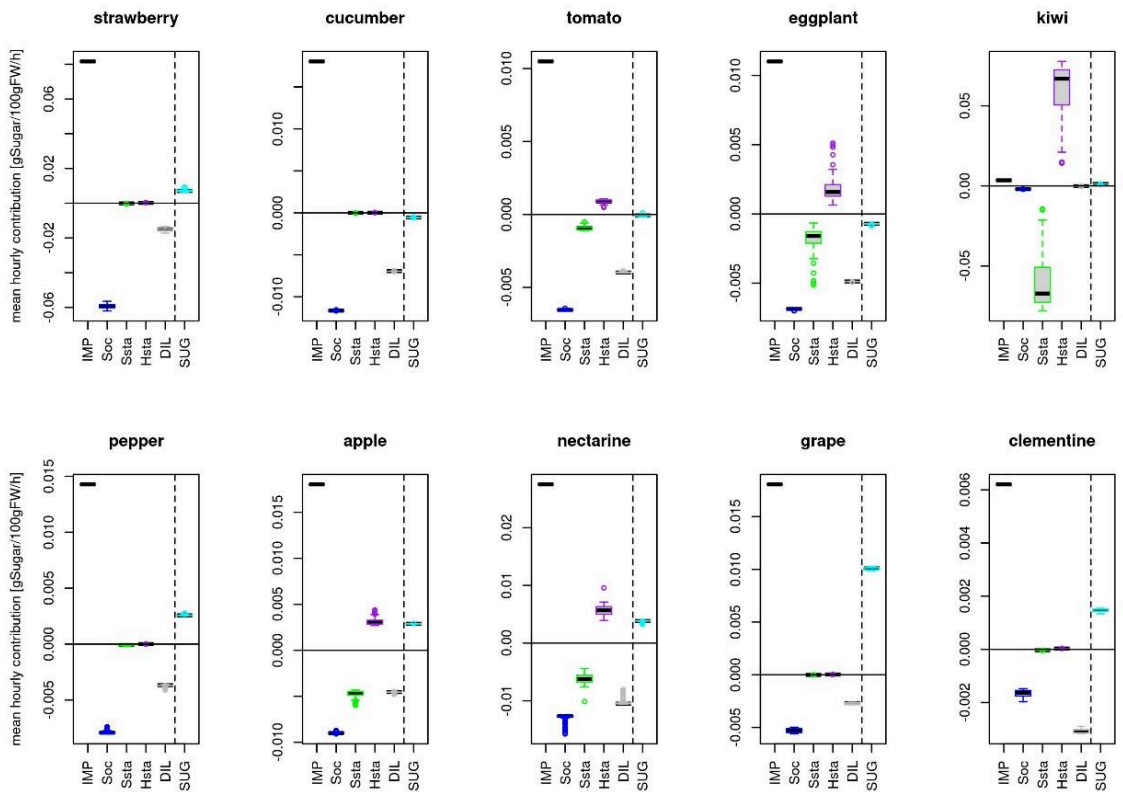



**Figure 9**: The mean hourly contribution of sugar importation (IMP; black), synthesis of other compounds than sugar and starch (Soc; blue), water dilution (DIL; green), starch synthesis (Ssta; purple) and starch hydrolysis (Hsta; grey) on sugar accumulation in strawberry, cucumber, tomato, eggplant, kiwi, pepper, apple, nectarine, grape and clementine during fruit development stages. SUG (cyan) represents the mean increment of sugar concentration computed from the processe balance during the targeted period. The mean hourly contribution were calculated over the period from 30% to 100% maturity. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best solutions.

metabolism strongly varied between species. In kiwifruit, starch synthesis and starch hydrolysis exceeded by far the other processes conditioning sugar concentration whereas in strawberry, cucumber, pepper, grape and clementine, the contribution of starch metabolism was close to zero. For tomato, eggplant, apple and nectarine, starch synthesis and hydrolysis also influenced sugar concentration but to a lower extent than in kiwifruit.

Interestingly, over the studied developmental period, the flow balance related to the five processes (SUG) is positive for most species except cucumber, tomato and eggplant, which

showed a negative flow balance. Thus, in the latter three species, the sugar concentration decreased from the developmental index 0.3 to maturity. This decrease was the result of higher starch synthesis, high dilution by water, high synthesis of compounds other than sugar and starch in comparison to net sugar import. On the opposite grape showed a high increment of sugar concentration (SUG), which was the result of low synthesis of other compounds than sugar and starch, and fairly low dilution in comparison to net sugar import.

## Discussion

The concentration of soluble sugars is a key determinant of the quality of fleshy fruits (Dai et al., 2016). The aim of this article was to investigate similarities and differences in fruit accumulation strategies among ten contrasting fruit species using a carbohydrate model. For this purpose, we developed a generic sugar model based on the description of the main metabolic and hydraulic processes (synthesis of other compounds than sugar and starch, synthesis and hydrolysis of starch, water dilution) involved in the accumulation of soluble sugars during fruit development. Using this approach, it was possible to classify fruit species on the basis of their metabolic rates and to quantify the effects of major physiological and dilution processes that affect sugar concentration in fruits.

### Inter-species comparison on basis of metabolic rates

Results of the statistical analyses (Clustering and PCA) on the estimated parameter sets showed that the ten species of this study can be split up into 6 groups based on their metabolic profiles. According to our analysis, the species are better separated according to their allocation to the synthesis of other compounds. Interestingly, species (cucumber, strawberry, tomato, eggplant, pepper) with a high synthesis rate have a relatively short development time (<100 days after flowering) and are all herbaceous species while those with a low synthesis rate of other compounds than sugar and starch have a long development time (>100 days after flowering) and represent both woody species (clementine, nectarine, apple) and vine species (grapes and kiwi).

The link between growth and synthesis of other compound was not completely unexpected though. Indeed, the function (equation 3) describing the synthesis rate of compounds other than sugar and starch in the model is dependent on the fruit relative growth rate (RGR) which can vary from species to species. Our results suggest that the development time of the species is inversely associated to their relative growth rate and to the synthesis of structural and metabolic compounds other than sugar and starch. Indeed, melon, an herbaceous species with a total development time of 40-50 days (Gao et al., 1999) has a much higher max RGR (80% day-1) than grape (14% day-1, Ollat and Gaudillere, 1998) and pear (6% day-1 , Shiratake et al., 1997) two perennial species with development time over 120 days. The positive relation between synthesis of other compounds and RGR can be interpreted assuming that fast growth needs to be supported by rapid synthesis of structural compounds (cell wall, but also proteins) in order

to support cell division and ensure the appropriate mechanical and functional properties. In grapes, Ollat and Gaudillere, (2000) showed that during the early stages of fruit development, the carbon imported into the fruit is mainly used to support the respiration and synthesis of structural compounds in the fruit.

The statistical analyses by PCA and HCA do not show a clear separation of the species into climacteric (tomato, apple, nectarine and kiwi) and non-climacteric (strawberry, eggplant, pepper, cucumber, clementine and grapes) groups. This could suggest that the three metabolic processes (synthesis of other compounds, starch synthesis and starch hydrolysis) related to sugar concentration are not tightly affected by ethylene-associated events that characterize the climacteric and non-climacteric categories of fruits, or that they do not describe metabolism with enough detail.

Strong differences may exist among varieties, though. Surprisingly, the first group identified by clustering includes climacteric tomato and non-climacteric strawberry and eggplant species, in line with what has been observed by Klie et al., (2014) for the tomato cultivar M82, but not for the cultivar Alisa Craig. Indeed, genotypic differences can significantly affect the estimation of model parameters, possibly resulting in different classifications. Most of the species considered here have been subjected to intensive breeding programs, that may have favored specific metabolic processes, depending on the expected end-use (e.g. fleshy ketchup tomato vs more juicy salad tomatoes). In the future, the impact of genotypic variability on inter-species comparison should be explicitly accounted for, in order to evaluate the robustness of the above-mentioned patterns and identify common regulatory principles across species.

Inter-species comparison based on the dynamics of physiological fluxes

The sugar concentration in fleshy fruits is influenced by incoming and outgoing sugar and water flows (Guichard et al., 2001), and by the rate of metabolic transformations. The model developed here allowed to compare the dynamics of sugar accumulation based on the contribution of five key processes (Fig. 8): the sugar net importation to the fruit, the metabolic transformation of sugars into compounds other than sugar and starch, the metabolic transformation of sugars into starch, the hydrolysis of starch into sugars and the dilution of sugars by water.

The model showed (Fig. 8) that species can display distinct degrees of coordination among processes. In typical annual vegetables such as tomatoes, cucumber, eggplant, and pepper, all

five processes have a synchronous dynamic, with a peak during the early stages of fruit development. In these species the maximum starch accumulation coincides with the peak of synthesis of structural compounds (cell walls, enzymes, organics acids...), suggesting that starch remobilization helps sustaining the fruit during the active period of cell division.

However, in perennial plants such as kiwi, apple and nectarine species, the increase in starch synthesis and hydrolysis fluxes only occurs after the drop in sugar import fluxes, dilution and synthesis of compounds other than sugar and starch (Fig. 8). In these species, the conversion of starch into soluble sugars is one of the most important events during ripening and directly affects the final sugar composition of the fruits (Berüter 1985; Wang et al. 1993; Richardson et al. 1997; Moing et al. 2001; Petreikov et al. 2009).

The dynamics of sugar import, metabolism and dilution are consistent with the results previously obtained by Luengwilai and Beckles, (2009) and Dai et al., (2016) in tomato. Results on the dynamics of starch metabolism agree with the observations reported in the literature on citrus fruits (Mehouachi et al., 1995; Mesejo et al., 2013), strawberry (Moing et al., 2001; Souleyre et al., 2004) , grape (Lebon et al., 2004), apple (Berüter, 1985; Brookfield et al., 1997; Ackerman and Samach, 2015), tomato (Luengwilai and Beckles, 2009; Petreikov et al., 2009) and kiwifruit (Richardson et al., 1997).

Among all species monitored, strawberry, clementine and grape showed a distinct dynamic compared to all other species. In the case of grape and clementine, such a difference could be partly due to our model input that started at 30% of their development and that did not allow a proper observation of the starch synthesis phase. The strawberry differs from other species in its ability to grow and accumulate sugar during the last stages of fruit development, when most species tend to reach a plateau (Fig.2 and Supplementary figure 1). The analysis of the underlying physiological processes revealed a second, late peak of sugar import and synthesis of other compounds after 60% of development time. In their work, Moing et al., (2001) observed an increase in organic acid concentration reaching maximum values during the later growth stages which suggests that the second peak observed in strawberries could at least partly be related to an accumulation of organic acids.

It is interesting to notice that species partition according to process dynamics does not coincide with the metabolic groups defined by PCA and HCA, suggesting that the inclusion of the dilution effect is important to correctly interpret the different sugar accumulation strategies.

The results obtained in this study represent a first step in order to understand the modes of the regulation of the major processes involved in sugar accumulation. In a next step, it would be interesting to dissociate the acids from the cell walls in the model in order to better assess the respective contribution to carbohydrates accumulation during the early phases of fruit development. The complex interplay between metabolic processes, water balance and fruit growth should also be better addressed, for instance by coupling of our generic sugar model with a biophysical model of fruit growth (Fishman and Génard, 1998; Lescourret and Génard, 2005; Génard et al., 2007). The concentration in soluble compounds (sugars, acids...) indeed, can affect the fruit osmotic potential and the resulting water uptake. Differences in skin conductance across species (from 30 cm/h in tomato to 800 cm/h for peaches according to Dai et al. 2016) can control fruit transpiration, in turn modifying the impact of dilution over metabolic concentration.

At term, a better understanding of the different mechanisms involved in the control of fruit composition, from the biophysical to the metabolic aspects, will help to identify the major regulatory steps, improving our ability to manage and select new high-quality products.

Acknowledgements

We thank Valérie Serra, Cécile Thomas, Patricia Ballias and Cédric Cassan for their technical help. For fruit culture, we thank Dr Daniel Plenet and INRA PSH, Dr Sylvaine Simon and INRA UE695, Dr Olivier Pailly and INRA UE CITRUS, Dr Vincent Truffault and CTIFL Carquefou, Pierre Gaillard, Henri Clerc, Eric Sclaunich, Daniel Chabot and Invenio, Jean-Pierre Petit, Prof. Eric Gomès, Prof. Serge Delrot, Dr. Philippe Vivin, Dr. Ghislaine Hilbert, Dr. Zhanwu Dai, Christel Renaud, Messa Meddar. Coffi Belmys Cakpo and Léa Roch were funded by FRIMOUSS (ANR-15-CE20-0009-01). The biochemical analyses were performed at Bordeaux Metabolome Facility, MetaboHUB - PHENOME-EMPHASIS (ANR-11-INBS-0010, ANR-11-INBS-0012).

Supplementary table 1. Culture conditions for the ten fruit species.

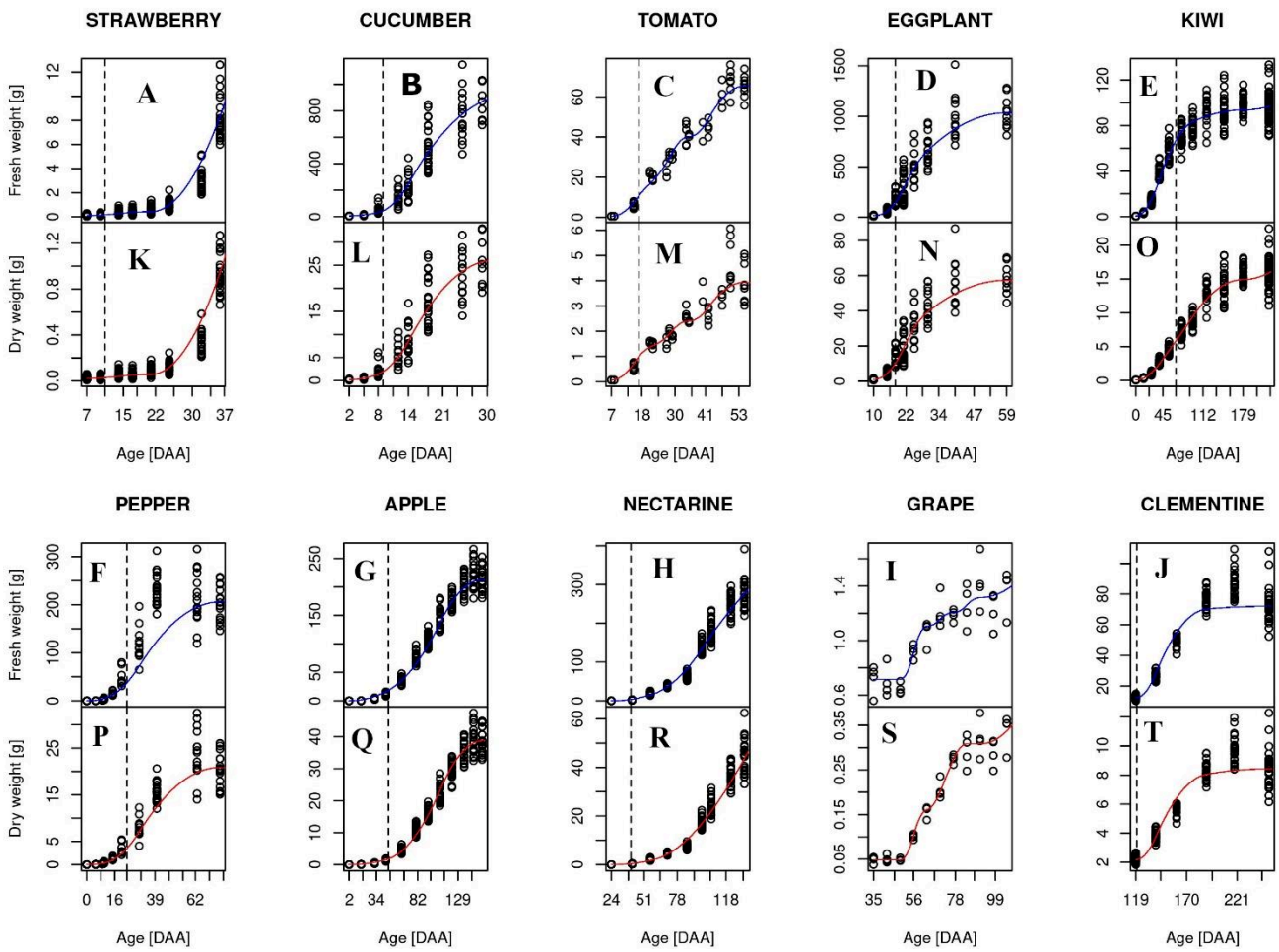
| Species | Cultivar | Culture site | Culture condition | Plantation density | Tree age | Plantation date | Substrate or soil type | Irrigation | Fertilisation | Flowering date |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tomato | Moneymaker | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Glass greenhouse | 2 plants/m² | - | 30/04/2010 germination,seedling transfert on 4 June 2010 | rockwoolblocks | Drip irrigation, water supply adjusted to the climate | Nutrient solutions as for commercial production practice | First in june 2010 |
| Strawberry | Gariguette | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Glass greenhouse | 10 plants/m² | - | 9/12/2015 (trayplants) | Peat/bark 60/40 | Drip irrigation with 2 drippers per bag of 6 plants. Triggered by different modes according to the period: - cyclical (every 60 to 120 min from 8:30 am to 6 pm approximately. - solarimeter (which adds irrigations according to a threshold and an accumulationof radiation) irrigation time of 5 min with 2 l/h drippers | Fertilization at each irrigation with an EC of 1.5 mS during the vegetative developemnt period and 1.3 mS during the fruiting and production period. | Week 5 in 2016 |
| Eggplant | Monarca RZ F1 (Rijk Zwaan) | INVENIO Ste Livrade (Lot et Garonne) | Plastic greenhouse | 1.2 plant/m² | - | 10/03/2016<br><br>Grafted at 80 days, KNVF rootstock | Coco fibre | Drip irrigation<br>60 to 80 min from 08:30 to 17:30 each with solarimeter control for additional irrigations when high irradiance or shorter irrigation time when low irradiance<br>Duration of 6 to 7 min at 2 l/h with 5 gutters for 3 plants | In irrigation water, with EC of 2.5 mS/cm at the beginning of culture and 2 mS during fruit production<br><br>Nutritive solution concentrations (meq/L) : $NO_3$ 11.8, Mg 3.46, K 7.1, Ca 6.5, SO4 3.36, H2PO4 1.31, Cl 0.55, Na 0.2<br>plus micronutriments | 05/04/2016 |
| Clementine | SRA 63 | INRA Corsica | Orchard | 6 m x 4 m | 35 | 19/03/1981<br><br>Poncirus trifoliata rootstock | Fersiallitic soil with sandy-loam texture | Sprinkling irrigation under foliage according to commercial cultural practices using water balance.<br>397 mm supplied between 30/05/2016 and 13/09/2016, about 2-weeks spaced, 20 mm to 47 mm each | Ammonitrate 33%<br>April: 270 kg ;<br>July: 140 kg;<br>August : 140 kg | 03/05/2016 |
| Cucumber | Aljona | CTIFL Nantes (Loire Atlantique) | Glass greenhouse, heated | 1.25 plant/m² | - | 15/06/2016 | Rockwool | Drip irrigation on solarimeter control, about 15 times per day | In irrigation water with EC of 2.5-3.0 mS/cm (2.8-3.2 in draining) and pH of 5.5 (5.8-6.0 in draining) Concentrations (meq/L) : $NO_3$ 18, $NH_4$ 0.1, P 0.9, K 8, Ca 13, plus micronutriments | First harvest week 27 in 2016 |

Supplementary table 1. Continued

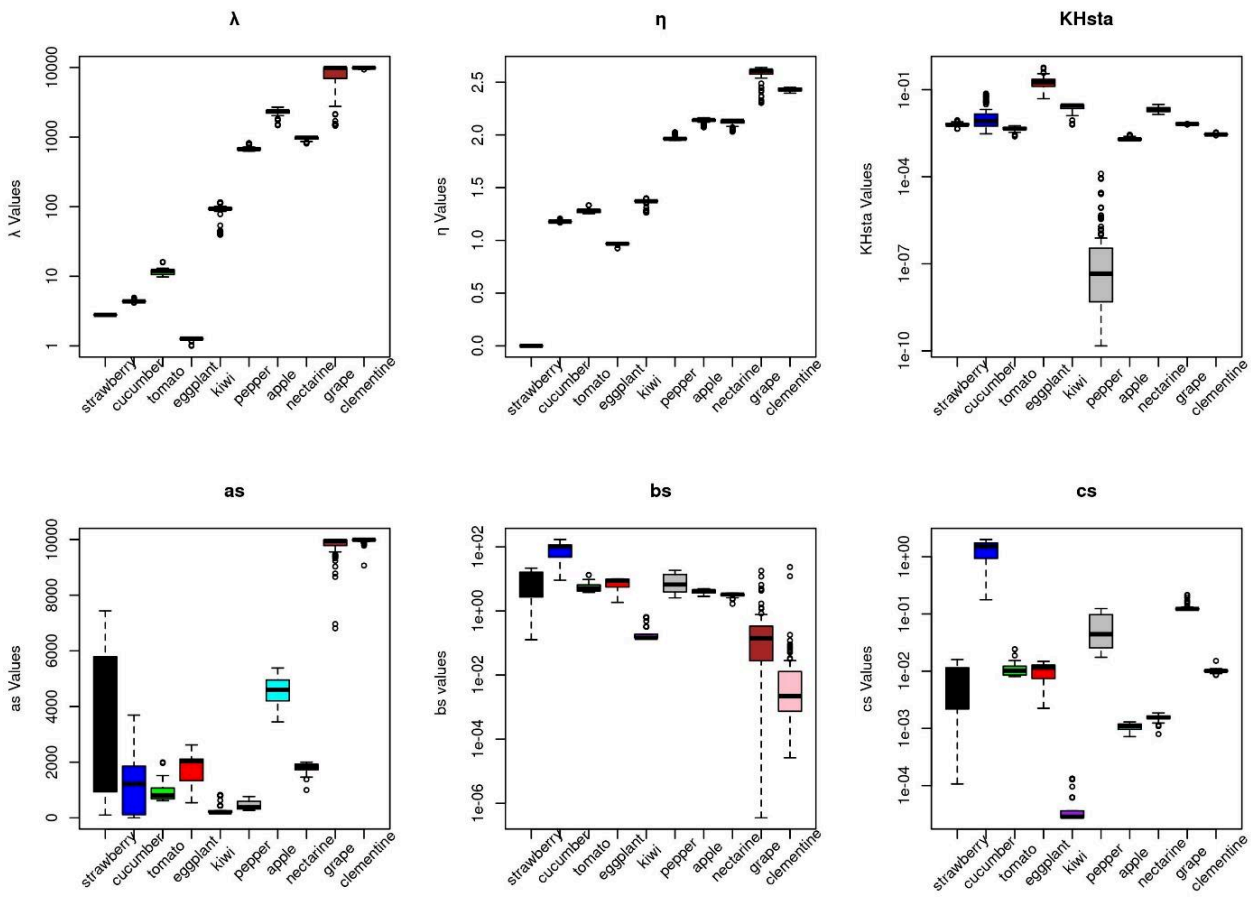
| Species | Cultivar | Culture site | Culture condition | Plantation density | Tree age | Plantation date | Substrate or soil type | Irrigation | Fertilisation | Flowering date |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Kiwi | Hayward | Ste Livrade (Lot et Garonne) | Commercial orchard | 500 trees/ha | 18 years | 2000 | Sandy-loam soil | Foggers under canopy piloted by underground tensiometric probes | February 2018 : 2 t/ha organic fertilizer (2-0.5-1, N-P-K)<br>Spring-Summer : 6 times 50 kg/ha/week potassium nitrate (13-0-46, N-P-K) by fertirrigation | Week 20-21 in 2016 |
| Peach | Nectarlove | INRA Avignon<br>(Vaucluse) | Orchard | 571 trees/ha | 4 years | 2013<br>GF677 rootstock | Homogeneous loam-clay-sand soil<br>Rooting depth 75-90 cm | Irrigation by micro-aspersion Spring: 0, 1 or 2 per week<br>Summer: 3 per week<br>Irrigation for 6-7 h in Spring, 4 h in Summer | 120 kg N/ha, 22.5 kg $P_2O_5$/ha, 45 kg $K_2O$/ha | 15/03/2016 |
| Pepper | Gonto (Clause) | INVENIO Ste Livrade (Lot et Garonne) | Plastic tunnel | 1.8 plant/m² | - | Sowing 09/02/2016<br>Plantation 20/04/2018 | Sandy-loam soil | Drip irrigation : 2-3 irrigations per day of 15-20 min at 4.5 mm/h/m² | Ground fertilization and in drip irrigation (90 kg/ha N) | 15/05/2016 |
| Apple | Golden delicious | INRA Valence (Drôme) | Orchard | 1000 trees /ha | 11 years | Plantation of 1 year-old scions in January 2005 | Homogeneous sandy-loam soil, shallow and stony from ancient eroded sediments Rooting depth 40 cm | Irrigation by micro-aspersion | 45 kg N/ha; 50 kg $P_2O_5$/ha, 65 kg $K_2O$/ha | 18/04/2016 |
| Grape | Cabernet Sauvignon | INRA Bordeaux Villenave d'Ornon (Gironde) | Glass greenhouse | Rooted cuttings in 1 l pots | - | 09/02/2016 | Sand : perlite : vermiculite (1:1:1 ; v:v:v) | Drip irrigation with nutritive solution<br>2 min 5 times per day, fully irrigated | Nutritive solution concentrations (mM): 1.20 N, 0.57 P, 1.75 K, 1.23 Ca, 0.69 Mg, 1.27 Cl, 0.99 S,<br>plus micronutriments | 05/05/2016 |

