



TMT1 et TMT2: deux transporteurs tonoplastiques de sucres impliqués dans l'expansion de la vacuole et le grandissement du fruit de tomate

Alice Destailleur

► To cite this version:

Alice Destailleur. TMT1 et TMT2: deux transporteurs tonoplastiques de sucres impliqués dans l'expansion de la vacuole et le grandissement du fruit de tomate. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT: 2021BORD0134 . tel-03647022

HAL Id: tel-03647022

<https://theses.hal.science/tel-03647022>

Submitted on 20 Apr 2022

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.

THESE



Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

École doctorale des Sciences de la VIE et de la Santé

Spécialité : Biologie Végétale

Par

Alice DESTAILLEUR

**TMT1 et TMT2 : deux transporteurs tonoplastiques de sucres
impliqués dans l'expansion de la vacuole et le grandissement du
fruit de tomate**

-

TMT1 and TMT2: two tonoplastic sugar transporters implicated in
vacuole expansion and tomato fruit growth

Sous la direction de Martine Dieuaide-Noubhani

Présentée et soutenue publiquement le 31 Mars 2021

Direction	Mme. Martine Dieuaide-Noubhani - Maitre de conférences, <i>Université de Bordeaux</i>
Président	M. Michel Hernould - Professeur, <i>Université de Bordeaux</i>
Rapporteurs	Mme Rossitza Atanassova – Professeur, <i>Université de Poitiers</i> M. Christophe Salon – Directeur de recherche, <i>INRAE Dijon</i>
Examineurs	M. Éric Gomes - Professeur, <i>Université de Bordeaux</i> Mme. Ana-Paula Alonso - Professeur associé, <i>Université North Texas</i>

A mes parents,

A mon frère,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres de mon jury, Michel Hernould, Rossitza Atanassova, Christophe Salon, Ana Paula Alonso et Eric Gomes, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Mes remerciements sont ensuite adressés à Yves Gibon pour m'avoir accepté dans son équipe et à tout le reste de la team Meta pour son accompagnement pendant ces cinq années, d'abord en stage de master 1 et 2 et pendant mes trois années de thèse. Merci de m'avoir préparée au concours de l'école doctorale pour décrocher la bourse qui m'a permis de vivre sans doute les meilleures années de ma vie.

Merci de m'avoir soutenue dans tous les nombreux retournements de situations, d'avoir partagé les bons mais aussi les pires moments, sans vous rien n'aurait été possible ! Un merci tout particulier à Bertrand et Sophie pour toute votre aide sur la partie modélisation et à Cédric pour ton support sur HitMe, mais aussi à tous les autres, Catherine, Stéphane, Pierre P, Pierre B, Mickael, Marie-Hélène, Kentaro, Cécile, Joana, vous avez tous contribué à ma réussite.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé pour les tâches en serre et surtout pour le travail de récolte de la T1, maintenant je peux le dire, le pire moment de ma thèse : Pierre B., Marie-Hélène, Sylvain, Cédric, Amélie, Michel, Fred D, Mickael, Cécile, Sophie, Kentaro, Martine, Nathalie et bien sûr mon armée de stagiaires, Alexandre, Isaty, Mathis et Léa. Un big-up particulier à Alexandre Sayssac qui a réalisé ses 3 ans de stage avec moi !

J'exprime ma reconnaissance aussi à toute l'équipe ORFE pour tout son accompagnement et son aide concernant la génération des plantes transgéniques. Un grand merci tout particulièrement à Norbert Bollier et Édouard Tournet d'avoir recueilli la « nulle de la biomol » et m'avoir permis d'acquérir toutes les compétences nécessaires pour développer mon autonomie. Gratitude immense à Frédéric Delmas pour son co-encadrement durant toute cette thèse !

Un immense merci aussi à Isabelle Atienza-Babin et Aurélie Honoré pour votre aide cruciale en serre, à Lysiane Brocard et Catherine Cheniclet pour votre aide sur la microscopie.

Et je n'oublie pas de remercier la team de fous furieux qui m'a accompagnée pendant ces 3 ans et demi de thèse, j'appelle mes supers collègues thésards (mais pas que) : Amél, Gab,

Toto, Gui, Cedric, Sisi, JJ, Edouard, Arthur, Isma, Paul, Constance, Léa, Simon. Vous avez su rendre ces trois années justes incroyables et j'en garderai à vie un souvenir mémorable.

Mes plus sincères remerciements et gratitude à ma directrice de thèse, Martine Dieuaide-Noubhani envers laquelle je suis reconnaissante pour sa confiance depuis mon stage de master 2 et jusqu'à la fin de ma thèse. Vous avez su tellement bien cerner ma manière de fonctionner et toujours su m'accompagner dans les coups durs pour que je puisse réussir à me surpasser. Bien plus qu'un encadrement professionnel, vous m'avez faite grandir aussi sur le plan personnel. Vous avez entretenu et développé ma passion pour la recherche, apprendre le métier de chercheur à vos côtés aura été une énorme chance. Pour toute votre implication, votre bienveillance et votre acharnement pour que ce projet aboutisse, MERCI !

Enfin toute ma gratitude à mes parents, à mon frère, et ma famille sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci de m'avoir soutenue dans toutes ces épreuves et de toujours m'avoir laissée libre dans mes choix, même si vous ne les compreniez pas toujours. Merci d'avoir supporté mes sauts d'humeur, mon mauvais caractère mais comme je l'ai toujours dit, vous faites un investissement sur l'avenir ! Je sais que mes sms avec des photos de graphs ou de plants de tomate et messages surexcités vont vous manquer !

J'ai souvent comparé mes plantes à mes bébés et c'est avec le plus grand des regrets mais aussi avec une énorme fierté que je transmets ce projet pour attaquer j'espère une nouvelle page de ma vie aussi riche de passion que ce qu'a pu me procurer celui-ci. Ces années auront été une expérience de vie sans précédent et pour rien au monde je n'y changerais quoi que ce soit si c'était à refaire. Enfin si, peut-être la canicule et le COVID, les vrais sauront de quoi je parle !

ABSTRACT

Tomato fruit growth results in two distinct but overlapping phases, namely cell division in the very early days post anthesis, followed by a cell expansion phase. The vacuole, which occupies almost 80% of the volume of cell fruit would play a major role in cell enlargement. Recently, our team developed a kinetic modeling approach, allowing a precise and dynamic description of tomato fruit metabolism throughout fruit growth (Beauvoit *et al.*, 2014). This model emphasized the crucial role of sugars in generating the osmotic strength of the vacuole, allowing its enlargement and thus, fruit growth. Their transport across the tonoplast is mainly ensured by secondary active transporters. Thanks to a bioinformatic study, we identified the tomato proteins implicated in these transports: SUTs/SUCs, (Sucrose Transporters family), VGT (vacuolar Glucose Transporters), SFPs (Sugar Facilitator Protein), TMTs (Tonoplast monosaccharide Transporters) as well as two passive transporters, SWEET16 and SWEET17.

In order to investigate the conclusions, put forward by the modeling approach, we generated transgenic RNAi lines for these transporters. After a phenotyping of the population of transgenic lines, we selected two candidates: TMT135S.2 and TMT235S.6 affected on TMT1 and TMT2 expression. A deeper phenotyping highlighted a drastic reduction of fruit size compared to the WT. At the metabolic level, TMTs under expression induced the reduction of hexoses (glucose and fructose) and hexoses phosphate contents to the profit of the accumulation of starch, amino acids and ions and to a lesser extent, organic acids and cell wall polysaccharides. However, despite this carbon reallocation, we showed that a shift from hexose accumulating metabolism to starch and amino acids accumulating metabolism, was inefficient to compensate the decrease in the total osmolarity, leading to the reduction of fruit size. Together with RNAseq published data (Tomato Expression Atlas - <http://tea.solgenomics.net/>) showing that TMT1 and TMT2 were expressed in specific area in the pericarp, our results suggest that TMT2 would be more implicated in generating the osmotic strength of the vacuole of the surrounding bundle cell, allowing phloem sucrose unloading in the early phase of fruit development, whereas TMT1 would be associated to pericarp cell enlargement.

Finally, a flux balance modeling confirmed in the TMT135S.2 line the deep remodeling of the metabolic network, leading to an additional energy cost that could in part, explain the growth limitation.

Key words: Vacuole, sugar metabolism, starch, cell growth, tonoplast, sugar transporters, modeling.

RESUME

La croissance du fruit de la tomate est divisée en deux phases distinctes mais chevauchantes, à savoir la division cellulaire dans les premiers jours après l'anthèse, suivie d'une phase d'expansion cellulaire. La vacuole, qui occupe près de 80% du volume cellulaire, jouerait un rôle majeur dans le grandissement cellulaire. Récemment, notre équipe a développé une approche de modélisation cinétique, permettant une description précise et dynamique du métabolisme du fruit de la tomate tout au long de la croissance (Beauvoit *et al.*, 2014). Ce modèle a mis l'accent sur le rôle crucial des sucres dans la création de la force osmotique de la vacuole, permettant son élargissement et donc la croissance des fruits. Le transport des sucres à travers le tonoplaste est principalement assuré par des transporteurs actifs secondaires. Grâce à une étude bio-informatique, nous avons identifié les protéines de tomate impliquées dans ces transports: SUTs / SUCs, (Sucrose Transporters family), VGT (Vacuolar Glucose Transporters), SFPs (Sugar Facilitator Protein), TMTs (Tonoplast monosaccharide Transporters) ainsi que deux transporteurs passifs, SWEET16 et SWEET17. Dans le but de valider les conclusions proposées par l'approche de modélisation, des lignées transgéniques exprimant une construction RNAi pour ces transporteurs ont été générés. Par un premier phénotypage de la population de lignées transgéniques, nous avons sélectionné deux candidats intéressants : TMT135S.2 et TMT235S.6 affectés sur l'expression de TMT1 et TMT2. Le phénotypage en génération T2 a montré une réduction drastique de la taille des fruits par rapport au WT. Au niveau métabolique, la sous expression des TMTs induit une diminution de la teneur en hexoses (glucose et fructose) et en hexoses phosphate au profit d'une accumulation d'amidon, d'acides aminés et d'ions et dans une moindre mesure, d'acides organiques et de polysaccharides pariétaux. Cependant, nous avons montré que cette réallocation du carbone (passage d'un métabolisme accumulant des hexoses à un métabolisme accumulant de l'amidon et des acides aminés) était inefficace pour compenser la diminution de l'osmolarité, conduisant à la réduction de la taille des fruits. Nos résultats, couplés à ceux de RNAseq (Tomato Expression Atlas - <http://tea.solgenomics.net/>) montrant que TMT1 et TMT2 étaient exprimés dans des zones spécifiques du péricarpe, ont permis de suggérer que TMT2 serait plutôt impliqué dans la génération de la force osmotique de la vacuole des cellules proches des faisceaux vasculaires. Cela faciliterait le déchargement du phloème dans les phases précoces du développement du fruit. TMT1 serait associé quant à lui, au grandissement des cellules du péricarpe.

Enfin, une approche de modélisation par FBA a confirmé chez la lignée TMT135S.2 le remodelage profond du réseau métabolique, dont le fonctionnement conduirait à un surcoût énergétique qui pourrait expliquer en partie la limitation de la croissance.

Mots clés : vacuole, métabolisme des sucres, croissance cellulaire, tonoplaste, transporteurs de sucres, modélisation.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
ABSTRACT.....	5
RESUME.....	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	11
Chapitre 1 – Introduction	18
I- Le développement du fruit de tomate	18
1. De la fleur au fruit	18
2. Morphologie du fruit.....	20
3. Les phases de développement du fruit	21
a. La phase de division cellulaire	22
b. La phase d'expansion cellulaire.	23
II- Origine et devenir des sucres chez le fruit au cours du développement.	25
1. Origine des sucres	25
a. Production et remobilisation des photoassimilats.....	26
b. Le transport des photoassimilats : chargement et déchargement du phloème	28
2. Notions de force de puit et ses conséquences sur la croissance.....	29
III- Le devenir du carbone dans le fruit : Le métabolisme primaire au cours du développement	31
1. Les voies du métabolisme primaire.....	32
b. Le cycle de Krebs et réactions associées.....	35
c. La chaîne respiratoire.....	36
d. La voie des pentoses phosphates (PPP).....	40
2. Le métabolisme du fruit de tomate au cours du développement	42
IV- La vacuole : un compartiment clef dans le développement du fruit.....	43
1. Biogenèse de la vacuole	44
2. La vacuole : un compartiment aux multiples rôles	45
- Stockage et détoxification.....	45
- La régulation de l'homéostasie du cytosol.....	45
- Osmorégulation	47
- Activité lytique et rôle dans les processus de mort cellulaire	48
3. Le tonoplaste et les transports associés	48
a. Les transporteurs de sucres	50
b- Les pompes à protons	57
c- Autres transports : les acides organiques	60

GENERAL OBJECTIVES	64
Chapter 2: Identification of candidate genes corresponding to tonoplast localized sugar transporters implicated in fruit growth - Large screening of a T1 generation.....	66
INTRODUCTION	66
RESULTS AND DISCUSSION	68
Isolation and homological analysis of tonoplast sugar transporter genes.....	68
Expression of candidate genes during early fruit development	72
Design of the RNAi sequence and generation of transgenic lines	73
Fruit growth is negatively correlated to starch and proteins amount	76
Two interesting clusters of candidate genes can be extracted from the T1 population.....	77
Selected lines showed a reduction of the targeted gene expression	82
Cell size and fruit weight are reduced as a consequence of under-expressing TMTs.....	84
Two TMTs RNAi lines show a reduction in sugar concentration in leaves	87
SUPPLEMENTAL DATA	88
Chapter 3: Role of TMT1 and TMT2 in tomato fruit growth and impact of their under expression at the metabolic and cell level.....	94
INTRODUCTION	94
RESULTS.....	96
TMTs proteins are located on the tonoplast of tomato cells	96
Two transgenic lines differentially affected in TMT1 and TMT2 gene expression	97
Reduction of TMT1 and TMT2 expression affected fruit growth.....	99
TMTs under expression triggered changes of composition.....	101
TMTs under expression induces carbon reallocation.....	102
TMT under expression induces dramatic changes in the capacities of enzymes involved in central metabolism	104
TMT under expression induced an accumulation of cation and anion in the early stages of development.....	106
Dry weight and carbon repartition are affected in the transgenic lines	107
TMTs induce a decrease of cell osmolarity and global pH of the fruit.....	109
Cell volume and cell division are affected in the transgenic lines	110
DISCUSSION	112
Tonoplast sugar transporters (TMTs) in tomato	112
Fruit growth occurs via cell division followed by cell expansion, two processes implicating TMTs genes	113
TMT1 and TMT2 harbor different functions and expression territories and cannot fully compensate each other.....	115
Starch over accumulation is negatively correlated with fruit growth.....	118

Starch accumulation that mobilizes hexose-phosphates leads to a competition between glycolysis and carbon storage	121
Starch accumulation instead of hexose accumulation: an expensive way to maintain sink strength	122
TMT genes play a crucial role in fruit growth by a concomitant involvement in sink strength and the maintenance of water potential of the vacuole	123
SUPPLEMENTAL DATA	125
Chapter 4: FBA modeling method: a preliminary global vision of flux remodeling throughout the fruit development of transgenic lines.....	128
INTRODUCTION	128
RESULTS.....	130
The stoichiometric model of tomato fruit	130
Constraints limiting the flux space and definition of the objective function	132
FBA: a way to estimate the flux carbon flux entering the fruit.....	134
Respiration and energy balance.....	136
Carbon partitioning between the main biosynthetic pathways	138
DISCUSSION	140
Accumulating sugars as the better way to ensure vacuole growth	140
The modeling approach: an indispensable tool for understanding metabolism despite some limitations	141
SUPPLEMENTAL DATA.....	144
GENERAL CONCLUSIONS.....	152
Chapitre 5 – Matériels et méthodes	156
I- Matériel biologique	156
1- <i>Matériel végétal et conditions de culture</i>	<i>156</i>
2- <i>Souche bactérienne et milieu de culture</i>	<i>158</i>
II- Manipulation et analyse des acides nucléiques	159
1- Extraction des acides nucléiques.....	159
a. <i>Extraction de l'ADN génomique de tomate</i>	<i>159</i>
b. <i>Extraction d'ADN plasmidiques de bactérie</i>	<i>160</i>
c. <i>Extraction d'ARN totaux et Rétrotranscription.....</i>	<i>160</i>
2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	161
3- PCR en temps réelle	161
III- Clonage moléculaire.....	163
1- Clonage moléculaire par la technologie Gateway	163
2- Clonage moléculaire par la technologie Modular Cloning (Moclo).....	164
3- Transformation d'E. Coli par électroporation.....	167

IV- Méthode de transgénèse et de sélection des plantes transgéniques.....	167
1- Transformation d'Agrobacterium tumefaciens et préparation des cultures pour la transformation stable.....	168
2- Transgénèse et sélection des plantes de tomate.....	168
3- Purification et transformation de protoplastes.....	169
V- Dosages biochimiques	170
1- Préparation des extraits.....	170
<i>a- Broyage et conservation.....</i>	<i>170</i>
<i>c- Extraction éthanolique</i>	<i>171</i>
<i>d- Extraction des enzymes solubles.....</i>	<i>171</i>
<i>e- Extraction des ions</i>	<i>172</i>
2- Dosages de métabolites	172
<i>a- Dosage des hexoses : glucose, fructose, saccharose.....</i>	<i>173</i>
<i>b- Dosage du malate</i>	<i>174</i>
<i>c- Dosage du citrate.....</i>	<i>174</i>
<i>d- Dosage de protéines totales solubles.....</i>	<i>175</i>
<i>e- Dosage de l'amidon</i>	<i>175</i>
<i>f- Dosage des acides aminés libres totaux.....</i>	<i>175</i>
<i>g- Dosage des ions</i>	<i>176</i>
<i>h- Estimation des parois et de la matière sèche</i>	<i>176</i>
3- Dosage des activités enzymatiques.....	177
<i>a. Dosage direct.....</i>	<i>177</i>
<i>b. Dosages indirects</i>	<i>182</i>
VI- Analyses cytologiques	187
1- Coloration au bleu de toluidine – Mesure des surfaces cellulaires, nombre d'assise cellulaire et épaisseur du péricarpe	187
<i>a- Coloration.....</i>	<i>187</i>
<i>b- Analyses d'image</i>	<i>187</i>
2- Détermination des volumes de compartiments subcellulaires.....	188
<i>a- Fixation et coloration</i>	<i>188</i>
<i>b- Analyses d'images.....</i>	<i>190</i>
BIBLIOGRAPHIE	193

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degrés Celsius
1,3-DPGA	1,3-Dihosphoglycérate
2,4D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2OGDH	2-oxoglutarate déshydrogénase
2-PGA	2-Phosphoglycérate
3-PGA	3 phosphoglycérate
6PGDH	6-phosphogluconate déshydrogénase
6-P-Glu	6-phosphate-Glucoconate
AcetylCoA	Acétyl coenzyme A
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
ADPG	Adénosine di phosphate glucose
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
AI	Invertase acide (Acidic invertase)
Ald	Aldolase
ALMT	Aluminium activated malate transporter
AOX	Oxydase alternative
ATP	Adénosine tri phosphate
ATPase	Pompe a proton ATP dependante
BAM	Exoamylase β -amylase
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Carbone
Ca(NO ₃) ₂	Nitrate de calcium
Ca ²⁺	Calcium
CAB1	Chlorophyl A/B binding protein
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CAX	Cation exchangers
CC/TC	Cellules compagnes/éléments criblés
Cl ⁻	Chlorure
CO ₂	Dioxyde de carbone
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9
CS	Citrate synthase
CTAB	Bromure de cétrimonium
Cyt.c	Cytochrome c
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHAP	Dihydroxyacétone Phosphate
DNA/ADN	Deoxyribonucleic acid/acide désoxyribonucléique
DO/OD	Densité optique
DPA	Day post anthesis
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)/Ellman's reagent
DTT	Dithiothréitol

DW	Dry weight (poids sec)
e ⁻	Electron
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Acide egtazique
ERD	Early response to dehydration
Ery-4-P	Erythrose-4-Phosphate
EtOH	Ethanol
F1,6BP	Fructose-1,6-Bisphosphate
F-1,6-BPase	Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase
F6P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavine adénine di-nucléotide oxydé
FADH ₂	Flavine adénine di-nucléotide réduit
FBA	Flux balance analysis
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
Fe-S	Complexe fer soufre
FK	Fructokinase
FMN	Flavine mononucléotide oxydé
FMNH ₂	Flavine mononucléotide réduit
Fru	Fructose
FW	Fresh weight (poids frais)
g	gramme
G1P	Glucose-1-phosphate
G3P	glyceraldehyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GBSS	Granule-bound starch synthase
GERL	Golgi associated Endoplasmic reticulum
GFP	Green fluorescent protein
GK	Glucokinase
Glc	Glucose
GOT	Glutamate-oxoglutarate aminotransferase
GPOX	Glutathione peroxidase
GWD	Glucan Water Dikinase
h	Heure
H ⁺	Proton
HCl	Chlorure d'hydrogène
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hexoses-P	Hexoses phosphate
HK	Hexokinase
HR	Hypersensitive response
Hz	Hertz

ICDH	Isocitrate déshydrogénase NAD(P) dépendante
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IPTG	Isopropyl-thio-galactoside
ISA	Isoamylase
KCl	Chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	Phosphate de monopotassium
K _m	Constante de Michaelis
KO	Knock out
KOH	Hydroxyde de potassium
L	litre
LV	Vacuole lytique (lytic vacuole)
M	Molaire
m	mètre
MDH	Malate déshydrogénase
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
milieu LB	Milieu lysogeny broth/milieu Luria-Bertani
milieu MS	Milieu Murashige and Skoog
min	Minute
mM	Milli molaire
MSF	Major facilitator Super Family
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
mV	Milli volt
MVB	corps multi vésiculaires (multivesicular body)
Na ⁺	Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NAD ⁺	Nicotinamide adénine di-nucléotide oxydé
NAD-GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase NAD dépendante
NADH	Nicotinamide adénine di-nucléotide réduit
NADP ⁺	nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate oxydé
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NaF	Fluorure De Sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NHX1	Sodium/hydrogen exchanger 1
NI	Invertase neutre (Neutral invertase)
OAA	Oxaloacétate
OE	Sur-expression (over expression)
OH ⁻	Hydroxyle
P	Phosphate
p/v	Poids/volume
PCD	Mort cellulaire programmée (programed cell death)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain reaction)
PEG	Polyéthylène glycol

Pentoses-P	Pentoses phosphate
PEP	Phosphoénol pyruvate
PEPc	Phosphoénol pyruvate carboxylase
PES	Phenazine ethosulfate
PFK	Phosphofructokinase
PFp	Diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase
PGI	Phosphoglucose isomérase
PGK	3-phosphoglycerokinase
P-Glu	Phospho-Gluconolactone
PGM	Phosphoglucomutase
Pi	Orthophosphate
PK	Pyruvate kinase
PPase	Pompe a proton pyrophosphate dependante
PPi	Pyrophosphate
PPP	Voie des pentoses phosphates
PSV	Vacuole de stockage (protein storage vacuole)
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
PWD	Phosphoglucan water dikinase
qPCR	PCR quantitative
QTL	Locus de caractères quantitatifs (quantitative trait loci)
Rbu-5-P	Ribulose-5-Phosphate
RE	Reticulum endoplasmique
RGR	Taux relatif de croissance (Relativ growth rate)
Rib-5-P	Ribose-5-Phosphate
RMN	Résonance magnetique nucléaire
RNA/ARN	Ribonucleic acid/acide ribonucléique
RNAi	ARN interferent
rpm	Rotation par minute
RT	<i>Rétrotranscription</i>
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SDH	Succinate déshydrogénase
Sec/s	Seconde
Sed-7-P	Sedo-heptulose-7-Phosphate
SFP	Sugar Facilitator Protein
SPS	Sucrose phosphate synthase
SS	Starch synthase
Starch synthases	[1-4]-a-D-glucan4-a-D-glucosyltransferase glycosyl transférase
Suc	Saccharose
SUSY	Saccharose synthase
SUT	Sucrose transporter
SV	Petite vacuole (small vacuole)
SWEET	Sugars Will Eventually be Exported Transporters
TA	Transaldolase

TCE	Trichloroéthylène
tDT	Tonoplast dicarboxylate transporter
TGN	Réseau trans-golgien (Trans goli network)
TIP	Tonoplast instrinsec proteins
TK	Transalketolase
TK-C2	Intermediaire a deux carbones
TK-C3	Intermediaire a trois carbones
TMT	Tonoplast monosaccharide transporter
TPI	Triose phosphate isomérase
Triose-P	Trioses-Phosphate
UCP	Protéines découplante (uncoupling protein)
UDP	Uridine di phosphate
UDPG	Uridine-diphosphate-glucose
UGPase	UDP-Glucose pyrophosphorylase
UQ	Ubiquinone oxydée
UQ ^{•-}	Radical semiquinone
UQH ₂	Ubiquinone réduite
UTP	Uridine tri phosphate
V	Vacuole
v/v	Volume/volume
Vf	Volume final
VGT	Vacuolar Glucose Transporter
WT	Sauvage (wild type)
X-Gal	5Br,4Cl-indol-G
Xlu-5-P	Xylulose-5-Phosphate
ZI	Zone inferieure
ZS	Zone supperieure
ε	Coefficient d'extinction molaire

Chapter 1

INTRODUCTION

Chapitre 1 – Introduction

I- Le développement du fruit de tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est l'une des plantes les plus importantes dans le monde avec plus de 244 millions de tonnes de fruits produits en 2018, ce qui la place comme le premier fruit cultivé au monde. Elle est originaire de l'Ouest de l'Amérique du Sud et sa domestication aurait eu lieu en Amérique centrale. Du fait de son importance agronomique, de nombreux caractères phénotypiques ont été sélectionnés au fil du temps tels que le rendement, les qualités nutritionnelles et organoleptiques du fruit (notamment le rapport sucre/acide organique) ou encore sa résistance au stress biotique et abiotique. En plus de son importance agronomique, elle constitue un excellent modèle de recherche pour l'étude des fruits charnus. En effet, un large panel de ressources génétiques est disponible, incluant les variétés sauvages, domestiquées et cultivées, ainsi qu'une multitude de core collections pour appuyer les recherches génétiques. De plus, depuis 2012, le génome de référence de la variété Heinz est disponible (Tomato Genome Consortium, 2012) (Sato *et al.*, 2012) et de nombreuses autres variétés d'intérêt pour la recherche ont été séquencées. Enfin, la tomate est un modèle de choix pour l'étude en laboratoire grâce à un cycle de vie relativement court, une culture peu exigeante en plein air ou en serre, la possibilité de multiplication par bouturage, une reproduction naturelle par autofécondation (mais avec possibilité de croisement contrôlé) ainsi que la disponibilité de protocole de transformation bien établi.

En recherche, les cultivars les plus utilisés sont sans doute Microtom, Moneymaker et M82. Dans cette étude, nous avons fait le choix de travailler sur le cultivar M82 sous sa forme déterminée, c'est-à-dire que l'axe principal va se développer progressivement en plusieurs nœuds jusqu'à ce que la croissance de la tige s'arrête par deux inflorescences consécutives (Pnueli *et al.*, 1998).

1. De la fleur au fruit

La croissance de la tomate est qualifiée de sympodiale, c'est-à-dire qu'en plus des méristèmes apicaux, racinaires et axillaires, elle possède des méristèmes sympodiaux issus du redémarrage précoce des méristèmes axillaires situés en dessous de l'inflorescence. Le méristème sympodial va alors initier un nombre limité d'entrenœuds végétatifs avant de former une nouvelle inflorescence. Ce cycle va se répéter à partir d'un méristème sympodial

nouvellement formé, permettant la poursuite de la croissance de l'axe principal alors que la floraison a commencé. Cela se traduit par une architecture en modules répétitifs d'un nombre limité d'entrenœuds végétatifs se terminant par une inflorescence (Szymkowiak and Irish, 2006). En moyenne, une inflorescence de tomate est composée de six à dix méristèmes floraux qui donneront naissance aux fleurs.

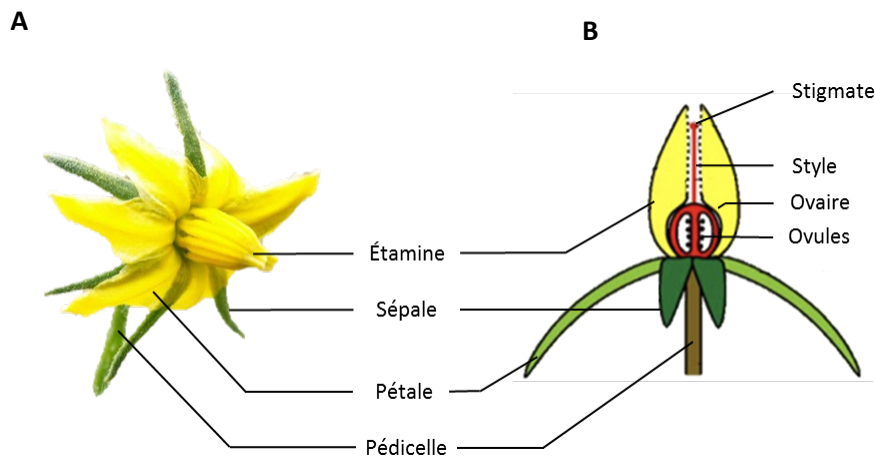


Figure 1 : Anatomie de la fleur de tomate. A. Fleur de tomate B. Représentation schématique d'une fleur de tomate (adaptée de l'université de Jussieu)

La structure de la fleur de tomate est relativement bien conservée au sein de l'espèce. Il s'agit généralement d'une fleur actinomorphe (symétrie radiale) et pentamérique. Les deux premiers verticilles représentent le périanthe (pièces non reproductives) composé de 5 sépales de couleur verte qui persistent après fécondation et 5 pétales de couleur jaune, fusionnés à la base, qui dégénéreront à l'issue de la fécondation. Le troisième verticille est formé par cinq étamines, dont les anthères forment un cône autour du pistil permettant au pollen d'être libéré à l'intérieur de la fleur. Enfin, le quatrième et dernier verticille est composé du gynécée formé par deux à trois carpelles fusionnés, renfermant l'ovaire abritant les ovules (Figure 1). Le développement de la fleur se fait en 20 étapes détaillées précisément par (Brukhin *et al.*, 2003). A maturité les anthères vont libérer les grains de pollen qui une fois déposés sur le stigmate vont germer à travers le style jusqu'à l'ovaire où les ovules seront fécondés. La fécondation d'un nombre suffisant d'ovules, entraîne le déclenchement de signaux hormonaux initiant la transformation du/des ovaire(s) en fruit.