Supplementary table 2. Literature data used for carbon content

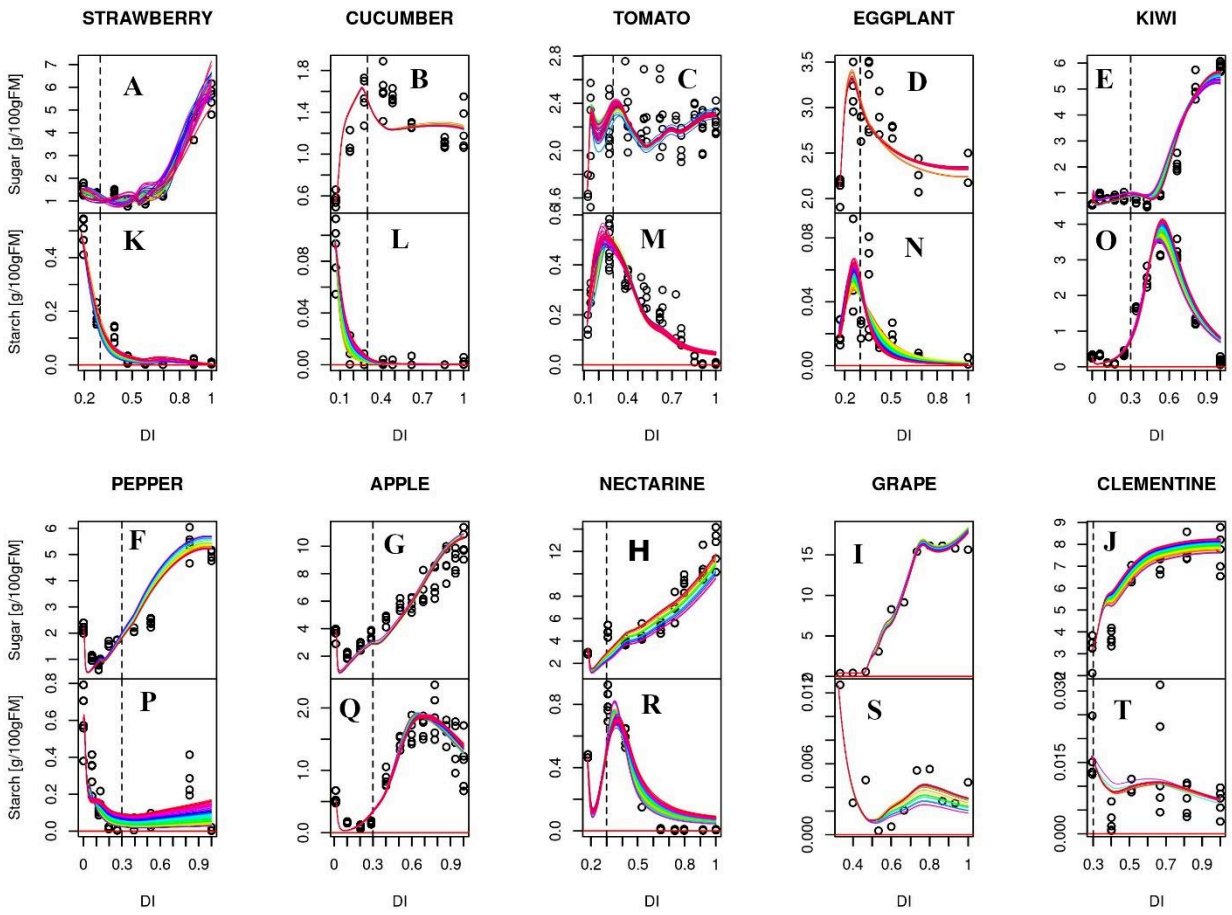
| species | value used for model | litterature value | units | Literature Cited |
|---|---|---|---|---|
| cucumber | 0.454 | 454 | mg C/gdw | Gijzen (1995) |
| cucumber | 0.46 | 0.46 | g C/gDM | Marcelis (1994) Chapter 2 table 4 thesis (isbn: 9054853107) |
| grapevine fruit | 0.443 | 443 | mg /gdw | Vivin, P. Castellan-Estrade, M. and Gaudillère, J.-P. (2003) |
| grapevine fruit | 0.456 | 456 | mg /gdw | Vivin, P. Castellan-Estrade, M. and Gaudillère, J.-P. (2003) |
| peach | 0.445 | 0.445 | g carbon/g DW | Génard and Souty (1996) |
| mango | 0.4239 | 0.4239 (0.0048) | g carbon/g DW | Léchaudel et al (2005) |
| tomato | 0.44 | 0.44 | g carbon/g DW | Gary et al 1998 |
| tomato | 0.457 | 0.457 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Cowpea, pod+seed | 0.471 | 0.471 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Faba bean, pod+seed | 0.473 | 0.473 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Field bean, pod+seed | 0.472 | 0.472 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Groundnut, pod+seed | 0.616 | 0.616 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Maize, cob+grain | 0.491 | 0.491 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Millet, ear+grain | 0.484 | 0.484 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Pigeon pea, pod+seed | 0.476 | 0.476 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Rice, inflor.+grain | 0.487 | 0.487 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Sorghum, ear+grain | 0.486 | 0.486 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Soya bean, pod+seed | 0.527 | 0.527 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Wheat, ear+grain | 0.471 | 0.471 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |
| Sunflower, inflor.+seed | 0.549 | 0.549 | g carbon/g DW | penning de vries et al (1983,1989) |



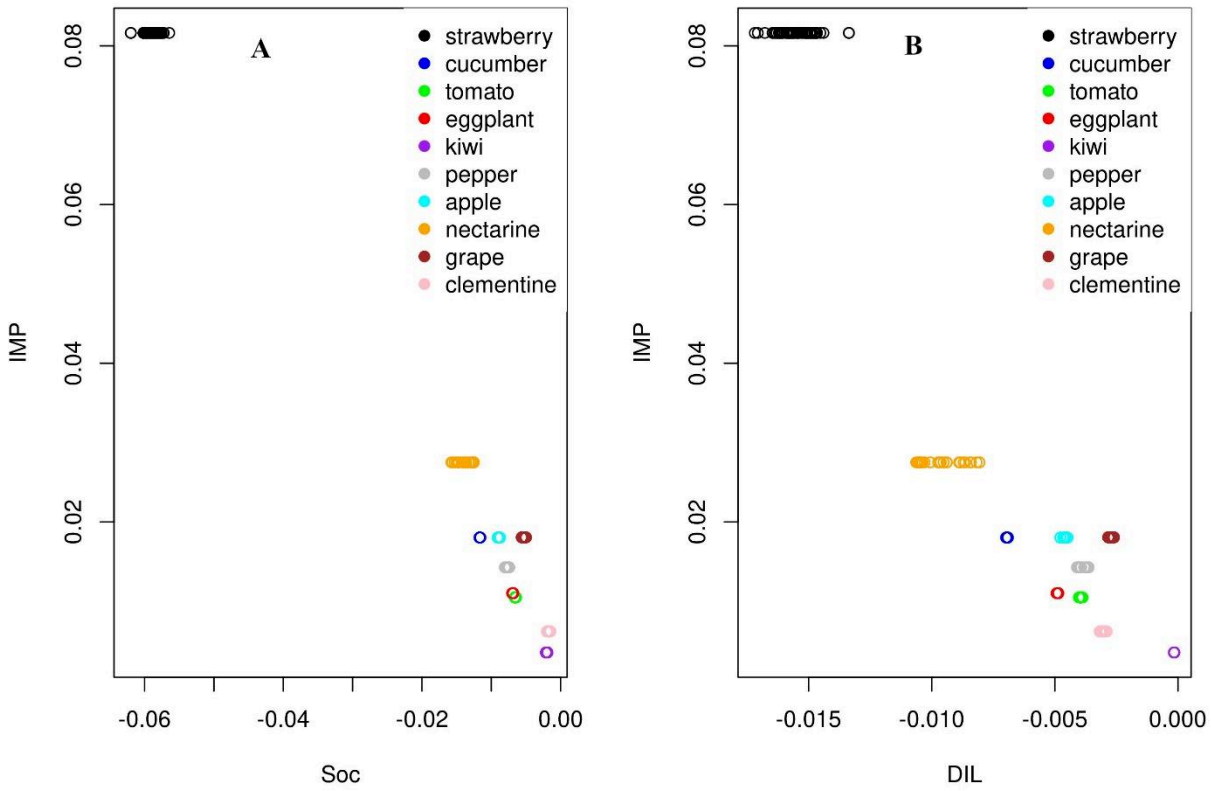

Supplementary figure 1: Developmental profiles of Fresh mass (blue; A–j), dry mass (red; K–T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. All curves are smoothed fits of the observed data points using the cobs function (Ng and Maechler, 2007) of the “cobs” package (developed for R).




Supplementary figure 2: Distribution of parameters of synthesis of other compounds than sugar and starch ($\lambda$ and η), starch hydrolysis (KHsta) and starch synthesis (as, bs and cs) for each species. Each boxplot of a given species is composed of the 100 best parameter sets selected




Supplementary figure 3: Developmental profiles of soluble sugar concentration (A-J) and starch concentration (K-T) in strawberry (A,K), cucumber (B,L), tomato (C,M), eggplant (D,N), kiwi (E,O), pepper (F,P), apple (G,Q), nectarine (H,R), grape (I,S) and clementine (J,T) fleshy fruits. The soluble sugar and starch concentrations are expressed in g.100gFM$^{-1}$. The black points represent the experimental data. All curves are adjustments to the soluble sugar and starch concentrations data obtained by using the sugar model developed. Each coloured curve of a given species comes from one of the best 100 optimal solutions selected.




Supplementary figure 4: The relation between the absolute mean hourly contributions of sugar import (IMP) and absolute mean hourly contributions of synthesis of other compounds than sugar and starch (A), and dilution (B). Each colour represents a given species.

# Chapitre III : Les fruits charnus ont-ils les mêmes mécanismes de croissance ? De l'importance des différents processus dans la croissance des fruits charnus

# Introduction

Comprendre les mécanismes qui contrôlent la croissance et l'élaboration de la qualité des fruits est l'un des principaux objectifs dans l'étude de la biologie des fruits et un défi toujours ouvert pour la modélisation du développement des organes de la plante. En effet, la croissance et la qualité des fruits impliquent de nombreux processus, biochimiques et biophysiques, en interaction avec l'environnement. Ces processus sont en très forte interaction. L'importation et le métabolisme des sucres dépendent de la photosynthèse et des flux de carbone, les flux d'eau jouent un rôle moteur sur la croissance des fruits mais réduisent la concentration en sucre (Génard and Lescourret 2004). Ainsi, pour mieux appréhender la complexité des mécanismes impliqués dans la croissance et la qualité des fruits, il est nécessaire d'élaborer un modèle de croissance capable d'intégrer nos connaissances sur les processus biochimiques et biophysiques.

## Modèles impliquant des processus biophysiques et biochimiques

Des modèles ont été développées, intégrant à la fois les processus biophysiques et biochimiques impliqués dans la croissance et la qualité des fruits. Ces modèles génériques ont été appliqués sur plusieurs espèces comme la pêche (Fishman and Génard 1998; De Swaef *et al.* 2014), la tomate (Liu *et al.* 2007) et la mangue (Lechaudel *et al.* 2007). Dans ces modèles, le fruit est représenté comme une grande cellule dont la croissance résulte à la fois des flux phloémien et xylèmien, de la transpiration et de la respiration du fruit ainsi que des transformations métaboliques du sucre réçu de la plante. Le sucre importé du phloème dans le fruit peut rester sous forme soluble (sucres solubles, acides organiques) ou être transformé sous des formes non solubles (amidon, parois cellulaires, autres composés organiques non solubles). Hall et al. (2013, 2017) ont étendu le modèle préalablement développé pour la pêche (Fishman and Génard 1998) au kiwi, en intégrant au modèle les processus liés aux métabolismes de l'amidon (synthèse/dégradation).

## Importance de la prise en compte du métabolisme de l'amidon dans les modèles

Selon les espèces, l'accumulation de l'amidon est très variable. Par exemple la pastèque, les agrumes (El-Otmani *et al.* 2011), le melon (Rosa 1928), l'ananas (Moyle *et al.* 2005) et le raisin (Hunter *et al.* 1995) ne stockent quasiment pas de réserve d'amidon (Hubbard *et al.* 1990). A contrario, la pomme (Stevenson *et al.* 2006), la banane (Gibert *et al.* 2009) et le kiwi (Nardozza *et al.* 2010) présentent un stockage temporaire du carbone sous forme d'amidon très important. Chez ces espèces, il a été démontré que l'amidon joue un rôle majeur dans la

régulation de l'importation de carbone (Ho *et al.* 1983; Wang *et al.* 1993) et dans le potentiel osmotique du fruit (Hall *et al.* 2013) durant la phase de croissance. Durant la phase de maturation du fruit, la dégradation de l'amidon augmente significativement la concentration en sucre et donc la qualité du fruit (Davies and Cocking 1965; Ho and Hewitt 1986; Ho 1988; Robinson *et al.* 1988; Bertin *et al.* 2009; Bertin and Génard 2018).

## Flux de sucre et d'eau vers le fruit

Outre le métabolisme de l'amidon, d'autres processus comme le déchargement des sucres, les flux d'eau xylémiens et phloémiens et la transpiration ont également été étudiés chez les fruits charnus en lien avec leurs croissances.

### Déchargement du sucre

Chez la pomme (Zhang *et al.* 2004), le concombre (Hu *et al.* 2011), les agrumes (Koch and Avigne 1990), la fraise (Li *et al.* 2012) et la poire (Zhang *et al.* 2014), le déchargement du phloème est apoplasmique tout au long du développement des fruits. A contrario, pour la tomate (Ruan and Patrick 1995), le raisin (Zhang *et al.* 2006), le kiwi (Gould *et al.* 2013) et la pêche (Masia *et al.* 1992), les sucres sont déchargés principalement par voie symplasmique, c'est-à-dire au travers des plasmodesmes, au stade précoce du développement et par voie apoplasmique aux stades ultérieurs du développement des fruits. Cependant, pour la tomate, le mécanisme de déchargement du sucre phloémien fait toujours l'objet d'un débat (Nardozza *et al.* 2013). Selon certains auteurs, les fruits charnus synthétisant des composés insolubles tels que l'amidon ont un déchargement essentiellement symplasmique durant leurs premiers stades de développement (Nardozza *et al.* 2013; Ma *et al.* 2018). Pourtant, il a récemment été mis en évidence, que le déchargement du phloème pouvait emprunter majoritairement la voie apoplasmique même pour des fruits riches en amidon comme la pomme (Zhang *et al.* 2004) et la poire (Zhang *et al.* 2014). Tout ceci suggère à la fois la complexité des relations entre les différentes voies de déchargement de carbone et le métabolisme des sucres dans le fruit ainsi que les limites de nos connaissances sur le fonctionnement général des fruits charnus.

### Flux d'eau entrant dans le fruit

La contribution relative des flux d'eau du phloème et du xylème à la croissance des fruits fait toujours l'objet de débat, comme chez la tomate (Windt *et al.* 2009). Toutefois, de nombreuses études ont montré que cette contribution pouvait être variable suivant les espèces et pouvait également varier en fonction du stade phénologique, comme le montre les études menées sur pomme (Lang 1990; Dražeta *et al.* 2004), kiwi (Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and

Corelli Grappadelli 2010; Clearwater *et al.* 2012), pêche (Morandi *et al.* 2007; Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and Corelli Grappadelli 2010), raisin (Greenspan *et al.* 1994) et tomate (Ho *et al.* 1987; Guichard *et al.* 2005). Chez ces espèces, le flux xylémien est très élevé en début de développement et diminue progressivement au cours du développement des fruits (Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and Corelli Grappadelli 2010). Cette diminution du flux xylémien avec le développement du fruit a été attribuée à une diminution de la conductivité hydraulique des vaisseaux (Dražeta *et al.* 2004; Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and Corelli Grappadelli 2010; Mazzeo *et al.* 2013). Toutefois, les causes de cette diminution de la conductance hydraulique xylémienne demeurent incertaines (Nordey *et al.* 2015). De façon parallèle au flux xylèmien, le flux phloémien peut diminuer également au cours du développement de la pomme, de la pêche (B. Morandi *et al.* 2012), et de la tomate (Ho *et al.* 1987; Guichard *et al.* 2005). En revanche chez le raisin, le flux phloémien s'accroît avec le développement du fruit (Bondada *et al.* 2005; Keller *et al.* 2006; Choat *et al.* 2009).

### Pertes en eau

Les pertes en eau du fruit sont associées d'une part à la transpiration du fruit lui-même et d'autre part à un flux d'eau inverse, c'est à dire du fruit vers la plante généralement. Ce flux peut apparaître en particulier en cas de déficit hydrique ou pendant les heures les plus chaudes de la journée, c'est-à-dire quand le statut hydrique de la plante est défavorable. Des flux d'eau inverses, du fruit à la plante, ont ainsi été mis en évidence chez des espèces comme la pomme (Lang 1990), le raisin (Bondada *et al.* 2005; Keller *et al.* 2006) et les agrumes (Huang *et al.* 2000). Les pertes transpiratoires des fruits peuvent être très variables selon les espèces de fruit, en raison d'une part des fortes variations dans la surface de la peau du fruit et d'autre part de la perméabilité cuticulaires (Greenspan *et al.* 1996; Lescourret *et al.* 2001; Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and Corelli-grappadelli 2010; B. Morandi *et al.* 2012; Zhang and Keller 2015).

## Objectif du travail

Bien que les précédents travaux de modélisations aient permis une avancée dans la compréhension et l'intégration des connaissances sur les mécanismes qui sous-tendent la croissance et la qualité des fruits, ils se sont surtout concentrés sur les derniers stades de développement (Baldazzi *et al.* 2013) et pour un nombre réduit d'espèces. Pour d'autres espèces de fruits charnus comme la pomme, la clémentine, la fraise, le concombre, le poivron, l'aubergine, les études sont rares et ne permettent pas d'appréhender les multiples processus

impliqués dans leur croissance. En mettant l'accent sur les différents processus décrits ci-dessus (flux de sucre et d'eau, métabolisme du carbone), une comparaison sur une grande diversité d'espèces à fruit charnu a été entreprise pour identifier les principales stratégies adoptées. Ces espèces sont représentatives de différents types de fruits charnus, tels que les fruits non climactériques (fraise, poivron, aubergine, concombre, raisin, clémentine) et les fruits climactériques (pomme, kiwi, tomate, nectarine), ce qui les rend biologiquement significatifs pour comparaison.

Le modèle biophysique de croissance (Fishman and Génard 1998) a été adapté pour permettre de simuler le développement de ces 10 espèces depuis le stade de floraison jusqu'à la maturité. Pour cela nous avons décidé de prendre en compte (1) la variation possible de la conductivité hydraulique xylémienne avec le développement du fruit et (2) les différences dans le métabolisme de l'amidon selon les espèces et l'incorporation du carbone dans les tissus structuraux, via le couplage avec le sous modèle générique de transformation métabolique du sucre présenté au chapitre 2. Cependant, par soucis de simplification nous avons maintenu constant la conductivité du phloème comme dans le modèle de croissance de base. Les valeurs des paramètres de ce modèle ont permis de caractériser chaque espèce, dont on a ensuite comparé, via le modèle, les flux impliqués dans la croissance ainsi que les pressions osmotiques et de turgescence en lien avec le métabolisme de l'amidon et la croissance des fruits.

# Matériels et méthodes

## Matériel végétal et conditions de culture

Cette étude a été menée sur 10 espèces de fruit : fraise (Fragaria × ananassa. cv Gariguette), concombre (Cucumis sativus L. cv Aljona), tomate (Solanum lycopersicum L. cv. Moneymaker), aubergine (Solanum melongena L. cv Monarca RZ), kiwi (Actinidia deliciosa Chev. cv Hayward), poivron (Capsicum annuum L. cv Gonto Clause), pomme (Malus x domestica Borkh. cv Golden), nectarine (Prunus persica L. cv Nectarlove), raisin (Vitis vinifera L. cv Cabernet Sauvignon) et clémentine (Citrus clementina hort. cv SRA 63). Le choix des différentes variétés a été fait soit en raison de leur intérêt commercial, soit en raison des études exhaustives déjà réalisées sur certaines d'entre elles (Biais *et al.* 2014; Colombié *et al.* 2015, 2017). Les expérimentations ont été réalisées en France sur des vergers de nectarines (INRA Avignon), de pommes (INRA Gotheron), de kiwi (chez un agriculteur près de Sainte Livrade) et de clémentine (INRA San Giuliano), en tunnel pour le poivron (INVENIO Sainte Livrade), et en serre pour le raisin (INRA Bordeaux), le concombre (CTIFL Carquefou), la tomate, l'aubergine et la fraise (INVENIO Sainte Livrade). Toutes les espèces ont été cultivées selon des pratiques commerciales, à l'exception du raisin (Ollat *et al.* 1998), cultivé comme boutures fruitières (voir le Tableau 1 du chapitre 1 pour les conditions de culture).

### Récolte des fruits et expérimentation.

Les récoltes des fruits, les mesures des masses et les analyses biochimiques ont été effectuées sur les 10 espèces telles que définies dans le chapitre 1. Outre ces mesures, des mesures de potentiel hydriques de l'arbre et de conductance cuticulaire du fruit ont été effectuées sur certaines espèces (cf. Tableau S1 et Tableau 2&3 du chapitre 1).

### Description du modèle

Dans le modèle (Fishman and Génard 1998), le fruit est décrit comme un compartiment unique séparé des tissus vasculaires (xylème, phloème) de la plante par des membranes composites. L'eau et le carbone provenant de la plante entrent dans le fruit via la membrane composite et sortent respectivement du fruit par les processus de transpiration et de respiration, qui dépendent des variables environnementales (température et humidité).

La croissance du fruit résulte des flux d'eau (dw/dt en g/h) et de matière sèche (ds/dt en g/h), et du bilan entre les flux entrants et sortants :

$$\frac{dw}{dt} = U_x + U_p - T_f \quad (1)$$

$$\frac{ds}{dt} = U_S - R_f \quad (2)$$

où $U_x$ [g eau.h$^{-1}$] et $U_p$ [g eau.h$^{-1}$] sont respectivement les flux d'eau xylémien et phloémien, $U_s$ [g sucre.h$^{-1}$] est le flux de sucre, et $T_f = Af*\rho*\alpha*(Hf-Ha)$ [g eau.h$^{-1}$] et $R_f = Rm+Rg$ [g sucre.h$^{-1}$] sont respectivement les pertes transpiratoires d'eau et respiratoires de sucre. Nous avons supposé que l'activité photosynthétique des fruits était négligeable, quel que soit leur âge, même au cours de leurs premiers stades du développement. La transpiration des fruits $T_f$ [g eau.h$^{-1}$] dépend de la surface du fruit (Af, cm²), de la conductance cuticulaire du fruit (ρ, cm h$^{-1}$) et des conditions climatiques via le déficit de pression de vapeur (qui dépend de l'humidité relative de l'air et de la température). La respiration du fruit ($R_f$) est la somme de (i) la respiration de croissance ($Rg$) proportionnelle au coefficient de respiration de croissance (qg) et au gain de masse sèche, et (ii) la respiration de maintenance ($Rm$) proportionnelle au coefficient de maintenance (qm) et à la masse sèche du fruit. La respiration de maintenance dépend de la température via le paramètre Q10.

Pour chacune des espèces sauf pour le kiwi, la conductance cuticulaire du fruit est assumée constante pour la fraise et la tomate et variable pour les autre espèces (ρ, cm h-1). Elle a été estimée par la perte de masse de fruits détachés, comme décrit dans le chapitre 1. Pour le kiwi, la conductance a été estimée à partir de l'équation empirique dépendante de l'âge du fruit de Hall et al. (2013) . La surface du fruit ($Af$) a été estimée à partir de la masse totale (Wf, g) du fruit par la relation empirique$Af = \lambda * W_f^n$, calibré dans le chapitre 1.
Les flux d'eau xylémien ($Ux$ [g eau.h-1]) et phloémien ($Up$ [g eau.h-1]) ont été calculés :

$$Ux = Ax * Lx * [Px - Pf - \sigma x * (\pi x - \pi f)] \quad (3)$$

$$Up = Ap * Lp * [Pp - Pf - \sigma p * (\pi p - \pi f)] \quad (4)$$

où les indices *x*, *p* et *f* désignent respectivement le xylème, le phloème et le fruit. $Ax$ et $Ap$, la surface (cm$^2$) d'échange entre les tissus vasculaires de la plante et le compartiment du fruit, est considérée proportionnelle à la surface du fruit ($Af$) selon un coefficient (a) constant et adimensionnel ($Ax$=$Ap$=a * $Af$. $Lx$ et $Lp$ sont respectivement la conductivité hydraulique [g cm² bar$^{-1}$ h$^{-1}$] du xylème et du phloème. $\sigma x$ et $\sigma p$ sont les coefficients de réflexion des solutés

pour la membrane composite. P et π sont respectivement les pressions hydrostatiques et osmotiques (bar) avec P $=\pi + \psi_x$. Le potentiel osmotique du xylème est considéré comme nul ($\pi x = 0$, concentration en solutés négligeable dans le xylème) et la membrane imperméable aux sucres ($\sigma x = 1$). Le coefficient de réflexion $\sigma p$ peut varier au cours de la croissance du fruit avec la disparition progressive des plasmodesmes suivant la fonction de Liu *et al.*, (2007) :

$$\sigma p = 1 - e^{-(\tau s * t^2)} \quad (5)$$

où t est l'âge du fruit (h) et $\tau s$ ($h^{-2}$) un paramètre constant. La membrane peut ainsi être totalement perméable aux sucres par la voie symplasmique ($\sigma p$ =0) jusqu'à être totalement imperméable en l'absence de connexion symplasmique ($\sigma p$ =1) La conductivité hydraulique xylémienne au cours du développement des fruits charnus (Dražeta *et al.* 2004; Morandi, Manfrini, Losciale, Zibordi, and Corelli Grappadelli 2010; Mazzeo *et al.* 2013; Nordey *et al.* 2015), peut également varier avec l'âge du fruit selon l'équation :

$$Lx = \frac{LxAsy}{1 + e^{kx(t-tx)}} \quad (6)$$

où *LxAsy* [g cm² $bar^{-1}$ $h^{-1}$] est la valeur maximale de la conductivité, *kx* [$h^{-1}$] représente la vitesse de perte de conductivité et *tx* [h] est l'âge du fruit quand la conductivité xylémienne est réduite de 50% par rapport à sa valeur maximale.

L'absorption totale de sucre du phloème vers le fruit est la somme des contributions dues (i) au flux de masse à travers les plasmodesmes, (ii) à la diffusion passive et (iii) au mécanisme de transport actif.

$$U_s = (1 - \sigma p) C_s U_p + A_p P_s (C_p - C_f) + \frac{s v_m C_p}{(K_m + C_p)(1 + e^{-(t-t^*)/\tau_a})} \quad (7)$$

(i) (ii) (iii)

avec

$$C_s = \frac{C_p + C_f}{2}$$

où $C_p$ et $C_f$ [g sucre g $fruit^{-1}$], sont respectivement les concentrations de sucre dans le phloème et dans le fruit. $P_s$ est le coefficient de perméabilité de la membrane composite aux solutés [g $sucre.cm^{-2}.h^{-1}$], $v_m$ est la vitesse maximale de transport actif des sucres par unité de matière sèche [g $sucre.gDW^{-1}.h^{-1}$], $K_m$ est la constante de Michaelis-Menten ou l'affinité du

transporteur [g sucre. g eau$^{-1}$]. Le deuxième terme du dénominateur de transport actif du sucre représente un effet inhibiteur qui augmente avec l'âge du fruit. $\tau_a$ est le temps caractéristique pour l'accumulation de l'inhibiteur et $t^*$ est le temps pour lequel l'inhibiteur diminue de moitié le transport actif.

L'expansion des fruits suit la loi de Lockhart (Lockhart 1965) en négligeant l'élasticité du fruit:

$$\frac{dV}{dt} = V\phi\left(P_f - Y\right) \quad (8) \quad \left(siP_f \geq Y\right)$$

$$dV/dt=0 \text{ si } P<Y$$

où V [cm$^3$] est le volume du fruit calculé à partir de la somme des masses sèche et fraîche rapportées respectivement à la densité de sucre et de l'eau , $\phi$ [bar$^{-1}$ .h$^{-1}$] est un paramètre constant représentant la plasticité des tissus du fruit et $Y$ [bar] la valeur seuil de pression de turgescence au-delà de laquelle l'expansion irréversible se produit. Le pas de temps du modèle est horaire.

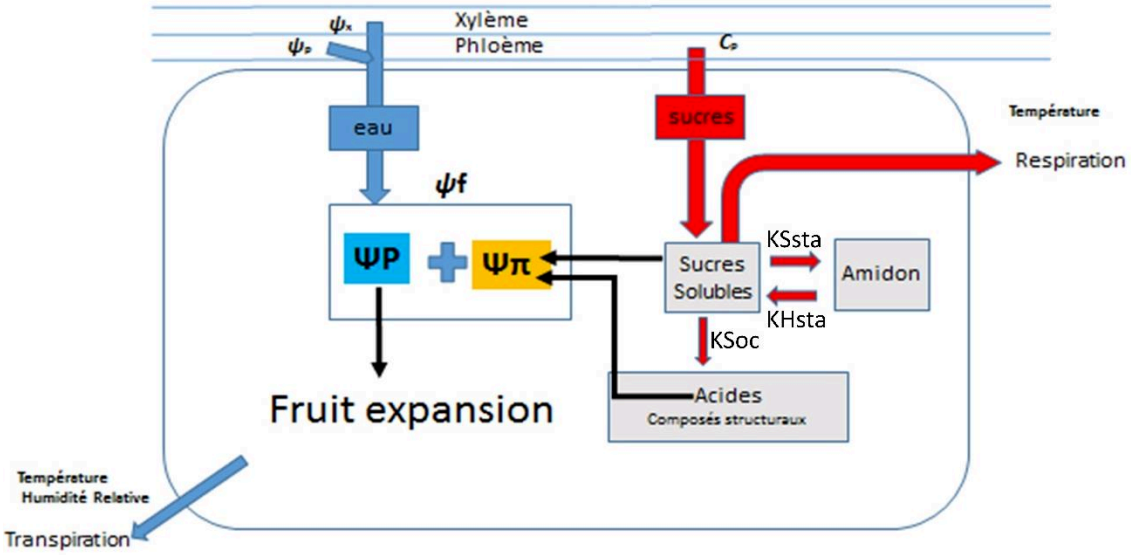



**Fig. 1 :** Représentation schématique du couplage du modèle croissance – sucre. Les flèches bleues indiquent les flux d'eau, les flèches rouges indiquent les flux métaboliques liés aux sucres et les flèches noires indiquent les flux d'information. Les flux d'eau et de sucre provenant du xylème et du phloème, influent sur le potentiel hydrique des fruits (ψf) en modifiant le potentiel osmotique (ψπ) et hydrostatique (ψP), et par conséquent influencent l'expansion du fruit.

## Extension du modèle

### Sous-modèle sucre

Le modèle original de Fishman et Génard, (1998) n'incluait pas le stockage transitoire de l'amidon au cours de la croissance du fruit (processus de synthèse et d'hydrolyse de l'amidon). La synthèse d'amidon à partir des sucres solubles entraîne la diminution de la pression osmotique du fruit et a contrario son augmentation lors de l'hydrolyse de l'amidon. Du fait de l'importance de l'amidon dans le métabolisme du sucre de certaines espèces, le modèle générique de sucre détaillé dans le chapitre 2 a été couplé au modèle de croissance (Figure 1). Le sucre du fruit peut rester (i) sous forme de sucres soluble indispensables pour l'absorption de l'eau dans le fruit, (ii) être transformé en amidon ou (iii) permettre la synthèse d'autres molécules (acides organiques, parois cellulaires, membranes). La quantité de sucre ($M_{sol}$) s'accumulant dans le fruit est calculée:

$$\frac{dM_{sol}}{dt} = \Delta CI + KH_{sta} * M_{sta} - \left(KS_{oc}(t) + KS_{sta}(t)\right) * M_{sol} \quad (9)$$

où t est l'âge du fruit [en heure après l'anthèse (h)], $\Delta CI$ est l'importation nette du carbone du phloème, $M_{sol}$ et $M_{sta}$ [en gC] sont respectivement les quantités de sucre soluble et d'amidon dans le fruit, $KH_{sta}$ [$g.g^{-1}.h^{-1}$ ] est le taux d'hydrolyse de l'amidon, $KS_{sta}$ (t) [en $g.g^{-1}.h^{-1}$] est le taux de synthèse de l'amidon et $KS_{oc}$ (t) [en $g.g^{-1}.h^{-1}$] est le taux de consommation des sucres pour la synthèse des composés autres que le sucre et l'amidon.

La pression osmotique totale du fruit intervenant dans les équations 3 et 4 du modèle couplé sucre-croissance est la somme des contributions de pression osmotique dues (i) aux sucres solubles obtenue avec le sous modèle sucre et (ii) aux substances osmotiquement actives autres que les sucres solubles supposé constante et la même pour toutes les espèces comme dans Fishman and Génard, (1998).

$$\pi_f = R * T * \left( \frac{\left( \frac{M_{sol}}{\frac{\sigma_{sol}}{w}} \right)}{M_x} \right) + \pi_{f0} \quad (10)$$

(i) (ii)

où R = 83.14 ($cm^3$ bar $mol^{-1}$ $K^{-1}$) est la constante des gaz parfaits, T la température en (K), $\sigma_{sol} = 0.4$ gC $g^{-1}$ est la teneur en carbone dans les sucres solubles, $M_x$ est la masse molaire du sucre majoritaire dans une espèce donnée (saccharose pour la clémentine et la nectarine et glucose pour les autres espèces) et $\pi_{f0} = 5.7$bar est une estimation moyenne déduite à partir des mesures de pression osmotique totale du fruit et de pression osmotique due aux sucres solubles calculée avec le modèle sucre sur des fruits de concombre, clémentine, pomme et nectarine (voir tableau S3).

Notons que le couplage du modèle sucre avec le modèle de croissance, nous permet de prendre en compte pour chacune des espèces la dynamique réelle de la concentration en sucre influencée par le métabolisme de l'amidon (synthèse/hydrolyse) et par la synthèse des composés différents du sucre et de l'amidon (parois, …).

### Entrées du modèle

Le modèle couplé de développement et composition des fruits est piloté par deux variables environnementales (température et humidité relative), deux variables décrivant la disponibilité en eau et en sucre pour le fruit (potentiel hydrique de la tige et concentration en sucre dans le phloème). L'évolution de la conductance cuticulaire du fruit au cours du temps a été estimée par interpolation linéaire entre les différentes dates de mesures. Certaines variables d'entrées proviennent de la littérature tandis que d'autres ont été mesurées ou estimées selon les espèces (voir tableau S1).

### Paramétrisation du modèle

La plupart des paramètres ont été obtenus à partir de la littérature (tableau 1) et de l'ajustement global sur les teneurs en sucre et en amidon précédemment effectué avec le modèle sucre (chapitre2), c'est-à-dire que l'ensemble des paramètres impliqués dans l'accumulation du sucre et de l'amidon a d'abord été estimé avec le sous modèle sucre (chapitre 2). Ensuite, les paramètres du modèle croissance impliqués dans l'accumulation de

Tableau 1 : Description des paramètres

| Description du paramètre | symbole et valeurs | unités | sources |
|---|---|---|---|
| **relation allométrique** | | | |
| surface du fruit | λ | adimensionnelle | experimentation |
| | η | | experimentation |
| ratio de la surface de la membrane composite à la surface du fruit | a =0.035 (valeur moyenne) | adimensionnelle | (Fishman and Génard 1998; Liu et al 2007; Hall and al 2013) |
| Pression osmotique due aux autres solutés | pif0 =5.7 (valeur moyenne) | bar | expérimentation |
| **Respiration** | | | |
| Coefficient de respiration de croissance | qg = 0.15 | adimensionnelle | Tableau S2 |
| Coefficient de respiration de maintenance | qm = 0.0002 | h-1 | Tableau S2 |
| ratio de température de la respiration de maintenance | Q10= 1.9 | adimensionnelle | Tableau S2 |
| **Transpiration** | | | |
| paramètre de conductance cuticulaire | ρ | cm/h | experimentation |
| **Absorption active du sucre** | | | |
| Constante de Michaelis pour le transport actif du sucre | km = 0.08 | g sacc/g eau | Milner et al., 1995 |
| vitesse maximale d'absorption de sucre | $vm$ | g sacc/g dw/h | calibration |
| inhibiteur (t* plus elevé implique une diminution tardive de l'absorption du sucre) | t* | h | calibration |
| inhibiteur ($\tau a$ élevé implique une accumulation lente de l'hinibiteur et donc une diminution lente du taux d'absorption active du sucre durant la croissance du fruit) | $\tau a$ | h | calibration |
| **Mass flow** | | | |
| Paramètre impliqué dans le transport du sucre de la voie symplasmique à la voie apoplasmique | $\tau s$ | h-2 | calibration |
| | | | |

| Tableau 1 : suite | | | |
|---|---|---|---|
| **Difusion** | | | |
| Coefficient de perméabilité de la membrane composite au soluté | Ps = 3.6e-05 | g.cm-2.h-1 | Ruan and Patrick 1995 |
| **Absorption de l'eau** | | | |
| Conductivité hydraulique du phloème | lp | | calibration |
| **Conductivité hydraulique du xylème** | | | |
| valeur minimale de la conductivité du xylème | Lxmin = 0 | g cm² $bar^{-1}$ $h^{-1}$ | fixée |
| valeur maximale de la conductivité du xylème | LxAsy | g cm² $bar^{-1}$ $h^{-1}$ | calibration |
| pente maximale de la courbe logistique inversée | kx | h-1 | calibration |
| l'âge du fruit où la conductivité du xylème atteint la moitié de sa valeur maximale | tx | h | calibration |
| Extensibilité irréversible de la paroi cellulaire | φ | bar-1.h-1 | calibration |
| Seuil pression hydrostatique nécessaire à la croissance | Y | bar | calibration |

Tableau 2 : Description des paramètres estimés et des bornes des paramètres pour les dix espèces de fruits

| | | raisin | | fraise | | tomate | | clémentine | | kiwi | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom du paramètre | description | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure |
| t* | inhibiteur de l'accumulation du sucre | 1E-05 | 4E+03 | 1E-03 | 4E+03 | 1E-05 | 8E+03 | 1E-05 | 1E+04 | 1E-05 | 8E+03 |
| Ta | temps caractéristique d'inhibition | 1E+00 | 4E+03 | 1E-05 | 4E+03 | 1E+00 | 2E+04 | 1E+00 | 2E+04 | 1E+00 | 2E+04 |
| Vm | vitesse maximale d'absorption active du sucre | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 |
| φ | plasticité du fruit | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 3E-01 | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 |
| Y | Seuil pression hydrostatique nécessaire à la croissance | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 |
| Lp | conductivité hydraulique du phloème | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 2E+00 | 1E-08 | 8E+00 | 1E-20 | 1E-08 | 1E-08 | 2E+00 |
| LxAsy | conductivité hydraulique maximale du xylème | 9E-10 | 1E+00 | 9E-10 | 4E+00 | 9E-10 | 5E+00 | 9E-10 | 2E+00 | 9E-10 | 1E+00 |
| Kx | vitesses de perte de conductivité hydraulique du xylème | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 |
| Tx | temps de perte de conductivité hydraulique du xylème | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 6E+03 | 1E+00 | 1E+04 | 1E+00 | 6E+03 |
| Ts | Paramètre impliqué dans le transport du sucre par voie symplasmique | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-03 |

Tableau 2 suite :

| | | pomme | | poivron | | nectarine | | concombre | | aubergine | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nom du paramètre | description | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure | Inférieure | Supérieure |
| t* | inhibiteur de l'accumulation du sucre | 1E-05 | 2E+03 | 1E-05 | 2E+03 | 1E-05 | 4E+03 | 1E-05 | 2E+03 | 1E-05 | 2E+03 |
| Ta | temps caractéristique d'inhibition | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 |
| Vm | vitesse maximale d'absorption active du sucre | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 | 1E-05 | 5E-01 |
| φ | plasticité du fruit | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 | 1E-08 | 5E-01 |
| Y | Seuil pression hydrostatique nécessaire à la croissance | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 | 0E+00 | 2E+01 |
| Lp | conductivité hydraulique du phloème | 1E-08 | 2E+00 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-20 | 1E-08 | 1E-08 | 2E+00 | 1E-08 | 1E-01 |
| LxAsy | conductivité hydraulique maximale du xylème | 9E-10 | 1E-02 | 9E-10 | 2E+00 | 9E-10 | 2E+00 | 9E-10 | 2E+00 | 9E-10 | 2E+00 |
| Kx | vitesses de perte de conductivité hydraulique du xylème | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 | 1E-08 | 1E-01 |
| Tx | temps de perte de conductivité hydraulique du xylème | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 | 1E+00 | 4E+03 |
| Ts | Paramètre impliqué dans le transport du sucre par voie symplasmique | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 | 9E-10 | 1E-01 |

masse sèche ( $v_m, t^*, \tau_a, \tau_s$), la conductivité hydraulique du phloème ($L_p$) et du xylème ($L_{xAsy}, k_x, t_x$), la plasticité du fruit ($\phi$) et la valeur seuil de la pression hydrostatique du fruit ($Y$), ont été estimées à travers un ajustement global sur les masses sèche, fraîche et les concentrations en sucre et en amidon du fruit. Tous les paramètres estimés sont présentés dans le tableau 2.

Pour évaluer la qualité de l'ajustement du modèle, nous avons utilisé l'erreur quadratique moyenne normalisée (NRMSE), comme indice de performance. La NRMSE est calculée selon Wallach et al (2014) comme suit :

$$NRMSE[\%] = \frac{100 * \sqrt{\frac{1}{n} * \sum_{i=1}^{n} (Oi - Si)^2}}{\frac{1}{n} * \sum_{i=1}^{n} Oi} \quad (11)$$

où *Oi* et *Si* sont respectivement les valeurs observées et simulées, et *n* est le nombre d'observations.

Pour chacune de nos quatre variables d'intérêt, un indice NRMSE a ainsi été calculé. Nous cherchons à trouver les combinaisons de 10 paramètres ( $v_m, t^*, \tau_a, \tau_s, L_p, L_{xAsy}, k_x, t_x, \phi, Y$) permettant de minimiser simultanément nos quatre indices de performance : $NRMSE_{MS}$, $NRMSE_{MF}$, $NRMSE_{CSS}$, $NRMSE_{CA}$. Les indices MS, MF, CSS et CA des NRMSE représentent respectivement les observations de masse sèche, masse fraîche, concentration des sucres solubles et concentration de l'amidon.

La littérature propose de nombreux algorithmes d'optimisation permettant de résoudre différents problèmes d'optimisation. Cependant, dans le cas où le modèle utilisé est complexe et numérique c'est-à-dire où les objectifs à minimiser ne peuvent pas être explicitement exprimés en fonction des paramètres à estimer, le choix est beaucoup plus restreint. En effet, pour favoriser la convergence pour l'estimation des paramètres, certains algorithmes requièrent les dérivées premières (Jacobien) et secondes. Si les fonctions objectives ne sont pas dérivables explicitement par rapport aux paramètres à estimer, la plupart des algorithmes classiques peuvent ne permettre de trouver que des optima locaux, sans certitude de savoir si ces sont des optima globaux.

D'autres types d'algorithmes, comme les métaheuristiques, ont été proposés dans la littérature. Ces algorithmes ne requièrent pas de dérivée ou d'information sur le lien entre les paramètres à estimer et l'objectif à minimiser. Nous pouvons citer à titre d'exemple les

algorithmes évolutionnaires, le recuit simulé, la recherche taboue, ou les essaims particulaires. Les algorithmes évolutionnaires sont parmi les métaheuristiques les plus utilisés. Même si ces algorithmes ne garantissent pas l'optimalité de la (ou des) solution(s) obtenue(s), ils présentent un rapport qualité de l'estimation/temps de calcul intéressant. Parmi ces algorithmes, l'algorithme NSGA-II mis au point par Deb *et al.*, (2002) a fait ses preuves dans plusieurs domaines d'application et est considéré comme une référence dans la communauté scientifique traitant de l'optimisation multi-objectif.

Malgré ses performances, l'algorithme NSGA-II a montré ses limites au-delà de 3 objectifs (Ishibuchi *et al.* 2008). Par conséquent, nous avons choisi de réduire la taille de notre problème d'optimisation pour ne garder que trois objectifs à minimiser. Pour ce faire, et en se basant sur nos simulations préliminaires, nous avons choisi d'agréger les indices de performance $NRMSE_{CSS}$ et $NRMSE_{CA}$ (respectivement les erreurs sur les concentrations en sucres solubles et en amidon) dans un seul objectif. Nous avons choisi de minimiser l'erreur maximale entre les deux erreurs. En procédant ainsi, l'algorithme pénalise les écarts importants sur ces 2 objectifs. Après cette simplification, notre problème de calibration a donc pu être reformulé comme suit :

$$min_{X \in D}$$

où $X = \left(v_m, t^*, \tau_a, \tau_s, L_p, L_{xAsy}, k_x, t_x, \phi, Y\right)^T$ est le vecteur des paramètres à estimer et $D$ est l'espace de recherche défini par les bornes des paramètres fixées selon les dires d'experts et d'après la littérature (voir tableau 2).

Nous avons solutionné notre problème de calibration en utilisant l'algorithme NSGA-II via le package Java jMetal. L'algorithme a été lancé avec une taille de population fixée à 200 et un nombre de générations fixé à 300. Comme l'algorithme NSGA-II est stochastique, le processus d'optimisation a été répété 200 fois pendant la phase de calibration. Toutes les solutions issues de la calibration du modèle ont d'abord été filtrées grâce à la fonction is_dominated du package "emoa" (développé pour R) afin d'identifier le front de Pareto qui consiste à l'obtention de meilleurs compromis entre les trois fonctions objectifs.

Ensuite, parmi les $X_i$ solutions appartenant à l'ensemble P de solutions optimales du front de Pareto, nous avons sélectionné les 100 meilleures solutions dont les combinaisons de paramètres minimisent la somme des 3 fonctions objectives ($NRMSE_{MS}$ + $NRMSE_{MF}$ + max [$NRMSE_{CSS}$, $NRMSE_{CA}$]).

## Analyse des jeux de paramètres

Une analyse en composantes principales normée (centrée et réduite) ( package " ade4 " développé pour R,  Dray and Dufour, 2007) a été réalisée sur l'ensemble des jeux de paramètres sélectionné pour les 10 espèces afin de regrouper ou séparer les espèces en fonction de leur stratégie et mode de fonctionnement.

# Résultats

## Le modèle simule correctement la variabilité inter-spécifique de la croissance et de la composition

L'évolution de la masse sèche et fraîche a été suivie sur dix espèces de fruits charnus au cours de leur développement (Fig. 2). La durée, les dynamiques de croissance et les poids finaux étaient très différents entre les espèces.

A maturité, une grande différence de masse fraîche a été observée entre les espèces, avec une masse de 1035g ± 156 pour l'aubergine, suivie du concombre (870g ± 138), de la nectarine (276g ± 37), de la pomme (212 g ± 19), du poivron (206g ± 34), du kiwi (97g ± 14), de la clémentine (72g ± 12), de la tomate (65g± 5), de la fraise (8g ± 2) et du raisin (1.4g ± 0.2). Les dynamiques de croissance en masse fraîche et sèche des fruits ont atteint un plateau au cours de la période de développement, à l'exception de la fraise, de la tomate et de la nectarine dont la croissance, aussi bien en masse fraîche que sèche, a perduré jusqu'à la maturité des fruits et leurs récoltes (Fig. 2). Les masses fraîche et sèche du poivron et du kiwi ont atteint leurs plateaux dès la moitié de leur développement alors que les autres espèces ont atteint le plateau après 70% de leur développement. Des variations importantes ont également été observées dans la masse sèche des fruits, et si l'aubergine a bien la masse sèche la plus grande (57g ± 8), et le raisin avec la masse sèche la plus faible (0.3g ± 0.04), le classement des autres espèces n'est pas identique au classement en masse fraîche (Fig.2), laissant entrevoir que les teneurs en matière sèche et leurs dynamiques étaient très différentes entre les espèces.

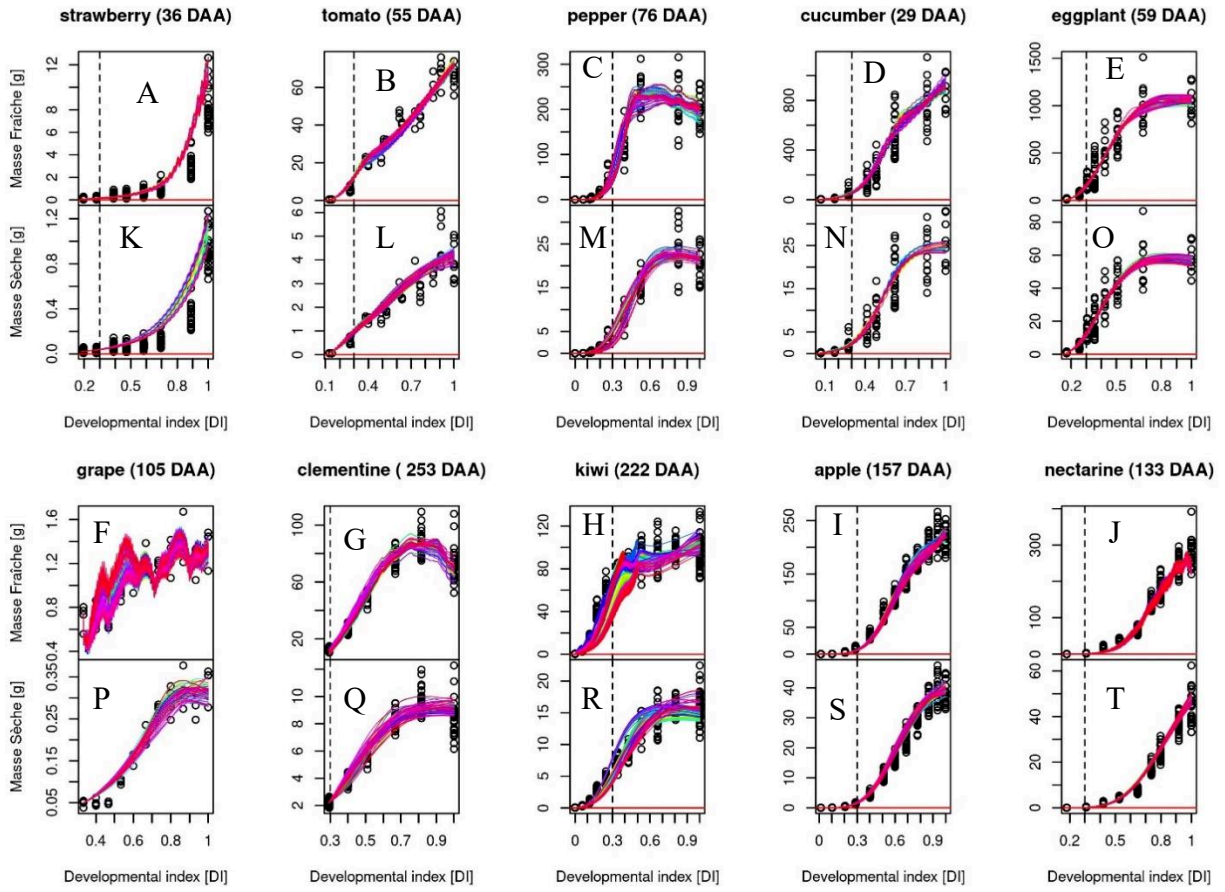



Fig. 2 : Evolution de la masse fraîche (A-J) et de la masse sèche (K-T) des fruits au cours de leur développement ; fraise (A,K), tomate (B,L), poivron (C,M), concombre (D,N), aubergine (E,O), raisin (F,P), clémentine (G,Q), kiwi (H,R), pomme (I,S) et nectarine (J,T). Les masses fraîches et sèches sont exprimées en g. Les points représentent les données expérimentales. Les courbes sont les simulations en masse fraiche, sèche et les concentrations en sucre soluble et en amidon obtenues à l'aide du modèle couplé sucre croissance, avec les 100 meilleures combinaisons de paramètres. L'indice de développement est le temps de développement normalisé par rapport au temps total entre l'anthèse et le fruit mûr (36 jours pour la fraise, 55 jours pour la tomate, 76 jours pour le poivron, 29 jours pour le concombre, 59 jours pour l'aubergine, 105 jours pour la grappe, 253 jours pour la clémentine, 222 jours pour le kiwi, 157 jours pour la pomme et 133 jours pour la nectarine).