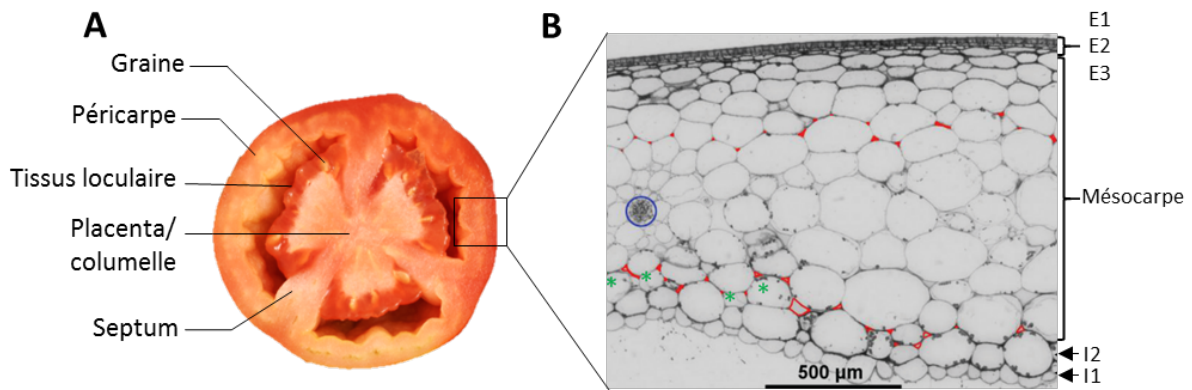


Figure 2 : Les différents tissus du fruit de tomate. A. Coupe équatoriale d'un fruit M82 B. Structure du péricarpe du fruit de tomate au stade breaker (*Renaudin et al., 2017*) E1, épiderme externe ; E2 et E3, deux couches cellulaires en dessous ; Mésocarpe formé de 4 couches cellulaires superposant les autres couches cellulaires qui se forment après l'anthèse par division de E2 et E3 ; L1 et L2 forment l'épiderme interne

2. Morphologie du fruit

Le fruit de tomate est composé de plusieurs tissus (Figure 2) :

- Le péricarpe externe : comprenant trois tissus, l'exocarpe ou épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe.
- Le péricarpe radial ou « septum » qui divise le fruit en plusieurs loges.
- Le péricarpe interne ou « columelle » qui constitue l'axe central du fruit et qui regroupe les tissus vasculaires connectant le fruit à la partie végétative de la plante.
- Le placenta, greffé sur les tissus vasculaires centraux sert de support aux futures graines qui se développeront dans les cavités loculaires.
- Le tissu loculaire ou gel qui se développe à partir du placenta après fécondation. Dans le fruit immature, ce tissu est ferme et compact mais à maturité les parois cellulaires se rompent et il devient gélatineux.
- Les graines qui se développent à partir des ovules présents dans l'ovaire

Le péricarpe a fait l'objet de nombreuses études s'intéressant à la croissance du fruit. Il est issu de la différenciation des parois de l'ovaire après fécondation. L'exocarpe est composé d'une couche de cellules supérieures ou épiderme (E1) et deux couches de cellules

inférieures collenchymateuses, aussi appelées hypoderme (E2 et E3). Il est recouvert par la cuticule, une couche lipophile composée de cutine et de cire et qui s'épaissira au cours du développement du fruit (Martin and Rose, 2014). Le mésocarpe (M) est constitué de cellules parenchymateuses dont la taille est supérieure dans la partie centrale et va diminuer vers l'épiderme et les locules ; le nombre d'assise cellulaires est quant à lui variable selon les cultivars. Il est composé de cellules polyploïdes avec de larges vacuoles et contient les tissus vasculaires du fruit. Les cellules du mésocarpe contiennent des plastides qui permettent au fruit vert de produire 10 à 15% de ses photoassimilats par la photosynthèse (Tanaka, Fujita and Kikuchi, 1974). Enfin, l'endocarpe est constitué de deux couches de cellules (une couche L1 correspondant à l'épiderme interne et une couche L2 sous épidermique) (Figure 2B) (Renaudin *et al.*, 2017).

3. Les phases de développement du fruit

Le développement du fruit de tomate est divisé en quatre phases :

- La mise à fruit : elle comprend le développement précoce de l'ovaire et la fécondation. La transformation de l'ovaire en fruit est dépendante de l'efficacité de la fécondation. En effet, il a été montré que c'est la présence d'un nombre suffisant d'ovules fécondés qui engendre la mise à fruit et que ce processus est dépendant de signaux hormonaux impliquant les auxines et les gibbérellines produites par le pollen lors de la fécondation (Nitsch, 1970). Il en résulte donc qu'une pollinisation inefficace donnera une mise à fruit incomplète se traduisant par un fruit plus petit ou un avortement des ovaires (Gillaspy, Ben-David and Gruissem, 1985).
- La phase de division cellulaire : durant cette phase, les cellules du péricarpe externe vont subir des divisions périclinales et anticlinales permettant l'augmentation du nombre d'assises cellulaires. Au niveau du placenta, les divisions cellulaires vont permettre la mise en place du tissu loculaire.
- La phase d'expansion cellulaire : en plus de l'expansion cellulaire, cette phase est marquée par une augmentation importante de la ploïdie des cellules du mésocarpe grâce au processus d'endoréduplication (détailé plus bas). Cette augmentation de la ploïdie est accompagnée d'une augmentation de la taille des cellules grâce à l'expansion de la vacuole et permet au fruit d'atteindre une taille proche de sa taille finale.
- La maturation : Cette phase permet au fruit de passer du stade vert mature au stade rouge

mur en passant par les stades Breaker, Turning et Orange. La maturation s'accompagne d'importants changements métaboliques se traduisant par l'accumulation de sucres, d'acides organiques et de pigments, ainsi que par la dégradation de la paroi cellulaire entraînant une perte de fermeté des tissus.

a. La phase de division cellulaire

La phase de division cellulaire permet d'augmenter le nombre de cellules au sein du péricarpe. Le cycle cellulaire est défini comme une succession d'évènements moléculaires conduisant à la transmission du matériel génétique d'une cellule mère vers 2 cellules filles identiques. Chez les plantes le cycle cellulaire est composé de 4 phases distinctes :

- La phase G1 : caractérisée par un contenu en ADN de 2C au sein du noyau, la cellule met en place les mécanismes qui permettent la réplication de l'ADN.
- La phase S : L'ADN est synthétisé.
- La phase G2 : caractérisée par un contenu en ADN de 4C, la cellule met en place les mécanismes permettant sa division en deux cellules filles.
- La phase M : Elle correspond à la phase de mitose pendant laquelle on observe la séparation des deux lots de chromosomes, formation de deux noyaux distincts et enfin division cellulaire par cytokinèse.

Dans le péricarpe, la phase de division cellulaire commence à la suite de la fécondation et se poursuit pendant 7 à 10 jours selon les variétés. Elle est très active dans les trois couches externes (E1, E2 et E3) pendant les 4 premiers jours après anthèse (DPA – day post anthesis). Durant cette phase, on distingue deux types de divisions : les divisions anticlinales (le plan de division est perpendiculaire à la surface du fruit) qui aboutissent à l'augmentation du nombre de cellules d'une assise et les divisions périclinales (le plan de division est parallèle à la surface du fruit) qui entraînent l'augmentation du nombre de couches cellulaires. Durant cette phase on observe majoritairement des divisions anticlinales et de façon encore plus marquée dans la couche épidermique E1 où elles représentent 80% des évènements de division, ce qui va conduire à l'augmentation de la surface du fruit. Les divisions périclinales sont quant à elles majoritaires dans les couches E2 et E3 (40% des évènements de division) afin de donner naissance aux nouvelles couches cellulaires du mésocarpe, conduisant à l'augmentation de l'épaisseur du péricarpe. Les cellules du mésocarpe (M) et de l'épiderme interne (L1 et L2) vont très peu se diviser, avec un index mitotique quasi nul (Renaudin *et al.*, 2017). Ce dernier

point suppose donc que le gain d'épaisseur du péricarpe va principalement être dû à l'expansion cellulaire.

b. La phase d'expansion cellulaire.

Si les divisions cellulaires au sein du péricarpe confèrent au fruit un « potentiel de grandissement » c'est bel et bien l'expansion cellulaire qui détermine sa taille finale. On distingue deux processus de grandissement cellulaire : l'expansion par un processus de vacuolisation et l'expansion par l'augmentation du volume du cytoplasme. L'expansion par vacuolisation chez les plantes est conférée par le fait qu'elles possèdent une large vacuole qui leur permet, de par son expansion, de multiplier le volume des cellules d'un facteur pouvant excéder 100 fois la taille de la cellule initiale. Ce processus se déroule à l'issue de la phase de division lorsque les cellules sortent du cycle cellulaire et commencent à se différencier. L'expansion cellulaire par expansion du cytoplasme se fait via le processus d'endoréduplication et peut conduire à une augmentation du volume cellulaire d'un facteur 10 (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003; Bourdon *et al.*, 2010).

➤ L'expansion cellulaire par vacuolisation

Chez les plantes, l'expansion cellulaire par vacuolisation représente le processus majeur qui permet à une cellule de grandir. En effet, dans les cellules matures, la vacuole occupe entre 80 et 90% du volume cellulaire total, restreignant le volume du cytoplasme à une fine couche à la périphérie de la cellule. Dans la mesure où la majorité du volume cellulaire est occupée par la vacuole, il paraît évident que le grandissement cellulaire va se faire par grandissement osmotique de la vacuole. L'expansion cellulaire commence en réalité dès le deuxième jour après anthèse dans les cellules du mésocarpe où l'on observe un grandissement et une fusion de petites vacuoles pour former une large vacuole centrale (Mohr and Stein, 1969). Au cours du grandissement, le volume cellulaire occupé par la vacuole et celui occupé par le cytosol suivent un profil en miroir, c'est-à-dire qu'entre 2 et 15 DPA, la vacuole grandit au détriment du cytosol (la fraction du volume cellulaire occupé par la vacuole passe de 20 à 75% alors que celle occupée par le cytosol passe de 65% à 10%). Au contraire, pendant la phase d'expansion, les deux compartiments grandissent dans la même proportion (Beauvoit *et al.*, 2014). L'expansion de la vacuole se fait grâce à des mouvements d'eau au travers du tonoplaste, conditionnés par les mouvements de métabolites, principalement sucres, acides organiques et ions. L'expansion cellulaire par vacuolisation résulte en fait de la balance entre la pression de turgescence exercée sur la paroi par l'expansion de la vacuole et le remodelage des parois cellulaires pour permettre

à la cellule de s'allonger.

L'équation gouvernant la croissance par vacuolisation fait appel à la différence de potentiel hydrique ($\Delta\psi$) entre la paroi et l'intérieur de la cellule et peut s'écrire comme suit : $\Delta\psi = P - \Delta\pi$ où P représente le potentiel hydrostatique (ou potentiel de turgescence) lié à la résistance qu'exerce la paroi et π représentant le potentiel osmotique qui dépend de la concentration des solutés présent dans le compartiment ($\pi = iCRT$, avec i , le coefficient osmotique du soluté, C , la concentration du soluté, R , la constante des gaz parfaits et T , la température). On peut ainsi décomposer l'expansion en plusieurs étapes :

- L'augmentation de concentration des osmolytes dans la vacuole entraîne une diminution du potentiel osmotique qui s'accompagne d'une entrée d'eau par le phénomène d'osmose. La cellule devient alors turgescence, exerçant une pression sur la paroi qui fait augmenter P .
- Un remodelage de la paroi permet de faire diminuer la pression de turgescence ; il se traduit par un allongement de la cellule.
- $\Delta\psi$ revient à son état initial ce qui permet de restaurer la force motrice pour de nouveau autoriser l'import d'eau et la poursuite du grandissement.

Théoriquement, la croissance devrait ralentir lorsque $P = \Delta\pi$ du fait de la dilution des solutés intracellulaires suite à l'import d'eau. En réalité, les cellules en croissance maintiennent un $\Delta\pi$ constant grâce aux processus d'osmorégulation et l'importation de solutés permettant de maintenir les cellules en « état stationnaire de croissance » pendant plusieurs heures voire plusieurs jours (Schopfer, 2006). La régulation des transports de métabolites non diffusibles, surtout de sucres et d'acides organiques apparaît donc comme un point majeur dans le contrôle de l'expansion cellulaire. Ce point sera discuté en détail dans la partie IV.

➤ L'expansion par l'augmentation du volume du cytoplasme

L'expansion par l'augmentation du volume du cytoplasme se fait grâce à un cycle cellulaire modifié appelé endocycle. Cette capacité qu'ont les cellules végétales à rentrer dans ce type de cycle entraîne une augmentation de la ploïdie dans le noyau mais sans augmenter le nombre de chromosomes grâce à une alternance de phase de synthèse d'ADN (phase S) et de phase G mais sans division cellulaire (Joubes and Chevalier, 2000; Chevalier *et al.*, 2014). Le péricarpe, le tissu loculaire et la columelle vont tous trois être capables de réaliser des endocycles mais c'est au niveau du péricarpe et du tissu loculaire que l'on aura le taux de ploïdie le plus important avec des noyaux pouvant aller jusqu'à 256C dans le péricarpe (Cheniclet *et al.*, 2005). Selon la

théorie du « ratio karioplasmique » élaborée par Sugimoto-shirasu et Robert en 2003 (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003), le volume du cytoplasme dépendrait de la quantité d'ADN dans le noyau. En effet, au cours des cycles successifs de synthèse d'ADN, le noyau devient hypertrophié, influençant alors la taille de la cellule qui ajuste la taille de son cytoplasme afin de conserver un ratio noyau/cytoplasme constant quel que soit le taux de ploïdie de son noyau (Bourdon *et al.*, 2012). De plus, le travail de Bourdon et ses collaborateurs en 2012 a établi que l'endopolyploïdie jouait un rôle dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle, probablement pour fournir l'énergie suffisante pour les processus biochimiques impliqués dans une croissance cellulaire soutenue. En plus de la relation taille du noyau/ taille du cytoplasme, il a été montré une corrélation positive entre le niveau de ploïdie, la taille cellulaire et le diamètre des cellules du péricarpe (Cheniclet *et al.*, 2005). De même, la sous expression de *CCS52A* et *WEE1*, deux gènes impliqués dans la régulation de l'endocycle, conduit à la réduction de la taille du fruit corrélée à une diminution de la taille des cellules et du niveau de ploïdie (Gonzalez *et al.*, 2007; Mathieu-Rivet *et al.*, 2010). Même si le lien fonctionnel entre endoreduplication et taille cellulaire n'est pas clairement établi, l'ensemble de ces observations semble en faveur d'un rôle de l'endoreduplication dans le grandissement cellulaire et par extension dans la taille du fruit.

II- Origine et devenir des sucres chez le fruit au cours du développement.

1. Origine des sucres

Au cours de son développement, le fruit de tomate passe d'un organe partiellement photosynthétique à un organe complètement hétérotrophe. Néanmoins, la photosynthèse du fruit ne produit qu'une quantité mineure de carbone puisqu'elle ne représente que 14% du carbone total (Tanaka, Fujita and Kikuchi, 1974). Son développement dépend donc de l'importation des assimilats, sucres et acides aminés produits par les organes sources. Chez la tomate, le saccharose est la source majeure de carbone importé dans le fruit. Chez les plantes, la croissance est fortement corrélée avec la notion de relation source puit et la balance qu'il existe entre les deux. Un organe source peut être défini comme un organe assurant un flux net d'export de carbone. Ainsi, la force source d'un organe correspond à la vitesse à laquelle cet organe va produire des assimilats, ou plus simplement, à son taux de photosynthèse. Au contraire, un organe puit est un organe avec un flux net d'import de carbone (Marcelis, 1996).

Les relations entre sources et puits dépendent donc de la production de photoassimilats par les tissus sources, de leur transport et enfin de leur utilisation dans les organes puits.

a. Production et remobilisation des photoassimilats

Le cycle de Calvin-Benson

L'activité photosynthétique des tissus sources pour la production de photoassimilats dépend du cycle de Calvin-Benson que l'on peut diviser en trois grandes étapes :

- La fixation du carbone : Le CO_2 atmosphérique est condensé avec le ribulose 1,5 biphosphate grâce à la RUBISCO générant ainsi deux molécules de 3 phosphoglycérate (3-PGA)
- La réduction : Le 3-PGA est converti en triose-P, à partir duquel est synthétisé l'amidon.
- La régénération : Le ribulose biphosphate est régénéré pour permettre une nouvelle fixation de CO_2

Les étapes de réduction et de régénération utilisent l'ATP et le NADPH produits lors de la phase autotrophe (lumière dépendante) de la photosynthèse. De plus, le triose-P formé peut être exporté dans le cytosol pour assurer la production de saccharose et assurer le métabolisme carboné de la feuille ou être métabolisé dans le chloroplaste pour produire les hexoses-P pour la synthèse de l'amidon.

L'amidon

- Synthèse et dégradation

L'amidon est une structure semi cristalline et insoluble sous forme de granules synthétisés dans les plastides. Il est composé de deux polymères : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est une chaîne d'unité glucose liée par des liaisons $\alpha 1-4$; elle est faiblement ramifiée par d'autres chaînes de glucose grâce à des liaisons $\alpha 1-6$. Ce polymère rentre dans la composition des grains d'amidon à hauteur de 10% dans les feuilles et entre 20 et 30% dans les organes de stockage. Il se présente sous forme d'hélices dans les zones amorphes de la matrice de l'amidon mais ne rentre pas directement dans leur structure. Au contraire, l'amylopectine est le polymère majeur des grains d'amidon, il est plus long, plus ramifié et est responsable de la structure des grains (Zeeman, Kossmann and Smith, 2010). De par sa structure, l'amidon est un excellent polymère permettant de stocker de grandes quantités de glucose sans affecter le potentiel hydrique des cellules.

La synthèse de l'amylose et de l'amylopectine se fait par rajout de glucose sur une chaîne polysaccharidique existante. Le glucose-6-phosphate (G6P) produit dans le plaste est converti en glucose-1-phosphate (G1P) puis en ADP-glucose (ADPG). La production de l'amidon est un processus complexe faisant intervenir (Zeeman, Kossmann and Smith, 2010):

- Les [1-4]- α -D-glucan-4- α -D-glycosyltransférase glycosyl transférases ou « starch synthases » : elles assurent l'élongation des chaînes glycosidiques par des liaisons α 1,4. Plusieurs starch synthases ont été identifiées, localisées dans le stroma et associée à la synthèse de l'amylopectine et la GBSS (Granule-bound starch synthase) associée au grain d'amidon et plutôt impliquée dans la synthèse de l'amylose.
- les enzymes « branchantes » qui assurent le branchement ou ramification des chaînes par des liaisons α 1,6.
- les enzymes « débranchantes », α -amylase et pullulanase (ou limit dextrinase) qui permettent d'éliminer les points de branchement aberrants.

La dégradation de l'amidon, quant à elle, se fait par rupture des polymères de glucose grâce à deux types d'enzymes hydrolytiques : les exoamylase β -amylase (BAM) qui clivent les liaisons α -1,4 et les enzymes de déramification isoamylase (ISA) qui clivent les liaisons α -1,6. De plus, dans la mesure où l'amidon est compacté en structures semi-cristallines, il est essentiel de diminuer le degré de cristallinité pour faciliter la dégradation et permettre un renouvellement rapide. La phosphorylation de la surface du granule, probablement par interférence avec la compaction des doubles hélices, facilite l'ouverture de la surface du granule, rendant ainsi l'amidon plus accessible pour les enzymes hydrolytiques. Ce rôle est assuré par deux types d'enzymes, les GWD (Glucan Water Dikinase) chargées d'ajouter un groupement phosphate provenant de l'ATP en position 6 des résidus glucose et les PWD (phosphoglucan water dikinase) qui catalysent l'ajout du groupement phosphate en position 3 et qui nécessite au préalable l'action des GWD (Ritte *et al.*, 2006). Cependant, pour une dégradation complète de l'amidon, une déphosphorylation est également nécessaire pour permettre l'accès à la β -amylase (Fulton *et al.*, 2008; Zeeman, Kossmann and Smith, 2010). Les produits de dégradation de l'amidon incluent le maltose en grande majorité, du glucose et du G1P. Le maltose, est par la suite exporté dans le cytosol, métabolisé par une glycosyl transférase qui libérera un glucose et transférera le deuxième sur un polysaccharide accepteur qui sera ensuite métabolisé pour redonner du G1P. Ce dernier sera finalement utilisé pour la synthèse du saccharose, dans la glycolyse ou dans la voie des pentoses phosphates après conversion en G6P par la phosphoglucomutase (PGM) (Fettke *et al.*, 2004).

- Dynamique journalière de l'amidon dans les feuilles et dans le fruit

Dans les feuilles, l'amidon s'accumule pendant la journée pour être remobilisé la nuit. On parle d'amidon transitoire. Une étude de la composition de la feuille de tomate au cours de la journée a montré que l'accumulation de l'amidon était faible par rapport à l'activité de la photosynthèse (Bénard *et al.*, 2015), laissant penser que les sucres seraient transitoirement stockés dans un autre organe, la tige par exemple. Cette même étude a mis en évidence une faible variation journalière du contenu en amidon dans les fruits avec un pic d'accumulation tôt le matin et une diminution au cours de la journée. Cette variation serait probablement associée à un stockage transitoire du carbone suite à l'import de saccharose depuis les organes sources (Bénard *et al.*, 2015).

b. Le transport des photoassimilats : chargement et déchargement du phloème

Les photoassimilats qui ne sont pas nécessaires au développement de la feuille sont convertis en sucres ou en acides aminés et chargés au niveau du phloème pour être transportés vers les organes puits. Le saccharose est le sucre le plus couramment utilisé par les plantes pour le transport phloémien. C'est le cas chez *Arabidopsis*, le maïs, la tomate ou encore le tabac. Cependant, certaines plantes utilisent d'autres sucres en plus du saccharose pour augmenter la capacité de transport du phloème, comme des sucres alcools tels que le sorbitol ou le mannitol chez les Rosacées ou le raffinose et ses dérivés chez les Cucurbitacées (Zhang *et al.*, 2004; Rennie and Turgeon, 2009; Hu *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs mécanismes de chargement/déchargement du phloème qui sont regroupés en deux catégories, ceux utilisant les voies symplasmiques et faisant intervenir le continuum symplasmique entre les cellules au travers des plasmodesmes et ceux qui utilisent les voies apoplasmiques faisant intervenir les transporteurs présents sur la membrane plasmique.

Le chargement du phloème

Le chargement du phloème implique le transport des photoassimilats depuis le site de synthèse ou stockage vers le lumen des cellules des complexes cellules compagnes/éléments criblés (CC/TC). Du fait de la forte densité de plasmodesmes qui existe entre les cellules du mésophylle de la feuille et les cellules du parenchyme phloémien, il est admis que le saccharose y est importé par voie symplasmique (Beebe and Russin, 1999). Par la suite, la forte concentration en saccharose présente au niveau des cellules du complexe CC/TC ainsi que la dilution des plasmodesmes due à la croissance oblige le saccharose à emprunter la voie apoplasmique pour passer des cellules du parenchyme phloémien au CC/TC (Ruan and Patrick, 1995). Chez la

tomate, deux transporteurs de saccharose/H⁺ ont été identifiés et co-localisent au niveau de la membrane plasmique des tubes criblés, LeSUT1 et LeSUT2. LeSUT1 est principalement exprimé au niveau des feuilles sources alors que LeSUT2 est exprimé de façon prédominante au niveau des organes puits (Barker *et al.*, 2000). Des lignées antisens LeSUT1 présentent une sénescence précoce des feuilles ainsi qu'une chlorose ce qui corrèle avec une réduction de l'activité photosynthétique de la feuille. Une analyse du contenu en métabolite a d'ailleurs montré que ces plantes accumulaient des sucres solubles au niveau des feuilles et étaient incapables de remobiliser l'amidon. De plus, une analyse de l'efflux de carbone au niveau du pétiole a montré un blocage du chargement du phloème rendant la production de fruit anormale (Hackel *et al.*, 2006).

Déchargement du phloème dans les tissus puits et force de puit

Le déchargement du phloème peut lui aussi se faire par la voie symplasmique ou la voie apoplasmique. Si c'est la voie apoplasmique qui est employée, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase acide pariétale (CWI) puis importé dans le cytosol des cellules. Les hexoses résultant de ces hydrolyses sont ensuite phosphorylés par l'hexokinase et/ou la fructokinase (FK) en G6P et F6P qui tendent à s'équilibrer via la réaction catalysée par la phosphoglucose isomérase (PGI), et sont les précurseurs d'un certain nombre de processus métaboliques dont la glycolyse. Si c'est la voie symplasmique qui est utilisée, le saccharose est soit hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase neutre cytosolique (NI), soit en fructose et UDP-glucose (UDPG) par la saccharose synthase (SUSY), soit importé dans la vacuole où il peut être hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase acide (AI). L'UDPG produit par la SUSY est converti en glucose-1-phosphate (G1P) par l'UDP glucose phosphorylase, qui tendra à s'équilibrer avec le G6P (PGM).

2. Notions de force de puit et ses conséquences sur la croissance

La force de puit d'un organe correspond à sa capacité à attirer des assimilats. Plusieurs paramètres permettent d'estimer la force de puit d'un organe :

- *Ho* (Ho, 1988) définit la force « nette de puit » comme la matière sèche accumulée par l'organe
- *Wareing et Patrick* (1975) définissent la force de puit d'un organe comme sa capacité potentielle à accumuler du carbone qui peut être quantifiée par le taux de croissance potentiel, c'est-à-dire le taux de croissance dans des conditions non limitantes en carbone (par exemple culture sous fort éclaircissement ou réduction du nombre d'organes

puits).

- *Warren Wilson* (1972) propose quant à lui que la force de puit corresponde au produit de la taille du puit et de son activité, autrement dit, le produit du poids du puit (ou le nombre de cellule et la taille des cellules) et son taux relatif de croissance ou RGR qui va être influencé par de nombreux processus tels que le métabolisme du carbone, le transport et le stockage du carbone dans les organes puits.

Bien que la force de puit soit affectée par la disponibilité en assimilats, le point critique réside dans la capacité intrinsèque du puit à recevoir ou attirer les assimilats. Ho, 1988 qualifie cette notion de « force de puit potentielle ». Le déchargement du phloème est assuré par le transporteur LeSUT2. En Effet, lorsqu'il est sous-exprimé, on observe un phénotype uniquement au niveau des tissus puits, à savoir un développement anormal des graines, une diminution du taux de germination du pollen et une réduction de l'élongation du tube pollinique (Hackel *et al.*, 2006). Chez la tomate, les mécanismes de chargement du phloème sont relativement bien connus mais ceux impliqués dans le déchargement ont été identifiés plus récemment. Durant les phases précoces de développement du fruit, le déchargement du saccharose dans le péricarpe se fait via la voie symplasmique (Ruan and Patrick, 1995). En effet, le transport symplasmique assure un flux élevé de photoassimilats qui permet de satisfaire les besoins en carbone des jeunes fruits qui sont les plus élevés dans les stades précoces par rapport à la masse fraîche (Colombié *et al.*, 2015). De plus, durant les jeunes stades (0-15 DPA), le fruit accumule principalement le carbone sous forme d'amidon ce qui permet de maintenir un gradient de concentration en saccharose compatible avec le transport symplasmique. Durant les stades plus tardifs (à partir de 25 DPA environ), les fruits passent d'un stockage d'amidon vers un stockage d'hexoses. Ce changement métabolique s'accompagne d'une rupture du continuum symplasmique dû à la dilution des plasmodesmes par la croissance de la cellule. Ainsi, au cours du passage dans la phase d'accumulation d'hexoses, il a été montré que c'est la voie apoplasmique qui est privilégiée pour l'import du saccharose dans le fruit (Ruan and Patrick, 1995). La rupture de ce continuum symplasmique permet d'accumuler les hexoses à de fortes concentrations en s'affranchissant d'un potentiel osmotique favorable entre le fruit et le phloème du fait de la dépendance énergétique des transports. Dans ce contexte, l'invertase pariétale catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose dans l'apoplasme ; ces derniers seront ensuite importés dans le cytosol pour y être métabolisés et/ou stockés. Ce mécanisme d'hydrolyse directement au point d'arrivée du saccharose permet de maintenir un gradient de concentration favorable au transport entre les éléments source et puits (Ruan and

Patrick, 1995).

Les relations source-puit sont donc conditionnées par le processus de chargement/déchargement du phloème vers les organes puits, lui-même dépendant du gradient osmotique et/ou des concentrations en métabolites carbonés, et donc du métabolisme des cellules des organes puits (Münch, 1930). A titre d'exemple, la surexpression de la sucrose-phosphate synthétase (SPS) chez la tomate entraîne une modification considérable de l'allocation du carbone dans la plante, ce qui se traduit par une augmentation du flux de déchargement du saccharose depuis le phloème aboutissant à des fruits plus gros et une augmentation de leur nombre (Micallef *et al.*, 1995). De façon similaire, lorsque l'activité de la SUSY est diminuée, les lignées transgéniques voient leur force de puits diminuée, autrement dit le déchargement du phloème se fait de façon réduite, ce qui se traduit par un nombre de fruits réduit et une croissance du fruit ralentie (D'Aoust, Yelle and Nguyen-Quoc, 1999).

III- Le devenir du carbone dans le fruit : Le métabolisme primaire au cours du développement

Le métabolisme regroupe l'ensemble des réactions biochimiques se produisant dans les cellules d'un organisme. On distingue généralement les réactions de l'anabolisme qui correspondent aux réactions de biosynthèses (production des composés structuraux, de réserve) et qui sont consommatrices d'énergie, et les réactions du catabolisme, impliquées dans la dégradation des molécules et la production de l'énergie nécessaire pour les biosynthèses. Certaines réactions sont au carrefour de l'anabolisme et du catabolisme puisqu'elles permettent à la fois la synthèse et la dégradation de molécules. C'est le cas par exemple du cycle de Krebs qui assure les étapes finales de la décarboxylation oxydative des sucres mais aussi la production d'acides organiques. La définition du métabolisme primaire est souvent source de discussion. Commun à la plupart des espèces et organes, il regroupe l'ensemble des voies métaboliques assurant la croissance et le développement normal d'un organisme (synthèse des protéines, lipides, acides nucléique, glucides, acides organiques, composés phosphorylés, respiration...). Il assure aussi la production des substrats du métabolisme secondaire. Celui-ci est un métabolisme plus spécialisé, pouvant être espèce, organe, voir cellule dépendant. Il regroupe par exemple les familles des flavonoïdes, alcaloïdes ou des terpènes. Très longtemps considéré comme non essentiel, on sait maintenant qu'il joue un rôle majeur dans l'adaptation de la plante

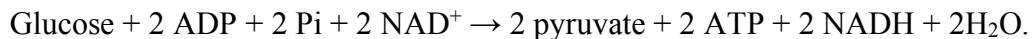
à son environnement. La frontière entre ces deux « métabolismes » est difficile à définir et l'on sait maintenant que certains composés du métabolisme secondaire sont même essentiels pour la production de composés du métabolisme primaire (Erb and Kliebenstein, 2020).

1. Les voies du métabolisme primaire

Si les réactions du métabolisme primaire sont hautement conservées entre les espèces, leur régulation varie énormément entre espèces, tissus mais aussi au cours du développement comme en témoignent par exemple les différences de sucrosité ou d'acidité entre les différentes espèces de fruits. Les réactions qui le constituent sont pour l'essentiel connues. Par contre sa régulation et la manière dont les flux sont orientés et modulés au cours du développement restent relativement mal comprises.

a. La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique ubiquitaire responsable de l'oxydation des sucres en pyruvate. Son fonctionnement assure la production d'énergie sous forme d'ATP et de pouvoir réducteur (production de NADH) mais aussi de briques métaboliques nécessaires à d'autres voies de biosynthèses. Pour chaque molécule de glucose consommée, le bilan net de la glycolyse permet de produire 2 molécules de pyruvate, 2 molécules d'ATP et 2 molécules de NADH :



Chez les plantes, la conversion des hexoses en pyruvate peut se faire indépendamment dans deux compartiments subcellulaires, le cytosol et le plaste avec une possible interaction entre les deux glycolyses par l'intermédiaire de transporteurs présents au niveau de l'enveloppe interne du plaste. La fonction principale de la glycolyse du plaste est de permettre le catabolisme de l'amidon pour générer le carbone, le pouvoir réducteur et l'ATP nécessaire aux voies anaboliques comme la synthèse des lipides. Si la quasi-totalité des enzymes est dupliquée entre les deux compartiments, il a été montré que les propriétés cinétiques et la régulation de ces enzymes différaient entre les deux compartiments (Plaxton, 1996).

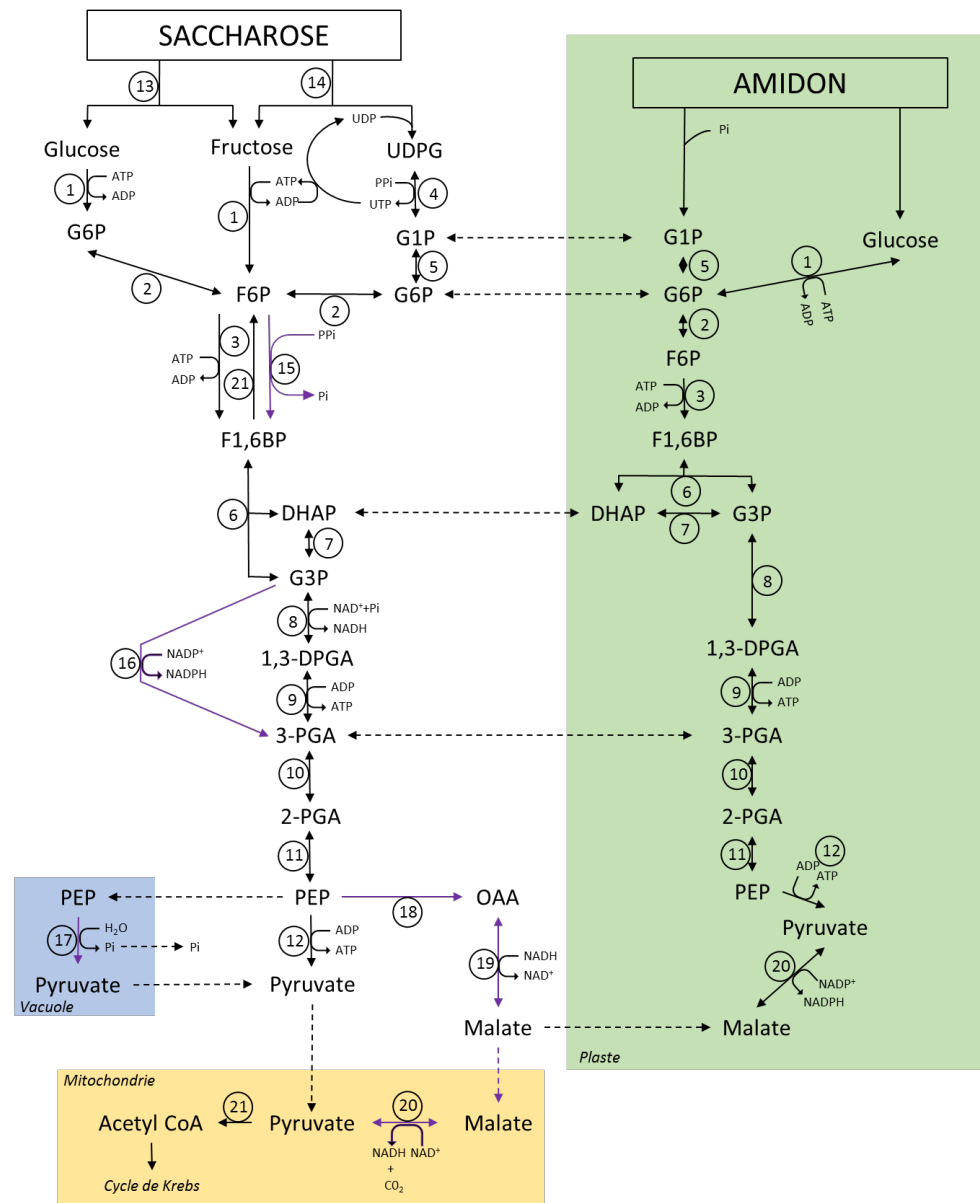


Figure 3 : Schéma de la glycolyse chez les plantes. PPI : pyrophosphate ; Pi : Orthophosphate ; G6P : Glucose-6-Phosphate ; F6P : Fructose-6-Phosphate ; G1P : Glucose-1-Phosphate ; F1,6BP : Fructose-1,6-Bisphosphate ; DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate ; G3P : Glycéraldéhyde 3-Phosphate ; 1,3-DPGA : 1,3-Dihosphoglycérate ; 3-PGA : 3-Phosphoglycérate ; 2-PGA : 2-Phosphoglycérate ; PEP : phosphoénol pyruvate ; OAA : Oxaloacétate ; NADH/NAD⁺ : nicotinamide adénine di-nucléotide réduit /oxydé ; NADPH/NADP⁺ : nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate réduit/oxydé ; UTP/UDP : Uridine tri/di-phosphate ; 1 : Hexokinase ; 2 : Phosphoglucose isomérase ; 3 : Phosphofructokinase ATP dépendante ; 4 : UDP-Glucose phosphorylase ; 5 : Phosphoglucomutase ; 6 : Aldolase ; 7 : Triose Phosphate Isomérase ; 8 : Glycéraldéhyde 3-Phosphate déshydrogénase NAD dépendante ; 9 : 3-Phosphoglycérate Kinase ; 10 : Phosphoglycérate mutase ; 11 : éolase ; 12 : Pyruvate Kinase ; 13 : invertase ; 14 : Sucrose Synthase ; 15 : Phosphofructokinase pyrophosphate dépendante ; 16 : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase NADP-dépendante ; 17 : Phosphoénolpyruvate Phosphatase ; 18 : Phosphoénolpyruvate carboxylase ; 19 : Malate déshydrogénase ; 20 : Enzyme malique ; 21 : Pyruvate déshydrogénase ; 22 : Fructose-1,6-bisphosphatase. Les flèches en pointillés représentent les réactions de transports.

On peut diviser la glycolyse en deux parties (Figure 3) : la première partie consomme deux molécules d'ATP pour produire 2 molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) à partir d'une molécule de glucose. Elle fait intervenir la glucokinase (GK), la phosphoglucose isomérase (PGI), la phosphofructokinase (PFK) ATP dépendante et pour finir, la triose phosphate isomérase (TPI). La seconde partie de la glycolyse produit 4 molécules d'ATP au cours de la transformation des G3P en pyruvate. Elle implique dans le cytosol, la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase NAD dépendante (NAD-GAPDH), la 3-phosphoglycérokinase (PGK), la phosphoglucomutase (PGM) et l'énolase. Pour finir, le PEP est transformé en pyruvate par la pyruvate kinase (PK). Dans le plaste, la glycolyse commencerait à partir d'hexoses-P importés par des échangeurs hexoses-P/Pi ou recyclés via la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates. Si les réactions sont globalement identiques, il existe cependant quelques différences avec par exemple la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui peut réduire le NADP en NADPH, générant ainsi du pouvoir réducteur pour les biosynthèses (ex : synthèse des acides gras).

En plus de ces enzymes très conservées, on trouve des réactions annexes qui permettent une plasticité du métabolisme des cellules végétales. C'est tout d'abord le cas de la réaction de conversion du fructose-6-phosphate (F6P) en fructose 1,6 bisphosphate (F1,6BP) qui peut aussi être catalysée dans le cytosol par la diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransférase (PFP). Cette enzyme catalyse la phosphorylation du F6P en utilisant du PPi comme donneur de phosphate et fonctionne près de l'équilibre, pouvant donc aussi déphosphoryler le F1,6BP en F6P. Le PPi pourrait provenir en majeure partie de l'activité UDPG-pyrophosphorylase associée à la synthèse du saccharose, ainsi que de toutes les ligases qui utilisent l'ATP comme source d'énergie dans les voies de synthèses et libèrent de l'AMP et du PPi. Cette enzyme jouerait un rôle majeur lorsque l'ATP devient limitant, en cas d'anoxie par exemple (Carnal and Black, 1979; Mustroph *et al.*, 2013). Le deuxième exemple est la conversion directe et irréversible du G3P en 3-PGA par une GAPDH-NADP dépendante, sans production d'ATP (Scagliarini *et al.*, 1990) mais production de NADPH. Surtout présente dans les tissus verts chez lesquels elle pourrait jouer un rôle navette pour transférer le NADPH du chloroplaste vers le cytosol, elle a été mise en évidence dans certains tissus non photosynthétiques nécessitant des besoins accrus en NADPH (Jacob and Auzac, 1972; Rumpho, Edwards and Loescher, 1983). Elle a été caractérisée dans les feuilles de céleri et associée à la production du sorbitol (Gao and Loescher, 2000).

b. Le cycle de Krebs et réactions associées

Le cycle de Krebs appelé aussi cycle des acides tricarboxyliques est une voie universelle commune à tous les organismes aérobies. Nous avons vu précédemment que la glycolyse aboutissait à la synthèse de pyruvate. Le pyruvate est ensuite importé dans la mitochondrie où il subit une décarboxylation oxydative suivie d'une acétylation par le complexe pyruvate déshydrogénase pour donner de l'acétyl coenzyme A (AcetylCoA). Le groupement acétyle de l'acetylCoA va être transféré sur l'oxaloacétate (OAA) par la citrate synthase (CS) pour donner du citrate. Le citrate est ensuite converti en isocitrate par l'aconitase. L'isocitrate est oxydé et décarboxylé par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) en 2-oxoglutarate ce qui produit une molécule de CO_2 et une molécule de NADH. Le 2-oxoglutarate est à son tour oxydé par la 2-oxoglutarate déshydrogénase pour former le succinate en produisant une nouvelle fois un CO_2 et un NADH. Le succinate est pris en charge par la succinate déshydrogénase pour donner du fumarate produisant une molécule de FADH_2 puis la fumarase va produire du malate à partir du fumarate. Enfin, le malate est convertit en OAA par la malate déshydrogénase produisant ainsi une molécule de NADH (Figure 4).

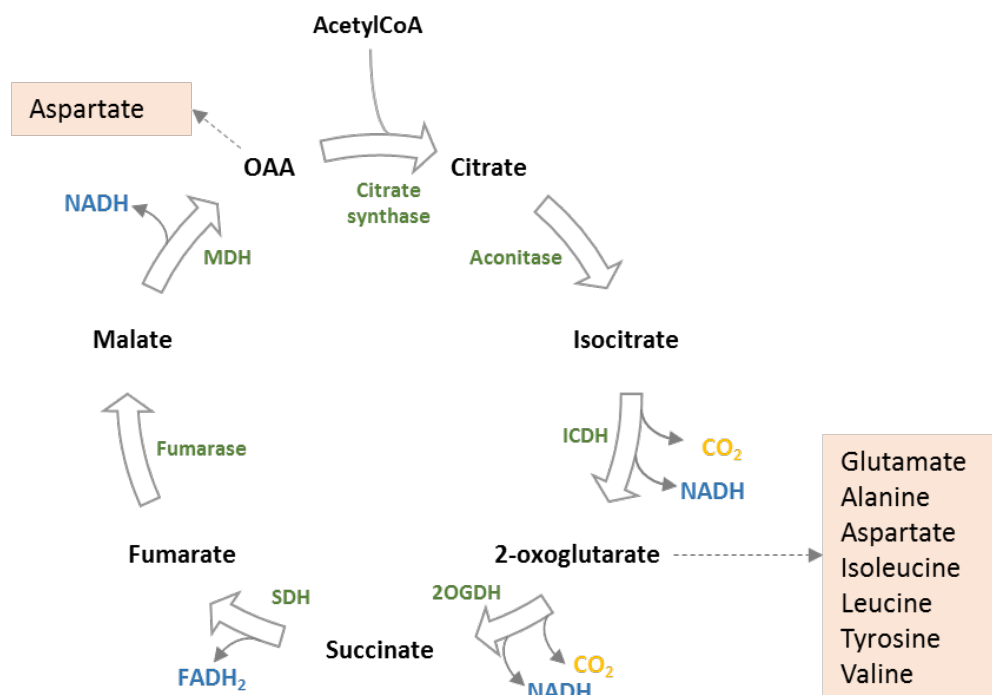


Figure 4 : Schéma du cycle de Krebs chez les plantes. Les enzymes impliquées dans les réactions sont indiquées en vert. ICDH : Isocitrate déshydrogénase NAD(P) dépendante ; 2OGDH : 2-oxoglutarate déshydrogénase ; SDH : Succinate déshydrogénase ; MDH : Malate déshydrogénase. La production de pouvoir réducteur sous la forme de NADH (nicotinamide adénine di-nucléotide réduit) ou FADH_2 (Flavine adénine di-nucléotide réduit) est indiquée en bleu. La production de CO_2 par décarboxylation est indiquée en jaune. Les encadrés orange représentent la connexion du cycle de Krebs avec le métabolisme des acides aminés

Le flux au travers du cycle de Krebs est au cœur du processus de respiration mitochondriale qui consiste en l'oxydation de substrat carboné pour générer du pouvoir réducteur (NADH et FADH₂) permettant la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative. En revanche, ce n'est pas son unique rôle car il fournit aussi les squelettes carbonés pour de nombreux processus de biosynthèse. Cette fonction implique un flux non cyclique qui nécessite des entrées de carbone extérieures par le biais de voies anaplérotiques pour compenser les sorties. Chez les plantes, une phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPc) dite ubiquitaire, génère de l'oxaloacétate à partir du PEP. Cet oxaloacétate peut être importé dans la mitochondrie, soit directement, soit sous forme de malate après avoir été réduit par la malate déshydrogénase cytosolique. La PEPc permet d'alimenter le cycle de Krebs en carbone, et est considérée comme participant à la voie anaplérotique majeure (Latzko and Kelly, 1983; Andreo, Gonzalez and Iglesias, 1987). Une partie du malate généré par les voies anaplérotiques peut être converti en pyruvate par l'enzyme malique mitochondriale NAD dépendante (Figure 3). Cette voie métabolique, assez peu active est surtout employée en cas de carence en phosphate (Theodorou and Plaxton, 1993).

Le cycle de Krebs est ainsi étroitement lié à la synthèse des acides aminés. En effet le 2-oxoglutarate est impliqué dans la synthèse du glutamate, de l'alanine, de l'aspartate, de l'isoleucine, de la leucine, de la tyrosine ou de la valine, tandis que l'OAA permet la synthèse de l'aspartate (Sweetlove *et al.*, 2010). Ces deux acides organiques pourront jouer un rôle dans la fourniture des squelettes carbonés pour l'assimilation de l'azote (Lancien *et al.*, 2002). Les voies anaplérotiques assurent aussi la production d'acides carboxyliques qui, une fois exportés de la mitochondrie, ont une variété de fonctions cellulaires comme la génération de pression de turgescence pour l'expansion cellulaire (Martinoia, Maeshima and Neuhaus, 2007), l'homéostasie du pH et l'équilibrage des charges (Hurth *et al.*, 2005; Martinoia, Maeshima and Neuhaus, 2007) ou encore ils peuvent servir de source de groupement acétyl pour l'extension des acides gras et la biosynthèse des terpènes (Fatland, Nikolau and Wurtele, 2005).

c. La chaîne respiratoire

La respiration est un processus fondamental commun à tous les organismes vivants permettant de générer l'ATP nécessaire à la croissance. L'appareil respiratoire peut être divisé en trois parties :

- Le cycle de Krebs qui va permettre la décarboxylation oxydative des acides organiques aboutissant à la synthèse de pouvoir réducteur sous forme de NADPH et FADH₂ et

d'ATP (détailé plus haut II.1.b)

- La chaîne de transport d'électrons couplant l'oxydation du NADH et FADH_2 et la réduction de l'oxygène avec la translocation de protons et la phosphorylation oxydative (OXPHOS)

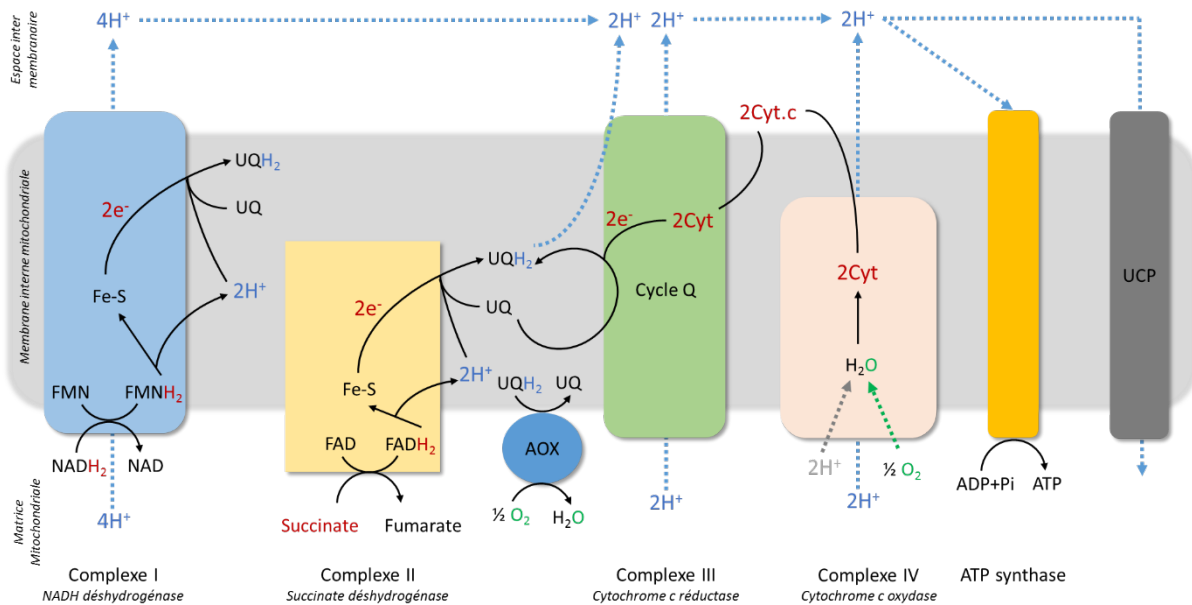


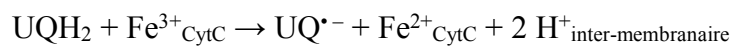
Figure 5 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale. NADH/NAD⁺ : nicotinamide adénine di-nucléotide réduit/oxydé ; FMN/FMNH₂ : Flavine mononucléotide oxydé/réduit ; Fe-S : complexe fer souffre ; UQ/UQH₂ ubiquinone oxydée/réduite ; e⁻ : électron ; FAD/FADH₂ : Flavine adénine di-nucléotide oxydé/réduit ; AOX : oxydase alternative ; Cyt.c : cytochrome c ; ATP : Adénosine tri-phosphate ; ADP : Adénosine di-phosphate ; UCP : protéines découplantes.

La chaîne de transport d'électrons est composée de 4 complexes enzymatiques qui interagissent entre eux par l'intermédiaire de l'ubiquinone (UQ) et les cytochromes c (Figure 5). Le flux d'électrons du NADH à l'oxygène est couplé à une translocation de protons vers l'espace inter membranaire pour permettre la synthèse d'ATP. Brièvement, le **complexe I** ou NADH déshydrogénase catalyse l'oxydation du NADH en NAD⁺ en réduisant une molécule de flavine mononucléotide (FMN) en FMNH₂. Les électrons de la FMNH₂ transitent ensuite par une série de complexes fer-souffre pour arriver sur l'accepteur final, l'ubiquinone qui va être réduite en UQH₂. Ce transfert d'électrons est couplé avec une translocation de protons, au nombre de quatre depuis la matrice de la mitochondrie vers l'espace inter membranaire, ce qui améliore grandement l'efficacité d'oxydation du NADH (Hirst, 2010).

Le **complexe II** est constitué par la succinate déshydrogénase, commune au cycle de Krebs. Le succinate est oxydé en fumarate, libérant ses deux électrons qui permettent la réduction du FAD en FADH₂. Les électrons du FADH₂ transitent ensuite de façon similaire au complexe I par des

complexes fer-souffre pour permettre la réduction de l'UQ en UQH₂. Au contraire du complexe I, le transfert d'électron catalysé par le complexe II ne participe pas à la génération du gradient de proton (Cecchini, 2003).

Le **complexe III** aussi appelé cytochrome c réductase catalyse l'oxydation de l'UQH₂ en réduisant deux molécules de cytochrome c. La première réaction transfère un électron de l'UQH₂ à un ion ferrique Fe³⁺ du cytochrome c réduit en ion ferreux Fe²⁺. Le second électron de l'UQH₂ est, quant à lui, transféré à une molécule d'UQ pour former le radical semiquinone UQ^{•-}. Une molécule UQ est ainsi utilisée comme récepteur intermédiaire d'électrons tandis qu'une autre est libérée par l'oxydation de UQH₂:



Ensuite, une seconde molécule de UQH₂ cède de nouveau un électron à un ion ferrique Fe³⁺ du cytochrome c à son tour converti en ion ferreux Fe²⁺, et cède son second électron à l'intermédiaire semiquinone UQ^{•-} issu de la première étape, qui redonne UQH₂ en pompant deux protons H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace inter membranaire.



Les deux électrons transmis au centre hémique du cytochrome c sont ensuite cédés chacun à un cytochrome c du côté inter membranaire. Ce mécanisme en deux étapes permet d'injecter quatre protons dans l'espace inter-membranaire, au lieu de deux s'il s'était agi d'un mécanisme de transfert direct des deux électrons de UQH₂ chacun à un cytochrome c (Schultz and Chan, 2001).

Enfin, le **complexe IV** ou cytochrome c oxydase permet de réduire l'oxygène, qui est le dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire, en deux molécules d'eau via l'oxydation de quatre molécules de cytochrome C. Cette dernière étape de transfert d'électrons s'accompagne de la translocation de quatre protons vers l'espace inter-membranaire.

Les transferts d'électrons catalysés par les complexe I, III et IV s'accompagne d'import de protons depuis la matrice de la mitochondrie vers l'espace inter membranaire, générant ainsi un delta de proton. Ce gradient de proton est utilisé par la dernière enzyme de la chaîne, le complexe V ou l'H⁺-ATP synthase qui convertit ce gradient électrochimique en ATP (Millar *et al.*, 2011).

- Les chaines de transport alternatives

En plus de la chaîne respiratoire classique, les plantes possèdent une chaîne de transport alternative non couplée au processus de phosphorylation qui permet le transfert d'électrons du NAD(P)H vers l'oxygène. Le premier mécanisme de contournement est réalisé par une quinol oxydase appelée alternative oxydase (AOX) qui se branche au niveau de l'ubiquinone et qui catalyse l'oxydation de l'UQH₂ pour réduire l'oxygène en eau mais sans translocation de protons, contournant ainsi les complexes III et IV et diminuant de façon significative l'efficacité de pompage des protons. Ce mécanisme a été montré comme étant impliqué dans la protection des plantes contre la suraccumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) en limitant le pool d'UQ réduite lors de l'attaque de pathogènes par exemple (Affourtit *et al.*, 2002). En effet, l'AOX devient active uniquement quand le pool d'UQ réduit est de 40-50% et son activité augmente brusquement et de façon non linéaire avec le niveau de réduction du pool d'UQ (Moore, Dry and Wiskich, 1988; Dry *et al.*, 1989). Le deuxième mécanisme de contournement implique les NAD(P)H déshydrogénase de type II capable d'oxyder le NADH ou le NADPH mais sans translocation de protons permettant ainsi de contourner le complexe I de la chaîne respiratoire classique (Rasmusson, Geisler and Møller, 2008).