Le modèle couplé sucre–croissance (Fig. 1) a été calibré sur les 10 espèces de fruits. Pour assurer une bonne exploration de l'espace des paramètres, la procédure de calibration du modèle s'appuyant sur un algorithme évolutionnaire a été répétée 200 fois pour chaque espèce. Le modèle a été capable de reproduire la diversité des évolutions des masses fraîches et sèches des fruits et de leurs concentrations en sucre et en amidon au cours du développement. Quelle que soit l'espèce, les dynamiques des masses sèches et fraîches ont été correctement simulées et comparées aux résultats expérimentaux (Fig. 2) avec des NRMSE entre 12 et 40% pour la plupart des espèces, excepté pour la fraise et le poivron pour lesquels le NRMSE était de 60-75% (Fig.3). Pour les sucres et l'amidon, l'ajustement aux données est également satisfaisant avec des NRMSE entre 20 et 64%, les valeurs les plus élevées correspondant à l'aubergine et la clémentine (Fig. 3). Pour ces dernières espèces, la concentration maximale en amidon mesurée était toujours très faible (moins de 1g/100 gFM), ce qui donnait lieu à une valeur NRMSE élevée, même pour un léger écart par rapport aux données mesurées (Fig. 2). La figure 9 présente les valeurs des paramètres pour les 100 meilleures combinaisons. Les valeurs des paramètres présentent de grandes variations entre les espèces et parfois au sein d'une même espèce.

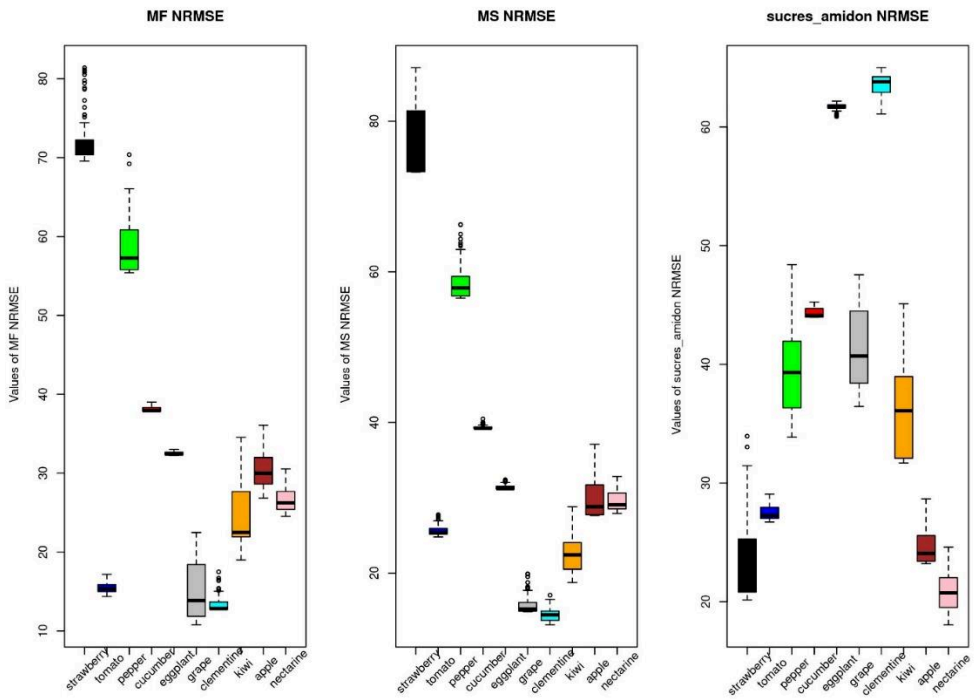



Fig. 3 : Distribution de l'erreur quadratique moyenne normalisée entre les mesures et les simulations (NRMSE) pour la masse fraîche (A), la mase sèche (B), et les concentrations en

sucres solubles et en amidon (C) pour chaque espèce. Les simulations ont été sélectionnées sur la base des plus faibles valeurs de NRMSE.

### Comparaison inter-espèces basée sur les paramètres biophysiques de croissance du fruit

Pour étudier les différences interspécifiques, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur les valeurs des paramètres biophysiques estimées pour toutes les espèces. Les deux premières composantes principales représentaient 46.1 % de la variabilité totale (29.8 % PC1 et 16.3 % PC2). Sur la figure 4, le plan PC1xPC2 oppose les fruits des espèces herbacées à durée de croissance courte (tomates, concombre, aubergines, fraise et poivron) aux fruits des espèces ligneuses (raisin, kiwi, clémentine, nectarine et pomme) à durée de croissance longue. Il faut noter qu'il n'y a pas de lien entre cette durée de croissance et la masse du fruit à maturité. En revanche, les espèces à croissance longue ont des teneurs en matière sèche à la récolte plus importantes (12-25% contre 3-12%, Figure S2 supplémentaire). Les fruits à croissance courte présentent des valeurs élevées de conductivité hydraulique maximale du xylème (*lxAsy*), mais une chute précoce et rapide de cette conductance (valeur faible tx et au contraire forte de kx), contrairement aux espèces à croissance longue. Ceci se traduit pour les espèces à croissance longue par une conductivité xylémienne plus stable dans le temps, permettant un flux xylémien qui perdure plus longtemps ce qui leur permet de croitre sur de longues périodes (6 à 8 mois selon l'espèce). Une forte conductivité hydraulique du phloème (*lp*) est également associée aux espèces à croissance courte.

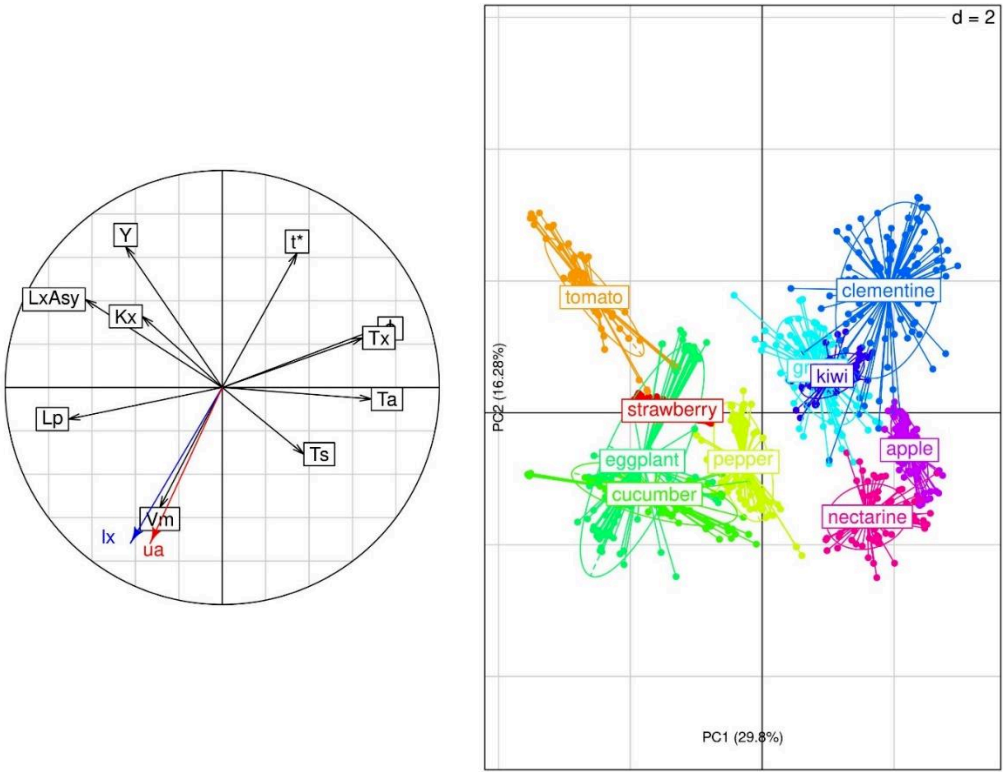



Fig. 4 : Analyse en composantes principales (ACP) des dix espèces de fruits (PC1xPC2). Les fonctions de conductivité hydraulique du xylème (lx) et du transport actif du sucre (ua) ont été projetées comme variables non actives sur les deux premiers axes de l'ACP (A). Les paramètres de conductivité hydraulique, d'expansion cellulaire et de l'accumulation du sucre ont été utilisés pour discriminer les dix espèces de fruits (B). Chaque point représente la projection de l'une des 100 meilleures combinaisons de paramètres.

Les espèces à croissance longue présentent de forte valeur d'extensibilité ($\phi$) du volume du fruit, mais des différences faibles entre la pression de turgescence du fruit (P*f*) et le seuil de croissance *Y* (Fig. 5) contrairement aux espèces à croissance courte. Ces résultats suggèrent que la stratégie des espèces à croissance courte s'appuie sur une forte pression de turgescence du fruit (Fig.8) permettant une croissance rapide en peu de temps. Cette dépendance à la pression de turgescence du fruit doit les rendre plus sensibles aux stress hydriques. Les espèces à croissance longue ont plutôt une forte plasticité du fruit ($\phi$) ce qui limite la dépendance de la croissance en volume aux fortes pressions de turgescence. Le paramètre $\tau$s est mal représenté sur le plan PC1xPC2. Les faibles valeurs de $\tau$s observées chez le kiwi, la tomate et l'aubergine

suggèrent que la contribution à l'entrée des sucres dans le fruit par le flux de masse via les plasmodesmes peut être importante pour ces espèces. Les espèces à croissance longue ont un fort temps caractéristique ($\tau_a$) indiquant la mise en place lente de l'inhibition de l'absorption active du sucre contrairement aux espèces à croissance courte.

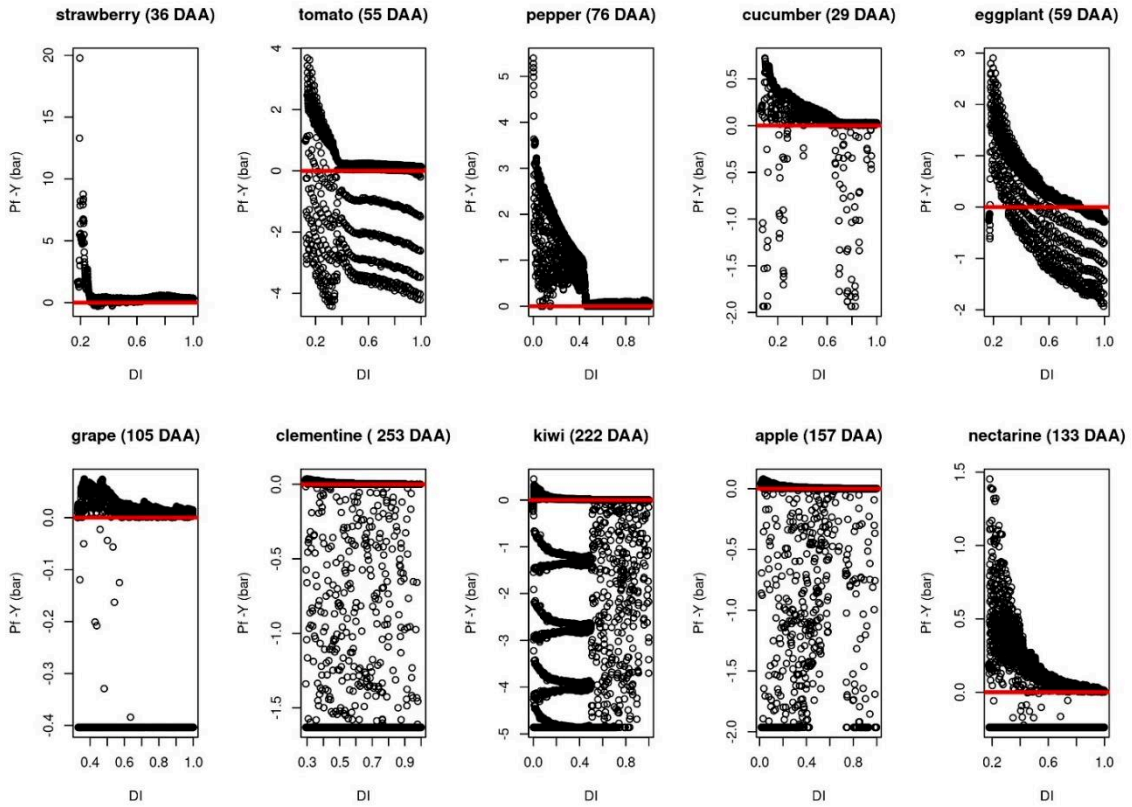



Fig. 5 : Variation au cours du temps de la différence entre la pression de turgescence du fruit (Pf) et la valeur seuil (Y) au-delà de laquelle il y a croissance irréversible. En deçà de cette valeur, il n'y a pas de croissance.

La deuxième composante principale oppose principalement les espèces de plus de 250 g comme la nectarine, le poivron, la pomme, l'aubergine et le concombre aux espèces de moins de 100g comme à la clémentine, le kiwi, la tomate, le raisin et la fraise. Cet axe est associé d'une part à la vitesse maximale d'absorption active du sucre ($v_m$) et au temps où l'inhibiteur a diminué de moitié le transport actif du sucre ($t^*$), le premier étant très élevée chez les espèces à gros fruit et le deuxième pour les petits fruits. Il est intéressant de noter que la distribution des espèces sur l'axe PC2 (Fig. 4) est corrélée (r=97.2%) à la masse fraîche finale du fruit. Cela laisse suggérer que pour faire des fruits de grosse taille, une des stratégies serait d'augmenter la vitesse maximale d'absorption active du sucre ($v_m$) et de ralentir son inhibition (faible t*) de manière à augmenter dans la durée le transport actif.

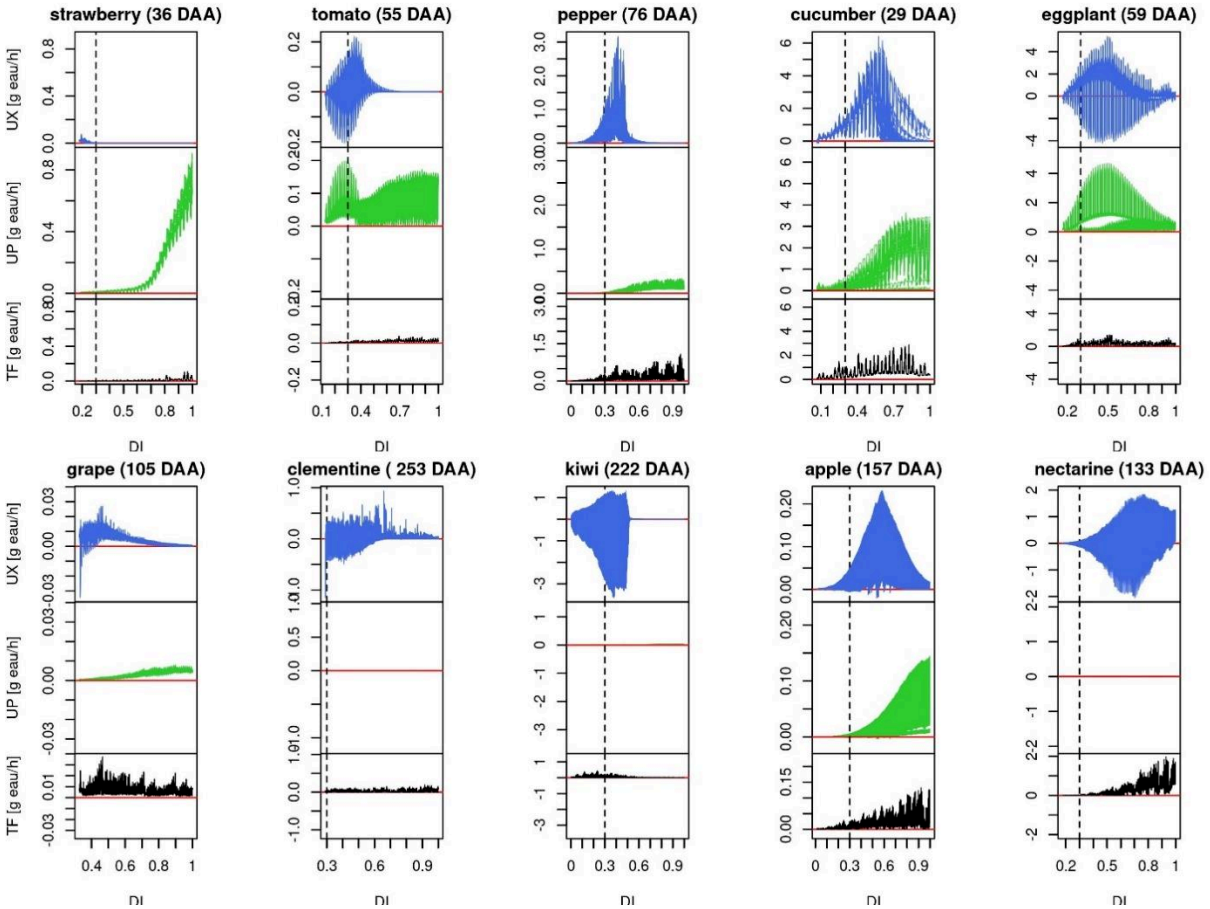



Fig. 6: dynamiques des flux d'eau xylémien (bleu), phloèmien (vert) et de la transpiration (noir) pour les 10 espèces de fruits au cours de leur développement, en fonction de l'indice de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de l'une des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées.

## Comparaison inter-espèces des flux d'eau et de carbone durant la croissance des fruits

La figure 6 qui représente les flux xylémiens, phloémiens et transpiratoires montre une grande diversité de situations, aussi bien en termes d'intensité des flux que de leurs contributions relatives, ce qui laisse suggérer qu'il existe différentes stratégies d'accumulation d'eau chez les fruits charnus. Hormis les cas du concombre, de l'aubergine et du kiwi, le flux xylémien décroit généralement beaucoup plus vite chez les espèces à croissance courte que chez les espèces à croissance longue (Fig.6). Cette décroissance est cohérente avec les observations faites précédemment sur le plan PC1xPC2, avec des âges de fruit plus faibles où la conductivité du xylème atteint la moitié de sa valeur maximale (*tx*, Fig.4). L'intensité du flux phloémien varie fortement (Fig. 6) et cela en accord avec le gradient de conductivité du phloème observée pour les différentes espèces sur le plan PC1 x PC2

Il est frappant de constater que chez trois espèces à croissance longue, le kiwi, la nectarine et la clémentine, l'entrée d'eau dans le fruit provient exclusivement du xylème. Toutes les espèces à croissance courte étudiées importent de l'eau dans le fruit via le phloème (cas de la fraise) ou simultanément via les deux tissus vasculaires (xylème/phloème) (Fig.6). Si l'on exclut le cas de l'aubergine, les flux xylémiens et phloémiens ont des cinétiques très différentes selon les espèces mais avec en général un flux phloémien qui se poursuit après l'arrêt du flux xylémien. Il est intéressant de noter que l'arrêt du flux xylémien coïncide avec le moment ou le fruit a atteint son plateau de croissance en poids frais sauf chez la tomate et la fraise (Fig.2). Pour ces deux espèces, le flux phloémien est intense jusqu'à maturité des fruits.

Si tous les fruits perdent de l'eau via le processus de transpiration, les intensités sont toutefois très différentes suivant les espèces. Pour certaines espèces comme la tomate, l'aubergine, le kiwi, la nectarine, le raisin et la clémentine, il apparaît également un flux xylémien inverse entre le fruit et la plante, communément appelé « backflow », c'est-à-dire que le fruit cède de l'eau à la plante à certaines périodes de sa croissance et pour certaines périodes de la journée. L'intensité du backflow est variable selon les espèces et semble se maintenir durant toute la période fonctionnelle du xylème sauf chez le raisin et la clémentine où le backflow est uniquement présent au début de la période d'étude. Ce flux d'eau du fruit vers la plante a une intensité nettement plus forte que le flux transpiratoire, à l'exception du cas du raisin.

Les résultats de la figure 7 montrent que seules trois espèces, une à croissance longue (le kiwi) et deux à croissance courte (la tomate et l'aubergine) ont un déchargement des sucres phloémiens à la fois par flux de masse via la voie symplasmique et par transport actif via la

voie apoplasmique. Il n'y a pas de lien évident entre la voie préférentielle d'accumulation des sucres dans le fruit et sa taille. Cependant, ces trois espèces sont caractérisées par des croissances précoces très rapides.

Pour la tomate, le transport du sucre par voie symplasmique est très important au début du développement du fruit. Le transport de sucre par la voie apoplasmique atteint des valeurs élevées après la chute progressive du transport symplasmique. A contrario, pour l'aubergine, le transport du sucre par flux de masse via la voie symplasmique est le principal mode de transport du sucre du phloème au fruit et perdure de façon parallèle au transport actif du sucre.

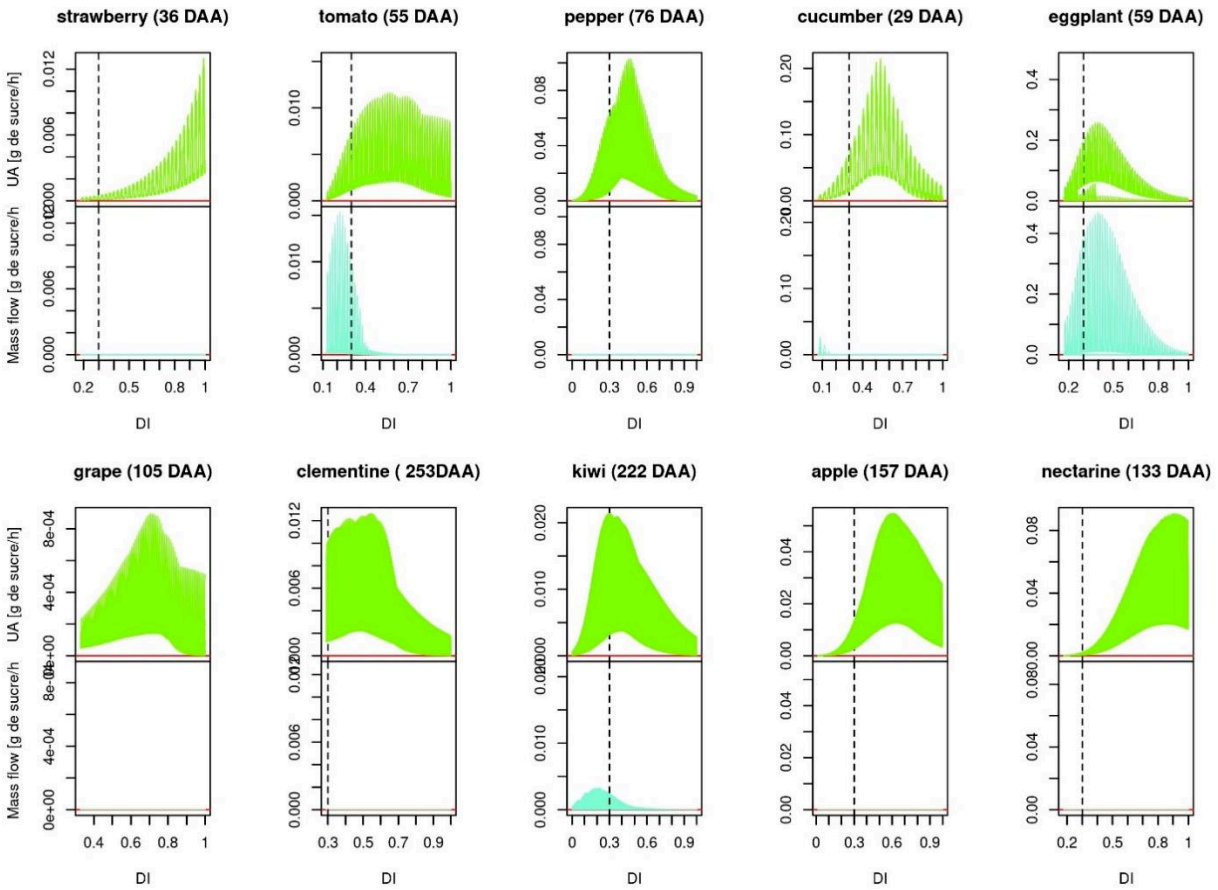



Fig. 7 : dynamiques des flux de sucre phloémien vers le fruit par la voie apoplasmique (bleu), et par la voie symplasmique (mass-flow, aigue marine) en fonction de l'index de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de l'une des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées.