Il a été montré que la chaîne de transfert d'électrons n'est pas entièrement couplée à la synthèse d'ATP et qu'un certain nombre de protons ne passent pas par l'ATP synthase ; ils sont directement repompés dans la matrice mitochondriale, créant ainsi une fuite de protons qui diminue le statut énergétique de l'espace inter mitochondrial. Cette fuite de proton est catalysée par des protéines découplantes (UCP-uncoupling proteins) appartenant à la famille des transporteurs anioniques mitochondriaux. De façon similaire aux AOX, les UCPs participeraient à la protection contre les ROS produit lors de la maturation des fruits (Almeida *et al.*, 1999). En effet, l'analyse de leur expression des gènes suggère que les UCPs réguleraient le métabolisme énergétique en réponse au stress en contrôlant la différence de potentiel électrochimique.

d. La voie des pentoses phosphates (PPP)

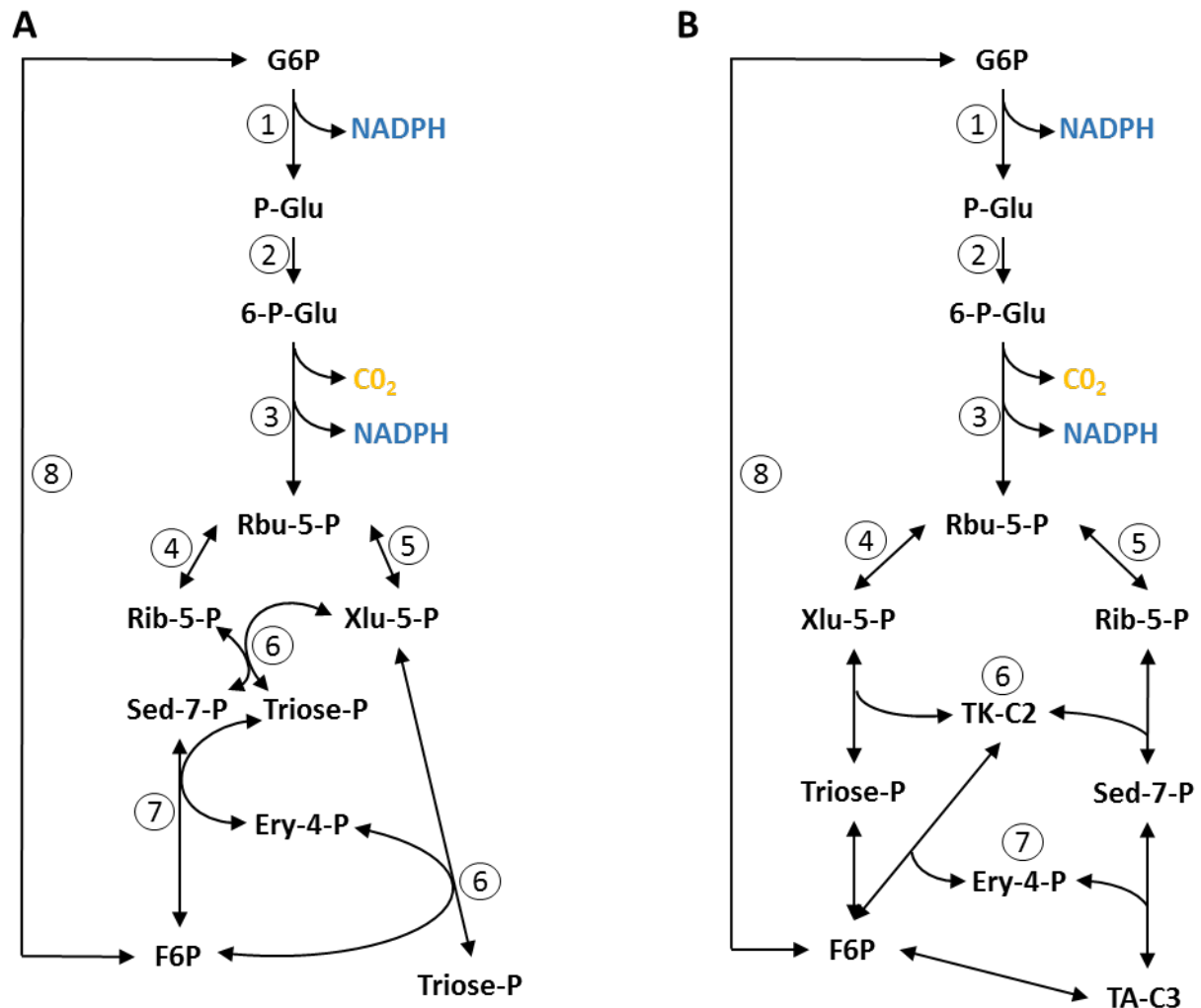


Figure 6 : Schéma des différentes représentations de la voie des pentoses phosphates chez les plantes. A. Représentation conventionnelle de la voie des PPP (Alonso *et al.*, 2005). B. Représentation alternative de la voie des PPP impliquant les intermédiaires à deux (TK-C2) et trois (TA-C3) carbones formés par un mécanisme de ping-pong entre les transketolase et transaldolase. G6P : Glucose-6-Phosphate ; P-Glu : Phospho-Gluconolactone ; 6-P-Glu : 6-phosphate-Gluconate ; Rbu-5-P : Ribulose-5-Phosphate ; Rib-5-P : Ribose-5-Phosphate ; Xlu-5-P : Xylulose-5-Phosphate ; Sed-7-P : Sedo-heptulose-7-Phosphate ; Ery-4-P : Erythrose-4-Phosphate ; Triose-P : Trioses-Phosphate ; F6P : Fructose-6-Phosphate. 1 : Glucose-6-Phosphate 1-déshydrogénase ; 2 : 6-Phosphogluconolactonase ; 3 : 6-Phosphogluconate déshydrogénase ; 4 : Ribose-5-Phosphate Isomérase ; 5 : Ribulose-5-Phosphate 3-épimérase ; 6 : Transketolase ; 7 : Transaldolase ; 8 : Glucose-6-Phosphate isomérase

La voie des pentoses phosphates peut être subdivisée en deux parties, la partie oxydative qui convertie le G6P en CO₂ et ribulose 5-phosphate et la partie non oxydative qui transforme le ribulose-5-phosphate en F6P et glyceraldéhyde 3-phosphate (ap Rees, 1985). Pour les cellules

non photosynthétiques, la voie oxydative des pentoses phosphate est une source majeure de pouvoir réducteur (NADPH) pour les processus de biosynthèse tels que la synthèse des acides gras, l'assimilation de l'azote ou encore le maintien du potentiel redox pour la protection contre le stress oxydatif. La partie non oxydative de cette voie métabolique est aussi une source de squelettes carbonés pour la synthèse de nucléotides, d'acides aminés ou de phénylpropanoïdes et leurs dérivés (Juhnke *et al.*, 1996). La voie des PPP classique est considérée comme se déroulant comme présenté figure 6A (Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1995; Alonso *et al.*, 2005). En revanche il a été montré que les transketolase (TK) et transaldolase (TA) possédaient une faible affinité pour leur substrat, ce qui conduit à des schémas alternatifs pour la partie non oxydative de la voie, impliquant notamment d'autres intermédiaires tels que l'octulose 8-phosphate. En effet, l'identification de ces nouveaux intermédiaires ainsi que l'incapacité d'expliquer le marquage des différents intermédiaires en suivant le schéma classique de la voie des PPP vient en appui à la proposition de tels schémas (Williams, Arora and Longenecker, 1987). Plus tard, Masakapalli et collègues (Masakapalli *et al.*, 2010) ont d'ailleurs proposé un autre déroulé faisant intervenir des intermédiaires à 2 et 3 carbones, résultant d'un mécanisme ping-pong entre les TK et les TA (Figure 6B). Même si aujourd'hui le déroulé précis de la voie des PPP n'est pas complètement élucidé, ces données semblent montrer que la voie des PPP ne peut pas être considérée comme un schéma rigide mais plutôt comme un pool d'intermédiaires en équilibre dynamique pouvant s'ajuster pour répondre par exemple aux conditions environnementales (Kruger and Von Schaewen, 2003).

En plus de ces différents schémas de nombreuses études ont montré une duplication de la partie oxydative de la voie des PPP entre les plastes et le cytosol. En effet, les isoformes plastidiaux et cytosoliques de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase ont pu être isolées dans une large gamme de tissus photosynthétiques et non photosynthétiques, suggérant que cette duplication pourrait être ubiquitaire chez les plantes (ap Rees, 1985). De plus, l'identification des gènes codant les deux isoformes de la G6PDH et la 6PGDH ont été identifiés chez le tabac, la pomme de terre et le maïs, confirmant la duplication de la voie (Graeve, von Schaewen and Scheibe, 1994; Redinbaugh and Campbell, 1998; Knight, Emes and Debnam, 2001). Si la compartimentation de la partie oxydative apparaît claire, celle de la partie non oxydative l'est beaucoup moins. Chez *Arabidopsis*, l'analyse des séquences codantes des enzymes de la partie non oxydative a montré l'existence de deux isoformes pour la ribose-5-phosphate isomerase et la ribulose-5-phosphate épimerase, l'une contenant un peptide d'adressage au plaste et l'autre n'en contenant

pas, suggérant une double localisation, plastidiale et cytosolique pour ces dernières, ce qui a par la suite été confirmé chez le maïs et le riz (Kopriva, Koprivova and Süß, 2000). En revanche chez *Arabidopsis*, les deux gènes codant la TK et la TA contiennent tous deux un peptide d'adressage au plaste, suggérant que l'activité de ces deux enzymes est restreinte au plaste (Kruger and Von Schaewen, 2003). Ces données suggèrent que le ribulose 5-phosphate peut être converti en ribose 5-phosphate et en xylulose 5-phosphate dans le cytosol et le plaste mais que la régénération du F6P et des trioses phosphate ne peut se faire que dans le plaste. De plus, la découverte d'un translocateur de pentose phosphate et notamment de xylulose 5-phosphate dans l'enveloppe interne du plaste vient en appui d'une coordination étroite de la voie des PPP entre le plaste et le cytosol (Eicks *et al.*, 2002). Ce translocateur pourrait permettre la production de NADPH et la provision de précurseurs pour les biosynthèses de façon indépendante entre les deux compartiments, donnant plus de souplesse à des réponses spatio temporelles ou environnementales (Redinbaugh and Campbell, 1998).

2. Le métabolisme du fruit de tomate au cours du développement

De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser le métabolisme du fruit au cours de son développement (Beauvoit *et al.*, 2014; Biais *et al.*, 2014; Bénard *et al.*, 2015; Colombié *et al.*, 2015), décrivant des profils métaboliques ou enzymatiques. Elles ont par exemple mis en évidence des variations importantes du contenu en amidon dans les fruits à l'échelle du développement. De façon générale, sa teneur augmente pendant les premières phases du développement, atteignant un maximum autour de 15 DPA, puis elle diminue pour devenir pratiquement nulle au stade rouge. (Baldet *et al.*, 2002; Biais *et al.*, 2014). Cette accumulation est d'ailleurs concomitante avec l'augmentation de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme du saccharose et de l'amidon tels que la SUSY, la fructokinase, AGPase et la SS qui présentent des activités maximales au début du développement et qui diminuent ensuite avec la dégradation de l'amidon (Schaffer and Petreikov, 1997; Biais *et al.*, 2014). Des expériences de pulse chase utilisant le [3H]-(fructosyl)-sucrose montrent qu'environ 25% du saccharose importé dans le fruit sert à la synthèse de l'amidon et que ce chiffre reste constant même lorsque le contenu en amidon diminue. Ces résultats suggèrent donc que la dégradation et la synthèse de l'amidon se font de façon simultanée et que la quantité d'amidon dépend surtout de la quantité de saccharose importé dans le fruit, ce qui fait de l'amidon un réservoir transitoire de carbone pour le développement du fruit (Nguyen-Quoc *et al.*, 1999). La dégradation de l'amidon en sucre soluble est un des événements les plus importants du processus de maturation. En effet, le catabolisme de ces photoassimilats importés et initialement

stockés sous forme d'amidon permet de soutenir les besoins en ATP du processus de maturation.

Plus récemment, des études basées sur une modélisation de type FBA se sont attachées à étudier les flux de carbone au cours du développement du fruit (Colombié *et al.*, 2015; Colombié *et al.*, 2017). Il a été montré qu'à 40 jours après anthèse, la concentration des composants majeurs de la biomasse tels que les sucres solubles, les acides organiques et les protéines atteignent un plateau, se traduisant par une forte diminution de leurs flux d'accumulation. Au même moment, les flux de dégradation de l'amidon et de la paroi atteignent leur maximum libérant un pool important de sucres solubles. Cet excès de carbone métabolisé et respiré serait responsable du pic de CO₂ au début de la maturation (Colombié *et al.*, 2015; Colombié *et al.*, 2017). Ce phénomène, qui s'accompagne d'une production d'éthylène, est référencé comme la crise climactérique et concerne de nombreux fruits tels que la banane, la pêche ou le kiwi (Roch *et al.*, 2020). De façon intéressante les flux calculés pour les AOXs et les UCPs montrent un profil similaire avec une augmentation qui commence à 30 DPA et atteint son maximum à 40 DPA (Colombié *et al.*, 2017). De plus, Xu et collègues (Xu *et al.*, 2012) ont mis en évidence le rôle des AOXs dans les processus de maturation du fruit puisque des lignées transgéniques présentant une réduction de l'activité AOX, montraient un phénotype de retard de maturation et une respiration diminuée. Ensemble, ces données suggèrent que les AOXs et les UCPs, en plus de leur implication dans la protection des plantes contre les stress, jouent un rôle clé en dissipant l'excès d'énergie libérée lors de la crise climactérique.

IV- La vacuole : un compartiment clef dans le développement du fruit

Chez les eucaryotes, la vacuole et/ou lysosome est définie comme un compartiment acide contenant des enzymes hydrolytiques pouvant dégrader et recycler un grand nombre de molécules organiques. Chez les plantes, on trouve deux types de vacuoles : les vacuoles de stockage ou PSV (protein storage vacuole) et les vacuoles lytiques (LV, lytic vacuole). Les PSVs sont des compartiments subcellulaires impliqués dans l'accumulation de protéines de stockage et de sucres au niveau des graines en développement alors que les LVs sont des compartiments acides occupant jusqu'à 90% des cellules végétatives. Les LVs sont impliquées dans de nombreux processus essentiels tels que la détoxification, le grandissement cellulaire,

les réactions de défense ou encore le contrôle du pH cytosolique (Shimada *et al.*, 2018). Pour le reste de cette étude, nous nous intéresserons uniquement aux vacuoles lytiques.

1. Biogenèse de la vacuole

Même si de nombreuses études se sont, ces dernières années, intéressées à la physiologie de la vacuole en termes de biogenèse et de transport, les processus impliqués dans la biogenèse de cette dernière restent encore très controversés et plusieurs modèles s'affrontent.

C'est dans les années 1960 où les premières hypothèses quant à l'origine membranaire des vacuoles ont été émises. Matile and Moor, 1968 ont proposé un modèle consistant à dire que la formation des vacuoles résultait de la fusion de vésicules dérivant du réticulum endoplasmique aussi appelé provacuoles. Cette hypothèse était alors fondée sur le fait que ces vésicules contiennent des enzymes caractéristiques du réticulum endoplasmique et sur la ressemblance structurale du tonoplaste avec la membrane du RE. Cette hypothèse a été reprise récemment par Viotti *et al.*, 2013 grâce à une analyse combinant microscopie électronique et immuno-marquage d'une protéine marqueur du RE, où apparaît une connexion physique entre les provacuoles et le réticulum endoplasmique.

Un second modèle implique quant à lui le réseau trans-golgien (TGN) et plus précisément le GERL (Golgi associated Endoplasmic reticulum) comme origine membranaire de ces provacuoles. Ce modèle provient lui aussi, d'études par imagerie électronique 3D à haut voltage révélant la présence d'un réseau tubulaire complexe au niveau du TGN d'où émergent les provacuoles. Cette hypothèse est soutenue par le fait que ces deux compartiments sont acides et contiennent tous deux des hydrolases acides (Marty, 1978).

L'étude la plus récente combine, quant à elle, diverses méthodes d'analyse (tomographie électronique 3D, microscopie électronique à balayage à émission de champ et technique de photo conversion). Elle aboutit à un model complexe impliquant les petites vacuoles (SV - small vacuole) comme organelles d'origine des vacuoles, elles même dérivant de la fusion d'endosomes tardifs aussi appelés corps multi vésiculaires (MVB – multivesicular body) dérivant du TGN. La vacuole lytique mature résulterait finalement de la fusion de ces SVs (Cui *et al.*, 2019).

Enfin, durant certains stades de développement et notamment la formation et la germination des graines, les LVs et les PSVs ont été montrées comme inter convertibles indiquant la potentielle héritabilité des vacuoles (Zheng and Andrew Staehelin, 2011).

2. La vacuole : un compartiment aux multiples rôles

- *Stockage et détoxification*

La vacuole a longtemps été considérée comme un compartiment « poubelle » chargé d'accumuler les composés qui pourraient être toxiques pour la cellule. L'exemple le plus parlant est sûrement son implication dans la régulation de la concentration cytosolique des métaux lourds. En effet, si les métaux sous forme d'ions tels que le fer, le zinc ou le cuivre sont essentiels au bon fonctionnement de la cellule, d'autres tels que le cadmium, le mercure ou l'arsenic présents dans l'environnement doivent être maintenus à une concentration inférieure à leur seuil de toxicité pour garantir le bon fonctionnement de la cellule et la compartimentation vacuolaire tient un rôle clef dans ce processus de détoxification, en séquestrant ces composés grâce à une large variété de transporteurs présents sur le tonoplaste (Sharma, Dietz and Mimura, 2016). Un autre exemple est l'implication de la vacuole dans la séquestration de composés en réponse au stress pour permettre l'adaptation des plantes à leur environnement. En effet, la surexpression de l'antiport Na^+/H^+ (AtNHX1) présent au niveau du tonoplaste a permis de conférer à *Arabidopsis* une tolérance à l'augmentation de la salinité du sol grâce à la séquestration du sodium dans la vacuole (Apse *et al.*, 1999). De façon similaire, la surexpression de la pompe à protons pyrophosphate dépendante chez le tabac a permis d'augmenter la résistance au stress salin en générant un gradient de pH suffisant pour permettre la séquestration du sodium dans la vacuole (Graus *et al.*, 2018). Enfin, la compartimentation vacuolaire peut être combinée à la modification chimique de molécules pour les processus de détoxification. C'est le cas notamment du processus impliquant la liaison covalente de certains xénobiotiques absorbés au niveau des racines qui seront conjugués au glutathion dans le cytoplasme pour les rendre plus polaires et permettre leur transport vers la vacuole grâce à un transporteur ATP dépendant (Coleman, Blake-Kalff and Emyr, no date)

- *La régulation de l'homéostasie du cytosol*

L'homéostasie du pH cytosolique est un point essentiel dans la mesure où la plupart des enzymes présentes dans ce compartiment possèdent un optimum d'activité à pH7. Le fait que le pH cytosolique reste très stable, même en condition extrême démontre que la concentration en proton dans le cytosol est finement régulée. En effet, l'étude par spectroscopie RMN d'une suspension de cellule de tabac cultivée en milieu acide a montré que le pH du cytosol restait relativement constant alors que celui de la vacuole diminuait. Ce résultat indique que lorsque le pH externe est faible, l'importation passive de protons dans le cytosol à cause du gradient

instauré entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, est compensée par un flux équivalent entre le cytosol et la vacuole (Torimitsu *et al.*, 1984). Ce résultat a d'ailleurs été confirmé dans le cas d'une production excessive de protons dans le cytosol en condition d'anaérobie (Roberts *et al.*, 1982).

Les acides organiques, notamment le malate, jouent un rôle crucial dans le maintien de cet équilibre. En effet, la synthèse du malate par la PEP carboxylase cytosolique libère un proton alors que sa dégradation par l'enzyme malique libère un OH⁻. Davies *et al.*, 1986 ont montré dans leur étude que l'acidification du cytosol inhibait la PEP carboxylase et activait l'enzyme malique, soulignant l'aspect essentiel du maintien du ratio entre dégradation et synthèse du malate pour le maintien du pH cytosolique. Cet équilibre serait assuré grâce à la régulation du transport du malate vers la vacuole, dans la mesure où l'essentiel du malate intra cellulaire est stocké dans la vacuole (Gerhardt and Heldt, 1984). Le fait que 1/ l'acidification du cytosol induise l'expression du gène AtMDT, transporteur tonoplastique du malate et que 2/ les mutants KO pour ce transporteur présentent une altération de leur capacité photosynthétique due à l'acidification du cytosol, vient en appui d'un rôle majeur du malate dans la régulation de l'homéostasie du cytosol (Hurth *et al.*, 2005).

Au-delà des notions de régulation de pH, la régulation de l'homéostasie du cytosol passe aussi par la régulation de la concentration ionique. En effet, les macroéléments tels que le potassium, le calcium, les chlorures, le magnésium ou le phosphate sont essentiels pour les biosynthèses, les régulations osmotiques, la régulation du pH ou la signalisation intracellulaire (Shitan and Yazaki, 2013). Ce dernier point est parfaitement illustré par le cas du calcium : de nombreuses voies de signalisation utilisent des changements de concentration cytosolique en calcium. Ceci implique que la concentration cytosolique en calcium doit être maintenue faible et constante mais doit aussi pouvoir varier rapidement en cas d'exposition à un stress afin de permettre à la plante d'y répondre efficacement. Dans la mesure où la majorité du calcium est vacuolaire, les échanges entre vacuole et cytosol sont un point crucial. Ce point a été parfaitement illustré par Cheng *et al.*, 2003 qui ont montré chez *Arabidopsis* que les mutants KO pour le gène CAX1, antiport Ca²⁺/H⁺ localisé au niveau du tonoplaste, présentaient une altération dans leur développement avec un nombre de racines latérales réduit et un retard dans la transition entre la phase végétative et reproductive.

- *Osmorégulation*

Les deux composantes physiques de l'osmorégulation sont la pression osmotique et la pression de turgescence. La pression osmotique correspond à la pression minimale qu'il faut exercer pour empêcher les mouvements d'eau au travers d'une membrane semi perméable (tonoplaste/membrane plasmique) entre une solution et l'eau pure. La pression de turgescence correspond à la pression qu'exerce le contenu de la cellule sur la paroi. Ainsi l'osmorégulation correspond aux mécanismes mis en place par la cellule pour lui permettre de survivre et grandir dans un environnement où la pression osmotique va varier sous l'influence des cellules voisines, de l'apoplasme ou encore de l'environnement. La vacuole tient un rôle majeur dans le maintien et la modulation de la pression de turgescence de la cellule. Une stratégie générale inhérente au processus d'osmorégulation des cellules par la vacuole est le couplage étroit entre importation/exportation de solutés impliqués dans le maintien de la turgescence entre la vacuole et le cytosol. Ce couplage permet de maintenir l'équilibre osmotique entre les deux compartiments. Ce phénomène a d'ailleurs été mis en évidence chez l'épinard chez lequel la remobilisation du nitrate vacuolaire était accompagnée d'une accumulation de sucre et d'acide organique dans la vacuole pour rétablir l'équilibre osmotique (Steingröver, Ratering and Siesling, 1986). La rapide accumulation de Na^+ et Cl^- dans la vacuole chez les plantes halophytes soumises à un stress salin est probablement l'exemple le plus parlant pour illustrer le rôle de la vacuole dans l'osmorégulation et le maintien de la pression de turgescence (Slama *et al.*, 2015).

La perméabilité membranaire joue un rôle majeur dans les processus d'osmorégulation. Il a été démontré que la perméabilité du tonoplaste à l'eau était extrêmement élevée en comparaison de celle de la membrane plasmique (Maurel *et al.*, 1997). Cette différence est due à la présence d'aquaporines de la famille des TIPs (tonoplast intrinsic proteins) qui facilitent le passage de l'eau au travers du tonoplaste. La découverte des aquaporines a permis de comprendre que les flux d'eau au travers des membranes n'étaient pas uniquement régulés par les différences de pression osmotique mais aussi par l'abondance et/ou l'activité des aquaporines. Cette différence de perméabilité souligne le rôle tampon attribué à la vacuole pour prévenir les changements de pression osmotique que peut subir le cytosol à cause de la perméabilité de la membrane plasmique. Il a d'ailleurs été montré que lorsque des cellules de chou-fleur étaient soumises à un stress hydrique, l'expression de BobTIP26-1, codant une aquaporine tonoplastique augmentait afin de compenser les pertes en eau (Barrieu *et al.*, 1999). Si le tonoplaste joue un rôle majeur dans l'osmorégulation de la cellule, c'est l'action de concert

des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique et du tonoplaste qui permet une réelle adaptation au stress hydrique. En effet, chez l'épinard soumis à un stress hydrique (Johansson *et al.*, 1998), les aquaporines localisées au niveau de la membrane plasmique sont déphosphorylées, ce qui entraîne leur fermeture. Cette diminution de la perméabilité de la membrane plasmique s'accompagne d'une surexpression des aquaporines tonoplastiques afin de faciliter les mouvements d'eau depuis la vacuole vers le cytosol et maintenir une pression osmotique compatible avec le métabolisme.

- *Activité lytique et rôle dans les processus de mort cellulaire*

Il est bien connu que la majorité du pool d'enzymes lytiques se trouve dans la vacuole ce qui la classe d'ailleurs comme analogue fonctionnel des lysosomes que l'on retrouve dans les cellules animales. Les hydrolases vacuolaires ont aussi été montrés comme possédant une activité protéolytique qui participe au turnover des protéines cytoplasmiques (Müntz, 2007). Ces dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de la vacuole dans les processus de mort cellulaire programmée (PCD) notamment dans le cas du mécanisme de HR (hypersensitive response) mis en place lors de l'attaque de pathogènes. Ce mécanisme se traduit par une mort cellulaire au niveau du site d'attaque pour prévenir la croissance et la diffusion du pathogène au niveau des tissus sains (Thakur *et al.*, 2019). Il existe deux mécanismes de PCD impliquant la vacuole : Le mode non destructif et le mode destructif. La mort cellulaire par voie non destructive est causée par une fusion du tonoplaste avec la membrane plasmique, libérant les enzymes hydrologiques vacuolaires dans la matrice extracellulaire provoquant la mort cellulaire. Au contraire, la PCD par voie destructive se traduit par une dégradation du tonoplaste qui provoque la libération des enzymes hydrolytiques dans le cytosol pour dégrader les composants cytoplasmiques, entraînant la mort cellulaire (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011)

3. Le tonoplaste et les transports associés

Nous avons vu précédemment que la vacuole pouvait occuper jusqu'à 90% du volume subcellulaire dans les cellules matures et qu'elle était séparée du reste de la cellule par une membrane appelée tonoplaste. Dans la mesure où la vacuole occupe la quasi-totalité du volume subcellulaire, elle occupe un rôle essentiel dans la physiologie de la cellule, tant pour son rôle dans la croissance que pour son rôle d'organite de stockage. On y retrouve des molécules de nature chimique variée qui s'accumulent: les sucres, les acides organiques, les ions, les acides aminés, des métabolites secondaires, des dérivés de phytohormones, des protéines de stockages, des enzymes ou encore des composés toxiques (Martinoia *et al.*, 2012). En fonction

du tissu que l'on considère, la composition des vacuoles ainsi que leur physiologie varient. Par exemple, les vacuoles de cellules de mésophylle de feuille vont généralement stocker des sucres de façon transitoire alors que dans la tige de la canne à sucre ou dans les tubercules de pomme de terre, les sucres sont stockés sur le long terme (Martinoia, Maeshima and Neuhaus, 2007). L'accumulation ou le transport de solutés dans ou hors de la vacuole se fait généralement contre le gradient de concentration impliquant donc la nécessité d'un couplage énergétique. Même si certaines molécules sont transportées par des transporteurs actifs primaires tels que des ATPase de type P ou des ATP-binding cassettes (transporteurs ABC) (Rea, 2007; Palmgren and Nissen, 2011), la plupart des composés sont importés/exportés en utilisant le gradient électrochimique généré par des pompes à protons. On en trouve de deux types sur le tonoplaste, les ATPase de type V, ATP dépendante et les PPase, PPi dépendante. Dans cette partie les différents types de transporteurs tonoplastiques sont détaillés. Pour les besoins de cette thèse, nous nous intéresserons de façon plus approfondie **aux transporteurs de sucres**.

a. Les transporteurs de sucres

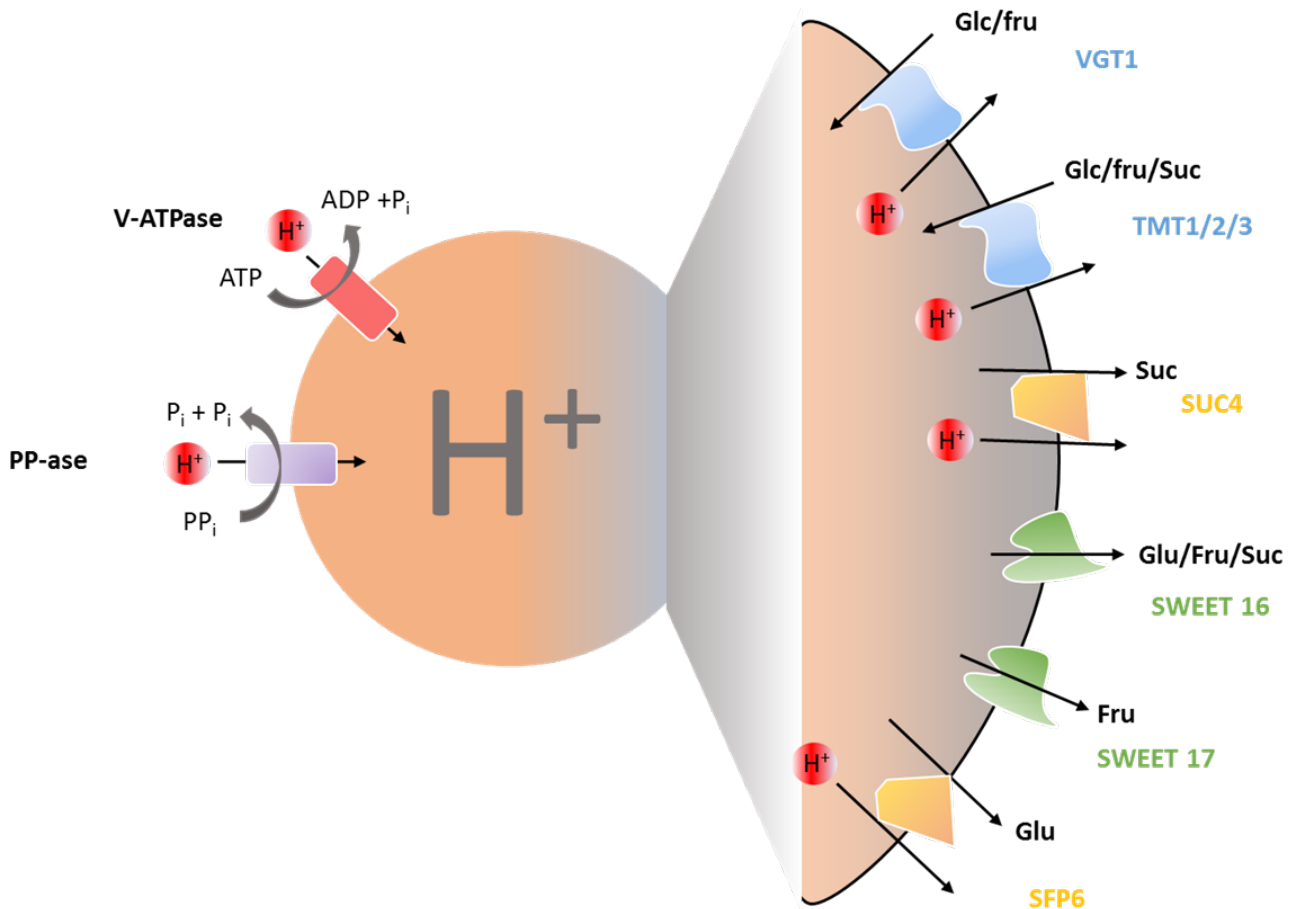


Figure 7 : Les différents types de transporteurs tonoplastiques impliqués dans le métabolisme des sucres au sein de la vacuole chez les plantes. V-ATPase : pompe à proton ATP dépendante ; PP-ase : pompe à protons pyrophosphate dépendante ; VGT : Vacuolar Glucose Transporter ; TMT : tonoplast monosaccharide transporter (aussi appelé TST pour Tonoplast Sugar Transporter) ; SUT : Tonoplast Sucrose Transporter ; SWEET : Sugars Will Eventually be Exported Transporters ; SFP : Sugar Facilitator Protein ; Glc : Glucose, Fru : Fructose : Suc : Saccharose

Les transporteurs de sucres tonoplastiques peuvent être divisés en deux grandes familles : Les MSFs (Major facilitator Super Family) et les SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) contenant respectivement 52 et 32 gènes chez la tomate.

➤ Les transporteurs MSF

La famille des transporteurs MSFs peut être divisée en 7 sous-familles qui contiennent des protéines avec un large panel de localisations subcellulaires. Parmi elles, quatre sous familles contiennent des protéines localisées au niveau du tonoplaste : Les SUTs/SUCs (Sucrose

Transporters family), les VGTs (Vacuolar Glucose Transporters), les SFPs (Sugar Facilitator Protein) ou ERD6-like (Early Response to Dehydration 6-like family) et les TMTs/TSTs (Tonoplast Monosaccharide/Sugar Transporters). Il est important de préciser que la plupart des données présentées ici ont été acquises chez *Arabidopsis*. En revanche lorsque des informations sont disponibles sur les protéines de tomate, elles seront détaillées en priorité.