## Comparaison inter-espèces des liens entre croissance, pressions osmotiques et de turgescence, et concentration en amidon

La figure 8 montre que les espèces à croissance courte ont de fortes valeurs de pressions de turgescence qui diminuent au cours du développement du fruit comparativement aux espèces à croissance longue dont les faibles valeurs de pressions de turgescence restent constantes tout au long du développement du fruit. Vu les valeurs seuils de pression de turgescence obtenues pour la croissance irréversible (*Y*) (Figure 9), les fortes valeurs de pression de turgescence (P*f*) observées chez les fruits à croissance courte entraînent de fortes valeurs de différence entre P*f* et *Y* observées à la figure 5.

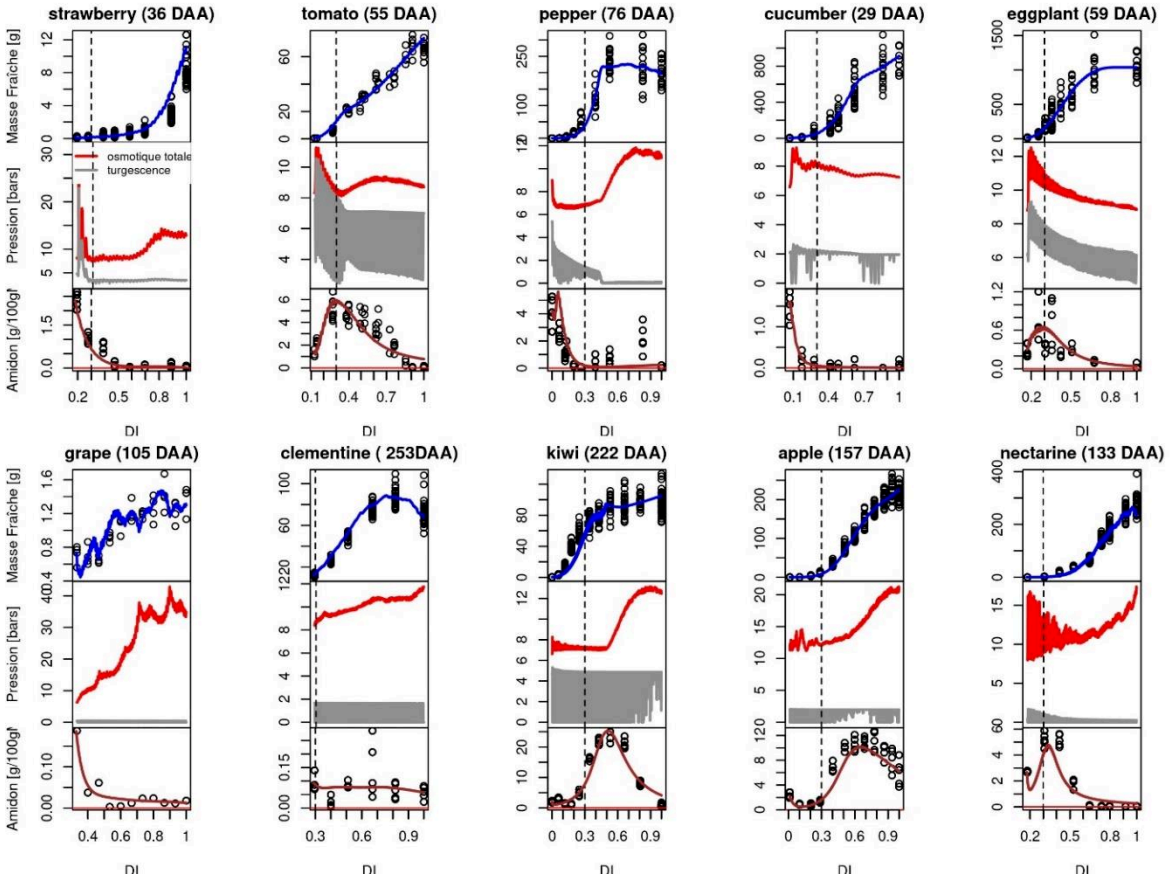



Fig. 8 : dynamiques de la masse fraîche, de la pression osmotique et de la pression de turgescence, de l'amidon en fonction de l'indice de développement normalisé (0 à la floraison, et 1 à la maturité). Chaque courbe d'une espèce donnée provient de la meilleure des 100 meilleures solutions optimales sélectionnées.

Chez les espèces ayant encore beaucoup d'amidon après 20% de leur développement (tomate, kiwi, pomme et nectarine), l'hydrolyse de l'amidon entraîne l'augmentation de la pression osmotique, qui permet le maintien de la pression de turgescence nécessaire à la croissance. Néanmoins, on peut avoir chez certaines espèces une forte augmentation de la pression osmotique en l'absence d'amidon (fraise, poivron, raisin et clémentine).

Les deux espèces de masse fraîche élévée (concombre et aubergine) stockent pas ou peu d'amidon et voient leur pressions osmotique diminuer au cours de leur développement, liée au moins partiellement à la dilution par l'eau (cf. Chapitre. 2).

On peut remarquer que les espèces dont les fruits atteignent précocement leur plateau de croissance comme le kiwi et le poivron, voient leur concentration en sucres et leur pression osmotique augmenter fortement. La cause en est l'accumulation de sucres due à l'hydrolyse de l'amidon pour le kiwi ainsi qu'à des apports phloémiens de sucres pour le poivron et à l'absence de dilution, le volume du fruit ne changeant plus.

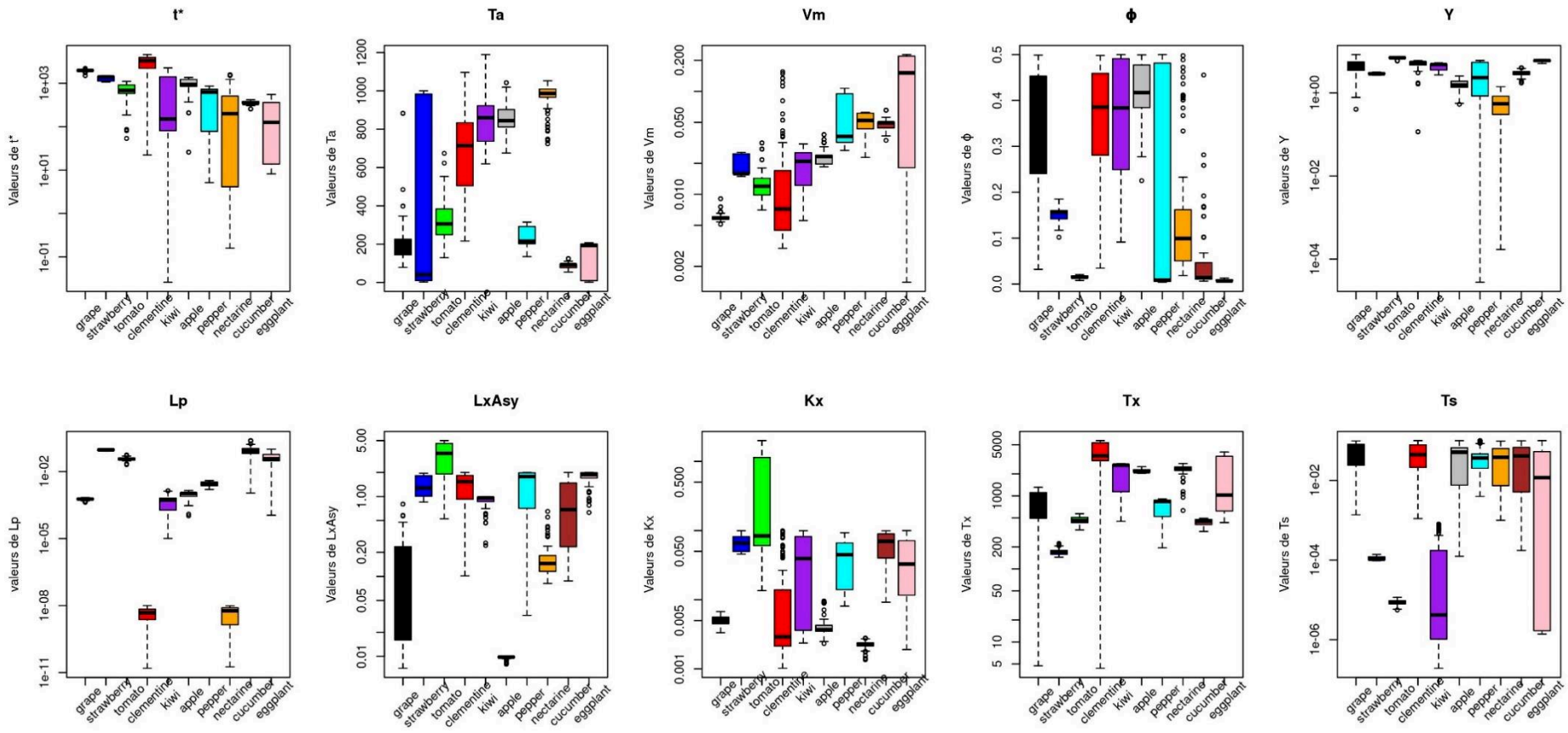



Figure 9: Distribution des paramètres de transport actif du sucre (t*, Ta, Vm), de l'expansion cellulaire (ϕ, Y), de conductivité hydraulique du phloème (Lp), de conductivité hydraulique du xylème (LxAsy, Kx, Tx) et de transport du sucre par voie symplasmique (Ts) pour chaque espèce. Chaque boxplot est composé des 100 meilleures combinaisons de paramètres pour chaque espèce.

## Discussion

Les fruits charnus sont caractérisés par une diversité de patterns et de temps de croissance. L'objectif de ce chapitre est d'étudier les similitudes et les différences dans les stratégies d'accumulation de carbone et d'eau entre dix espèces de fruits contrastés en utilisant une approche de modélisation. Pour ce faire, nous avons couplé le modèle de croissance biophysique développé à la base pour la pêche au modèle générique de sucre développé dans le chapitre 2. Le couplage du modèle sucre-croissance est basé sur la description des processus biophysiques et biochimiques majeurs impliqués dans le fonctionnement des fruits lors de leur développement. Le modèle couplé a été capable de reproduire les dynamiques de croissance des masses fraîches et sèches. Cette approche a permis de classer les espèces fruitières en fonction de leur durée de développement et de quantifier la contribution des principaux processus biophysiques et biochimiques qui influent sur le fonctionnement des fruits.

### Comparaison inter-espèces de stratégie d'import d'eau dans le fruit

Un résultat intéressant de notre étude est que les espèces à croissance courte sont caractérisées par des conductivités hydrauliques élevées du xylème et du phloème. Ces conductivités conduisent à des flux d'eau importants entraînant une pression de turgescence élevée du fruit. Cependant, pour ces espèces, la conductivité diminue ensuite rapidement au contraire des espèces à croissance longue ou la perte de conductivité est plus tardive. Les espèces à croissance longue sont associées à une forte plasticité des tissus qui compense une pression de turgescence moindre et un déchargement des sucres plus régulier dans le temps. Ces différences de stratégies ne se traduisent pas par des fruits de tailles différentes, mais par des vitesses de croissances différentes. Les espèces à croissance courte ont tendance à privilégier l'accumulation d'eau associée à de fortes pressions de turgescences, ce qui se traduit par des teneurs en matière sèche des fruits faibles.

La diversité et l'intensité des contributions relatives du phloème, du xylème, de la transpiration et du flux d'eau inverse du fruit vers la plante de la plupart des espèces suivies sont cohérentes avec les observations faites dans la littérature (Cf. introduction). L'arrêt précoce du flux d'eau xylémien chez la plupart des espèces à courte durée de croissance, à l'exception du concombre et de l'aubergine, indiquerait l'isolement de ces fruits des vaisseaux du xylème de la plante. En effet, la perte de conductivité peut être due à une embolie progressive ou à des discontinuités xylémienne comme observées dans les pédicelles de la fraise (Pomper and Breen 1995) et de la tomate (Lee 1989). Cette perte fonctionnelle ou discontinuité vasculaire ralentie puis stoppe

tout flux xylèmien d'eau et empêche ainsi le mouvement des solutés vers le xylème. Pomper and Breen (1995) ont observé dans l'apoplasme de la fraise des concentrations de solutés relativement basses aux stages jeunes et des concentrations élevées en solutés durant la maturité du fruit. Les concentrations élevées de solutés peuvent fortement modifier la pression osmotique du fruit et accroître la différence de potentiel hydrique entre la plante et le fruit, ce qui peut largement favoriser les apports d'eau par le phloème dans le fruit. A contrario, des concentrations apoplastiques relativement basses en solutés observées aux stades jeunes de la fraise suggèrent que le flux phloémien à un rôle mineur au début du développement (Pomper and Breen 1995), ce qui est cohérent avec le faible flux d'eau phloémien prédit par notre modèle au début du développement de la fraise (Fig. 6).

Il est intéressant de noter la forte prépondérance de la contribution des flux d'eau xylémien dans l'accumulation d'eau chez la plupart des espèces à durée de croissance longue. Chez ces espèces, le flux phloémien vers les tissus du fruit reste toujours marginal. Dans ces conditions, pour maintenir un déchargement des sucres du phloème vers le fruit, il importe d'avoir, même en l'absence de flux phloémien entrant dans le fruit, une circulation phloémienne permettant l'apport de sucre par flux de masse, et pas seulement par diffusion dans les tubes criblés. Ceci impliquerait un transfert de l'eau du phloème vers le xylème permettant la recirculation de l'eau phloémienne. On aurait ici une sorte de moteur hydraulique qui permettrait de maintenir un fort flux de sucres via le phloème (nécessaire pour maintenir la concentration dans le phloème à l'interface plante/fruit) tout en n'accumulant pas d'eau directement du phloème dans le fruit.

On retrouve dans nos résultats de simulations le phénomène de « back flow », flux d'eau du fruit vers la plante par le réseau vasculaire xylémien, noté chez plusieurs espèces dans la littérature (Cf. introduction) lorsque la différence de potentiel entre la plante et le fruit est négative. Mais ce reflux d'eau xylèmien lorsqu'il existe est nettement plus important que les pertes transpiratoires à l'exception du raisin, chez qui la prépondérance de la perte d'eau par transpiration est cohérent avec les travaux de Lang and Thorpe, (1989) sur le raisin.

### Comparaison inter-espèces des modes de déchargement du sucre dans le fruit

Les modes de déchargement du sucre phloémien simulés par voie symplasmique et ou apoplasmique et leurs contributions respectives sont en accords avec les observations faites dans la littérature chez les espèces étudiées (cf. Introduction).

Un premier point intéressant qui est étayé par de nombreux travaux (Kato and Kubota 1978; Schapendonk and Brouwer 1984; Yelle *et al.* 1988; Moriguchi *et al.* 1990; Iwatsubo *et al.* 1992; Marcelis 1996; Shahidul Islam *et al.* 1996; Lo Bianco *et al.* 1999; Yamaki 2010) est la corrélation entre l'intensité potentielle du transport actif et la masse des fruits. Cette corrélation est certainement à la base du concept de force de puits utilisé dans de nombreux modèles de culture.

La comparaison des espèces sur les modes de déchargement du phloème entre les fruits, montre aussi que chez des fruits de petite tailles et à durée de croissance courte, le transport par voie symplasmique en début de développement faciliterait chez la tomate une croissance précoce très rapide comparativement à une espèce strictement apoplastique comme la fraise dont la croissance est retardée. Chez l'aubergine et le concombre toutes deux de grande taille, le transport symplasmique favoriserait également une croissance précoce plus rapide pour l'aubergine que pour le concombre, espèce qui favorise la voie apoplastique. Un caractère marquant chez l'aubergine est également la durée importante de la phase de transport symplasmique qui permettrait d'avoir une masse sèche élevée (Fig. 2) comparativement au concombre. Les travaux de Lee *et al.*, (1997) montrent que le transport symplastique existe chez l'aubergine, mais son importance au cours de la croissance serait à confirmer par d'autres études. Le cas du kiwi est intéressant car il a une durée de développement longue, mais sa croissance effective est assez courte et rapide, d'où le besoin d'un apport additionnel de sucre par voie symplasmique. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Baldazzi et al., (2013) obtenus à l'échelle cellulaire. Ces auteurs ont montré que le transport symplasmique dans les cellules des fruits favorise une importation rapide de carbone et d'eau dans la cellule, tandis que, en absence d'importation de carbone par transport symplasmique, l'accumulation de masse sèche par transport actif seulement, s'avère extrêmement retardée dans le temps. Selon Baldazzi et al (2013), le transport symplasmique agit comme un starter pour un transport actif plus efficace du sucre phloémien, ce qui assure une augmentation exponentielle de la masse sèche pendant toute la phase d'expansion. L'explication réside dans la forme mathématique de la cinétique de transport actif qui suppose une vitesse de transport maximale proportionnelle à la masse sèche des cellules du fruit (voir eqn 7). En augmentant précocement cette masse sèche, le transport symplasmique permet une augmentation précoce du transport actif. Par ailleurs, l'accumulation élevée de solutés dans le fruit induit une augmentation de l'importation d'eau de la plante, ce qui favorise la croissance de la masse fraîche du fruit. Ceci est cohérent

avec le démarrage tardif de la croissance chez la plupart des espèces caractérisées uniquement par le transport apoplasmique durant tout leur stade développement (Fig. 7).

### Les changements dans l'accumulation nette de l'amidon et le potentiel osmotique total du fruit n'expliquent pas la croissance en masse fraîche.

Les teneurs et la dynamique de l'amidon varient très fortement d'une espèce à l'autre. La dégradation nette de l'amidon (bilan entre l'hydrolyse de l'amidon et sa synthèse) survient très tôt chez la fraise, le poivron, le concombre, le raisin et la clémentine, mais l'hydrolyse de l'amidon n'est pas suffisante pour faire augmenter la concentration en sucres car les sucres doivent être utilisés pour la construction de structure (parois …). Par conséquent, le métabolisme de l'amidon n'est pas un déterminant majeur de la variation de la concentration de sucre soluble et donc de la pression osmotique de ces espèces.

Toutefois pour les autres espèces, les processus métaboliques autour de l'amidon sont des déterminants majeurs de la variation de la concentration en sucre soluble. Par exemple, la diminution de la pression osmotique de la tomate et de l'aubergine coïncide avec la phase de synthèse nette d'amidon. Ceci suggère que chez ces espèces, la synthèse nette d'amidon participe à la régulation de la concentration en sucre des fruits et donc de leur pression osmotique. Plus tardivement, chez ces mêmes espèces, la dégradation nette de l'amidon est concomitante de l'augmentation de la pression osmotique, à l'exception de l'aubergine.

Bien que la dégradation nette de l'amidon augmente la pression osmotique chez ces espèces, elle ne s'accompagne pas toujours d'une croissance en masse fraîche. Ainsi selon nos résultats de simulation, il n'y a pas de lien évident entre le métabolisme de l'amidon et la croissance en masse fraîche du fruit. Ce qui laisse suggérer que la croissance en masse fraîche du fruit est régie par d'autre processus plus déterminant que celui de l'amidon tels que l'importation du sucre, les processus métaboliques des acides et les flux d'eau.

Le cas du kiwi est exemplaire de ce point de vue puisque le kiwi synthétise beaucoup d'amidon, sans ralentissement de sa croissance en masse fraîche durant la période de synthèse d'amidon et sans augmentation de sa masse fraîche durant la période d'hydrolyse de l'amidon. L'absence de variation de la pression osmotique chez le kiwi durant la phase de croissance en masse fraîche suggère que la croissance du kiwi est pilotée par la pression osmotique due aux acides organiques et aux minéraux définit constante dans notre modèle. Ce qui est en accord avec les travaux de Nardozza *et al.*, (2010) qui ont montré le rôle dominant des acides

organiques pendant la croissance du kiwi comparativement à la tomate dont la croissance est pilotée par les sucres solubles.

Notre analyse par simulation suggère que la croissance en masse fraîche du fruit devrait être régie par d'autre processus plus déterminant que celui de l'amidon, tels que l'importation du sucre dont on a vu qu'elle était liée à la masse du fruit, les processus métaboliques des acides, les flux d'eau ou les caractères physique des tissus (comme leur plasticité). Bien que ces résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence un lien direct entre la croissance et la présence ou non de l'amidon chez le fruit charnu, ils nous permettent toutefois de mettre en évidence l'influence de l'amidon sur la qualité (ici teneur en sucres à la récolte) chez certaines espèces de fruit charnu.

Tableau S1: Provenance des entrées du modèle Coulpé sucre-croissance

| espèces | Ψmin/Ψmax | références Ψmin/Ψmax | Cp | Référence Cp | Conductance cuticulaire | Référence Conductance cuticulaire |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pomme | mesures | | littérature | Jensen et al 2013 | mesures | |
| clémentine | mesures | | littérature | | mesures | |
| nectarine | mesures | | littérature | | mesures | |
| concombre | mesures | | littérature | | mesures | |
| fraise | mesures concombre | | littérature | | mesures | |
| aubergine | mesures concombre | | littérature | | mesures | |
| poivron | mesures concombre | | littérature | | mesures | |
| tomate | littérature | Baldazzi et al 2013 | littérature | | mesures | |
| kiwi | littérature | Torres-Ruiz et al 2015 | littérature | | estimation | Hall et al 2013 |
| raisin | estimation | Dai Z. 2009 | littérature | | mesures | |

Tableau S2 : Données de la littérature utilisées pour définir les paramètres de la respiration des fruits.

| Espèces | Coef de respiration de croissance **qg** (ghexose/gdm) | Coef de respiration de maintenance **qm** (ghexose/gdm/h) | Q10 | Auteurs |
|---|---|---|---|---|
| Pêche | 0.075 | 0.00015 | 2 | Génard and Gouble (2005) |
| Pêche | 0.21 | 0.00007 | 2 | De Jong and Goudriaan (1989) |
| Concombre | 0.108 | 0.000425 | 2 | Marcelis and Baan Hofman-Eijer (1995) |
| Kiwi | 0.21 | 0.00007125 | 2.01<br>2.07 | Walton and DeJong (1990) |
| Tomate | 0.21 | 0.0003375 | 1.4 | qg: Gary et al.(1998); qm: Walker and Thornley (1977);Q10: Bertin and Heuvelink (1993) |
| Mangue | 0.1 | 0.00012 | 1.9 | Léchaudel and al. (2005) |

Tableau S3 : pression osmotique dans le fruit. pif0 est la pression osmotique due aux autres solutés autres que les sucres. La pression osmotique totale du fruit est mesurée. La pression osmotique du fruit due au sucre est calculée à partir du modèle sucre-amidon développé dans le chapitre 2

| Espèce | Jour après anthèse | Pression osmotique totale du fruit (bar) | Pression osmotique du fruit due au sucre (bar) | pif0 (bar) | pif0 (bar) (moyenne) |
|---|---|---|---|---|---|
| Pomme | 45 | 12.8898593 | 4.34 | 8.54985932 | 5.70481432 |
| Pomme | 63 | 14.6993973 | 5.17 | 9.52939726 | |
| Pomme | 80 | 19.0026272 | 7.29 | 11.7126272 | |
| Pomme | 94 | 19.6985557 | 9.32 | 10.3785557 | |
| Pomme | 108 | 16.7419442 | 11.65 | 5.0919442 | |
| Pomme | 122 | 22.6834482 | 14.1 | 8.58344824 | |
| Pomme | 136 | 20.5775036 | 16.12 | 4.45750362 | |
| Pomme | 147 | 21.8631845 | 17.31 | 4.55318446 | |
| Pomme | 157 | 26.4787456 | 17.8 | 8.67874563 | |
| Concombre | 2 | 6.10285262 | 0.96 | 5.14285262 | |
| Concombre | 5 | 6.21192066 | 2.04 | 4.17192066 | |
| Concombre | 8 | 5.82522489 | 2.32 | 3.50522489 | |
| Concombre | 12 | 5.60213117 | 1.84 | 3.76213117 | |
| Concombre | 14 | 5.08157916 | 1.76 | 3.32157916 | |
| Concombre | 18 | 4.79899378 | 1.77 | 3.02899378 | |
| Concombre | 25 | 4.48666257 | 1.81 | 2.67666257 | |
| Concombre | 29 | 4.5808577 | 1.8 | 2.7808577 | |
| Clémentine | 119 | 14.1581884 | 5.29 | 8.86818843 | |
| Clémentine | 139 | 15.7900777 | 8.18 | 7.61007767 | |
| Clémentine | 160 | 15.3005109 | 9.69 | 5.61051089 | |
| Clémentine | 190 | 17.183174 | 11.18 | 6.003174 | |
| Clémentine | 218 | 14.8729146 | 11.63 | 3.2429146 | |
| Clémentine | 253 | 21.6797518 | 11.82 | 9.85975185 | |
| Nectarine | 86 | 14.1788453 | 10.17 | 4.00884525 | |
| Nectarine | 106 | 16.608088 | 12.65 | 3.95808797 | |
| Nectarine | 122 | 17.5872215 | 15.78 | 1.80722151 | |
| Nectarine | 133 | 21.5657262 | 18.43 | 3.13572617 | |

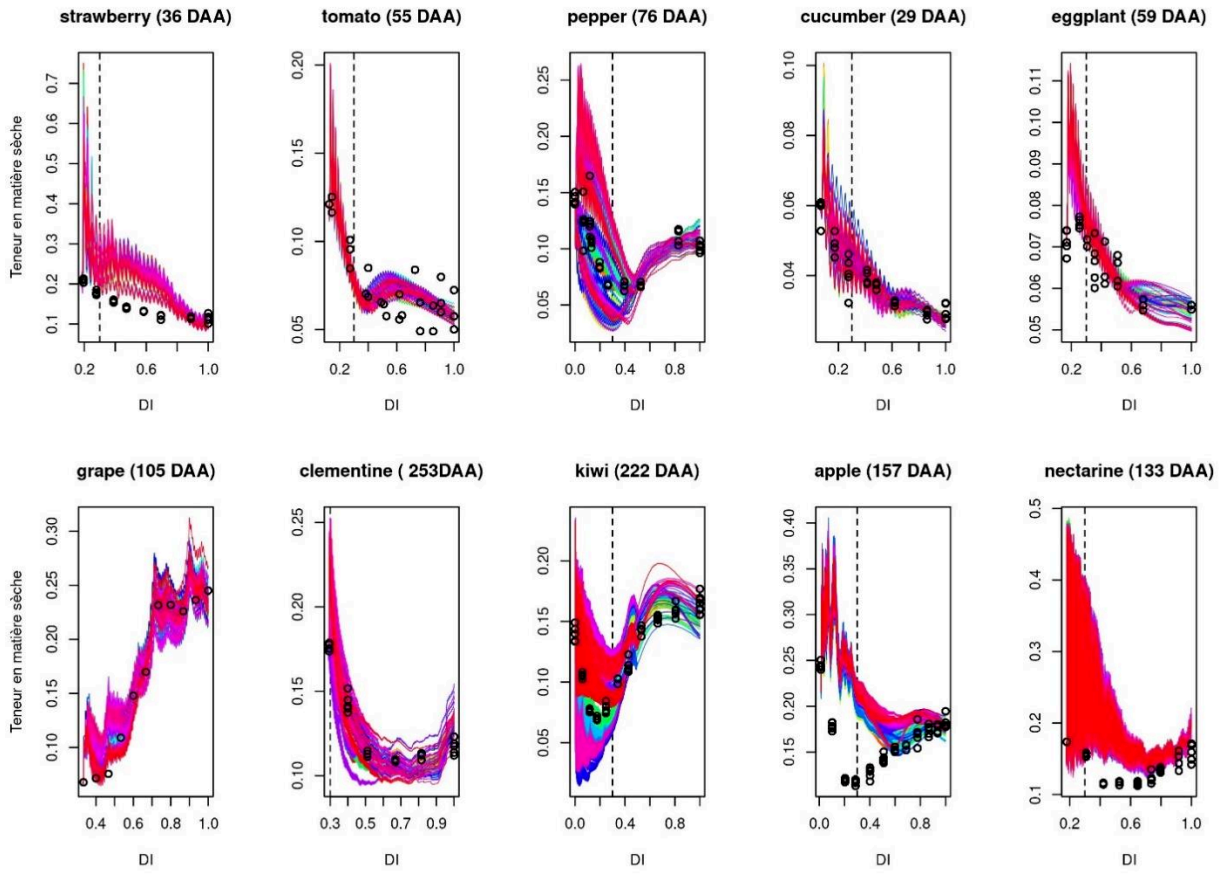



Figure S1 supplémentaire : Teneur en matière sèche des fruits. Les points représentent les données expérimentales. Toutes les courbes sont les simulations des poids secs et frais, avec les 100 meilleures combinaisons de paramètres pour chaque espèce

# *Discussion générale et perspectives de recherche*

## Bilan des connaissances acquises

Des approches expérimentales et de modélisation ont été utilisées dans ce travail de thèse pour analyser et disséquer chez 10 espèces de fruits contrastés, les processus majeurs qui pilotent la croissance des fruits ainsi que les concentrations en métabolites primaires en particulier les sucres solubles et l'amidon. Cette approche a également visé à identifier chez ces espèces, les modes de régulation de l'accumulation du sucre et/ou de l'amidon ainsi que de l'eau, permettant de mettre en évidence différentes stratégies de croissance et d'élaboration de la qualité.

Le stockage transitoire de l'amidon est un déterminant majeur de la concentration en sucre soluble et de la croissance chez certaines espèces. De fait, plusieurs études dans la littérature ont caractérisé la croissance, les concentrations en amidon et en sucre soluble dans les fruits charnus avant ce travail de thèse. Mais la grande majorité de ces études est limitée à un nombre réduit d'espèces, dites « espèce modèle », et ont été effectuées pour la plupart à des stades de développement tardif du fruit, ne permettant pas d'avoir ces dynamiques sur l'ensemble de la croissance des fruits.
Comprendre les différences et les similitudes des stratégies de croissance et d'accumulation de sucre au travers d'une analyse comparative d'espèces contrastées peut aider à identifier les processus physiologiques clés, les mécanismes régulateurs communs ainsi que les compromis possibles, dans la perspective d'améliorer la qualité des fruits (Roch et al. 2019). C'est le pari que nous avons fait, bien que seuls quelques travaux avaient abordé la question de la comparaison des espèces jusqu'à ce jour. L'une des raisons réside dans la difficulté de résumer les différences tant dans la nature des processus physiologiques impliqués (flux d'eau et de carbone, flux métaboliques) que dans leur durée, entre les différentes espèces.

A cause du peu de travaux qui existaient, il n'était pas possible avant cette thèse, de dresser un tableau de la diversité des modes de régulations de la croissance et des concentrations en sucre, prenant en compte les processus impliqués et notamment le métabolisme de l'amidon et ce depuis l'anthèse à la maturité. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis la caractérisation de la croissance et du métabolisme des sucres et de l'amidon ainsi que la prise en compte de l'évolution temporelle de ces composés durant le développement pour une dizaine d'espèces biologiquement différentes. Ces espèces sont contrastées et concernent des fruits non climatériques (fraise, poivron, aubergine, concombre, raisin, clémentine) et

climatériques (pomme, kiwi, tomate, nectarine). L'utilisation de modèle pour décrire le système constitué par le fruit a été un cadre unifiant. Il a en effet permis de caractériser les dix espèces étudiées sur la même base conceptuelle.

Le premier modèle mathématique permettant de simuler les concentrations en sucres chez la pêche au cours du développement du fruit a été développé par Génard and Souty (1996). Les principales différences entre ce modèle et le modèle métabolique développé au cours de cette thèse résident en la considération d'un pool de sucres solubles totaux et en l'introduction de l'amidon ce qui a nécessité de représenter sa synthèse et son hydrolyse dans les équations de réactions. Ce modèle métabolique a permis d'étudier les mécanismes intervenant dans l'accumulation des sucres solubles dans le fruit au cours de son développement. Il met en lumière le manque d'information dans la littérature sur les processus impliqués dans le métabolisme de l'amidon chez plusieurs espèces contrastées.
Le couplage de ce modèle de sucre générique avec le modèle de croissance biophysique développé à la base pour la pêche par Fishman and Génard (1998) a permis d'intégrer l'effet des sucres solubles sur la pression osmotique et son impact sur les flux d'eau vers le fruit. Ce couplage a également nécessité l'extension du modèle biophysique de croissance en intégrant des connaissances nouvelles (notamment sur les variations des flux d'eau du xylème) à travers (i) l'ajout de paramètres permettant de décrire l'évolution de la conductivité du xylème au cours de la croissance du fruit et (ii) différentes fonctions permettant de décrire l'évolution de l'importation de sucre par flux de masse via les plasmodesmes préalablement définit par Liu *et al.* (2007). Le couplage du modèle sucre-croissance, nous a permis de décrire la croissance des fruits et les variations de la concentration des métabolites primaires, notamment les sucres solubles et l'amidon, durant la croissance du fruit.

### Hypothèses et limites des modèles écophysiologiques développés

Les modèles développés ont été construits sur la base des travaux précédents. Nous avons ainsi choisi de modéliser la concentration des sucres solubles totaux et de l'amidon. Ces deux composés, apparaissent comme les processus déterminants de l'accumulation des sucres solubles indispensables pour l'absorption de l'eau dans le fruit et donc pour sa croissance et *in fine* la masse totale du fruit. La qualité des prédictions des modèles développés nous conforte à posteriori dans le choix de nos hypothèses. Les résultats obtenus dans cette étude constituent une première étape pour comprendre la croissance des fruits des espèces charnues au travers de

l'analyse des principaux processus biophysiques et biochimiques. Dans une prochaine étape, il serait judicieux de considérer les pressions osmotiques dues aux acides organiques et aux minéraux (considérées comme constantes dans cette étude) car elles peuvent représenter une part non négligeable du potentiel total comme l'ont révélé les simulations faites sur kiwi en accord avec les observations de Nardozza *et al.* (2010). Ces observations suggèrent que le kiwi accumule de grandes quantités d'amidon sur une longue période de croissance, ne stocke que des quantités limitées de sucres solubles et que sa pression osmotique est principalement déterminée par l'accumulation des acides organiques (Nardozza *et al.* 2010). De tels modèles, plus complexes et plus difficiles à construire et à paramétrer, donneraient une image plus complète de l'interaction entre l'accumulation des métabolites primaires (sucre, amidon et acides organiques) et la régulation des flux d'eau dans le fruit. Une autre amélioration envisageable du modèle couplé pourrait être de considérer le rôle de l'éthylène dans la maturation des fruits climactériques, notamment en post récolte. En effet, la maturation des fruits climactériques est déclenchée par un pic précoce de production d'éthylène qui s'accompagne de la conversion de l'amidon en sucres solubles associée à une augmentation importante de l'activité respiratoire (Bapat *et al.* 2010). Plusieurs études ont révélé le rôle de l'éthylène dans la régulation de nombreux gènes contrôlant la fermeté, le goût, la couleur et les arômes du fruit (Bapat *et al.* 2010).

### La durée de développement et la vitesse de croissance influence fortement le mode de régulation du sucre ainsi que les stratégies de croissance des fruits

La modélisation et l'analyse statistiques des chapitre II et III, nous ont permis d'identifier deux groupes d'espèces similaires sur la base des paramètres impliqués dans le métabolisme des sucres solubles et dans les processus biophysiques de croissance.

Contrairement à ce qui était pressentie, la répartition de ces 2 groupes d'espèces similaires ne montre pas une séparation claire des espèces en groupes climactériques (tomate, pomme, nectarine et kiwi) et non climactériques (fraise, aubergine, poivron, concombre, clémentine et raisin). Cela suggère que les processus métaboliques (synthèse d'autres composés, synthèse et hydrolyse de l'amidon) et les processus biophysiques ne sont pas étroitement affectés par les événements associés à l'éthylène qui caractérisent la distinction entre fruits climactériques et non climactériques.

Les espèces à durée de croissance courte ont une forte vitesse de croissance relative comparativement aux espèces à durée de croissance longue. Pour pousser vite, les espèces à durée de croissance courte allouent une part importante du carbone importé à la fabrication des composés structuraux (parois, membranes et machineries cellulaires). La part du carbone stocké précocement en réserve sous forme d'amidon est remobilisée par ces espèces pour soutenir les processus liés à la division cellulaire. Le restant du carbone sous forme de sucre soluble non respiré par le fruit est utilisé pour permettre l'existence de fortes pressions de turgescences qui vont favoriser la croissance du fruit et l'accumulation d'eau. Les conséquences se traduisent par des teneurs faibles en matière sèche des fruits pour ces espèces. Inversement, les espèces à durée de croissance longue sont caractérisées par une forte plasticité des tissus qui compense une turgescence moindre, un maintien plus tardif de la conductivité hydraulique du xylème et un déchargement des sucres plus régulier dans le temps. Chez les espèces à durée de croissance longue avec une grande réserve d'amidon, le processus d'hydrolyse de l'amidon affecte soit la croissance (cas de la pomme et de la nectarine), soit la qualité comme chez le kiwi.

Bien que les deux groupes d'espèces présentent chacune des caractéristiques similaires sur les paramètres liés à la croissance et au métabolisme primaire, on note des spécificités dans les modes de régulation des flux biophysiques et métaboliques.

En effet, selon que le mode de transport utilisé par l'espèce, symplasmique et apoplasmique ou seulement apoplasmique, l'accumulation de masse sèche s'avère respectivement extrêmement rapide ou lente dans le temps.

## Perspectives de recherche

Aujourd'hui dans un contexte de changement climatique, où se pose la question de savoir comment produire des fruits de qualité dans des environnements de plus en plus contraignants en eau et en température, le modèle sucre-croissance couplé pourrait être utilisé en faisant varier les variables environnementales (diminution du potentiel hydrique de la plante, augmentation de la température et diminution de l'humidité relative de l'air) pour mieux apprécier la réponse et le comportement des espèces à fruit charnus et rechercher ainsi les espèces les mieux adaptées aux climats du futur.

Pour chaque espèce nous avons trouvés 100 combinaisons de paramètres qui permettaient de simuler convenablement la croissance et les concentrations en sucres mesurées.

Ces 100 combinaisons présentaient parfois une forte variabilité sur la valeur des paramètres, ce qui montre qu'une même croissance et/ou composition peut être obtenue avec plusieurs solutions et laisse à penser qu'il existe plusieurs stratégies possibles pour chaque espèce, leur permettant une plus grande flexibilité face à des conditions environnementales variables. Ceci est un point qu'il conviendrait d'explorer davantage dans le futur. Les systèmes biologiques sont en effet connus pour présenter un spectre des paramètres peu contraints (« sloppy ») le long de certaines directions de l'espace des paramètres, ce qui permet de conserver un comportement (phenotype) du système robuste face à des variations de valeurs de paramètres (Gutenkunst *et al.* 2007; Daniels *et al.* 2008).
De plus, l'utilisation des méthodes statistiques et numériques pour l'estimation de paramètres peut être sujette à des problèmes d'identifiabilité (Ashyraliyev *et al.* 2009). En effet, l'identifiablité d'un modèle peut être « structurelle » c'est-à-dire dérivé directement de la structure mathématique des fonctions et équations utilisées, ou « pratique », liés à la quantité et qualité des données expérimentales dont on dispose pour la calibration. Plusieurs méthodes ont été développées durant ces dernières années pour détecter les éventuels problèmes d'identifiabilité et pour améliorer la qualité des estimations (Raue *et al.* 2009; Kreutz 2018). Il serait sans doute intéressant de les tester dans notre cas.

Aussi, afin de réduire l'espace des paramètres à estimer, Il serait souhaitable de développer des plateformes de mesures de certaines propriétés physiques du fruit comme par exemple la plasticité du fruit, qui est actuellement difficiles à évaluer. De façon complémentaire, la mesure non destructive et non-invasive des flux d'eau (par PET ou IRM, Windt et al., 2009; Van de Wal et al., 2017) permettrait de valider les contributions relatives du xylème et du phloème aux flux d'eau vers le fruit, ainsi que d'éventuels flux inverses du fruit vers la plante.

Un autre aspect important pour le futur est la prise en compte de la variabilité intra-specifique. En effet, le métabolisme primaire ainsi que la croissance des fruits peuvent varier selon le génotype et l'environnement (Kooke *et al.* 2012). Aussi, lorsque les activités enzymatiques paraissent assez conservées, la composition des fruits dépend fortement des conditions de culture, tant quantitativement que qualitativement (Biais *et al.* 2014; Desnoues *et al.* 2014).

De ce fait, pour identifier de façon robuste les stratégies des différentes espèces étudiées, il serait donc important de mieux appréhender ces variabilités liées aux génotypes et à l'environnement ainsi que les conséquences sur les patterns d'accumulation de sucres et de

l'amidon. Pour cela, il sera nécessaire de rajouter à l'étude plusieurs génotypes et conditions de culture, pour chacune des 10 espèces étudiées.
A terme, ceci pourrait contribuer à la sélection variétale des fruits charnus répondant à la fois aux critères de qualités et à la croissance du fruit dans des environnements contraignants.

Le fait que nous retrouvions les mêmes groupes d'espèces sur la base d'analyses statistiques (ACP) effectuées séparément sur les paramètres impliqués dans le métabolisme des sucres solubles et dans la croissance en masse sèche et fraîche des dix espèces de fruits charnus reste cependant encourageant. En effet, nos 10 espèces ont été cultivées dans différentes régions (4) et sont donc indirectement soumises à des conditions environnementales différentes au cours de leur croissance. Le fait de pouvoir regrouper les 10 espèces selon des critères physiologiques (durée de croissance, plante annuel vs vivace) robustes suggère que les différences inter-espèces pourraient être plus fort que les variations environnementales.

## Références bibliographiques

**Albertini M V., Carcouet E, Pailly O, Gambotti C, Luro F, Berti L**. **2006**. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. *Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8335−8339.

**Ackerman M, Samach A**. **2015**. Doubts regarding carbohydrate shortage as a trigger toward abscission of specific Apple (Malus domestica) fruitlets. *New Negatives in Plant Science* **1–2**: 46–52.

**Alistair J. Hall, Peter E. H. Minchin, Michael J. Clearwater, Michel Génard,** A biophysical model of kiwifruit (Actinidia deliciosa) berry development, Journal of Experimental Botany, Volume 64, Issue 18, December 2013, Pages 5473–5483, https://doi.org/10.1093/jxb/ert317

**Aloni B, Karni L, Rylski I, *et al.* 1998**. Cuticular cracking in pepper fruit. I. Effects of night temperature and humidity. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**: 743–749.

**Ashyraliyev M, Fomekong-Nanfack Y, Kaandorp JA, Blom JG**. **2009**. Systems biology: Parameter estimation for biochemical models. *FEBS Journal* **276**: 886–902.

**Baldazzi V, Pinet A, Vercambre G, Bénard C, Biais B, Génard M**. 2013. In-silico analysis of water and carbon relations under stress conditions. A multi-scale perspective centered on fruit. Frontiers in Plant Science **4**, 495.

**Bapat VA, Trivedi PK, Ghosh A, Sane VA, Ganapathi TR, Nath P**. **2010**. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances* **28**: 94–107.

**Beaudry RM, Severson RF, Black CC, Kays SJ**. **1989**. Banana ripening: implications of changes in glycolytic intermediate concentrations, glycolytic and gluconeogenic carbon flux, and fructose 2,6-bisphosphate concentration. *Plant physiology* **91**: 1436–1444.

**Beauvoit B, Belouah I, Bertin N, *et al.* 2018**. Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. : 1–21.

**Ben-Yehoshua S, Burg SP, Young R**. **1985**. Resistance of citrus fruit to mass transport of water vapor and other gases. *Plant physiology* **79**: 1048–1053.

**Bertin N, Causse M, Brunel B, Tricon D, Génard M**. **2009**. Identification of growth processes involved in QTLs for tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **60**: 237–248.

**Bertin N, Génard M**. **2018**. Tomato quality as influenced by preharvest factors. *Scientia Horticulturae* **233**: 264–276.

**Bertin N, Heuvelink E**. 1993. Dry-matter production in a tomato crop—comparison of 2 simulation models. Journal of Horticultural Science 68, 995–1011.

**Berüter J**. **1985**. Sugar Accumulation and Changes in the Activities of Related Enzymes during Development of the Apple Fruit. *Journal of Plant Physiology* **121**: 331–341.

**Biais B, Benard C, Beauvoit B, *et al.*** 2014. Remarkable Reproducibility of Enzyme Activity Profiles in Tomato Fruits Grown under Contrasting Environments Provides a Roadmap for Studies of Fruit Metabolism. Plant Physiology **164**, 1204–1221.

**Blanco MJS, Torrecillas A, León A, Amor F del**. **1989**. The effect of different irrigation treatments on yield and quality of Verna lemon. *Plant and Soil* **302**: 299–302.

**Bondada BR, Matthews MA, Shackel KA**. 2005. Functional xylem in the post-veraison grape berry. Journal of Experimental Botany **56**, 2949–2957.

**Brookfield P, Murphy P, Harker R, MacRae E**. **1997**. Starch degradation and starch pattern indices; interpretation and relationship to maturity. *Postharvest Biology and Technology* **11**: 23–30.

**Brüggenwirth M, Winkler A, Knoche M**. **2016**. Xylem, phloem, and transpiration flows in developing sweet cherry fruit. *Trees - Structure and Function* **30**: 1821–1830.

**Bugaud C, Deverge E, Daribo MO, Ribeyre F, Fils-Lycaon B, Mbéguié-A-Mbéguié D**. **2011**. Sensory characterisation enabled the first classification of dessert bananas. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**: 992–1000.

**Bussières P**. **1994**. Water import rate in tomato fruit: a resistance model. *Annals of Botany* **73**: 75–82.

**Cantín CM, Gogorcena Y, Moreno MÁ**. **2009**. Phenotypic diversity and relationships of fruit quality traits in peach and nectarine [Prunus persica (L.) Batsch] breeding progenies. *Euphytica* **171**: 211–226.

**Carrari F, Baxter C, Usadel B, *et al.* 2006**. Integrated Analysis of Metabolite and Transcript Levels Reveals the Metabolic Shifts That Underlie Tomato Fruit Development and Highlight Regulatory Aspects of Metabolic Network Behavior. *Plant Physiology* **142**: 1380–1396.

**Carrière SD, Martin St-Paul NK, Cakpo CB, *et al.* 2019**. The role of deep vadose zone water in tree transpiration during drought periods in karst settings – Insights from isotopic tracing and leaf water potential. *Science of The Total Environment* **699**: 134332.

**Chapman GW, Horvat RJ**. **1990**. Changes in nonvolatile acids, sugars, pectin and sugar composition of pectin during peach (Cv. Monroe) maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 383–387.

**Choat B, Gambetta GAA, Shackel KAA, Matthews MAA**. 2009. Vascular function in grape berries across development and its relevance to apparent hydraulic isolation. Plant Physiology **151**, 1677–1687.

**Cirilli M, Bassi D, Ciacciulli A**. **2016**. Sugars in peach fruit : a breeding perspective.

**Clearwater MJ, Ong SEC, K.T. L**. 2012. Sap Flow and Vascular Functioning during Fruit Development. Doklady Biological Sciences **442**, 50–53.

**Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, *et al.* 2017**. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist* **213**: 1726–1739.

**Colombié S, Nazaret C, Bénard C, *et al.* 2015**. Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing Solanum lycopersicum (tomato) fruit. *Plant Journal* **81**: 24–39.

**Coombe BG**. **1976**. The development of fleshy fruits. *Annual Review of Plant Physiology* 27:1, 207-228

**Crisosto CH, Crisosto G**. **2005**. Understanding Tree Fruit Quality Based on Consumer Acceptance. *Acta Horticulturae* 712: 865–870.

**Crisosto CH, Crisosto GM, Echeverria G, Puy J**. **2006**. Segregation of peach and nectarine (Prunus persica (L.) Batsch) cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology* **39**: 10–18.

**Crisosto CH, Crisosto GM, Echeverria G, Puy J**. **2007**. Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology* **44**: 271–276.

**Crisosto CH, Crisosto GM, Metheney P**. **2003**. Consumer acceptance of ‘ Brooks ’ and ‘ Bing ’ cherries is mainly dependent on fruit SSC and v isual skin color. *Postharvest Biology and Technology* **28**: 159–167.

**Crisosto CH, Johnson RS, Luza JG, Crisosto GM**. **1994**. Irrigation Regimes Affect Fruit Soluble Solids Concentration and Rate of Water Loss of ‘ O ’ Henry ’ Peaches. *Horticultural Science* **29**: 1169–1171.

**Dai N, Cohen S, Portnoy V, Tzuri G**. **2011**. Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit : a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. : 1–18.

**Dai Z, Wu H, Baldazzi V, van Leeuwen C, Bertin N, Gautier H, Wu B, Duchêne E, Gomès E, Delrot S, Lescourret F, Génard M. 2016**. Inter-Species Comparative Analysis of Components of Soluble Sugar Concentration in Fleshy Fruits. *Frontiers in Plant Science* **7**: 649.

**Dai Z**. 2009 Analyse et modélisation de la croissance et de la composition biochimique des baies de raisin (Vitis vinifera L.) en réponse à la disponibilité carbonée et hydrique. Thèse Université d'Avignon http://www.theses.fr/2009AVIG0612

**Dai ZW, Léon C, Feil R, Lunn JE, Delrot S, Gomès E**. **2013**. Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (Vitis vinifera L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1345–1355.

**Dai ZW, Vivin P, Robert T, Milin S, Li SH, Génard M**. **2009**. Model-based analysis of sugar accumulation in response to sourcesink ratio and water supply in grape (Vitis vinifera) berries. *Functional Plant Biology* **36**: 527–540.

**Daniels BC, Chen YJ, Sethna JP, Gutenkunst RN, Myers CR**. **2008**. Sloppiness, robustness, and evolvability in systems biology. *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 389–395.

**Davies JW, Cocking ECO**. **1965**. Changes in carbohydrates, proteins and nucleic acids during cellular development in tomato fruit locule tissue. *Planta* **253**: 242–253.

**De Swaef T, Mellisho CD, Baert A, De Schepper V, Torrecillas A, Conejero W, Steppe K**. 2014. Model-assisted evaluation of crop load effects on stem diameter variations and fruit growth in peach. Trees - Structure and Function **28**, 1607–1622.