- Les SUTs/SUCs (Sucrose Transporters family)

Les transporteurs SUTs ont été identifiés comme étant des transporteurs actifs secondaires fonctionnant comme symport saccharose/H⁺. Cette sous famille peut être divisée en 4 ou 5 clusters (dont le cinquième n'est constitué que d'une protéine chez les monocotylédones et dont la fonction est inconnue).

Le cluster 1 regroupe des protéines exclusivement retrouvées chez les dicotylédones, le cluster 2 et 4, des protéines communes au monocotylédones et dicotylédones et les clusters 3 et 5 sont spécifiques des monocotylédones (Kühn and Grof, 2010). Chez *Arabidopsis*, on retrouve 9 gènes codant des protéines SUTs alors que chez la tomate uniquement 3 de ces homologues sont retrouvés (Poczai *et al.*, 2014; Reuscher *et al.*, 2017). Chez la tomate, les 3 protéines SUTs clustérisent dans les clusters 1 (SISUT1), 2 (SISUT2) et 4 (SISUT4). Les membres du cluster 1 ont été montrés comme étant localisés au niveau de la membrane plasmique chez de nombreuses espèces, ce qui est notamment le cas chez la tomate, le tabac et la pomme de terre et sont surtout impliqués dans le chargement du phloème et le transport longue distance (Kühn *et al.*, 1997). L'immuno-marquage a permis de montrer que SISUT2 était localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules du tissu conducteur et qu'il agissait potentiellement comme un senseur de saccharose au niveau de ces éléments conducteurs (Barker *et al.*, 2000). Enfin, l'expression transitoire de SISUT4 dans des protoplastes a permis de montrer qu'il était localisé au niveau du tonoplaste. En revanche ces données sont controversées car la protéine peut aussi être adressée au RE en fonction de la position de GFP (Schneider *et al.*, 2012) mais la localisation tonoplastique de SUT4 a aussi été montrée chez *Arabidopsis* (Endler *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2011).

Chez *Lotus japonicus*, le transporteur SUT4 tonoplastique a été catégorisé comme fonctionnant dans le sens de l'export de saccharose avec une faible affinité pour son substrat puisque le K_m est de 16 mM a pH 5.3 (Reinders *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis*, des expériences de patch-clamp sur des vacuoles de plantes sur-exprimant SUT4 ont montré une augmentation de l'efflux de protons et de saccharose, confirmant les résultats obtenus précédemment (Schulz

et al., 2011). Chez *Arabidopsis* et la pomme de terre, SUT4 a été montré comme étant spécifique des tissus puits puisqu'il est majoritairement exprimé dans les anthères, l'extrémité apicale des tiges, le méristème floral et les racines alors qu'il est absent dans les rosettes et il est retrouvé dans les fleurs, les tubercules et la racine chez la pomme de terre (Chincinska *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2012). Chez la tomate, il est majoritairement exprimé dans les feuilles puits, les cotylédons et dans les stades jeunes du fruit (Weise *et al.*, 2000). Dans la mesure où les organes puits sont carbone dépendants, SUT4 pourrait être impliqué dans l'export du saccharose rentré passivement vers le cytosol pour maintenir une concentration vacuolaire faible et ainsi soutenir la force de puit. En condition normale les mutants *Atsuc4* chez *Arabidopsis* ne présentent pas de phénotype par rapport au WT. Ceci ne semble pas étonnant dans la mesure où SUT4 est faiblement exprimé. En revanche, des sur-expressseurs du même gène montrent une diminution de l'accumulation de saccharose dans les plantules (Schneider *et al.*, 2012).

- Les TMTs ou TSTs (Tonoplast Monosaccharides/Sugars Transporters)

On retrouve trois isoformes de TMT : TMT1, TMT2 et TMT3 identifiés comme transporteurs actifs secondaires fonctionnant comme antiports glucose/H⁺ chargés d'importer les sucres dans la vacuole (Endler *et al.*, 2006; Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*, 2010). Chez *Arabidopsis*, TMT1 et TMT2 sont retrouvés dans toutes les parties de la plante (racine, tige, feuille jeune, feuille adulte, fleur) à un niveau d'expression relativement élevé alors que TMT3 n'est que très faiblement exprimé et ne semble pas participer à l'activité TMT (Wormit *et al.*, 2006). En plus de leur rôle physiologique, les TMTs répondent au stress. En effet, que ce soit en réponse au froid ou lors d'un stress osmotique, on constate une accumulation de transcrit TMT1 combinée à une forte accumulation de glucose dans les vacuoles de cellule de mésophile. De plus, dans ces mêmes conditions, le simple mutant *tmt1* présente une réduction des capacités de transport de glucose de 60% et le double mutant *tmt1-tmt2* accumule 30% de glucose et fructose en moins par rapport au WT mais ne présente pas de phénotype pour le saccharose (Wormit *et al.*, 2006). Ces données ont par la suite été confirmées en condition normale par Wingenter *et al.*, 2010 (Wingenter *et al.*, 2010) grâce à des lignées TMT1::TDNA sur-exprimant TMT1 : elles montrent une accumulation de sucres dans la vacuole s'accompagnant d'un développement accéléré. De façon intéressante chez ces lignées, la respiration nocturne est diminuée ce qui semble indiquer une meilleure utilisation nette du carbone pendant la journée. En parallèle, on observe une augmentation de l'expression de SUT2 impliqué dans les processus de chargement du phloème. Au contraire, chez les lignées mutantes *tmt1-2* on

constate une diminution du nombre de graines. La corrélation positive trouvée entre l'activité des TMTs et la croissance ou le rendement en graines résulte probablement d'une altération dans la perception du signal sucre. En général, les fortes concentrations en glucose sont perçues par l'hexokinase et conduisent à une sous expression des gènes nécessaires à la photosynthèse (Hanson and Smeekens, 2009). Ainsi, chez les lignées sur-exprimant les TMTs, il y aura moins de glucose dans le cytosol ce qui conduira à l'augmentation de l'expression des gènes de photosynthèse et donc un meilleur rendement (Wingenter *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données indique que chez *Arabidopsis*, les TMTs sont impliqués dans l'export strict d'hexoses et qu'ils agissent comme senseur de sucre capable de moduler des processus physiologiques tels que la photosynthèse ou la force de puits.

La seule étude concernant les TMTs sur les fruits charnus a été réalisée avec l'isoforme TMT2 du melon CmTMT2 (Cheng *et al.*, 2017) où TMT2 a été montré comme étant exprimé dans les cellules du mésocarpe du fruit (celles qui accumulent le plus de sucre). Au contraire de l'isoforme d'*Arabidopsis*, chez le melon, TMT2 est catégorisé comme saccharose/H⁺ antiport. Lorsque CmTMT2 est transitoirement exprimé chez la fraise, on constate un retard de maturation du fruit accompagné d'une diminution de l'accumulation des sucres dans les premiers jours après injection du vecteur. On peut supposer que la surexpression de TMT2 conduit à l'importation de plus de saccharose dans la vacuole, diminuant sa concentration dans le cytosol et affectant potentiellement le signal sucre induisant la maturation. Lorsque le même gène est transformé chez le concombre, espèce accumulant peu de sucre, on constate une augmentation de l'accumulation du glucose, fructose et saccharose. Ensemble, ces données indiquent que les TMTs sont potentiellement capables de transporter les trois sucres et confirment leur rôle dans les processus de signalisation.

- Les VGTs (Vacuolar Glucose Transporters)

Chez *Arabidopsis*, les VGT sont au nombre de trois isoformes mais seul VGT1 a été montré comme étant localisé au niveau du tonoplaste (Aluri and Bu, 2007; Hedrich, Sauer and Neuhaus, 2015). VGT1 est catégorisé comme antiport glucose/H⁺ chargé d'importer le glucose dans la vacuole avec un K_m de 3.7 mM. Ce transporteur est aussi capable de prendre en charge le fructose mais avec une affinité plus faible, par contre le transport du saccharose n'a pas été montré. VGT1 est fortement exprimé au niveau du pollen et à un niveau basal dans les feuilles et les tiges mais l'expression du gène n'a pas été détectée dans les racines en condition normale, bien que son expression soit augmentée d'un facteur 2 dans ce même tissu en cas d'attaque de

nématodes (Hammes *et al.*, 2005; Aluri and Bu, 2007). Même si les mutants *Atvgt1* montrent un retard de floraison par rapport au WT ainsi qu'une diminution de 20% du taux de germination, le rôle exact de VGT1 dans la physiologie de la plante n'est pas bien connu. De plus, le quadruple mutant *Attmt1/Attmt2 AtVgt1/AtVgt2* ne présente pas de différence au niveau du transport des sucres par rapport au double mutant *Attmt1/Attmt2* ce qui semble indiquer qu'en condition normale, la fonction d'importateur de sucre dans la vacuole est prise en charge majoritairement par les TMTs (Schulz *et al.*, 2011)

- SFPs (Sugar Facilitator Protein) ou ERD6-like (Early response to dehydration 6-like family)

SFP6 ou ERDL6 fait partie chez *Arabidopsis* d'une sous famille contenant 10 membres que l'on retrouve par homologie de séquences chez la tomate. Seul l'isoforme 6 a été montrée expérimentalement comme étant localisé au niveau du tonoplaste et est exprimé dans un large panel de tissus et d'organes incluant les tissus verts ainsi que les tissus puits non photosynthétiques tout au long du développement mais surtout dans les stades où le turnover métabolique est élevé (Poschet *et al.*, 2011). La protéine a été catégorisée comme symport glucose/H⁺ impliquant donc un export de glucose de la vacuole depuis le cytosol. Chez *Arabidopsis*, des lignées KO pour ce gène présentent deux fois plus de glucose mais aucune différence des teneurs en fructose et saccharose. Cette augmentation globale de glucose a été montrée comme étant due à une augmentation de la concentration vacuolaire. Au contraire, lorsque SFP6 est surexprimé, on retrouve un contenu en glucose, fructose et sucrose réduit d'un facteur 2 par rapport au WT et une réduction de la tolérance au stress froid (Poschet *et al.*, 2011). Ce résultat est en accord avec la théorie selon laquelle l'adaptation au froid implique une accumulation massive de sucres dans la vacuole pour prévenir la formation de cristaux de glace, ce qui est favorisé par l'induction des gènes TMTs et la répression de SFP6 (Wormit *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2011; Klemens *et al.*, 2014). De plus, Klemens *et al.*, 2014 ont montré que l'expression de ERDL6-like était étroitement gouvernée par la signalisation sucre puisque les lignées sur-exprimant ERDL6-like présentent une réduction de CAB1, gène rapporteur de ce processus de signalisation. Il semblerait donc que les TMTs soient chargés de l'import des sucres dans la vacuole et que pour prévenir d'un cycle futile import/export d'hexose, la perception du signal sucre permette de réprimer l'expression de ERDL6-like.

➤ Les SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters)

Les SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) ont récemment été découverts chez les plantes et correspondent à une famille de protéines transmembranaires caractérisée par 7 domaines transmembranaires. Ces protéines sont présentes chez de nombreux organismes et ont pour point commun de transporter les sucres de façon passive, autrement dit dans le sens du gradient de concentration. Le premier SWEET à avoir été caractérisé chez *Arabidopsis* est AtSWEET1, impliqué dans le transport du glucose dans de nombreux processus (Chen *et al.*, 2010). Par la suite, AtSWEET11 et AtSWEET12 ont été montrés comme acteurs clefs du déchargement du phloème (Chen *et al.*, 2012). Chez la tomate, on retrouve 29 gènes regroupés en deux grands groupes.

Le groupe 1 est subdivisé en 3 sous classes : le groupe 1a regroupe 9 gènes codants des protéines chargées du transport de glucose au niveau de la membrane plasmique et sont majoritairement exprimés dans les organes floraux. Le groupe 1b regroupe 2 gènes, SWEET 16 et SWEET17 qui sont les seuls SWEETs retrouvés au niveau du tonoplaste. Ces gènes sont fortement exprimés au niveau des racines chez *Arabidopsis* et codent des protéines transportant le fructose (Chardon *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). Le groupe 1c regroupe des protéines fonctionnant comme transporteurs bidirectionnels à faible affinité pour le glucose, localisés au niveau de la membrane plasmique. Les membres de ce groupe sont principalement exprimés au niveau des organes floraux et du pollen. Enfin le groupe 2 regroupe 13 gènes impliqués dans le transport du glucose et du saccharose (Feng *et al.*, 2015).

Si tous les SWEET étudiés à ce jour montrent une localisation au niveau de la membrane plasmique, SWEET16 et SWEET17 sont quant à eux adressés au niveau du tonoplaste. De façon intéressante, les deux protéines ont un territoire d'expression extrêmement réduit et on les retrouve, bien que faiblement exprimées, au niveau des cellules du parenchyme du xylème dans les feuilles, les fleurs et les racines (Chardon *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2013).

La protéine SWEET17 a été identifiée à l'origine au cours d'une étude de génétique quantitative cherchant à identifier un QTL responsable de l'accumulation de fructose dans les feuilles d'*Arabidopsis* en condition de stress (Chardon *et al.*, 2013). Par la suite, le rôle de SWEET17 comme transporteur de fructose strict a été confirmé et son K_m estimé à 25.6 mM. On constate une forte accumulation de transcrit SWEET17 au niveau des cellules du cortex des racines lorsqu'elles sont alimentées par du fructose. De plus, chez des mutants KO *sweet17*, la croissance racinaire est réduite en cas d'excès de fructose, probablement en raison d'une

réduction de l'import de ce dernier dans la vacuole et donc de l'augmentation de sa concentration cytosolique (*Cho et al., 2011*). De façon intéressante, après 48 heures d'incubation dans l'obscurité, conduisant à une diminution des substrats respiratoires et à l'activation de l'export de sucres depuis la vacuole, l'expression de SWEET17 est induite dans les cellules de la zone d'élongation de la racine. SWEET17 permettrait d'assurer l'export de fructose pour permettre à la plante de s'adapter à son environnement (*Cho et al., 2011*). Ce résultat a pu être confirmé en étudiant des lignées sur exprimant SWEET17 et cultivées en condition de stress froid : alors que le fructose aurait dû s'accumuler, les auteurs ont constaté une réduction de 80% de la teneur en fructose vacuolaire par rapport au WT, due à une fuite du fructose hors de la vacuole (*Guo et al., 2014*). Enfin, le fait que les sur-expressseurs de SWEET17 ne présentent pas de phénotype particulier lorsqu'ils sont cultivés en condition normale impliquerait ce gène plutôt dans les processus d'adaptation et de réponse au stress (*Guo et al., 2014*)

Au contraire de SWEET17 qui est spécifique du fructose, SWEET16 est capable de prendre en charge le glucose, le fructose et le saccharose avec des K_m de 9.9 mM, 15.7 mM et 10.8 mM respectivement. Si les lignées sur-exprimant SWEET16 ne présentent pas de phénotype de croissance (pas de différence de matière fraîche), leur contenu en sucre est altéré puisqu'on constate, chez ces lignées, une incapacité à accumuler du glucose et du fructose ainsi qu'une augmentation du saccharose (*Klemens et al., 2013*). SWEET16 a été montré comme hautement régulé par les conditions environnementales avec une réduction de son expression induite par les fortes concentrations en glucose, fructose ou sucrose, par un stress osmotique ou par un stress froid (*Klemens et al., 2013*). Ce résultat n'est pas étonnant puisque nous avons vu précédemment que l'acclimatation au froid nécessitait une augmentation de la concentration vacuolaire en sucre : la répression de SWEET16 permet de maintenir une concentration vacuolaire d'hexoses élevée. De façon intéressante, les lignées sur exprimant SWEET16 ont des graines présentant de meilleurs pourcentages de germination. Il est admis que les fortes concentrations en sucres répriment la croissance, et de façon encore plus importante durant la germination. Ceci est dû au rétrocontrôle de l'activité de l'hexokinase par les fortes concentrations en sucre. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la surexpression de SWEET16 faciliterait le transport des sucres dans la vacuole, diminuant ainsi leur concentration cytosolique (*Klemens et al., 2013*). Cependant, ce résultat est en contradiction avec celui des sur-expressseurs SWEET17 (*Guo et al., 2014*) et reste à vérifier dans le sens ou les sucres

s'accumulent normalement dans la vacuole, ce qui limiterait la diffusion des sucres vers la vacuole.

b- Les pompes à protons

Du fait du volume important qu'occupe la vacuole dans la cellule végétale (80-90% dans les cellules matures), pour qu'un composé soit en concentration similaire dans la vacuole et dans le cytosol, sa quantité doit être 5-10 fois plus importante dans la vacuole. Malgré tout, une large gamme de métabolites s'accumule dans la vacuole, excédant parfois très largement les concentrations cytosoliques impliquant la nécessité d'un gradient électrochimique pour énergiser les transports et permettre leur accumulation. Ce gradient peut être créé par l'action de deux transporteurs actifs primaires, les V-ATPase qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'import d'un proton et les V-PPase qui utilisent, quant à elles, l'énergie libérée par l'hydrolyse du pyrophosphate. Tous les types de vacuoles possèdent au moins un type de pompe, ce qui en fait d'ailleurs un marqueur de ce compartiment. Même si l'import de protons participe à l'acidification de la vacuole qui a un pH autour de 4 (contre 7 pour le cytosol), la différence de potentiel de membrane entre la vacuole et le cytosol reste relativement faible, autour de 30mV, ce qui implique un flux d'anion majeur nécessaire à la dissipation de ce potentiel et au maintien de l'équilibre (Martinoia, Massonneau and Frangne, 2000). Dans le fruit de tomate, la contribution relative de ces deux pompes à protons pour la génération du gradient de protons dépend du stade de développement et du tissu. *Taiz, 1986* (Taiz, 1986) a montré que l'activité V-PPase était particulièrement abondante dans les tissus en croissance tels que les fruits au stade jeune dans lesquels la forte activité de biosynthèse générerait de grande quantité de pyrophosphate (conversion du PEP en pyruvate, synthèse de l'ADN et ARN, synthèse du saccharose et de la cellulose, synthèse des acides gras). Or l'accumulation de PPi dans le plaste inhiberait l'ADPG pyrophosphorylase et donc de la synthèse d'amidon. Ainsi, l'utilisation du PPi par la V-PPase permettrait de maintenir des concentrations en PPi compatibles avec les biosynthèses (Amir and Cherry, 1972). Dans les stades plus tardifs de développement, l'activité de la V-PPase baisse au profit de l'activité ATPase (Milner, Ho and Hall, 1995).

- Les V-ATPase

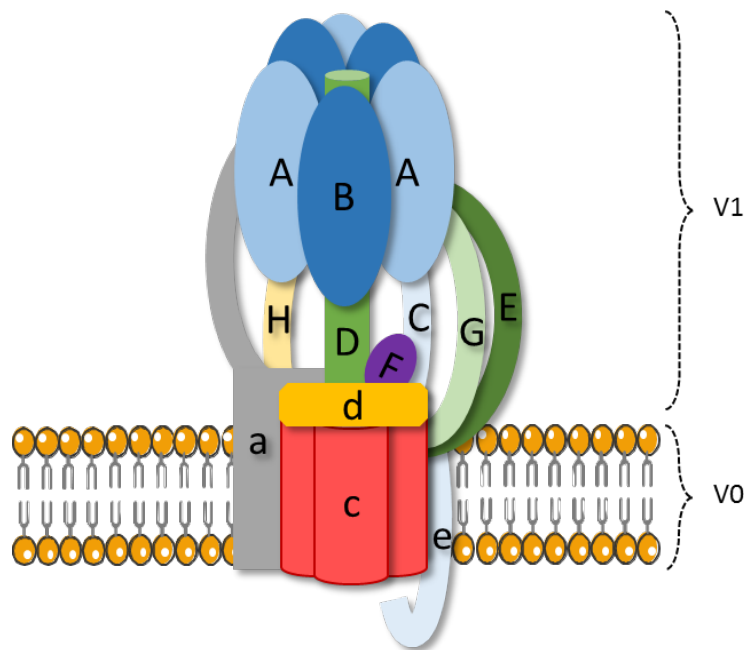


Figure 8 : Schéma de la V-ATPase chez les plantes.

Les pompes V-ATPase sont ubiquitaires pour les compartiments subcellulaires acides et sont retrouvées chez tous les êtres vivants de façon extrêmement conservée. Chez les plantes, on retrouve ces protéines au niveau du tonoplaste, de la membrane du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ainsi qu'au niveau de certaines vésicules et de la membrane plasmique (Sze *et al.*, 2002). Leur rôle majeur est l'acidification de ces compartiments pour fournir l'énergie nécessaire aux transports principalement des ions et divers métabolites pour permettre leur accumulation. Les V-ATPase sont des protéines complexes de type F. Elles sont composées de deux unités fonctionnelles : une unité périphérique V1 et une unité transmembranaire V0 (Figure 8). L'unité V1 est elle-même composée de plusieurs sous-unités, notées de A à F. La fonction catalytique d'hydrolyse de l'ATP est assurée par l'association de 3 sous-unités A et de 3 sous-unités B. Les sous-unités de C à H forment un domaine central qui permet de relier V0 à V1. La sous-unité C est impliquée dans la stabilité de V1 tandis que les sous-unités D, G, E et F sont impliquées dans la connexion de V0 à V1 et participent au couplage de l'hydrolyse de l'ATP et l'import de protons ; la sous-unité H est quant à elle impliquée dans la régulation du complexe protéique. L'unité V0 est composée des sous-unités a, c, d et e : toutes les V-ATPase de type F présentent 1 sous-unité a et 6 sous-unité c qui permettent la translocation de protons grâce à un changement de conformation qui implique un mécanisme de rotation (Imamura *et al.*, 2003). La sous-unité d permet l'assemblage de V0 et participe à sa stabilité tandis que la

sous-unité e n'a pas de fonction connue à ce jour (Milner, Ho and Hall, 1995; Ratajczak, 2000; Sze *et al.*, 2002). Le mécanisme d'assemblage et la spécificité d'adressage de ce complexe protéique restent relativement obscurs. Chez la levure, il a été montré que l'unité V0 était dans un premier temps enchâssée dans la membrane et que l'unité V1 venait se fixer par la suite. Ainsi, les auteurs ont montré que la sous-unité a, codée par deux gènes distincts, ferait la spécificité d'adressage de la protéine : codée par le gène VPH1P, le complexe protéique est adressé au tonoplaste ; codée par son homologue STV1P, elle est adressée aux autres endomembranes (Kanes *et al.*, 1992; Manolson *et al.*, 1994). Chez *Arabidopsis*, la sous-unité a est codée par trois gènes a1, a2, a3. De façon similaire au système d'adressage chez la levure, il a été montré que si le complexe V0 était assemblé avec la sous-unité a1, le complexe se retrouvait adressé au TGN alors que les sous-unités a2 et a3 étaient détectées uniquement au niveau du tonoplaste. En revanche, aucun de ces trois isoformes n'a montré une localisation spécifique au réticulum endoplasmique dont le système d'adressage reste encore inconnu (Dettmer *et al.*, 2006).

Afin de préciser les rôles de la V-ATPase dans le développement du fruit de tomate, Amemiya *et al.*, 2006 (Amemiya *et al.*, 2006) ont généré des lignées antisens de la sous-unité A sous le contrôle du promoteur 2A11 fruit spécifique. Ces lignées présentent une réduction de la taille du fruit de 49 à 79% par rapport au WT avec des contenus en glucose et fructose inchangés et une augmentation de la concentration en saccharose. Dans cette étude, les auteurs proposent que l'augmentation du contenu en saccharose soit due à une réduction de l'activité de l'invertase acide suite à l'alcalinisation de la vacuole. En revanche, il reste très difficile d'étudier l'implication de la V-ATPase spécifiquement dans la physiologie de la vacuole dans la mesure où de nombreuses sous unités du complexe sont communes au ATPase des autres endo-membranes, ce qui est le cas de la sous unité visée par cette étude.

- Les V-PPase

Au contraire de la V-ATPase, la V-PPase n'est constituée que d'un seul polypeptide de 761 à 771 acides aminés. Chez les plantes, il existe deux types de PPase, le type 1 (AVP1-like) activé par le potassium et le type 2 (AVP2-like) qui y est insensible. De plus, AVP2 est trois fois plus sensible au calcium que AVP1 (Drozdowicz, Kissinger and Rea, 2000; Maeshima, 2000). La surexpression de AVP1 chez *Arabidopsis* augmente la tolérance des plantes au stress salin et à la sécheresse grâce à une augmentation du gradient de protons qui permet de séquestrer le sodium en excès dans la vacuole et permet d'augmenter la rétention d'eau (Gaxiola *et al.*,

2001). Chez la tomate, on retrouve 5 isoformes de PPase de type 1 et 1 seul du type 2. Dans une étude s'intéressant à deux isoformes de type 1 (SIVP1 et SIVP2) et l'isoforme de type 2 (SIVP3), les auteurs ont montré que ces gènes étaient majoritairement exprimés dans les stades très précoces de développement du fruit (de 2 à 15 DPA). Des lignées RNAi sous la dépendance d'un promoteur fruit spécifique montrent un retard de croissance par rapport au WT dans les 5 premières semaines après anthèse mais finissent par présenter un phénotype proche de celui du WT à maturité. Autrement dit, les fruits issus de ces lignées continuent leur croissance même après que la plupart des fruits du WT soient à maturité (Mohammed *et al.*, 2012).

c- Autres transports : les acides organiques

Les acides organiques correspondent à une catégorie de métabolite s'accumulant de façon importante dans la vacuole. En effet, si la concentration cytosolique en malate reste relativement constante, le malate vacuolaire va pouvoir varier de façon importante, par exemple en réponse aux changements environnementaux (Gout *et al.*, 1993). De plus, son rôle central dans le métabolisme primaire (régulation du pH, cycle de Krebs, β -oxydation, production de NADH) et sa compartimentation imposent une régulation fine de son métabolisme. Le transport du malate au travers du tonoplaste a été largement étudié en utilisant des analyses de flux, des sondes fluorescentes ou encore des expériences de patch-clamp. Il ressort de ces études que le transport du malate est dépendant de la différence de potentiel électrochimique généré par les pompes à protons entre la vacuole et le cytosol (Martinoia *et al.*, 1985; Cerana, Giromini and Colombo, 1995; Hafke *et al.*, 2003). Un transporteur de malate au niveau du tonoplaste a par la suite été identifié au niveau moléculaire chez *Arabidopsis* par homologie avec un transport d'acide dicarboxylique chez les mammifères (Emmerlich *et al.*, 2003). Si les lignées T-DNA pour ce transporteur AtDT ne présentent pas de phénotype, leurs feuilles contiennent néanmoins 25 à 50 % moins de malate par rapport au WT, en raison de la diminution de l'activité du transport du malate de 20% et de la réduction de son accumulation dans la vacuole. L'homologue de ce transporteur a été décrit chez la tomate et de façon similaire, si les lignées RNAi présentent une croissance normale ainsi qu'un processus de maturation comparable au WT, le contenu en malate est réduit (Liu *et al.*, 2017). De façon intéressante, ces lignées présentent un contenu en citrate plus élevé, ce qui est en accord avec les résultats publiés par Frei *et al.*, 2018 (Frei *et al.*, 2018) montrant que la surexpression de AtTDT provoque une augmentation des concentrations en malate et une réduction de celles en citrate. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le transporteur TDT fonctionnait comme un antiport malate/citrate impliquant un import de malate contre l'export d'un citrate. Le faible phénotype

observé chez les lignées T-DNA ou RNAi suggère que le transport du malate se fait aussi par d'autres types de transporteurs. En effet, plus récemment les transporteurs de la famille des ALMT (aluminium activated malate transporter) ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Les vacuoles isolées sur-exprimant AtALMT9 montrent une augmentation du transport du malate alors que si le transporteur est réprimé, on observe une diminution du transport de ce dernier (Kovermann *et al.*, 2007). Ce phénotype a d'ailleurs été confirmé chez la tomate grâce à des lignées CRISPR-Cas9 pour ALMT9 (Ye *et al.*, 2017). Ensemble, ces données indiquent que le transport du malate se fait d'une part par un antiport malate/citrate TDT qui prend en charge la majeure partie de l'activité de transport, mais aussi par un canal ALMT qui importe un malate contre un proton.

Si le transport du malate au travers du tonoplaste commence à être relativement bien compris, celui du citrate reste plus obscur. Marin *et al.*, 1981 (Marin, Smith and Lüttge, 1981) ont montré que l'import de citrate dans la vacuole était stimulé par l'ajout d'ATP soulignant l'implication d'un transport ATP-dépendant. Au contraire, Oleski *et al.*, 1987 (Oleski, Mahdavi and Bennett, 1987) ont montré un transport indépendant de l'ATP et du gradient de proton dans des vacuoles isolées de fruit de tomate. De plus, les auteurs ont montré que l'import du citrate était inhibé par l'ajout de malate ou d'oxaloacétate suggérant un mécanisme de transport peu spécifique et saturable, probablement par diffusion facilitée. Ces données contradictoires semblent indiquer deux mécanismes différents pour l'import de citrate, l'un faisant appel à des canaux anioniques et l'autre au travers de transporteurs ATP-dépendant. Mais les analyses des flux de transport utilisant du citrate et du malate radio marqués et le fait que l'import de malate soit inhibé par l'ajout de citrate suggère que ces deux acides organiques utilisent les même transporteurs (Oleski, Mahdavi and Bennett, 1987; Martinoia and Rentsch, 1992; Canel, Bailey-Serres and Roose, 1995). Plus récemment, Shimada *et al.*, 2006 (Shimada *et al.*, 2006) ont identifié et caractérisé un transporteur de citrate, CsCit1 localisé au niveau du tonoplaste des cellules du citron et agissant comme symport $\text{citrateH}^{2-}/2\text{H}^{+}$. En revanche les vacuoles étant particulièrement acides chez le citron, les mécanismes de régulation et de transport des acides organiques sont potentiellement spécifiques à l'espèce et à l'heure actuelle, un transporteur spécifique du citrate au niveau du tonoplaste n'a pas été clairement identifié.