**Deb K, Member A, Pratap A, Agarwal S, Meyarivan T**. **2002**. A Fast and elitist multiobjective genetic algorithm : NSGA-II. IEEE *Transactions on Evolutionary Computation* **6**(**2**): 182–197.

**Debord C, Maucourt M, Baldet P, Bernillon S, Biais B, Talon G, Ferrand C, Jacob D, Fezzy-Dumazet H, de Daruvar A, Rolin D, Moing A. 2009**. Proton NMR quantitative profiling for quality assessment of greenhouse-grown tomato fruit. *Metabolomics* 5: 183–198.

**Defilippi BG, Dandekar AM, Kader AA**. **2004**. Impact of Suppression of Ethylene Action or Biosynthesis on Flavor Metabolites in Apple (Malus *domestica* Borkh) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 5694–5701.

**Dejong, T.M. and J. Goudriaan**. 1989. Modeling peach fruit growth and carbohydrate requirements: Reevaluation of double-sigmoid growth pattern. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114:800-804

**Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, *et al.* 2007**. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC genomics* **8**: 429.

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

**Dorey E, Fournier P, Léchaudel M, Tixier P**. **2015**. Modeling sugar content of pineapple under agro-climatic conditions on Reunion Island. *European Journal of Agronomy* **73:** 64-72

**Dray S, Dufour A-B**. **2007**. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists Stéphane. *Journal of Statistical Software* **22**(4)

**Dražeta L, Lang A, Hall AJ, Volz RK, Jameson PE**. 2004. Causes and effects of changes in xylem functionality in apple fruit. Annals of Botany **93**, 375–382.

**El-Otmani M, Ait-Oubahou A, Zacarías L**. **2011**. *Citrus spp .: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime*. Editor(s): Elhadi M. Yahia, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, Woodhead Publishing Limited: 437-516

**Etienne A, Génard M, Lobit P, Bugaud C**. **2014**. Modeling the vacuolar storage of malate shed lights on pre- and post-harvest fruit acidity. : 1–17.

**Etienne A, Génard M, Lobit P, Mbeguié-A-Mbéguié D, Bugaud C**. **2013**. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1451–1469.

**Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, *et al.* 2008**. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant physiology* **148**: 730–750.

**Figueroa-Torres GM, Pittman JK, Theodoropoulos C**. **2017**. Kinetic modelling of starch and lipid formation during mixotrophic, nutrient-limited microalgal growth. *Bioresource Technology* **241**: 868–878.

**Fishman S, Génard M**. **1998**. A biophysical model of fruit growth: Simulation of seasonal and diurnal dynamics of mass. *Plant, Cell and Environment* **21**: 739–752.

**Gao Z, Petreikov M, Zamski E, Schaffer AA, Ec UP**. **1999**. Carbohydrate metabolism during early fruit development of sweet melon ( Cucumis melo ). *Physiologia Plantarum* **106**: 1–8.

**Gary C, Jones JW, Tchamitchian M**. **1998**. Crop modelling in horticulture: State of the art. *Scientia Horticulturae* **74**: 3–20.

**Gary C, le Bot J, Frossard J-S, Andriolo JL. 1998.** Ontogenic changes in the construction cost of leaves, stems fruits, and roots of tomato plants**.** *Journal of Experimental Botany* **49, 59–68.**

**Gary, C., N. Bertin, J.-S. Frossard and J. Le Bot**. 1998. High mineral contents explain the low construction cost of leaves, stems and fruits of tomato plants. J. Exp. Bot. 49:49–57

**Geigenberger P, Lerchi J, Stitt M, Sonnewald U**. **1996**. Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long- distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plants Cells and Environment* **19**: 43–55.

**Génard M, Baldazzi V, Gibon Y**. **2014**. Metabolic studies in plant organs: don't forget dilution by growth. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–5.

**Génard M, Bertin N, Borel C, Bussières P, Gautier H, Habib R, Léchaudel M, Lecomte A, Lescourret F, Lobit P, Quilot B. 2007**. Towards a virtual fruit focusing on quality: Modelling features and potential uses. *Journal of Experimental Botany* **58**: 917–928.

**Génard M, Gouble B**. 2005. ETHY. A theory of fruit climacteric ethylene emission. Plant Physiol 139: 531–545

**Génard M, Huguet JG**. **1996**. Modelling response of peach fruit growth to water stress. *Tree Physiology* **16**: 407–415.

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

**Génard M, Lescourret F**. 2004. Modelling fruit quality: ecophysiological, agronomical and ecological perspectives. Production Practices and Quality Assessment of Food Crops **1**, 47–82.

**Génard M, Souty M**. **1996**. Modeling the peach sugar contents in relation to fruit growth. *Acta Horticulturae* **701 II**: **517**–522.

**Gibert C, Françoise Lescourret, Michel G, Vercambre G, Pastor AP**. **2005**. Modelling the Effect of Fruit Growth on Surface Conductance to Water Vapour Diffusion. : 673–683.

**Gibert C, Génard M, Vercambre G, Lescourret F**. **2010**. Quantification and modelling of the stomatal, cuticular and crack components of peach fruit surface conductance. *Functional Plant Biology* **37**: 264–274.

**Gibert O, Dufour D, Giraldo A, Sanchez T, Reynes M, Pain JP, Gonzalez A, Fernandez A, Diaz A. 2009**. Differentiation between Cooking Bananas and Dessert Bananas. 1. Morphological and Compositional Characterization of Cultivated Colombian Musaceae ( Musa sp . ) in Relation to Consumer Preferences. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **57***:* 7857–7869.

**Gijzen, H. 1995.** Development of a simulation model for transpiration and water uptake and of a comprehensive crop growth model **- A**.B Report 18. AB-DLO, Wageningen. 80pp. (In press).

**Giovannoni JJ**. **2006**. Breeding new life into plant metabolism. *Nature Biotechnology* **24**: 418–419.

**Gould N, Morrison DR, Clearwater MJ, Ong S, Boldingh HL, Minchin PEH**. 2013. Elucidating the sugar import pathway into developing kiwifruit berries (Actinidia deliciosa). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science **41**, 189–206.

**Grechi I, Hilgert N, Génard M, Lescourret F**. **2008**. Assessing the Peach Fruit Refractometric Index at Harvest with a Simple Model Based on Fruit Growth. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **133**: 178–187.

**Greenspan MD, Schultz HR, Matthews MA**. 1996. Field evaluation of water transport in grape berries during water deficits.

**Greenspan MD, Shackel KA, Matthews A**. 1994. Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits - 1994 - Greenspan, Shackel, Matthews.pdf. , 811–820.

**Gruda N**. **2005**. Impact of environmental factors on product quality of greenhouse vegetables for fresh consumption. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 227–247.

**Guichard S, Bertin N, Leonardi C, Gary C**. **2001**. Tomato fruit quality in relation to water and carbon fluxes. *Agronomie* **21**: 385–392.

**Guichard S, Gary C, Leonardi C, Bertin N**. 2005. Analysis of growth and water relations of tomato fruits in relation to air vapor pressure deficit and plant fruit load. Journal of Plant Growth Regulation **24**, 201–213.

**Gutenkunst RN, Waterfall JJ, Casey FP, Brown KS, Myers CR, Sethna JP**. **2007**. Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS Computational Biology* **3**: 1871–1878.

**Hall AJ, Minchin PEH, Clearwater MJ, Génard M**. **2013**. A biophysical model of kiwifruit (Actinidia deliciosa) berry development. *Journal of Experimental Botany* **64**: 5473–5483.

**Hall AJ, Minchin PEH, Gould N, Clearwater MJ**. 2017. A biophysical model of fruit development with distinct apoplasmic and symplasmic pathways. Acta Horticulturae, 367–374.

**Hall AJ, Richardson AC, Snelgar WP**. **2006**. Modelling fruit development in “Hayward” kiwifruit. *Acta Horticulturae* **707**: 41–47.

**Hawker JS**. **1969**. Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* **8**: 9–17.

**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.

**Hill SA, Rees T**. **1994**. Fluxes of carbohydrate metabolism in ripening bananas. **44**: 52–60.

**Ho LC, Grange RI, Picken AJ**. **1987**. An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. *Plant, Cell & Environment* **10**: 157–162.

**Ho LC, Hewitt JD**. **1986**. Fruit development. 201–239. In: J. G. Atherton and J. Rudich (eds.), *The Tomato Crop: A scientific basis for improvement. Chapman & Hall, New York*.

**Ho LC, Sjut V, Hoad G V.** 1983. The effect of assimilate supply in fruit growth and hormone level in tomato plants. Ann. Bot. **171**, 155–171.

**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.

**Hu L, Sun H, Li R, Zhang L, Wang S, Sui X, Zhang Z**. 2011. Phloem unloading follows an extensive apoplasmic pathway in cucumber (Cucumis sativus L.) fruit from anthesis to marketable maturing stage. Plant, Cell and Environment **34**, 1835–1848.

**Huang XM, Huang HB, Gao FF**. 2000. The growth potential generated in citrus fruit under water stress and its relevant mechanisms. Scientia Horticulturae **83**, 227–240.

**Hubbard NL, Pharr DM, Huber SC**. **1990**. Sucrose Metabolism in Ripening Muskmelon Fruit as Affected by Leaf Area. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **115**: 798–802.

**Hunter JJ, Ruffner HP, Volschenk CG**. **1995**. Starch concentrations in grapevine leaves, berries and roots and the effect of canopy management. *South African Journal of Enology and Viticulture* **16**: 35–40.

**Iglesias DJ, Cercós M, Colmenero-Flores JM, *et al.* 2007**. Physiology of citrus fruiting. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**: 333–362.

**Ishibuchi H, Tsukamoto N, Nojima Y**. 2008. Evolutionary many-objective optimization: a short review. In: Evolutionary Computation, 2008. CEC 2008. (IEEE World Congress on Computational Intelligence). IEEE Congress on, 1–6 June 2008, pp 2419–2426. , 2419–2426.

**Iwatsubo T, Nakagawa H, Ogura N, Hirabayashi T, Sato T**. 1992. Acid Invertase of Melon Fruits: Immunochemical Detection of Acid Invertases. Plant and Cell Physiology **33**, 1127–1133.

**Jensen KH, Savage JA, Holbrook NM**. **2013**. Optimal concentration for sugar transport in plants. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* **10**: 20130055.

**Jones HG, Higgs KH**. **1982**. Surface conductance and water balance of developing apple (Malus pumila mill.) fruits. *Journal of Experimental Botany* **33**: 67–77.

**Jourda C, Cardi C, Gibert O, *et al.* 2016**. Lineage-Specific Evolutionary Histories and Regulation of Major Starch Metabolism Genes during Banana Ripening. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1–21.

**Kaare H. Jensen, Jessica A. Savage and N. Michele Holbrook**. 2013. Optimal concentration for sugar transport in plants. J. R. Soc. Interface.1020130055 http://doi.org/10.1098/rsif.2013.0055

**Kader AA**. **1999**. Fruit maturity, ripening, and quality relationships. *Acta Horticulturae* **485**: 203–208.

**Kato T, Kubota S**. 1978. Properties of Invertases in Sugar Storage Tissues of Citrus Fruit and Changes in Their Activities during Maturation. Physiologia Plantarum **42**, 67–72.

**Keller M, Smith JP, Bondada BR**. 2006. Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot. Journal of Experimental Botany **57**, 2577–2587.

**Klee HJ**. **2010**. Improving the flavor of fresh fruits: Genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytologist* **187**: 44–56.

**Klie S, Osorio S, Tohge T, Drincovich M, Fait A, Giovannoni J, Fernie A, Nikoloski Z. 2014**. Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species. *Plant physiology* **164**: 55–68.

**Knee M**. **1993**. Pome fruits. *Biochemistry of Fruit Ripening*: 325–346.

**Kobashi K, Sugaya S, Fukushima M, Iwahori S**. **2002**. Sugar accumulation in highbush blueberry fruit as affected by artificial pollination with different pollen sources in relation to seed number, invertase activities and ABA content. *Acta Horticulturae*: 47–51.

**Koch KE, Avigne WT**. 1990. Postphloem, Nonvascular Transfer in Citrus: Kinetics, Metabolism, and Sugar Gradients. Plant Physiology **93**, 1405–1416.

**Kooke R, Wijnker E, Keurentjes JJB**. **2012**. Backcross Populations and Near Chapter 1. **871**: 3–16.

**Kreutz C**. **2018**. An easy and efficient approach for testing identifiability. *Bioinformatics* **34**: 1913–1921.

**Ladaniya MS**. **2008**. *Citrus Fruit Biology, Technology and Evaluation* (AP is an imprint of Elsevier, Ed.).

**Lakso AN, Grappadelli LC, Barnard J, Goffinet MC**. **1995**. An expolinear model of the growth pattern of the apple fruit. *Journal of Horticultural Science* **70**: 389–394.

**Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW**. **2003**. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell and Environment* **26**: 37–56.

**Lang A, Thorpe MR**. 1989. Xylem, phloem and transpiration flows in a grape: Application of a technique for measuring the volume of attached fruits to high resolution using archimedes' principle. Journal of Experimental Botany **40**, 1069–1078.

**Lang A**. 1990. Xylem , Phloem and Transpiration Flows in Developing Apple Fruits. **41**, 645–651.

**Lebon G, Duchêne E, Brun O, Magné C, Clément C**. **2004**. Flower abscission and inflorescence carbohydrates in sensitive and non-sensitive cultivars of grapevine. *Sexual Plant Reproduction* **17**: 71–79.

**Léchaudel M, Génard M, Lescourret F, Urban L, Jannoyer M**. 2005. Modelling effects of weather and source-sink relationships on mango fruit growth. Tree Physiol25:583–597

**Lechaudel M, Vercambre G, Lescourret F, Normand F, Genard M**. 2007. An analysis of elastic and plastic fruit growth of mango in response to various assimilate supplies. Tree Physiology **27**, 219–230.

**Lee DR**. 1989. Vasculature of the abscission zone of tomato fruit: implications for transport. Canadian Journal of Botany **67**, 1898–1902.

**Lee DR**. **1990**. A unidirectional water flux model of fruit growth. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **68**: 1286–1290.

**Lee TH, Sugiyama A, Takeno K, Ohno H, Yamaki S**. 1997. Changes in content of indole-3-acetic acid and in activities of sucrose-metabolizing enzymes during fruit growth in eggplant (Solanum melongena L.). Journal of Plant Physiology **150**, 292–296.

**Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, Riederer M, Vogg G**. **2007**. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: Effects of a deficiency in a β-ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiology* **144**: 1667–1679.

**Lescourret F, Génard M, Habib R, Fishman S**. **2001**. Variation in surface conductance to water vapor diffusion in peach fruit and its effects on fruit growth assessed by a simulation model. : 735–741.

**Lescourret F, Génard M**. **2005**. A virtual peach fruit model simulating changes in fruit quality during the final stage of fruit growth. *Tree physiology* **25**: 1303–1315.

**Li CL, Fang KF, Lei H, Xing Y, Shen YY**. 2012. Phloem unloading follows an extensive apoplastic pathway in developing strawberry fruit. Journal of Horticultural Science and Biotechnology **87**, 470–477.

**Li M, Feng F, Cheng L**. **2012**. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PLoS ONE* **7**.

**Li SH, Génard M, Bussi C, *et al.* 2002**. Preliminary study on transpiration of peaches and nectarines. *Gartenbauwissenschaft* **67**: 39–43.

**Li S-H, Huguet J-G, Schoch PG, Orlando P**. **1989**. Response of peach tree growth and cropping to soil water deficit at various phenological stages of fruit development. *Journal of Horticultural Science* **64**: 541–552.

**Liu H-F, Génard M, Guichard S, Bertin N**. **2007**. Model-assisted analysis of tomato fruit growth in relation to carbon and water fluxes. *Journal of Experimental …* **58**: 3567–80.

**Lo Bianco R, Rieger M, Sung SJS**. 1999. Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach cultivar 'Encore'. Tree Physiology **19**, 103–109.

**Lockhart JA**. 1965. An Analysis of Irreversible Plant Cell Elongation. , 264–275.

**Lombardo V a., Osorio S, Borsani J, *et al.* 2011**. Metabolic Profiling during Peach Fruit Development and Ripening Reveals the Metabolic Networks That Underpin Each Developmental Stage. *Plant Physiology* **157**: 1696–1710.

**Luengwilai K, Beckles DM**. **2009**. Starch Granules in Tomato Fruit Show a Complex Pattern of Degradation. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **57**: 8480–8487.

**Ma S, Li Y, Li X, Sui X, Zhang Z**. **2018**. Phloem Unloading Strategies and Mechanisms in Crop Fruits. *Journal of Plant Growth Regulation* **38**:494-500.

**Marcelis LEM, Baan Hofman-Eijer LR** . 1995 Growth and maintenance respiratory costs of cucumber fruits as affected by temperature, and ontogeny and size of the fruits. Physiol Plant 93: 484–492

**Marcelis LFM, Heuvelink E, Goudriaan J**. **1998**. Modelling biomass production and yield of horticultural crops: A review. *Scientia Horticulturae* **74**: 83–111.

**Marcelis LFM**. 1996. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. Journal of Experimental Botany **47**, 1281–1291.

Marcelis, L.F.M. 1994. Fruit growth and dry matter partitioning in cucumber. PhD Thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen. CIP-Data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, 173 pp. ISBN 90-5485-310-.7. https://edepot.wur.nl/206322

**Martınez-Vilalta J, Poyatos R, Aguad D, Retana J, Mencuccini M**. **2014**. A new look at water transport regulation in plants.

**Masia A, Zanchin A, Rascio N, Ramina A**. 1992. Some Biochemical and Ultrastructural Aspects of Peach Fruit Development. Journal of the American Society for Horticultural Science **117**.

**Matsui H, Yuda E, Nakagawa S**. **1979**. Physiological studies on the ripening of Delaware grapes, 1: Effects of the number of leaves and changes in polysaccharides or organic acids on sugar accumulation in berries. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **48**:4-18

**Mazzeo M, Dichio B, Clearwater MJ, Montanaro G, Xiloyannis C**. 2013. Hydraulic resistance of developing Actinidia fruit. Annals of Botany **112**, 197–205.

**Mehouachi J, Serna D, Zaragoza S, Agusti M, Talon M, Primo-Millo E**. **1995**. Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of Citrus unshiu. *Plant Science* **107**: 189–197.

**Mesejo C, Yuste R, Martínez-Fuentes A, Reig C, Iglesias DJ, Primo-Millo E, Agusti M. 2013**. Self-pollination and parthenocarpic ability in developing ovaries of self-incompatible Clementine mandarins (Citrus clementina). *Physiologia Plantarum* **148**: 87–96.

**Mezzetti B**. **2014**. Integrating breeding and biotech for improving strawberry nutritional quality. *Acta Horticulturae* **1049**: 89–97.

**Mills TM, Behboudian MH, Tan PY, Clothier BE**. **1994**. Plant water status and fruit quality in “Braeburn” apples. *HortScience* **29**: 1274–1278.

**Milner ID, Ho LC, Hall JL. 1995.** Properties of proton and sugar transport at tonoplast of tomato (Lycopersicon esculentum) fruit, *Physiologia Plantarum*, **vol. 94**

**Mittler R, Finka A, Goloubinoff P**. **2012**. How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences* **37**: 118–125.

**Moing A, Renaud C, Gaudillère M, Raymond P, Roudeillac P, Denoyes-Rothan B**. **2001**. Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 394–403.

**Morandi B, Losciale P, Manfrini L, Pierpaoli E, Zibordi M, Corelli Grappadelli L**. **2012**. Short-period changes in weather conditions affect xylem, but not phloem flows to young kiwifruit (Actinidia deliciosa) berries. *Scientia Horticulturae* **142**: 74–83.

**Morandi B, Manfrini L, Losciale P, Zibordi M, Corelli Grappadelli L**. 2010*b*. Changes in vascular and transpiration flows affect the seasonal and daily growth of kiwifruit (Actinidia deliciosa) berry. Annals of Botany **105**, 913–923.

**Morandi B, Manfrini L, Losciale P, Zibordi M, Corelli-grappadelli L**. 2010*a*. The positive effect of skin transpiration in peach fruit growth. Journal of Plant Physiology **167**, 1033–1037.

**Morandi B, Rieger M, Grappadelli LC**. 2007. Vascular flows and transpiration affect peach (Prunus persica Batsch.) fruit daily growth. Journal of Experimental Botany **58**, 3941–3947.

**Morandi B, Zibordi M, Losciale P, Manfrini L, Bastías RM, Grappadelli LC**. 2012. Apple and peach: A different role for fruit transpiration? Acta Horticulturae **932**, 213–218.

**Moriguchi T, Abe K, Sanada T, Yamaki S**. **1992**. Levels and role of Sucrose Synthase, Sucrose-phosphate Synthase, and Acid Invertase in sucrose accumulation in fruit of Asian pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**: 274–278.

**Moriguchi T, Sanada T, Yamaki S**. **1990**. Seasonal fluctuations of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **115**: 278–281.

**Moyle R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M, Botella JR**. **2005**. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *Journal of Experimental Botany* **56**: 101–112.

**Murtagh F, Legendre P**. **2014**. Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification* **32**: 46–62.

**Naor A, Naschitz S, Peres M, Gal Y**. **2008**. Responses of apple fruit size to tree water status and crop load. *Tree Physiology* **28**: 1255–1261.

**Nardozza S, Boldingh HL, Osorio S, Höhne M, Wohlers M, Gleave A, MacRae EA, Richardson AC, Atkinson R, Sulpice R, Fernie A, Clearwater MJ. 2013**. Metabolic analysis of kiwifruit (Actinidia deliciosa) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism. *Journal of Experimental Botany* **64**: 5049–5063.

**Nardozza S, Boldingh HL, Richardson AC, Costa G, Marsh H, MacRae EA, Clearwater MJ. 2010**. Variation in carbon content and size in developing fruit of Actinidia deliciosa genotypes. *Functional Plant Biology* **37**: 545–554.

**Ng P, Maechler M**. **2007**. A fast and efficient implementation of qualitatively constrained quantile smoothing splines. *Statistical Modelling* **7**: 315–328.

**Nordey T, Léchaudel M, Génard M**. 2015. The decline in xylem flow to mango fruit at the end of its development is related to the appearance of embolism in the fruit pedicel. Functional Plant Biology **42**, 668–675.

**Ollat N, Gaudillere JP**. **1998**. The Effect of Limiting Leaf Area During Stage I of Berry Growth on Development and Composition of Berries of Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture:* 251–258.

**Ollat N, Gaudillere JP**. **2000**. Carbon balance in developing grapevine berries. *Acta Horticulturae* **526**: 345–350.

**Ollat N, Geny L, Soyer P**. **1998**. Grapevine fruiting cuttings: validation of an experimental system to study grapevine physiology. I. Main vegetative characteristics. *Journal International des sciences de la vigne et du vin* **32**: 1–9.

Penning de Vries F.W.T, Jansen D.M, ten Berge H.F.M, Bakema A. 1989. Simulation of ecophysiological processes of growth in several annual crops. Wageningen, The Netherlands: Centre for Agricultural Publishing and Documentation. https://edepot.wur.nl/108856

**Penning de Vries F.W.T, Van Laar H.H, Chardon M.C.M. 1983.** Bioenergetics of growth of seeds fruit and storage organs Proceedings of the symposium on the potential productivity of field crops under different environments 1980. Manila, Philippines: International Rice Research Institute, 37–59.

**Petreikov M, Yeselson L, Shen S, Levin I, Schaffer AA, Efrati A, Bar M. 2009**. Carbohydrate balance and accumulation during development of near-isogenic tomato lines differing in the AGPase-L1 allele. *Journal of American Society of Horticulture Science* **134**: 134–140.

**Pomper KW, Breen PJ**. 1995. Levels of apoplastic solutes in developing strawberry fruit. Journal of Experimental Botany **46**, 743–752.

**Prabha N, Bhagyalakshmi N**. **1998**. Carbohydrate Metabolism in Ripening Banana Fruit. *Phytochemistry* **37**: 804–808.

**Prudent M, Lecomte A, Bouchet J, Bertin N, Causse M, Génard M**. **2011**. Combining ecophysiological modelling and quantitative trait locus analysis to identify key elementary processes underlying tomato fruit sugar concentration. *Journal of Experimental Botany* **62**: 907–919.

**Quilot B, Génard M, Kervella J, Lescourret F**. **2004**. Analysis of genotypic variation in fruit flesh total sugar content via an ecophysiological model applied to peach. *Theoretical Applied Genetics* **109**: 440–449.

**Raue A, Kreutz C, Maiwald T, *et al.* 2009**. Structural and practical identifiability analysis of partially observed dynamical models by exploiting the profile likelihood. *Bioinformatics* **25**: 1923–1929.

**Rebucci B, Poni S, Lakso AN**. **1998**. Effects of manipulated berry transpiration on post-veraison sugar accumulation. *Acta Horticulturae* **513**: 467–475.

**Richardson AC, Mcaneney KJ, Dawson TE**. **1997**. Carbohydrate dynamics in kiwifruit. *Journal of Horticultural Science* **72**: 907–917.

**Robinson NL, Hewitt JD, Bennett AB. 1988**. Sink Metabolism in Tomato Fruit 1. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes *Plant Physiology* **87**: 727–730.

**Roch L, Dai Z, Gomès E, *et al.* 2019**. Fruit Salad in the Lab: Comparing Botanical Species to Help Deciphering Fruit Primary Metabolism. *Frontiers in Plant Science* **10**.