GENERAL OBJECTIVES

GENERAL OBJECTIVES

As a consequence of its agronomical importance, tomato (*Solanum lycopersicum*) has been intensively studied in terms of genetics, physiology and biochemistry, making tomato fruit an interesting model for studying fleshy fruit development. However, only few studies provided metabolic proprieties over the entire fruit growth allowing to have a dynamic and global view of metabolic changes linked to development. Recently, our team developed a kinetic modeling approach, allowing a precise and dynamic model of tomato fruit metabolism throughout fruit growth (Beauvoit *et al.*, 2014). This model emphasis the crucial role of vacuole growth dynamic in fruit development and established a close link between sugars metabolism and their subsequent subcellular compartmentation, vacuole growth and finally fruit growth. Indeed, the high accumulation of soluble sugars within de vacuole together with organic acids have been shown to be largely implicated in generating the osmotic-driven vacuole expansion especially during the cell division phase. In addition, it emphasis the controlling role of tonoplast localized sugar transporters on this process.

My PhD is part of the continuation of this work and consists in studying the hypotheses raised by the model. In this context, the aim was to generate transgenic lines affected on tonoplastic sugar transporters. This work was divided in three main part:

- Identify the candidate genes, corresponding to tonoplast localized sugar transporters, implicated in controlling vacuole expansion and by extension fruit size. This candidate genes will then be used to generate transgenic lines in order to affect the expression of the given candidates.
- Phenotype the best candidates' transgenic lines on macroscopic parameters (fruit size and shape, pericarp thickness...) at the metabolic levels (carbon content and enzymatic activities) and at the cell level (impact on cell size).
- Use the data collected to implement two types of model developed in our team: a flux balance analysis approach (Colombié *et al.*, 2015, 2017) and a kinetic modeling approach (Beauvoit *et al.*, 2014) to draw new conclusions especially on the energy cost and the control exerting by vacuole growth on fruit metabolism and fruit size.

Chapter 2

IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES CORRESPONDING TO TONOPLAST LOCALIZED SUGAR TRANSPORTERS IMPLICATED IN FRUIT GROWTH

—

LARGE SCREENING OF A T1 GENERATION

Chapter 2: Identification of candidate genes corresponding to tonoplast localized sugar transporters implicated in fruit growth - Large screening of a T1 generation

INTRODUCTION

Due to its large size, occupying up to 80% of the subcellular volume, vacuole expansion is the driving force of cell growth, mediated by osmotic enlargement of this later, thanks to a fine regulation of vacuolar storage/released of a multitude of different compounds. Sugars have been highlighted as ones of the main contributors generating the osmotic potential of the vacuole (Beauvoit *et al.*, 2014). However, knowledge on the proteins implicated in sugar transports as well as their regulation, specificities and kinetic proprieties are limited.

In order to better characterized the tonoplast localized sugar transporters implicated in vacuole growth, an approach of under or overexpression have been envisaged. In this chapter, we'll present the first steps of this project, dedicated to the choice of the strategies (under/overexpression), the candidate genes and the transformants identified as good candidates for full phenotyping and modeling.

To summary, we used the current knowledge in *Arabidopsis* to identify the homolog proteins in tomato. In addition, because these transporters are mostly secondary active transporters, we also selected the two type of proton pump shown to be localized on the tonoplast and implicated in generating the proton gradient necessary to energize the transports. As these proteins have been mostly characterized for their role in the growth of vegetative parts, we first check their expression in tomato fruit throughout the development. In a view of their relatively high expression in the fruit and in order to investigate their controlling role on vacuole growth, we generated a large population of RNAi transgenic lines targeting the selected candidate genes using two promoters, the constitutive 35S cauliflower promoter, to affected the entire plant and the PP2C fruit specific promoter to affect vacuole growth specifically in the fruit. In addition, for the genes that were low expressed, over expressing lines under the control of the PEPc promoter have also been generated.

In order to identify the best candidate's genes, we opted for a funnel strategy by starting to phenotype the transgenic population based on metabolic composition and the resulting

expression of the targeted genes. The lines presenting the highest metabolic phenotype were further characterized at the cell level. This first phenotyping revealed two interesting candidates, effected on TMTs gene expression (Tonoplast Monosaccharide Transporters) and exhibiting a drastic reduction of fruit size. Finally, the impact of TMTs under expression was investigated on the vegetative part of the plant by measuring the sugar content in the leaves.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and homological analysis of tonoplast sugar transporter genes

Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* isolated vacuoles (Carter *et al.*, 2004; Shimaoka *et al.*, 2004), reverse genetic approaches and bioinformatics analysis allowed to have a more precise view of the tonoplast proteins composition and to identify a wide range of transmembrane proteins implicated in sugar transport, as well as proton pumps in charge to generate the proton gradient necessary for secondary active transport. Among all the proteins identified, we selected those which have been experimentally shown to be directly implicated in sugar transport. Table 1 summarizes the candidate genes identified in *Arabidopsis thaliana*, associated with their Genebank locus ID and the references used to select them. Two families of tonoplast sugar transporters have been identified: The Major Facilitator Superfamily (MSF) characterized by twelve transmembrane domain proteins and the SWEET family containing proteins with seven transmembrane domains. Basing on the publicly accessible tomato (*Solanum lycopersicum*) genome (Tomato Genome Consortium 2012), we identified homologous sequences to *Arabidopsis* identified tonoplast sugar transporters and proton pumps in the tomato genome by BLAST analysis:

1. **Active sugar exporters** (sugars/H⁺ symporters): among the MSF family SISFP6 (Soly12g089180) the closest homolog (76% identity) of two *Arabidopsis* genes (AtERDL4 and AtERDL6), coding Glucose>>Fructose/sucrose/H⁺ symporter, and SISUC4 (Soly04g076960) homolog to AtSUC2, a sucrose/H⁺ symporter.
2. **Active sugar importers** (sugars/H⁺ antiporters): in *Arabidopsis*, the TMTs family (Tonoplast Monosaccharide Transporters) regroups three orthologue genes (AtTMT1, AtTMT2 and AtTMT3) and the VGTs family (Vacuolar Glucose Transporters) is composed of two members (AtVGT1 and AtVGT2) classified as sugars/H⁺ antiporters. We identified three tomato homologs SITMT1 (Soly03g032040 68.76% identity), SITMT2 (Soly04g082700 70.3% identity) and SITMT3 (Soly02g082410 71% identity) and two homologs SIVGT1 (Soly03g078000 66.5% identity) and SIVGT2 (Soly03g096950 71.81% identity) in the tomato genome. Their sequences are well conserved between the two species, as they group together in the same node based on a phylogenetic analysis (Figure 1).
3. **Passive transporters:** Two members of the SWEET family genes, AtSWEET16 and AtSWEET17, have been shown to be localized on the tonoplast and used to identify

their corresponding tomato homologs, SISWEET16 (Solyc01g099880 68% identity) and SISWEET17 (Solyc01g099870 69% identity).

We also selected candidate genes coding for the two types of proton pumps localized on the tonoplast: the subunit a of the V-ATPase, implicated in targeting the V-ATPase complex to the tonoplast and the V-PPase proton pump. In *Arabidopsis* the subunit a of the V-ATPase is encoded by three isoforms AtVHA-a1, AtVHA-a2 and AtVHA-a3, all three found in a conserved way in the tomato genome (with a percentage of identity of 75.2%, 71.38%, 73.98% respectively). The V-PPase proton pump is encoded by three different genes in *Arabidopsis*, AtVHP2.1, AtVHP2.2 clustering with the tomato homolog SIVP3 (Solyc04g071880 78.06% identity), and AtAVP1, which is phylogenetically close to the two tomato genes SIVP1 (Solyc07g007600) and SIVP2(Solyc03g117480) (80.61% and 79.44% of identity respectively).

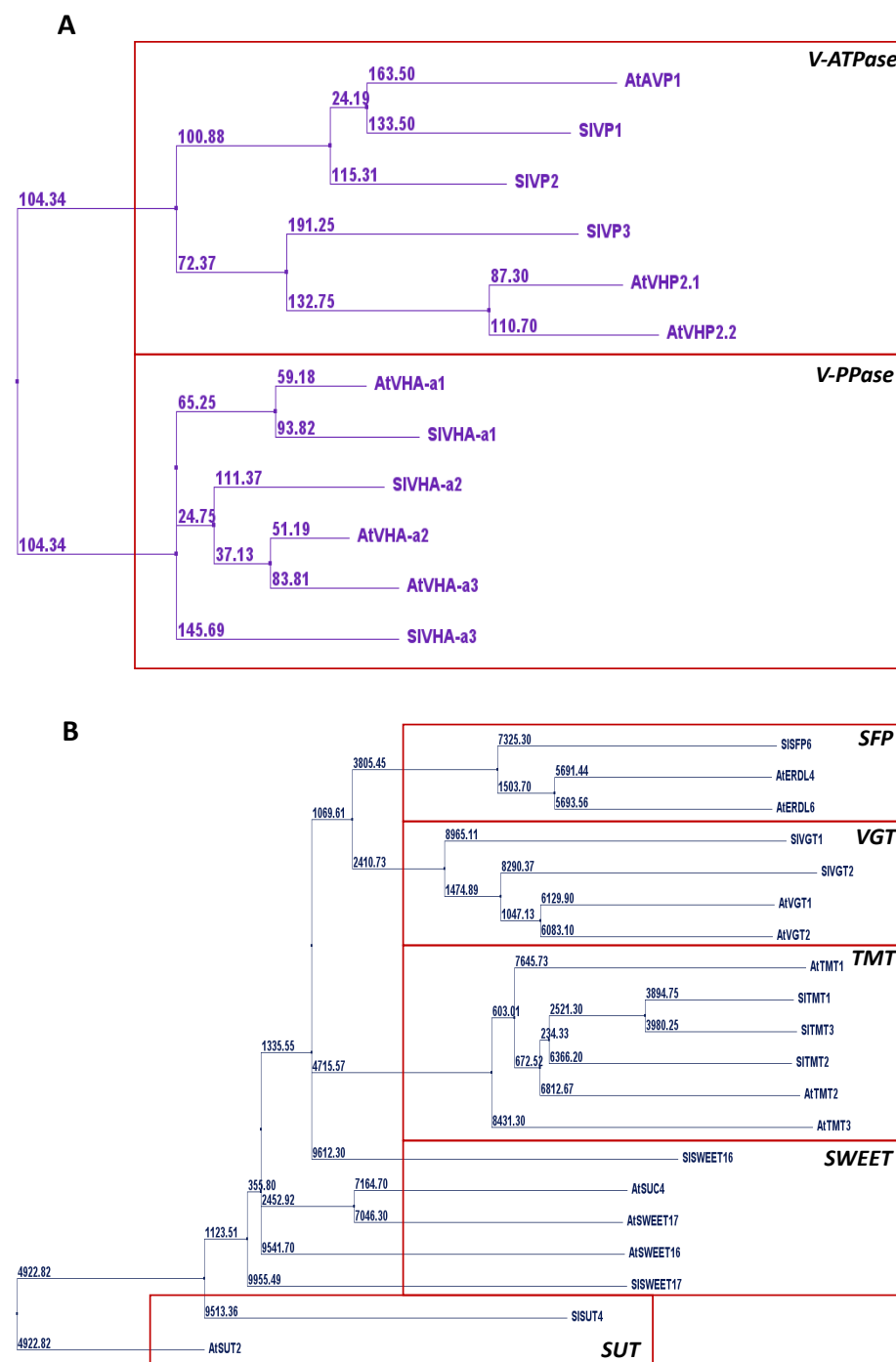


Figure1: Phylogenetic tree of tonoplast localized proton pumps and sugar transporters in *Arabidopsis thaliana* and tomato (*Solanum lycopersicum*). A. Proton pumps. B. Sugar transporters. The trees were constructed by neighbor-joining algorithm using Clustal Omega (NCBI) and visualized with Jalview (Waterhouse et al. 2009). Trees are constructed from a distance matrix formed from Jaccard distances between sequence features observed at each column of the alignment. Similarity at column $i = (\text{Total number of features displayed} - \text{Sum of number of features in common at } i) / \text{Total number of features displayed}$. Similarities are summed over all columns and divided by the number of columns. Since the total number of feature types is constant over all columns of the alignment, we do not scale the matrix, so tree distances can be interpreted as the average number of features that differ over all sites in the aligned region.

Protein name	<i>Arabidopsis</i> ID locus	Tomato ID locus	Function	Reference
VHA-a1	AT2G28520	Solyc06g075400	ATP-dependent proton pump subunit a	(Ratajczak, 2000; Sze <i>et al.</i> , 2002; Bageshwar <i>et al.</i> , 2005; Pizzio, Hirschi and Gaxiola, 2017)
VHA-a2	AT2G21410	Solyc07g032080		
VHA-a3	AT4G39080	Solyc01g110120		
VP1	AT1G15690	Solyc07g007600	PPi-dependent proton pump	(Suzuki, Maeshima and Yamaki, 1999; Drozdowicz, Kissinger and Rea, 2000; Gaxiola <i>et al.</i> , 2001; Li <i>et al.</i> , 2005)
		Solyc03g117480		
VHP2.1	AT1G78920	Solyc04g071880		
VHP2.2	AT1G16780			
ERDL6/ERDL4	ERDL4 AT1G19450 ERDL6 AT1G75220	Solyc12g089180	Glucose>>Fructose/sucrose export	(Yamada <i>et al.</i> , 2010; Poschet <i>et al.</i> , 2011; Klemens <i>et al.</i> , 2014)
SUC	SUC2	Solyc04g076960	Sucrose export	(Barker <i>et al.</i> , 2000; Endler <i>et al.</i> , 2006; Hofmann <i>et al.</i> , 2009; Schulz <i>et al.</i> , 2011; Schneider <i>et al.</i> , 2012)
TMT.1	AT1G20840	Solyc03g032040	Glucose/fructose/H ⁺ import	(Wormit <i>et al.</i> , 2006; Wingenter <i>et al.</i> , 2010; Schulz <i>et al.</i> , 2011)
TMT.2	AT4G35300	Solyc04g082700	Glucose/fructose/sucrose/H ⁺ import	(Wormit <i>et al.</i> , 2006; Schulz <i>et al.</i> , 2011)
TMT.3	AT3G51490	Solyc02g082410	?	(Wormit <i>et al.</i> , 2006)
VGT.1	AT3G03090	Solyc03g078000	Glucose/fructose/H ⁺ import	(Hammes <i>et al.</i> , 2005; Aluri and Bu, 2007)
VGT.2	AT5G17010	Solyc03g096950	?	
SWEET16	AT3G16690	Solyc01g099880	Fructose export	(Klemens <i>et al.</i> , 2013; Li-ping

				<i>et al.</i> , 2017)
SWEET17	AT4G15920	Solyc01g099870	Glucose, fructose, sucrose export	(Chardon <i>et al.</i> , 2013; Guo <i>et al.</i> , 2014; Li-ping <i>et al.</i> , 2017)

Table 1: Sugar transporters and proton pumps associated to the tonoplast of *Arabidopsis thaliana* and their corresponding homologs in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Arabidopsis* ID loci correspond to the Genebank ID. The functions of the genes have been attributed based on the cited publications. The homologs tomato genes correspond to those showing the highest identity percentage based on nucleotide BLAST (NCBI BLAST tool)

Expression of candidate genes during early fruit development

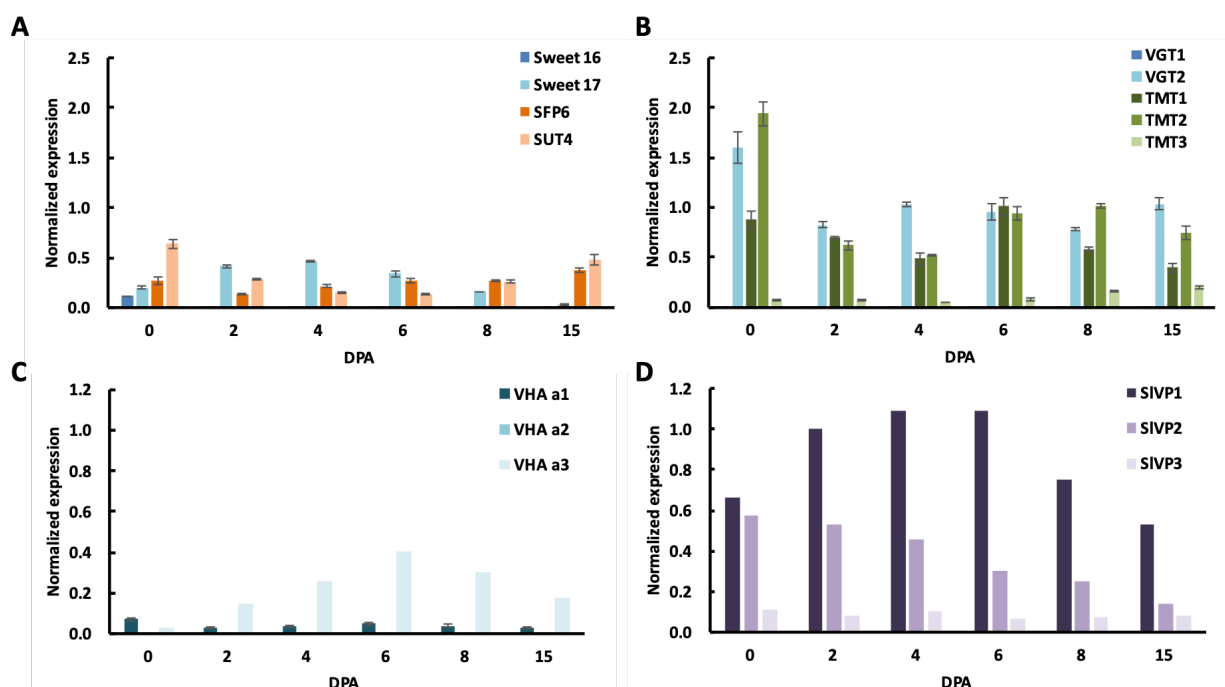


Figure 2: Relative gene expression of tonoplast sugar transporters and proton pumps exporters in the pericarp of tomato M82 fruits during early growth. A. Sugar exporters relative expression (SWEET16, SWEET17, SFP6 and SUT4) B. Sugars importers relative expression (VGT, VGT2, TMT1, TMT2 and TMT3). C. V-ATPase subunit a expression (VHA-a1, VHA-a2 and VHA-a3). D. V-PPase relative expression (SIVP1, SIVP2 and SIVP3). Error bars indicate SD between three biological replicates. DPA, days post anthesis.

The expression of the candidate genes was measured by Real-Time quantitative PCR using RNA extracted from the pericarp of fruit at different stages: 0, 2, 4, 6, 8 and 15 DPA. The sugar exporters were weakly expressed compared to the sugar importers (Figure 2A and 2B). Whereas the expression of SWEET 17 was relatively constant from 0 to 8 DPA, SWEET 16 was only expressed at pollination (0 DPA). The expression of SFP6 was relatively low and

constant during the first 15 days and SUT4 expression followed an inverted bell curve with the highest expression just after pollination (0 DPA), a decrease up to 6 DPA then followed by a re-increase.

Among the sugar importers, VGT1 was not detected in the pericarp and TMT3 was only weakly expressed. TMT1 expression was almost constant during the first 15 days of development, even if some variations were detected. The two last genes, VGT2 and TMT2, presented very similar expression patterns: high expression immediately after pollination, then a decrease by a factor 2 at 2 DPA followed by a plateau up to 15 DPA. Interestingly, between 2 and 15 DAA, these 3 genes were similarly expressed.

Regarding proton pumps, the V-PPases (SLVP1 and SLVP2) were mostly expressed in the early stages of development, 6 to 10 times more than the V-ATPase. These data are consistent with data showing that the high level of biosynthesis in these early stages generates a large amount of PPi available for membrane transport (Martinoia, Maeshima and Neuhaus, 2007). In more detail, SLVP1 and SLVP2 transcript levels were similar at 0 DPA, then SLVP2 decreased progressively whereas SLVP1 followed a bell curve with the highest level of expression from 2 to 6 DPA. Regarding V-ATPase subunit a, VHA-a3 was the most highly expressed with a maximum reached at 6 DPA whereas the two other isoforms were weakly expressed.

Design of the RNAi sequence and generation of transgenic lines

In order to evaluate their respective importance for fruit growth, RNAi-mediated gene silencing was performed for all identified and significantly expressed encoding tonoplasmic proton pumps and sugar transporters. Figure 3 shows the position of the RNAi fragment on the cDNA sequence of the candidate genes. For the TMTs family, the position of the RNAi fragment was chosen in an area that shares the highest homology between TMT1 and TMT2 in order to target both genes at the same time. Two RNAi fragments were cloned, one of 300 base pairs designed on the exon 2 of TMT1 cDNA sequence, sharing 42% of identity with TMT2, and the other designed on the exon 3 of TMT2 with a length of 285 base pairs, sharing 42.08% of identity with TMT1. The RNAi fragment relating to SFP6 was designed to straddle exons 5 to 8 with a length of 300 base pair. Regarding VGT2, the RNAi fragment of 300 base pairs straddles exons 6, 7 and the start of exon 8. SWEET17 RNAi fragment measuring 300 base pairs is straddling exons 3 and 4.

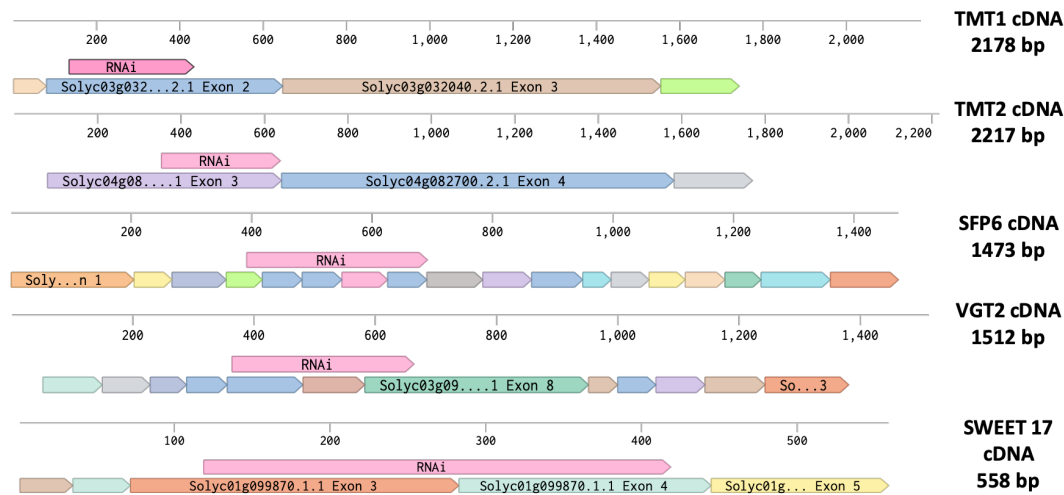


Figure 3: Position of the RNAi sequence on the cDNA of the candidate genes. The RNAi fragment is indicated by a pink bar with the mention « RNAi ». The other colored bars symbolize the exons of the corresponding gene. The length of each cDNA is indicated. Data on the cDNA were extracted from www.solgenimics.com.

The RNAi fragments were cloned in a pK7GWIWG2(I) (VIB collection), under dependency of the 35S cauliflower constitutive promotor. From the T0 generation, independent lines were selected to be conducted in T1: 5 transgenic lines for SWEET1735S RNAi, 4 for SFP6 35SRNAi, 3 for TMT1 35SRNAi, 5 for TMT2 35SRNAi and 2 for VGT2 35SRNAi.

In parallel, the same RNAi fragments were cloned in a pK8GWIWG-PPC2-B4 (VIB collection) and placed under the dependency of the fruit specific promotor PP2C (Guillet *et al.*, 2012) in order to repress the expression of the gene in a fruit specific way. Independent lines were selected: 4 lines for SFP6PEPcRNAi, 5 lines for TMT1PEPcRNAi and 4 lines for TMT2PEPcRNAi.

Finally, as SWEET genes are weakly expressed in the fruit, we generated over-expressing lines in which the cDNA sequence of SWEET16 and SWEET17 were placed under the dependency of the fruit specific promotor PP2C. From these two constructions 4 independent lines for SWEET16 and 3 independent lines for SWEET17 were selected.

For the 35SRNAi constructions, the independent lines were selected from the T0 generation, based on gene expression analysis for the target genes in fruit, whereas the PEPc lines were selected based on the detection of the transgene by PCR. The results of qPCR analysis are presented in figure S1 (Supplemental data). In the absence of WT plants as control, the transcript level of a targeted gene was compared to the mean level in all plants designed to repress another gene, as a reference.

Unfortunately, we didn't succeed in regenerating plants from the callus transformed with the 35S-VHAa1, a2 and a3 RNAi construction. In addition, if we succeeded to obtain plants from the callus transformed with 35SRNAi SIVP1, SIVP2 and SIVP3, when checking the insertion of the transgene by PCR, none of them showed positive results. The aim to get plants affected on proton pump gene expression was abandoned.

T1 plants were then grown in the greenhouse and for each plant, fruits were harvested at 4 stages: 8, 16, 30 DPA and Red ripe. Growth traits (fresh weight, diameters) and biomass composition (starch, free sugars, organic acids and protein content) were measured at the 4 stages. Other variables were measured at more specific stages: transporter gene expression at 16 DPA, mean cell area and number of cell layers at 30 DPA cell, pericarp thickness at 30 DPA and Red ripe.

Fruit growth is negatively correlated to starch and proteins amount

The dataset was first explored as a whole, regardless of developmental stages, using a correlation analysis as a mean of assessing whether or not the main compounds, sugars, organic acids and proteins were related to growth.

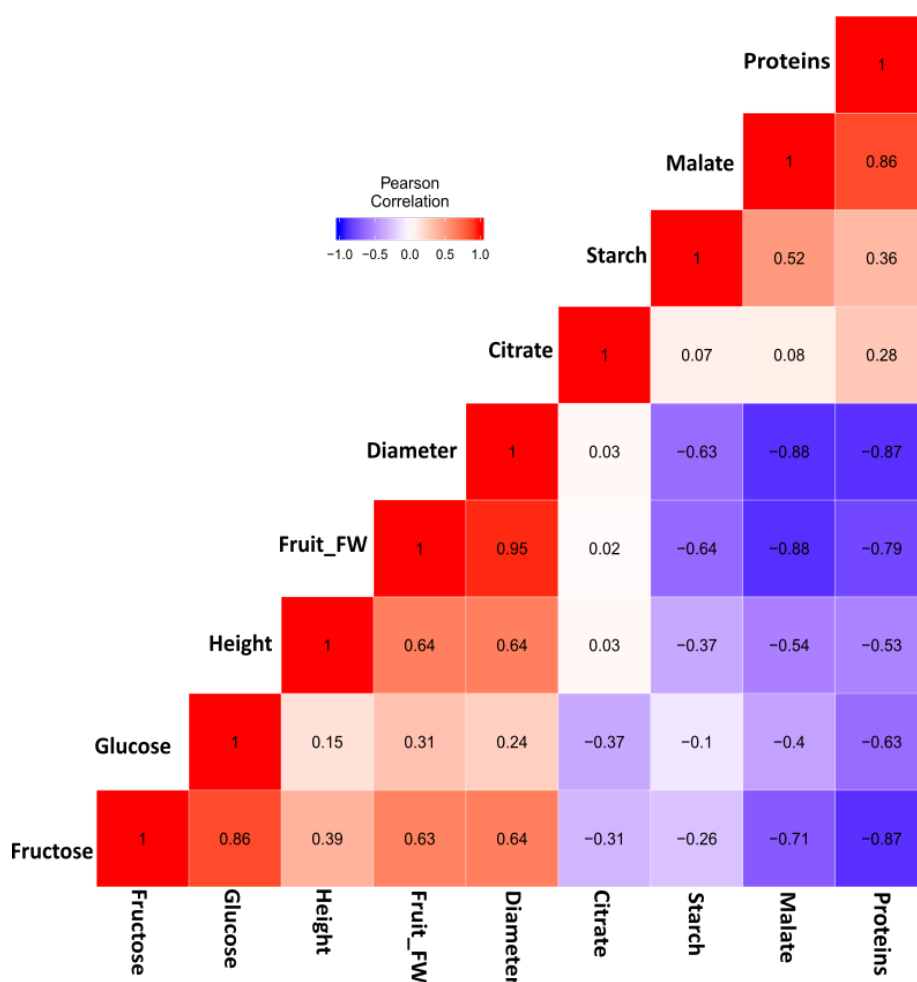
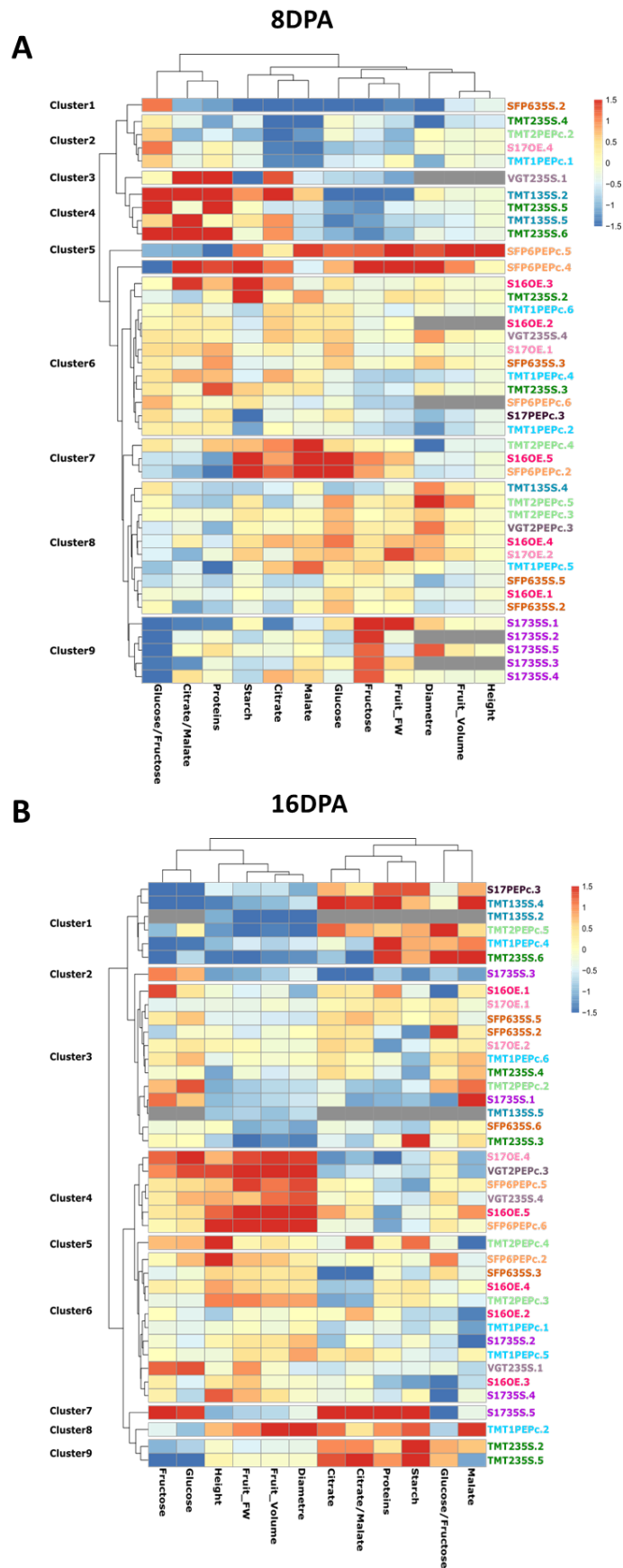


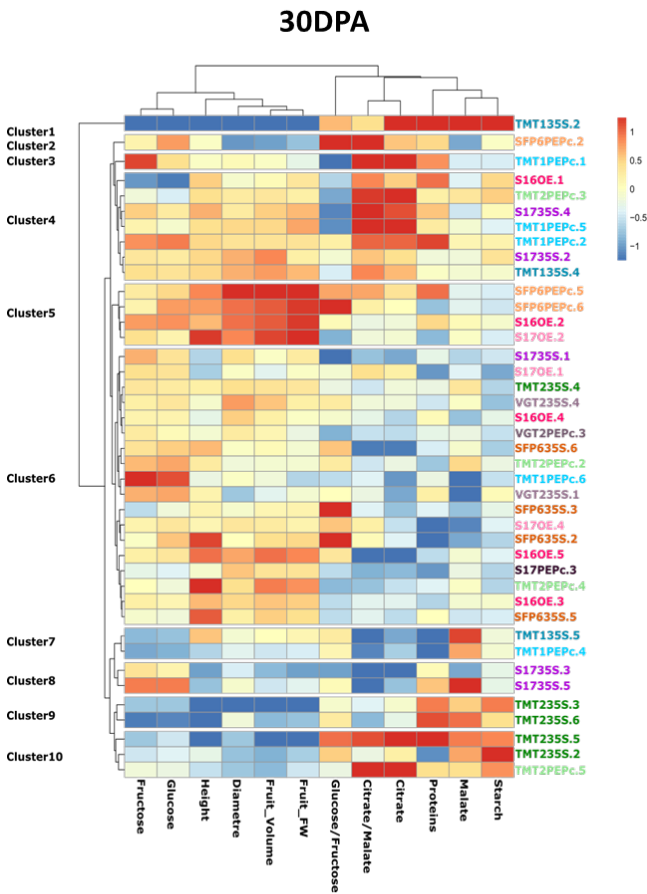
Figure 4: Heatmap correlation matrix of metabolic and fruit growth parameters measured on the T1 generation. The red color shows the parameters positively correlated and blue color indicates the parameters negatively correlated. The intensity of the colors reflects the degree of correlation. The numbers indicated the Pearson r correlation between the two variables.