**Rosa JT**. **1928**. Change in composition during ripening and storage of melons. *Hilgardia* **3**:421-443

**Ruan YL, Patrick JW**. 1995. The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. Planta: An International Journal of Plant Biology **196**, 434–444.

**Sadras VO, Collins M, Soar CJ**. **2008**. Modelling variety-dependent dynamics of soluble solids and water in berries of Vitis vinifera. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**: 250–259.

**Saraiva LDA, Castelan FP, Shitakubo R, Hassimotto NMA, Purgatto E, Chillet M, Cordenunsi BR. 2013**. Black leaf streak disease affects starch metabolism in banana fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 5582–5589.

**Schaffer AA, Petreikov M, Miron D, Fogelman M, Spiegelman M, Bnei-Moshe Z, Shen S, Granot D, Hadas R, Dai N, Bar M, Friedman M, Pilowsky M, Gilboa N, Chen L. 1999**. Modification of carbohydrate content in developing tomato fruit. *HortScience* **34**: 1024–1027.

**Schapendonk AHCM, Brouwer P**. 1984. Fruit growth of cucumber in relation to assimilate supply and sink activity. Scientia Horticulturae **23**, 21–33.

**Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen E a., Bradstreet ED**. **1965**. Hydrostatic Pressure and Osmotic Potential in Leaves of Mangroves and Some Other Plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **52**: 119–125.

**Shahidul Islam M, Toshiyuki M, Yoshida Y**. 1996. Carbohydrate content and the activities of sucrose synthase , sucrose phosphate synthase and acid invertase in different tomato cultivars during fruit development. Scientia Horticulturae.

**Shiratake K, Kanayama Y, Maeshima M, Yamaki S**. **1997**. Changes in H+-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant and Cell Physiology* **38**: 1039–1045.

**Souleyre E, Iannetta P, Ross H**. **2004**. Starch metabolism in developing strawberry (Fragaria x ananassa ) fruits. *Physiologia*: 369–376.

**Stevens M, Kader A. A., Albright-Holton M**. **1979**. Potential fot increasing tomato flavor via increased sugar and acid content. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **104**: 40–42.

**Stevenson DG, Domoto PA, Jane JL**. **2006**. Structures and functional properties of apple (Malus domestica Borkh) fruit starch. *Carbohydrate Polymers* **63**: 432–441.

**Stitt M, McC.Lilley R, Gerhardt R, W.Heldt H**. **1989**. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* **174**: 518–552.

**Sturm A**. **1999**. Update on Biochemistry Invertases . Primary Structures , Functions , and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning Some Common Molecular Features but Differ. *Plant physiology* **121**: 1–7.

**Tardieu F, Katerji N, Bethenod O**. **1990**. Relations entre l'état hydrique du sol, le potentiel de base et d'autres indicateurs de la contrainte hydrique chez le maïs. *Noûs*.

**Torres-Ruiz, J.M., Perulli, G.D., Manfrini, L., Zibordi, M., Lopéz Velasco, G., Anconelli, S.,Pierpaoli, E., Corelli-Grappadelli, L., Morandi, B.** 2015. Time of irrigation affects vine water relations and the daily patterns of leaf gas exchanges and vascularflows tokiwifruit (Actinidia deliciosa Chev.). Agric. Water Manag. 166, 101–110. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.12.012.

**Turner N (Csiro)**. **1981**. Chapter 3: Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* **58**: 339–366.

**Verpoorte R. 2000**. Secondary metabolism. Dordrecht. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*: 1–29.

**Vivin P, Castellan-Estrade M, Gaudillère J-P. 2003.** Seasonal changes in chemical composition and construction costs of grapevine tissues**.** *Vitis* **42(1):5–12**

**Vizzotto G, Pinton R, Varanini Z, Costa G**. **1996**. Sucrose accumulation in developing peach fruit. *Physiologia Plantarum* **96**: 225–230.

**Walker AJ, Ho LC**. **1978**. Carbon Translocation in the Tomato: Pathways of Carbon Metabolism in the Fruit. *Annals of Botany* **41**: 825–832.

**Walker, A.J. and J.H.M. Thornley**. 1977. The tomato fruit: import, growth, respiration and carbon metabolism at different fruit sizes and temperatures. Ann. Bot. 41:977–985

**Wallach D, Makowski D, Jones JW, Brun F, JamesW. Jones**. **2014**. *Working with Dynamic Crop Models*. In Methods, Tools and Examples for Agriculture and Environment, Academic Press, 2nd Edition.

**Walton, E. F., & De Jong, T. M**. 1990. Estimating the Bioenergetic Cost of a Developing Kiwifruit Berry and its Growth and Maintenance Respiration Components. Annals of Botany, 66(4), 417–424. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a088043

**Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A**. **1993**. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiol* **101**: 321–327.

**Wang L, Chen Y, Wang S, Xue H, Su Y, Yang J Li X. 2018**. Identification of candidate genes involved in the sugar metabolism and accumulation during pear fruit post-harvest ripening of "Red Clapp's Favorite" (Pyrus communis L.) by transcriptome analysis. *Hereditas* **155**: 11.

**Wang SY, Camp MJ**. **2000**. Temperatures after bloom affect plant growth and fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae* **85**: 183–199.

**Wei J, Liu G, Liu D, Chen Y**. **2017**. Influence of irrigation during the growth stage on yield and quality in mango ( Mangifera indica L ). *PloS One* **12(**4): e0174498

**Wind J, Smeekens S, Hanson J**. **2010**. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* **71**: 1610–1614.

**Windt CW, Gerkema E, Van As H**. 2009. Most Water in the Tomato Truss Is Imported through the Xylem, Not the Phloem: A Nuclear Magnetic Resonance Flow Imaging Study. Plant Physiology **151**, 830–842.

**Wu BH, Quilot B, Génard M, Li SH, Zhao JB, Yang J**. **2012**. Application of a SUGAR model to analyse sugar accumulation in peach cultivars that differ in glucose – fructose ratio. *The Journal of Agricultural Science* **150**: 53–63.

**Yamaki S**. **2010**. Metabolism and Accumulation of Sugars Translocated to Fruit and Their Regulation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **79**: 1–15.

**Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, DeVerna JW, Bennett AB**. 1988. Sink Metabolism in Tomato Fruit. Plant Physiology **95**, 1026–1035.

**Yin YG, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H, Sugaya S, Matsukura C. 2010**. Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (Solanum lycopersicum L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA-and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* **61**: 563–574.

**Zanon L, Falchi R, Santi S, Vizzotto G**. **2015**. Sucrose transport and phloem unloading in peach fruit: Potential role of two transporters localized in different cell types. *Physiologia Plantarum* **154**: 179–193.

**Zhang H ping, Wu J you, Tao S tian, Wu T, Qi K jie, Zhang S jun, Wang J zhong, Huang W jiang, Wu J, Zhang S ling**. 2014. Evidence for Apoplasmic Phloem Unloading in Pear Fruit. Plant Molecular Biology Reporter **32**, 931–939.

**Zhang L-Y, Peng Y-B, Pelleschi-Travier S, Fan Y, Lu Y-MY-F, Lu Y-MY-F, Gao X-P, Shen Y-Y, Delrot S, Zhang D-P**. 2004. Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. Plant physiology **135**, 574–86.

**Zhang X-Y, Wang X-L, Wang X-F, Xia G-H, Pan Q-H, Fan R-C, Wu F-Q, Yu X-C, Zhang D-P**. 2006. A Shift of Phloem Unloading from Symplasmic to Apoplasmic Pathway Is Involved in Developmental Onset of Ripening in Grape Berry. Plant Physiology **142**, 220–232.

**Zhang Y, Keller M**. 2015. Grape berry transpiration is determined by vapor pressure deficit, cuticular conductance, and berry size. American Journal of Enology and Viticulture **66**, 454–462.

**Zhang Y, Li P, Cheng L**. **2010**. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in “Honeycrisp” apple flesh. *Food Chemistry* **123**: 1013–1018.

**Zimmermann MH, Milburn JA**. **1975**. Transport in Plants I: Phloem Transport In: Zimmermann M., Ziegler H, eds. *Transport in Plants I: Phloem Transpor*

# Annexe 1

*Annals of Botany* **122**: 1–21, 2018
doi: 10.1093/aob/mcy057, available online at www.academic.oup.com/aob

ANNALS OF BOTANY

INVITED REVIEW

## Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits

**Bertrand Beauvoit[1], Isma Belouah[1], Nadia Bertin[2], Coffi Belmys Cakpo[2], Sophie Colombié[1], Zhanwu Dai[3], Hélène Gautier[2], Michel Génard[2], Annick Moing[1], Léa Roch[1], Gilles Vercambre[2] and Yves Gibon[1,*]**

*[1]UMR 1332 BFP, INRA, Univ. Bordeaux, F-33883 Villenave d'Ornon, France, [2]UR 1115 PSH, INRA, F-84914 Avignon Cedex 9, France and [3]UMR 1287 EGFV, INRA, Univ. Bordeaux, Bordeaux Sci Agro, F-33883 Villenave d'Ornon, France*
**For correspondence. E-mail yves.gibon@inra.fr*

Received: 5 October 2017 Returned for revision: 1 December 2017 Editorial decision: 28 March 2018 Accepted: 29 March 2018
Published electronically 27 April 2018

• **Background** One of the key goals of fruit biology is to understand the factors that influence fruit growth and quality, ultimately with a view to manipulating them for improvement of fruit traits.
• **Scope** Primary metabolism, which is not only essential for growth but is also a major component of fruit quality, is an obvious target for improvement. However, metabolism is a moving target that undergoes marked changes throughout fruit growth and ripening.
• **Conclusions** Agricultural practice and breeding have successfully improved fruit metabolic traits, but both face the complexity of the interplay between development, metabolism and the environment. Thus, more fundamental knowledge is needed to identify further strategies for the manipulation of fruit metabolism. Nearly two decades of post-genomics approaches involving transcriptomics, proteomics and/or metabolomics have generated a lot of information about the behaviour of fruit metabolic networks. Today, the emergence of modelling tools is providing the opportunity to turn this information into a mechanistic understanding of fruits, and ultimately to design better fruits. Since high-quality data are a key requirement in modelling, a range of must-have parameters and variables is proposed.

**Key words:** Fruits, metabolism, agricultural practice, post-genomics, kinetic modelling, stoichiometric modelling, process-based modelling.

### CONTEXT

Fruits have proven to be a huge success in the evolution of plants. Over 150 million years, the organ of angiosperms dedicated to seed dispersal has evolved in a myriad of forms, tastes and properties, sometimes to protect the seeds by becoming impenetrable or toxic, and sometimes to help their spread by becoming winged, floatable, explosive or even desirable. Humans have long enjoyed this profusion, first as consumers, then as farmers and eventually as breeders.

Today, production of fruit, which is essential in human nutrition, is under significant pressure not only from environmental stresses but also from changes in consumer preference for taste and nutritional value, resulting in a constantly renewed need for improved varieties to meet this demand. Metabolism is an obvious target for improving fruit production, especially in fleshy fruits, our main source of vitamins and antioxidants, and understanding the mechanisms linking it to fruit phenotypes will help to improve breeding strategies (Giovannoni, 2006). Indeed, traits such as pathogen and abiotic stress resistance during growth, as well as flavour, nutritional value and health benefits are all affected by the composition of metabolites in fruit tissues. A key goal is therefore to understand the factors that affect metabolite concentrations in cells and tissues and how they are balanced with growth, ultimately for manipulating their levels to improve crop traits.

The concept of metabolism can be sub-divided into primary and specialized metabolism, depending on absolute requirements for cell survival and growth (Verpoorte, 2000). Importantly, reactions involved in primary metabolism are highly conserved, whereas those involved in specialized pathways show much greater diversity between fruit species. It is nevertheless striking that a large part of fruit diversity involves primary metabolism. Furthermore, primary metabolism undergoes important changes throughout fruit development, as evidenced by large changes in acidity and/or sweetness that occur at ripening. Thus, while the reaction network remains the same, a set of regulations can direct metabolic fluxes to very different destinations. Moreover, while primary metabolism is probably one of the best known biological networks with regard to its different stages, the way in which metabolic fluxes are reoriented remains largely unknown.

The present review focuses on the contribution of primary metabolism to fruit growth and quality, and how it may be influenced to improve fruit quality and increase yield. After a brief description of fruit primary metabolism and the way in which it is programmed throughout fruit growth and ripening, different approaches that have been adopted to manipulate fruit quality and production are discussed: agricultural practice, breeding and the search for metabolic targets. The modelling of fruit development and metabolism is then presented as an ensemble

© The Author(s) 2018. Published by Oxford University Press on behalf of the Annals of Botany Company.
All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

# Annexe 2

| | | |
|---|---|---|
| INRA SCIENCE & IMPACT<br>Unité PSH | MODE OPERATOIRE<br>Mesure de la pression osmotique | MO-16-ZZ- α |

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

## Objectif :

Ce mode opératoire a pour objectif de présenter les différentes étapes permettant la préparation puis la mesure de la pression osmotique d'un organe. La mesure de la pression osmotique [MPa] dépend de la concentration en soluté de l'échantillon :

$$\pi = RTC$$

avec R, constante des gaz parfaits 8.314 $cm^3.MPa.mol^{-1}.K^{-1}$

T, température [K] $T_K = T_C + 273.15$

C, concentration en soluté [mM]

Domaine d'application :

Mesure sur pulpe de fruit ou feuille

Destinataires :

Toute personne amenée à préparer ou faire des mesures de pression osmotique

## Modifications apportées

Première version du document

| | |
|---|---|
| **Nom du rédacteur : Coffi-Belmys Cakpo**<br>Date et signature **:** | **Nom du vérificateur : Gilles Vercambre**<br>Date et signature **:** |
| **Nom de l'approbateur:**<br>Fonction **:**<br>Date et signature **:** | **Validation par le directeur d'unité**<br>Nom **:**<br>Date et signature **:** |

Hygiène et sécurité :

Hygiène et sécurité liée à la manipulation d'azote liquide.

1. Documents rattachés **:**

## 2. Matériels et produits nécessaires **:**

- Seringue à insuline,
- micropipette 10µl (Wescor VAPRO5520) ou 100µl (Löser OM-815)
- Coton hydrophile,
- Osmomètre :
    - à point de rosée (Vapro 5520 Wescor Inc., Logan, U.S.A.)
    - à congélation
- Solution étalon (ampoules scellées)
- tube Eppendorf
- l'azote liquide
- tissus de la pulpe (mésocarpe)
- eau déminéralisée

### 3. Contenu :

- Préparation de l'échantillon :
  - Si l'organe est petit, prendre la totalité, sinon prélever 2 morceaux opposés ;
  - Pooler ensemble les organes d'une même répétition dans un petit flacon 5ml
  - Plonger le flacon dans l'azote liquide,
  - Congeler les échantillons à l'azote liquide -80°C puis les conserver à -20°C (Galindo et al., 2016; Xu, Coulter, & Derek Bewley, 1990);
- Pour la mesure de la pression osmotique :
  - laisser réchauffer à 4°C les échantillons par lot (5)
  - préparer dans une seringue de 1ml (type insuline) un morceau de coton hydrophile d'un volume de 0,2ml (2 units) disposé au fond de la seringue; et placer l'échantillon par-dessus. Ne pas trop en mettre sinon il sera très difficile de le presser avec le piston de la seringue.
  - Extraire le jus du fruit avec la seringue dans un tube eppendorf ; il est nécessaire de recueillir au moins 10µl pour l'osmomètre à point de rosée, Vapro 5520 Wescor Inc., Logan, U.S.A. ou 100µl si on utilise un osmomètre à congélation.

- Il est important de réaliser régulièrement une vérification de l'osmomètre (~ tous les 5 échantillons) soit à l'aide d'une solution de référence (Solution étalon, ou une solution préparée au laboratoire) soit à l'aide d'un échantillon dont on dispose de suffisamment de matière.
- Si on observe une dérive importante, alors on refait un étalonnage, puis on refait les derniers échantillons avant réétalonnage à l'aide des ampoules scellées suivant trois points (un point à 300 mOsmol⁄kg un autre à 920 mOsmol⁄kg et un dernier à 0 mOsmol⁄kg à l'eau déminéralisée).

## Référence bibliographiques

Galindo, A., Cruz, Z. N., Rodríguez, P., Collado-González, J., Corell, M., Memmi, H., … Pérez-López, D. (2016). Jujube fruit water relations at fruit maturation in response to water deficits. *Agricultural Water Management*, *164*, 110–117. http://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.08.024

Xu, N., Coulter, K. M., & Derek Bewley, J. (1990). Abscisic acid and osmoticum prevent germination of developing alfalfa embryos, but only osmoticum maintains the synthesis of developmental proteins. *Planta*, *182*(3), 382–390. http://doi.org/10.1007/BF02411389

# Annexe 3

| | | |
|---|---|---|
| INRA SCIENCE & IMPACT<br>Unité PSH | MODE OPERATOIRE<br>Mesure de la conductance cuticulaire du fruit | MO-16-ZZ- α |

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

## Objectif :

Ce mode opératoire décrit les principales étapes permettant la préparation et la mesure de la conductance cuticulaire. La mesure de conductance cuticulaire est faite en suivant les pertes de masse fraiche de fruits détachés au cours du temps. Comme la transpiration du fruit dépend de la conductance cuticulaire du fruit et de la conductance de la couche limite, des précautions doivent être prises pour réduire au maximum la résistance de la couche limite.

L'épaisseur de la couche limite [m] est calculée comme suit :

$$\delta = \frac{2{,}8 * \sqrt{\frac{\phi}{u}} + \frac{0{,}25}{u}}{1000} \quad (1)$$

Où ∅ est le diamètre du fruit [m], et u la vitesse du vent [m/s] (Nobel, 1975 ; Gibert, Lescourret, Génard, Vercambre, & Pastor, 2004).

La résistance de la couche limite [s/m] est par conséquent calculée comme suit:

$$R_{couche\ limite} = \frac{\delta}{D_{wv}} \quad (2)$$

$$g_{couche\ limite} = \frac{1}{R_{couche\ limite}} \quad (3)$$

avec $D_{wv}$, le coefficient de diffusion de la vapeur d'eau dans l'air $D_{wv}$= 2,60.10$^{-5}$ m$^2$/s

Pour un fruit de diamètre 5 cm, et une vitesse de vent de 1m/s (3,6 km/h), l'épaisseur de la couche limite est de 0,8mm et la conductance de la couche limite est d'environ 10683 cm/h, soit plusieurs ordres de grandeur plus élevé que la conductance cuticulaire des fruits.

Du fait que la conductance de la couche limite est beaucoup plus élevée que celle du fruit, la résistance de la couche limite est négligée dans le calcul de la conductance cuticulaire du fruit.

La transpiration du fruit est classiquement calculée d'après Riederer & Schreiber, 2001, comme suit:

$$J = \mathrm{g}\, A_f \frac{M_w}{RT}(e_i - e_o) \qquad (4)$$

avec J (g.m$^{-2}$.s$^{-1}$) la transpiration du fruit, $A_f$ la surface du fruit (m$^2$), $M_w$ la masse molaire moléculaire de l'eau (18,02 g.mol$^{-1}$), R la constant des gaz parfaits (0,08314 m$^3$.hPa.mol$^{-1}$.K$^{-1}$), T la température (K), ei et eo (hPa) représentent respectivement la pression de vapeur d'eau à l'intérieur du fruit et dans l'atmosphère, et g (m.s$^{-1}$) la conductance du fruit <u>(pour un gradient de concentration exprimé en vapeur d'eau).</u>

| | |
|---|---|
| **Nom du rédacteur : Coffi-Belmys Cakpo**<br>Date et signature **:** | **Nom du vérificateur : Gilles Vercambre**<br>Date et signature **:** |
| **Nom de l'approbateur:**<br>Fonction **:**<br>Date et signature **:** | **Validation par le directeur d'unité**<br>Nom **:**<br>Date et signature **:** |

En supposant que la pression de vapeur du fruit est à saturation, on peut écrire :

$$J = \mathrm{g}\, A_f \frac{M_w}{RT} VPD \qquad (5)$$

La conductance peut également être exprimé par g' [mol.m$^{-2}$.s$^{-1}$]:

$$g' = \mathrm{g} \frac{P_{atm}}{RT} \quad (6)$$

Ainsi donc l'équation (4) peut s'écrire comme suit :

$$J = g' A_f M_w \frac{VPD}{P_{atm}} \; [g.s^{-1}]$$
$$d'où \quad g' = \frac{J}{A_f M_w \frac{VPD}{P_{atm}}} \; [mol.m^{-2}.s^{-1}] \qquad (7)$$

avec $VPD = e_{sat} - e = e_{sat}.(1 - RH)$ (8) [mBar=hPa]

et $e_{sat} = 6.1121.exp^{\left[\frac{17.502.T}{240.97+T}\right]}$

<u>Pour un transfert de vapeur d'eau basé sur un gradient de concentration,</u> la conductance g [cm.s$^{-1}$] a été calculée d'après (Lescourret, Génard, Habib, & Fishman, 2001):

$$J = gA_f \frac{M_w}{RT} VPD = [cm.s^{-1}][cm^2] \frac{[g.mol^{-1}]}{[83.14cm^3.bar.K^{-1}.mol^{-1}][K]} \cdot [bar] = [g.s^{-1}]$$
$$g = \frac{J}{A_f \frac{M_w}{RT} VPD} \; [cm.s^{-1}] \qquad (9)$$

Par conséquent, la conductance g' peut être déduite à partir de la conductance estimée précédemment comme suit:

$$g' = \frac{P_{atm}}{RT} g \simeq 0.4g \quad (10) \quad .$$

**4. Domaine d'application :**

Mesure sur fruit.

**5. Destinataires :**

Toute personne amenée à faire des mesures de conductance cuticulaire.

**6. Modifications apportées :**

Première version du document

**7. Hygiène et sécurité :**

**8. Documents rattachés :**

## 9. Matériels et produits nécessaires :

- Mastic (pâte d'étanchéité ou terostat),
- Ventilateur,
- Scalpel,
- Laboratoire avec de faible variation de la température et de l'humidité de l'air,
- Capteur de température et d'humidité (Sefram ) pour des mesures continues de la température et de l'humidité de l'air dans l'enceinte,
- Balance de précision adéquate (selon le poids du fruit).
- Pieds à coulisse (mesures des diamètres, de la hauteur)
- Glacière
- Pans de glace
- Sacs plastiques
- Enceinte munie d'un système de ventilation ou enceinte dans laquelle on peut mettre un ventilateur.
- Grille

## 10. Contenu :

### Sur terrain

- Prélever des fruits sur le terrain,
- Numéroter les fruits à l'aide d'un marqueur indélébile (afin de bien les identifier s'ils sont groupés pour les mesures),
- Ensacher chacun des fruits prélevés,
- Mettre immédiatement les fruits ensachés dans une glacière contenant des pans de glace,
- Bien fermer la glacière pour limiter l'entrée d'air et donc la transpiration du fruit,
- Transporter la glacière contenant les fruits jusqu'au laboratoire,

## Au laboratoire,

- Apprêter et programmer le capteur de température et d'humidité de l'air (Sefram) à un pas de temps (10 minutes)
- Sortir séparément les fruits
- Enlever les sépales et les pédicelles des fruits à l'aide d'un scalpel,
- Peser le fruit, et mesurer ses dimensions (hauteur, diamètres …),
- Placer du mastic sur l'ouverture laissée par le pédicelle coupée (pour éviter des pertes transpiratoires à ce niveau),
- Repeser le (s) fruit (s) avec le mastic pour avoir un point de départ,
- Placer les fruits sur la grille,
- Placer sur la grille le capteur déjà programmé (mettre le capteur entre les fruits s'ils sont groupés),
- Mettre l'ensemble (grille + fruit(s) + capteur) dans une enceinte munie d'un système de ventilation où on enregistre la température et l'humidité,
- En l'absence d'enceinte munie d'un système de ventilation ; mettre l'ensemble (grille + fruit(s) + capteur) dans l'enceinte ainsi qu'un système de ventilation forte à proximité (puissance max pour éliminer la couche limite),
- Noter l'heure de mesure à chaque pesée ou "groupe" de pesées
- Mesurer régulièrement le poids du (des) fruit (s) à un pas de temps de 1h30 ou 2 heures,
- Utiliser une balance de précision au milligramme (selon le poids du fruit)
- Replacer les fruits sur la grille et répéter jusqu'à avoir 5 à 6 points de mesure. Un point final peut être réalisé le lendemain matin,
- Formule de calcul de la conductance cuticulaire.

## Référence bibliographiques

Gibert, C., Lescourret, F., Génard, M., Vercambre, G., & Pastor, A. P. P. (2004). Modelling the Effect of Fruit Growth on Surface Conductance to Water Vapour Diffusion. *Annals of Botany*, 673–683. http://doi.org/10.1093/aob/mci067

Leonardi, C., Baille, A., & Guichard, S. (1999). Effects of fruit characteristics and climatic conditions on tomato transpiration in a greenhouse, *0316*(March).

http://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511183

Lescourret, F., Génard, M., Habib, R., & Fishman, S. (2001). Variation in surface conductance to water vapor diffusion in peach fruit and its effects on fruit growth assessed by a simulation model, 735–741.

Nobel, P. S. (1975). Effective Thickness and Resistance of the Air Boundary Layer Adjacent to Spherical Plant Parts, *26*(90), 120–130.

Riederer, M., & Schreiber, L. (2001). Protecting against water loss : analysis of the barrier properties of plant cuticles, *52*(363), 2023–2032.

http://people.bu.edu/nathan/gebi525_week6.pdf

Fig1: La grille

Fig2: Enceinte de mesure