The correlation matrix is shown in figure 4. The strong correlation found between the free sugars, mainly fructose and to a lesser extent glucose, and growth (expressed as FW, fruit diameter or fruit height) is in good agreement with their role in the decrease of the vacuolar water potential, driving the water influx for cell enlargement. On the contrary, growth was negatively correlated to protein content, starch and malate content.

Two interesting clusters of candidate genes can be extracted from the T1 population



C



D

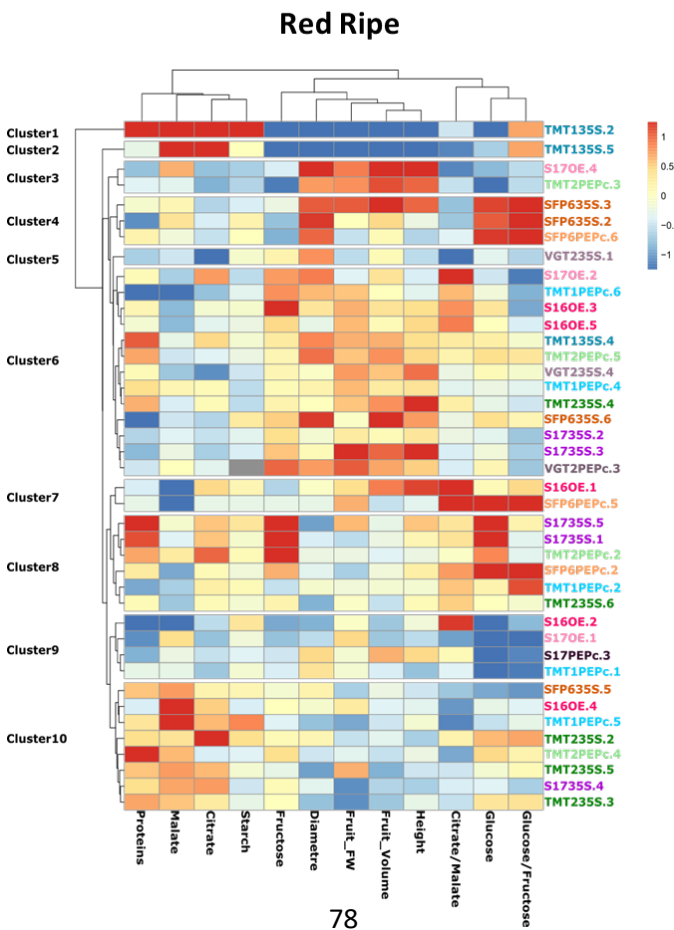


Figure 5: Hierarchical clustering of T1 individuals depending on their metabolic composition and fruit growth traits measured at 4 developmental fruit stages (8, 16, 30 DPA and Red ripe). The metabolites are in the columns and the genotypes are in the rows. Columns are mean-centered, with relative abundance represented by color (blue, lower abundance; red, higher abundance), as indicated in the legend. The data have been normalized against the WT. Metabolites and fruit growth parameters are clustered by the upper dendrogram, while the genotypes are clustered by the left dendrogram.

Taking 8 DPA as reference, 10 clusters were identified. Cluster 6 corresponds to lines closest to the WT. Two interesting clusters can be distinguished (Figure 5A):

The first one corresponds to Cluster 4, which groups TMT135S.2, TMT235S.5, TMT135S.5 and TMT235S.6. These lines were mostly affected in their capacity to accumulate glucose and fructose. Indeed, they respectively accumulated 6.6, 2.1, 1.9 and 2.2 times less glucose and 3.6, 1.4, 1.5 and 1.4 times less fructose than the WT (Figure 6). In addition, the glucose/fructose ratio was modified with an increase ranging between 1.2 and 1.8 compared to the WT lines, with the strongest phenotype observed for TMT135S.2. According to literature, sucrose is the major form of sugar entering the tomato fruit cell at young stages (Damon *et al.*, 1988). It's degradation by invertase would produce glucose and fructose (ratio Glc/Fru = 1) and by SUSY, only fructose (+ UDPG). The only way to increase glucose content independently of fructose content is the degradation of starch. However, these 4 transgenic lines accumulated more organic acids during the youngest stages and more starch (See supplemental data Figure S2). In consequence, we might assume that the increase of the ratio Glu/Fru reflect a better use of fructose in these transgenic lines. Among these 4 transgenic lines, TMT135S.2 was clearly the most affected by the repression of sugar transporters, presenting the highest phenotype. Interestingly, while the behavior of the TMT35SRNAi lines followed a similar pattern regarding their metabolic composition, their distribution in the different clusters was significantly changed during development. Indeed, TMT135S.2 and TMT135S.5 became clear outliers showing extreme phenotypes, clustering together and far from the other lines at the Red Ripe stage (cluster 1).

The second cluster clearly emerging at 8DPA corresponds to Cluster 9, which groups the SWEET35SRNAi lines S1735S.1, S1735S.2, S1735S.3, S1735S.4 and S1735S.5. These lines were characterized by an increase in fructose compared to WT. On average, fructose was increased by a factor 1.7 in SWEET1735S.5 to 2.4 in SWEET1735S.1, which presented the most pronounced phenotype (Figure 6). However, there was no difference found for the other measured traits. Moreover, this cluster grouping together the SWEET1735SRNAi lines

disappeared when considering the other developmental stages, suggesting that SWEET17 would only play an important role in fructose transport during early fruit development. Assuming that in tomato fruit, hexoses are mostly accumulated in the vacuole (Beauvoit *et al.*, 2014), the role of SWEET17 is probably to export fructose out of the vacuole for its use in the cytosol. In this case, a reduction of its expression would lead to an over accumulation of fructose within the vacuole.

The 8 DPA stage also revealed interesting PEPc lines even if the phenotype was less strong. Indeed, TMT1PEPc.1, TMT1PEPc.2, TMT1PEPc.4 accumulated less hexoses than the WT (59, 60 and 57 $\mu\text{mol/gFW}$, respectively for the transgenic lines against 71 $\mu\text{mol/gFW}$ for the WT) (Figure 6). This phenotype was amplified at 16 DPA for TMT1PEPc.4, and TMT1PEPc.2 that clustered with TMT135S.2 and TMT235S.5, respectively.

Interestingly there was a clear tendency for the phenotype to attenuate as the development progressed. Indeed, if the TMT35S cluster is still very clear at 30 DPA (cluster 9 and 10), it is less clear at maturity since TMT135S.2 and TMT235S.5 are in cluster 1, TMT235S.5 in cluster 10 and TMT35S.6 in cluster 8. It suggests that the roles of these transporters are less important at later developmental stages (from 30 DPA to red ripe), as the phenotype tended to disappear.

8 DPA

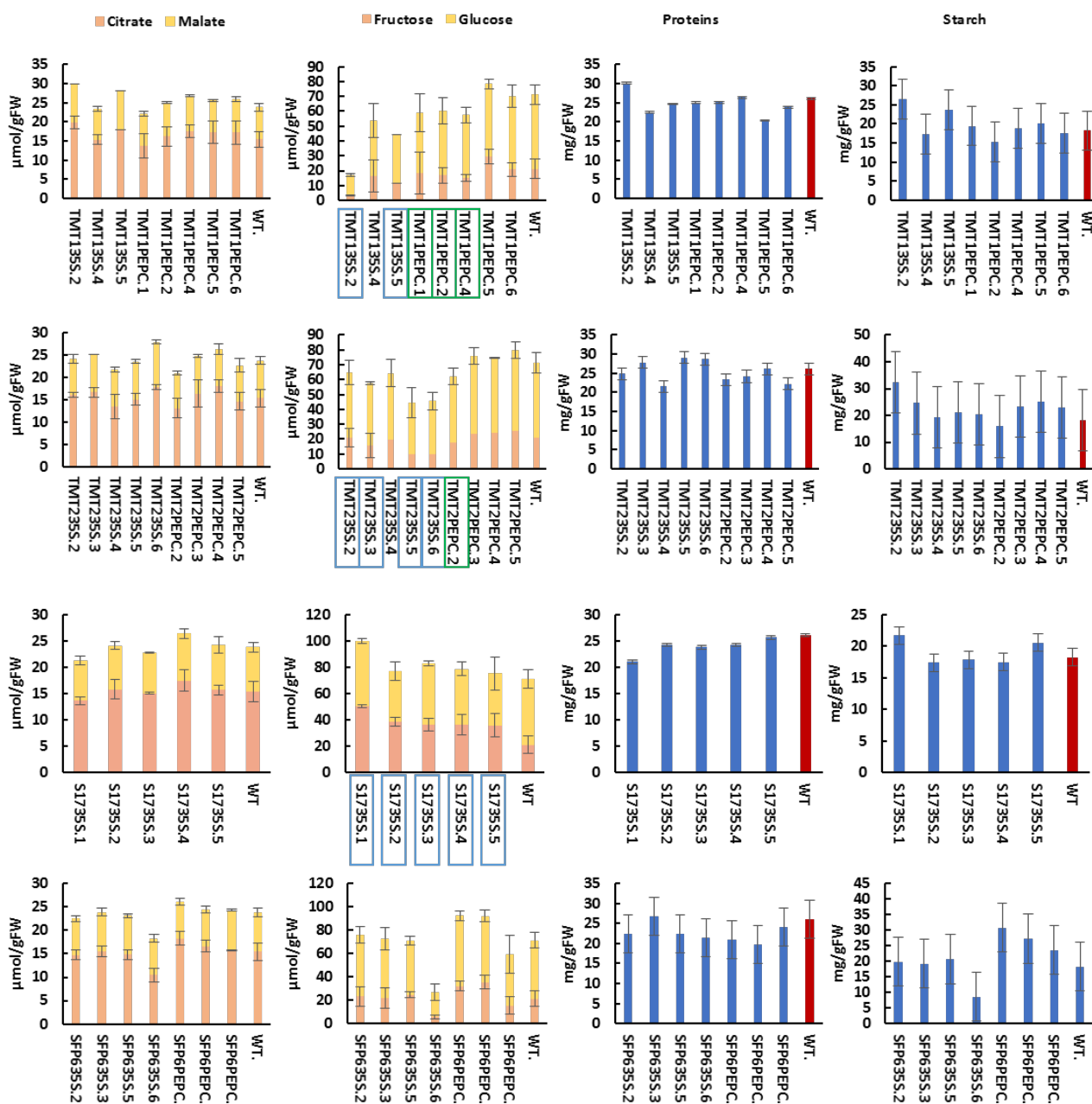


Figure 6: Metabolic composition in organic acids (citrate and malate), sugars (fructose and glucose), protein content and starch of the pericarp of transgenic lines and WT at 8DPA. The values represent the mean $\pm$ SD (n=3). Significant differences compared to the WT are shown by an asterisk according to a one-way ANOVA test followed by TuckeyHSD. The lines whose name is framed indicate interesting candidates showing a phenotype distinct from the WT.

Selected lines showed a reduction of the targeted gene expression

In order to confirm that the metabolic phenotype observed was correlated with the reduction in the expression of the targeted gene, we performed qPCR on the different lines previously mentioned on the 16 DPA pericarp samples mainly because it corresponds to the maximum expression of the PEPc promotor used for the RNAi construction (Fernandez *et al.*, 2009).

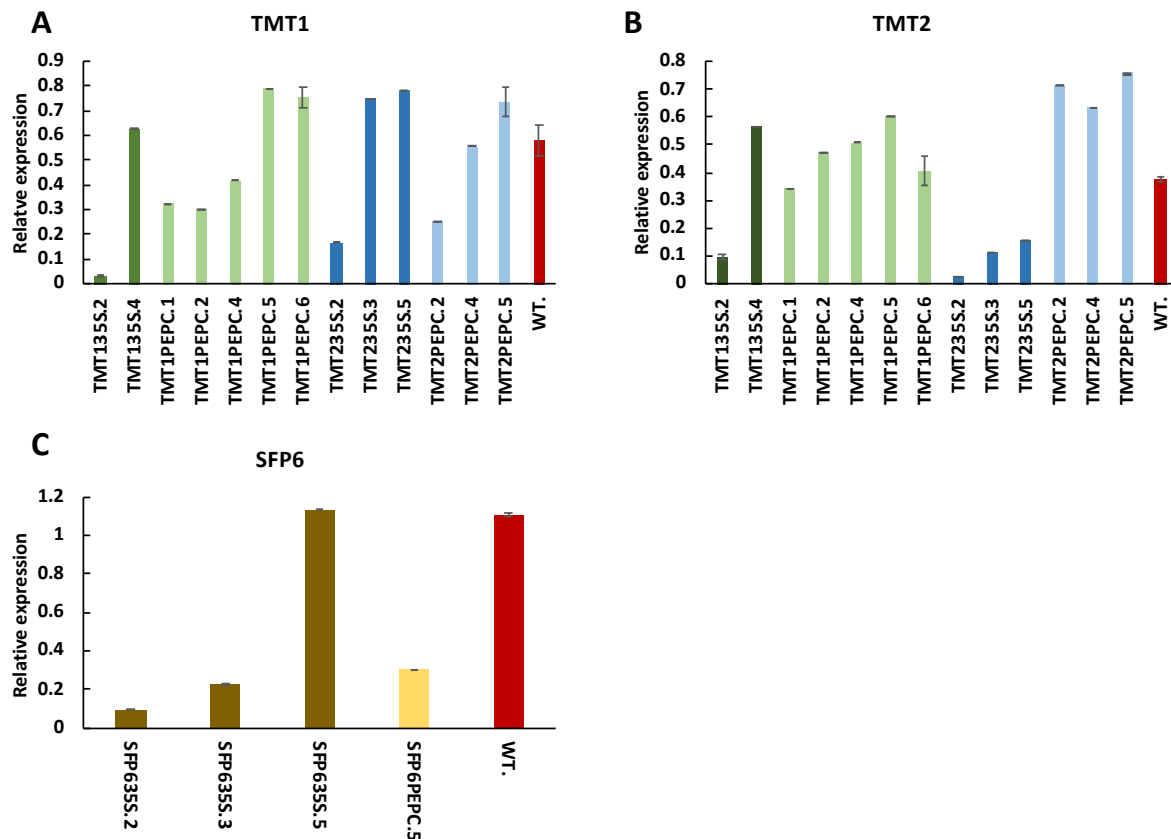


Figure 7: Relative gene expression of the candidate genes in the transgenic lines and WT in 16 DPA pericarp fruit sample. A. TMT1 relative expression B. TMT2 relative expression C. SFP6 relative expression. Error bars indicate SD between three biological replicates.

The expression of TMT1, TMT2 and SFP6 genes have been measured in the transgenic lines supposed to be affected for the corresponding genes (Figure 7). TMT135S.2, TMT1PEPC.1, TMT1PEPC.2, TMT1PEPC.4 showed significant reduction of TMT1 expression of 94%, 44%, 47% and 28% respectively. Interestingly, the expression of TMT1 was also reduced by 71% in TMT235S.2 and 43% in TMT2PEPC.2. Conversely, the RNAi construction used to repress TMT2 also affected TMT1 expression (Figure 7A). Regarding TMT2 expression, it was reduced by 74% in TMT135.2 and by 92%, 69% and 58% in TMT235S.2, TMT235S.3 and TMT235S.5, respectively. As it was the case for TMT2, the RNAi construction

targeting TMT1 was not specific and allowed a TMT2 under-expression. However, in some lines (TMT235S.3 and TMT235S.5), TMT2 was under-expressed whereas TMT1 was not modified. This would indicate that the cross effect depends on the insertion site of the transgene.

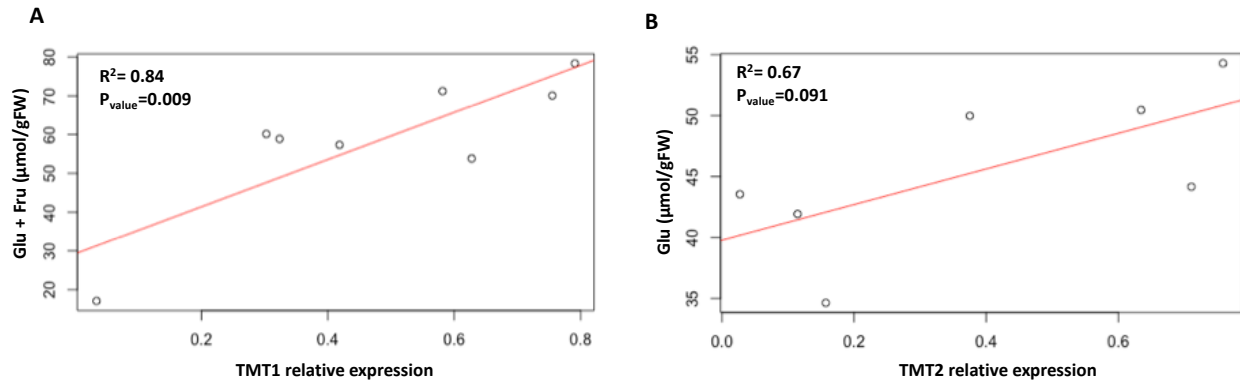


Figure 8: Correlation between TMT relative expression and sugar content in transgenic lines. A. Correlation between TMT1 relative expression and glucose + fructose content in TMT135S.2, TMT135S.4, TMT1PEPC.1, TMT1PEPC.2, TMT1PEPC.4, TMT1PEPC.5, TMT1PEPC.6 and the WT. B. Correlation between TMT2 relative expression and glucose content in TMT235S.2, TMT235S.3, TMT235S.5, TMT2PEPC.2, TMT2PEPC.4, TMT2PEPC.5 and the WT.

Interestingly, the hexose content was significantly correlated with the level of TMT1 relative expression in the TMTRNAi lines ($R^2=0.84$, $p_{\text{value}}=0.009$) (Figure 8A). In the TMT2 RNAi lines, the correlation was not significant ($R^2=0.63$, $p_{\text{value}}=0.12$), however the R^2 was increased when TMT2 expression was correlated to glucose content ($R^2=0.67$, $p_{\text{value}}=0.09$) potentially translated a difference in the affinity of TMT2 transporter for glucose and/or fructose (Figure 8B). This lack of significant correlation can be explained by the fact that we obtained less TMT2RNAi lines presenting a clear and strong phenotype compared to TMT1RNAi lines.

Regarding SFP6, its expression was reduced by 91% in SFP635S.2, by 79% in SFP635S.3 and by 72% in SFP6PEPc.5 (Figure 7C), but without any phenotype. As the expression of this transporter is low in the fruit (Figure 2), it is possible that SFP6 does not play an important role in sugar transport during vacuole growth in the fruit or, that its under-expression has been compensated by other transporters.

Unfortunately, we were not able to detect the expression of SWEET17. Indeed, SWEET17 transcripts were well detected in very young fruits and then rapidly decreased to an almost undetectable level (Figure 2). This result is consistent with the fact that the phenotype of fructose accumulation was not visible at 16 DPA. It would be necessary to measure

SWEET17 transcripts in younger fruits (between 0 and 8 DPA).

Cell size and fruit weight are reduced as a consequence of under-expressing TMTs

The TMT transformants being the most affected, we decided to study them more deeply. Cell size was measured at 30 DPA, in two areas of the pericarp, the upper area corresponding to the area between the vascular bundles and the outer epidermis, and the lower area corresponding to the area between the vacuolar bundles and the inner epidermis. The results are presented in Figure 9. In general, the cells of the upper area were smaller than those of the lower one (Figure 9A and 9B). On average over the two areas, TMT135S.2, TMT135S.5, TMT235S.5 and TMT235S.6 showed a significant and similar reduction of cell surface of around 1.7 fold compared to the WT. In contrast, none of the PEPc lines studied showed a significant difference in cell surface area.

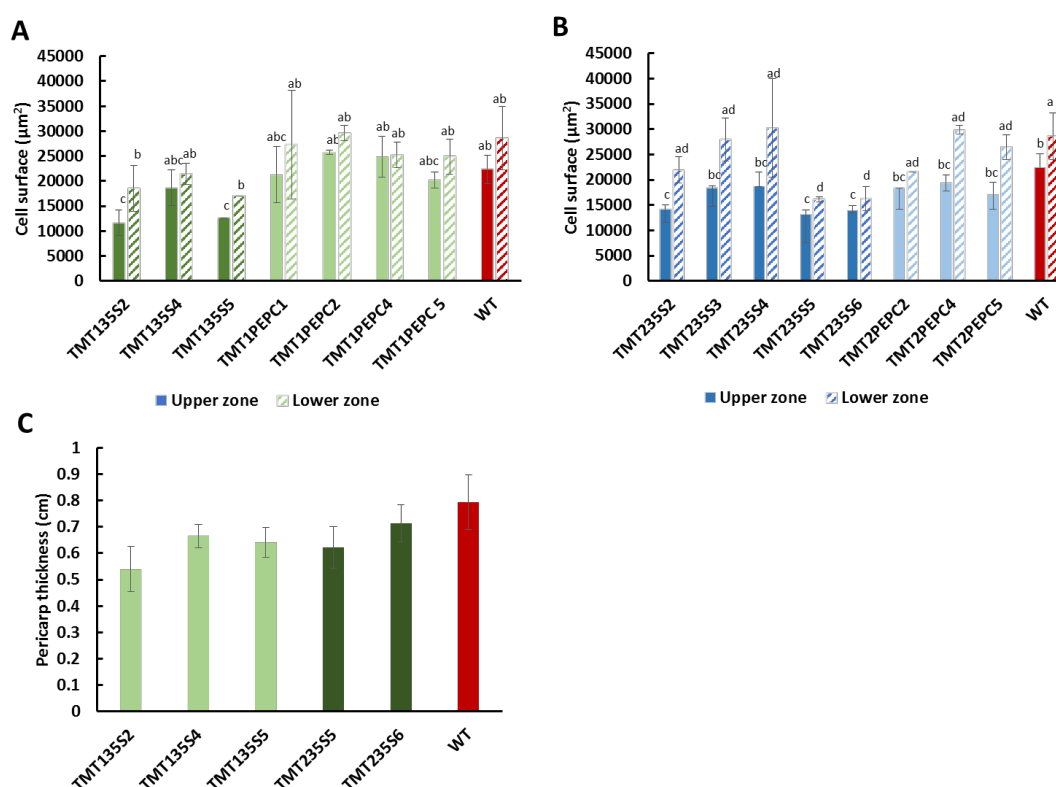


Figure 9: Effect of TMT repression on cell size and pericarp thickness. A. Cell surface in the upper (full colored bar) and lower (dashed bar) part of the pericarp for TMT135S and TMT1PEPc RNAi lines B. Cell surface in the upper (full colored bar) and lower (dashed bar) part of the pericarp for TMT235S and TMT2PEPc RNAi lines. The bar represents the mean value (n=3 individuals). Each measurement was done on 3 fruits collected on 3 different individuals and 2 different areas within the pericarp. The letters show the significant differences according to a one-way ANOVA test followed by TuckeyHSD.

As a consequence of the reduction of the cell surface, we also found a reduction in the pericarp thickness at the mature stage of the fruit (Figure 9C) with the most pronounced phenotype found for TMT135S2 ($0.54 \pm 0.08\text{cm}$ for TMT135S2 and $0.79\text{cm} \pm 0.1$ for the WT).

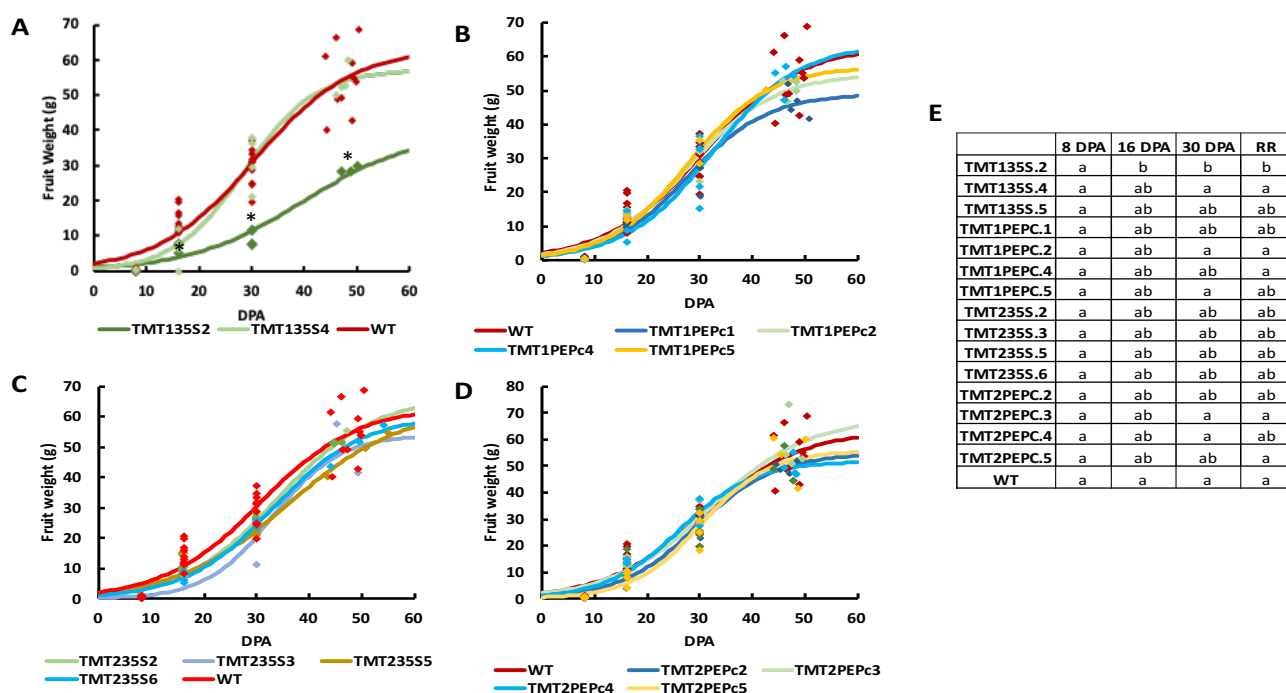


Figure 10: Growth curve of the fruit of transgenic lines compared to WT. A Fruit growth evolution for TMT135S RNAi lines. B Fruit growth evolution for TMT1PEPc RNAi lines. C Fruit growth evolution for TMT235S RNAi lines. D. Fruit growth evolution for TMT2PEPc RNAi lines. D. Statistical analysis showing the differences between the individuals for each experimental time point (8, 16, 30DPA and red ripe) according to a one-way ANOVA test followed by TukeyHSD. The points represent experimental data and the lines represent the fit of experimental time points using a sigmoidal function.

Fruit growth was clearly reduced in TMT135S.2, resulting in fruits 2 times smaller than in the WT at ripeness (54.5 gFW for the WT against 25 gFW for TMT135S.2) (Figure 10A). For all the other lines studied, there was no significant difference in fruit weight compared to the WT (Figure 10B, C and D).

This result could be explained by the large biological variation. The heterogeneity of the T1 population due to the heterozygous state of the transgene could explain the high variations between the transgenic lines. Indeed, even if the RNAi is supposed to be dominant, we don't know the potential effect of a variation of RNAi hairpin quantity between a homozygous or

heterozygous line. However, the phenotypic variability was particularly high for the WT, in which the FW of ripe fruits ranged from 40 to 70g. The high sensitivity of M82 to high temperatures (Mazzeo *et al.*, 2018) could explain our results. Indeed, the T1 culture has been conducted in the summer of 2019, during which the weather conditions were drastic with a 2 weeks heatwave. A direct consequence of high temperature was the development of blossom end rot in the WT, affecting most of the fruits with an impact on their development in terms of size and probably metabolic composition. Strikingly, the transgenic fruits were not affected by this non-pathogenic disorder. It is also known that pollen is very sensitive to high temperature and becomes sterile (Pressman, Peet and Pharr, 2002; Mazzeo *et al.*, 2018). This affects fruit pollination and induces abortion of the ovary or abnormal development of the fruit. Because the fruits have been sampled without preconceptions on their size but simply with reference to their age, we have potentially sampled abnormal fruit.

We will see in the next chapter that when tomato was grown under optimal conditions the final mass of M82 fruits was higher (65 to 85 g), whereas that of TMT135S.2 fruits remained unchanged. It is therefore possible that the unfavorable environmental conditions have masked some phenotype that would have been revealed in normal conditions. In the end, only drastic phenotypes were significantly highlighted.

In conclusion, to see more fine variations of the phenotype between the transgenic lines and the WT, the culture should be remade with the lines presenting the most interesting phenotypes, especially the PEPc RNAi lines (TMT1PEPc.1, .2 and .4 as well as TMT2PEPc.2). Indeed, better culture conditions and the fact that the lines would be in second generation with higher chances to get homozygous lines for the transgene could reveal more pronounced phenotypes. In a view of these results, we choose to continue to work with the two 35SRNAi lines that presented the clearest phenotypes: TMT135S.2 and TMT235S.6.

Two TMTs RNAi lines show a reduction in sugar concentration in leaves

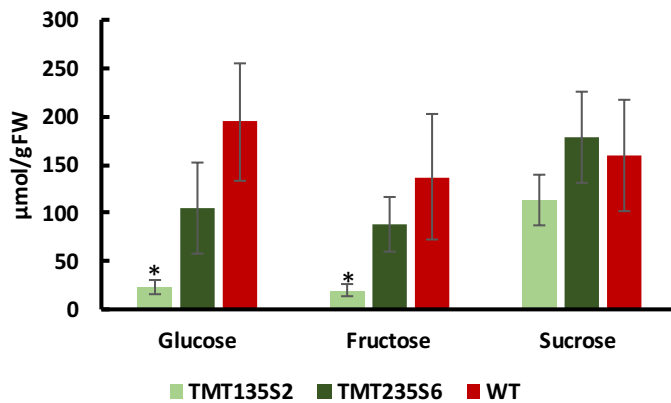


Figure 11: Glucose, fructose and sucrose content in the fourth leaf of transgenic lines compared to WT. Glucose, fructose and sucrose content are expressed in $\mu\text{mol/gFW}$ and have been measured in the fourth leaf collected when its length reached 15 cm. The values represent the mean ($n=4$) $\pm$ SD.

As we used a constitutive promotor to express the RNAi construction, we measured sugar concentration (glucose, fructose, sucrose) in the fourth leaf of the plants when it reached a size of 15 centimeters (Figure 11). TMT135S.2 showed a clear and significant reduction in glucose and fructose ($24 \pm 7 \mu\text{mol/gFW}$ and $20 \pm 6 \mu\text{mol/gFW}$ for glucose and fructose concentration in TMT135S2 compared to $194 \pm 60 \mu\text{mol/gFW}$ and $137 \pm 65 \mu\text{mol/gFW}$ in the WT). TMT135S.2 accumulated less sucrose than the WT, but the difference was not significant. For TMT235S.6, the differences were not significant compared to the WT (Figure 11).

Taken together, these results show that although glucose and fructose were strongly reduced in the RNAi lines, sucrose was only slightly (TMT135S2) or not (TMT235S.6) affected. This suggests that the export of sucrose produced by the leaves (source organs) to the fruits (sink organs) was not strongly impacted. However, this will need to be confirmed in future studies.

SUPPLEMENTAL DATA

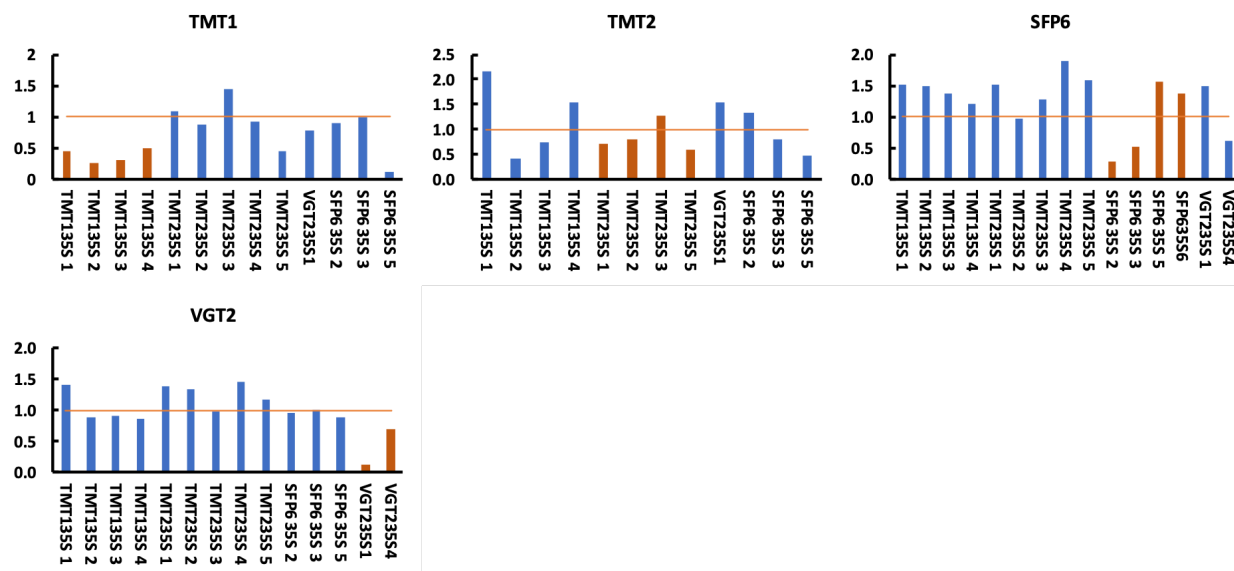
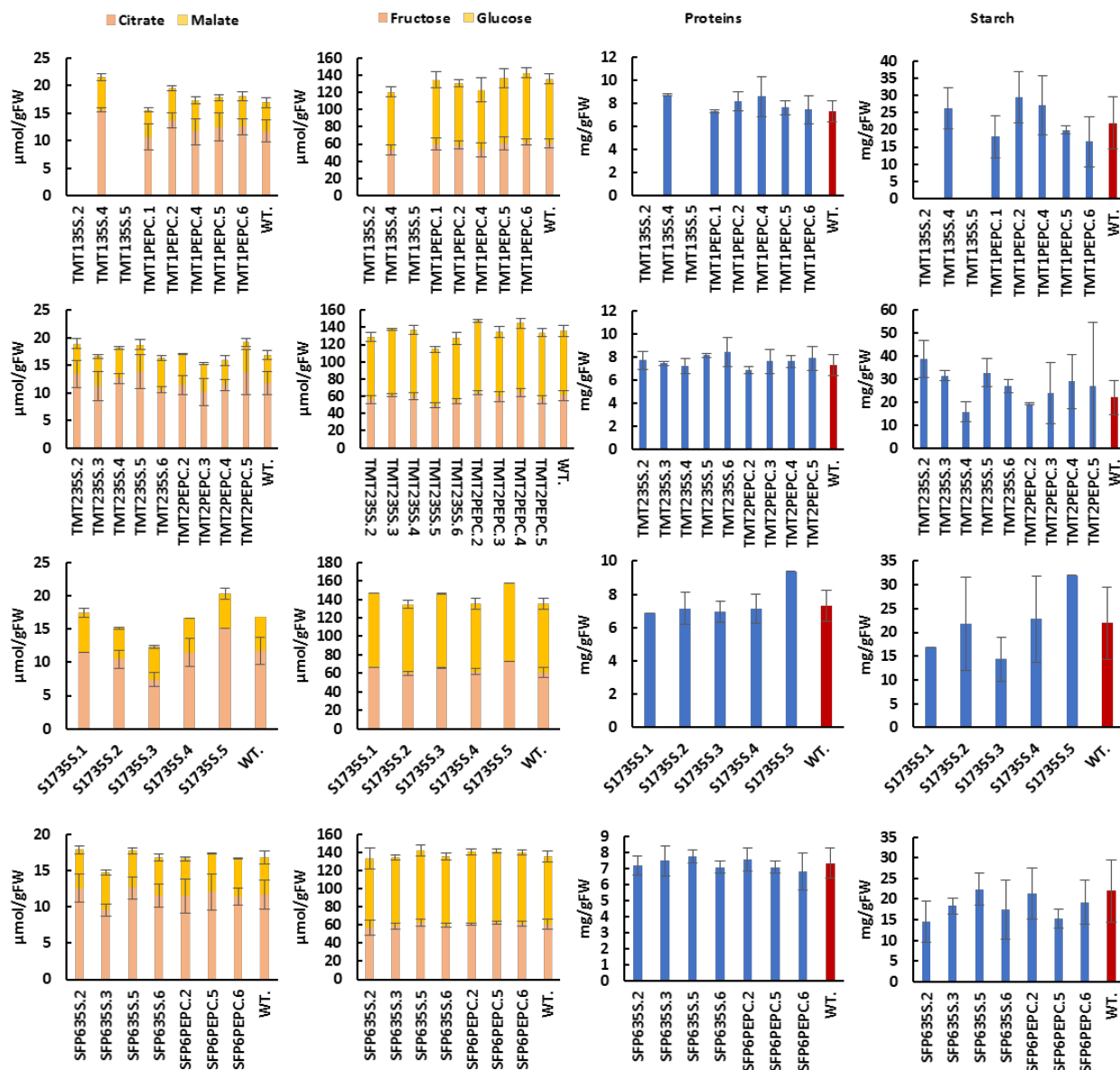
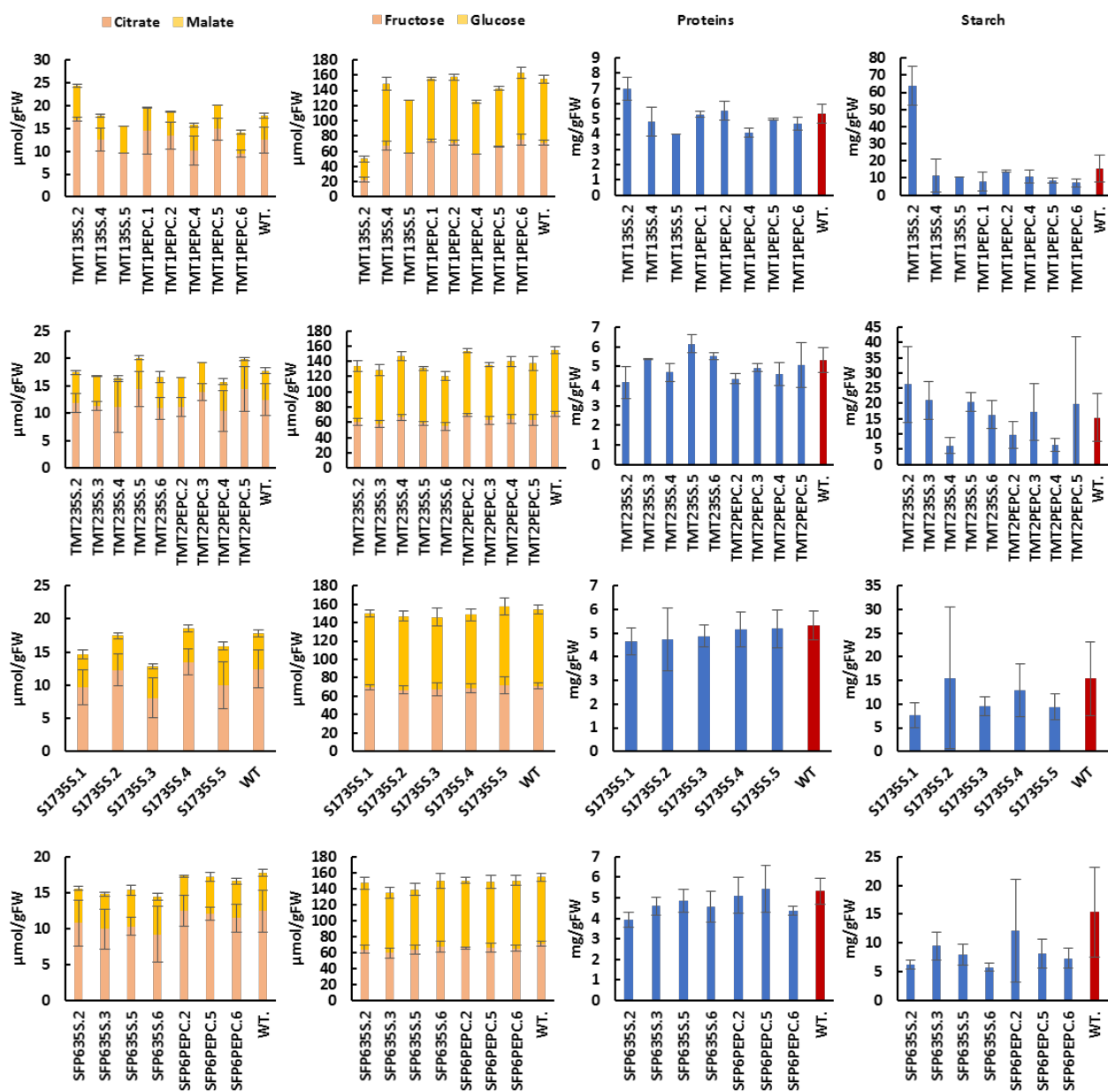


Figure S1: Relative gene expression of TMT1, TMT2, SFP6 and VGT2 the candidate genes in the transgenic lines and WT in 16 DPA pericarp fruit sample. The red line represents the average relative expression of the lines that haven't been transformed by the RNAi construction targeting the gene measured.

A**16 DPA**

B**30 DPA**

Red ripe

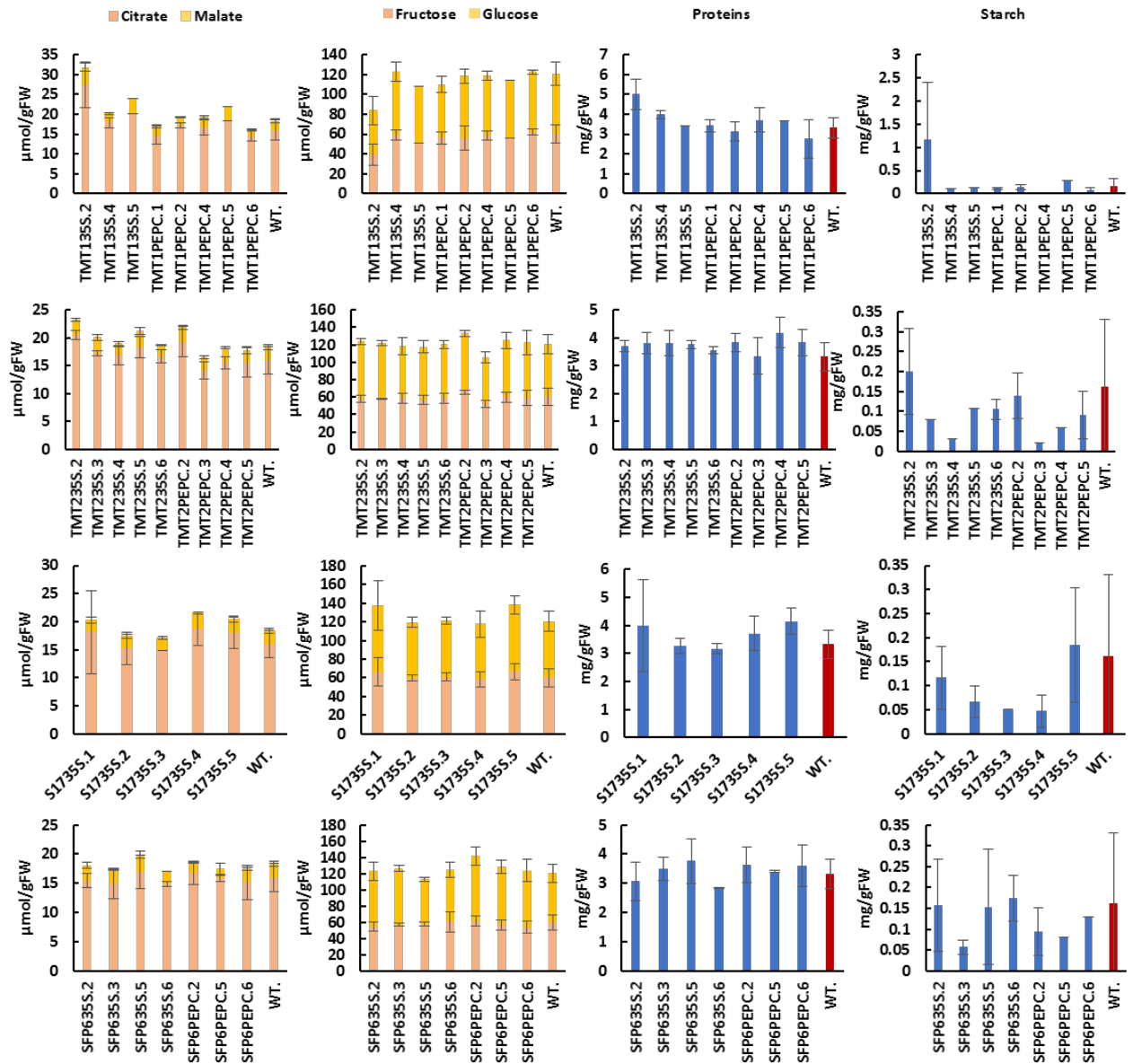


Figure S2: Metabolic composition in organic acids (citrate and malate), sugars (fructose and glucose), protein content and starch of the pericarp of transgenic lines and WT for three developmental stages. A. 16DPA fruits B. 30 DPA fruits. C. Red ripe fruits. The values represent de mean +/- SD (n=3).

Chapter 3

Role of TMT1 and TMT2 in tomato fruit growth and impact of their under expression at the metabolic and cell level

Chapter 3: Role of TMT1 and TMT2 in tomato fruit growth and impact of their under expression at the metabolic and cell level

INTRODUCTION

Tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit development can be divided in three phases: fruit set characterized by the fertilization, fruit growth and finally maturation. At the cell level, fruit growth is subdivided in two overlapping phases 1/ the cell division phase, during the very first day post anthesis (DPA). The pericarp cells will actively divide to give to the tissue a « potential size ». 2/ the phase of cell expansion, during which the cell volume will increase until the fruit gets its final size. From the beginning to the end of fruit growth the mean number of cell layers in the pericarp is increased by a factor two whereas cell volume is multiplied by 120, making cell expansion the major process for fruit growth (Bourdon *et al.*, 2012; Azzi *et al.*, 2015). Since the vacuole represents the major sub-cellular compartment of the fruit cells, occupying up to 80% of its total volume, it has been postulated that the osmotic-driven enlargement of the vacuole is the motor of cell expansion (Ho, 1996). The osmotic strength of the vacuole is ensured by the import and storage of a wide range of organic (sugars, organic acids, amino acids, secondary metabolites) and inorganic (ions) compounds into the vacuole. Among them, sugars have been shown to be major contributors to the osmotic potential of the vacuole, which can accumulate up to 80% of the sugars entering the cell (Beauvoit *et al.*, 2014). Their transport across the tonoplast is mainly ensured by secondary active transporters, which enable their transport against the concentration gradient, and thus their accumulation into the vacuole in exchange for protons. These transporters are coupled to primary transporters, i.e. V-ATPase and V-PPase which are the two types of proton pumps located on the tonoplast and respectively use the energy from ATP and PPi hydrolysis to import protons into the vacuole. Two distinct families of sugar transporters have been identified on the tonoplast: the MSF transporters (Major facilitator Super Family) and the SWEETs (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) transporters. Among the 7 families of the MSF group, four of them contain proteins that have been shown to be localized on the tonoplast: SUTs/SUCs family (Sucrose Transporters family) (Barker *et al.*, 2000; Endler *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2012), VGT (vacuolar Glucose Transporters) (Hammes *et al.*, 2005; Aluri and Bu, 2007), SFPs (Sugar Facilitator Protein)/ERD6-like (Early response to dehydration 6-like family) (Yamada *et al.*, 2010; Poschet *et al.*, 2011; Klemens *et al.*, 2014) and TMTs (Tonoplast monosaccharide Transporters) (Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*,

2010; Schulz *et al.*, 2011). SWEETs transporters have been identified more recently and are mostly implicated in passive transport of sugars (Feng *et al.*, 2015). If most of the SWEETs proteins have a plasma membrane localization, SWEET16 and SWEET17 have been shown to be localized on the tonoplast (Chardon *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017).

In *Arabidopsis*, the TMTs family is composed of three isoforms: TMT1, TMT2 and TMT3 which have been shown to act as glucose, fructose, sucrose/H⁺ antiporters (Endler *et al.*, 2006; Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*, 2010). If TMT1 and TMT2 are expressed in most of the plant tissues, TMT3 is weakly expressed and does not appear to participate to the TMT activity (Wormit *et al.*, 2006). TMT genes have been studied mostly in *Arabidopsis* using TDNA and over expressing lines. For instance, Wingenter *et al.*, 2010 showed that the double mutant *tmt1tmt2* was affected in the glucose transport inside the vacuole and accumulated 30% less hexoses compared to the WT. On the contrary, over expression of TMT1 induced a redistribution of glucose and fructose between cytosol and vacuole since over expressing lines accumulated 40% more hexoses in the vacuole than the WT (Wingenter *et al.*, 2010).

More recently, kinetic modeling of tomato fruit development highlighted the key role of tonoplast sugar transport during early fruit growth regarding the import of sucrose and the storage of hexoses in the vacuole (Beauvoit *et al.*, 2014). Indeed, during this phase, the osmotic potential of the vacuole reaches its highest level corresponding to about two-thirds of the osmotic pressure of the whole fruit, thus triggering water inflow within dividing and expanding cells (Beauvoit *et al.*, 2014). However, the lack of knowledge about the nature and the kinetic proprieties of tonoplastic sugar transporters in fleshy fruit becomes limiting to have a precise view of metabolic remodeling during fruit development.

In this work, we studied two RNAi lines, TMT135S.2 affected in TMT1, TMT2 and TMT3 expression and TMT235.6 affected in TMT2 expression. This study was conducted on a T2 generation of M82 tomato variety and the transgenic lines where studied at the level of gene expression, metabolic level and cell growth. The resulting expression of TMT genes as well as the other sugar transporters located on the tonoplast where measured by RT-qPCR. In addition, the study of the carbon and ion composition of the transgenic lines showed the occurrence of a strong metabolic reprogramming in transgenic lines, with an over-accumulation of starch, ions, organic acids and cell wall in response to the under expression of TMT genes, in addition to a decrease in hexose and hexose-phosphate levels. Finally, the study of cell growth and cell division revealed an unexpected role of TMTs genes in cell division since the transgenic lines presented a reduction of the number of cell layers in the pericarp.

RESULTS

TMTs proteins are located on the tonoplast of tomato cells

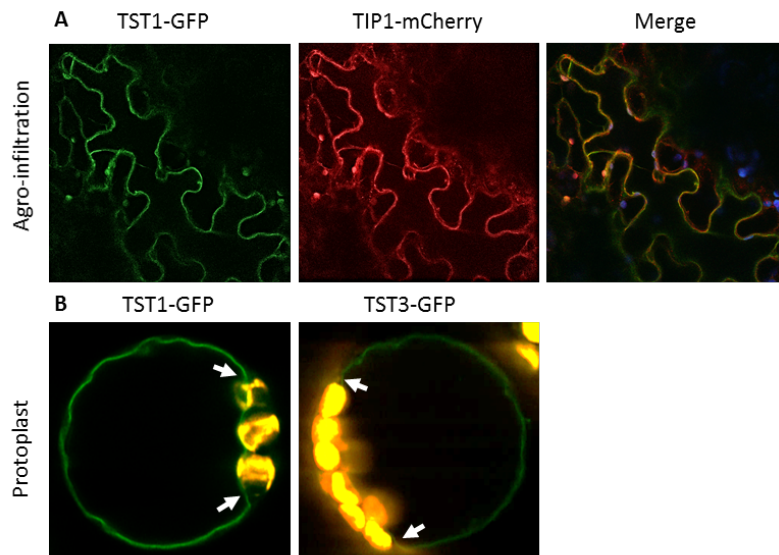


Figure1: Subcellular localization of an N-terminal TMT1-GFP and TMT3-GFP protein showed by tobacco leaf agro infiltration and tomato protoplast transformation. A. Subcellular localization of TMT1-GFP by the co-agro infiltration of TMT1-GFP fusion protein and TIP1-mcherry, a tonoplast located protein. B. Localization of TMT1-GFP and TMT3-GFP fusion protein in tomato protoplast. The white arrows indicate detachment between the tonoplast and the plasma membrane.

The analysis of *Arabidopsis* and barley tonoplast proteome (Carter *et al.*, 2004) revealed the presence of TMT1 and TMT2 in this membrane. However, beside the close similarity of sequence between tomato and *Arabidopsis* TMTs genes, and the fact that proteome analysis might provide false information on the presence or absence of proteins in a specific subcellular compartment due to potential contamination from other organelles, we choose to check the subcellular localization of TMTs proteins by expressing a TMT-green fluorescent protein (GFP) fusion protein in both tobacco leaf by agro infiltration and tomato protoplast.

Figure 1A shows the results of co-agroinfiltration of TMT1-GFP and TIP1-mCherry corresponding to a tonoplast protein that we used as a marker. As shown by the merged panel, the two labels overlap. However, because the leaf vacuole occupied almost all of the cell volume, it was difficult to exclude a plasma membrane localization for TMT1. Therefore, we also transformed protoplasts to confirm this first result. Figure 1B shows the chlorophyll auto

fluorescence in chloroplasts present in an isolated tomato protoplast. TMT1-GFP and TMT2-GFP fluorescence were clearly distinct from the chloroplast auto fluorescence, thus confirming that both TMTs have a tonoplastic localization. The latter localization is particularly visible as indicated by the arrows on Figure 1B, because of the large size of the marked membrane that bypasses the chloroplast from the inside, creating a detachment between the tonoplast and the plasma membrane.

Two transgenic lines differentially affected in TMT1 and TMT2 gene expression

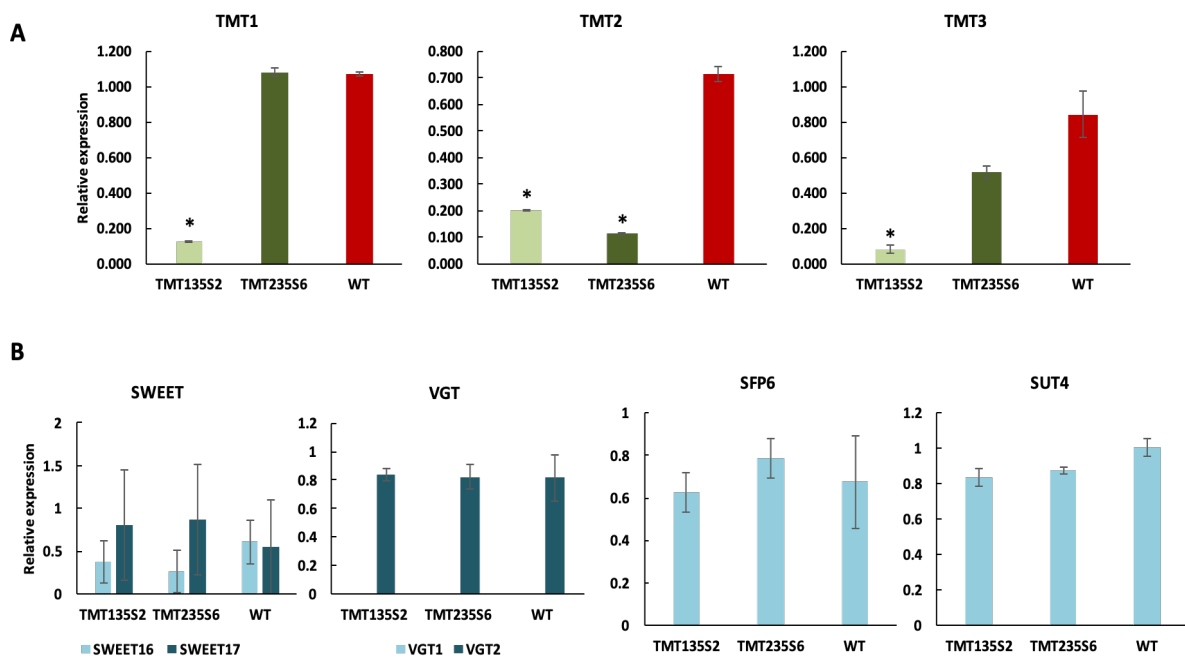


Figure 2: Expression of tonoplastic sugar transporters in 16DPA fruit pericarp tissue in tomato lines underexpressing TMT sugar-transporters. A. Relative expression of TMT1, TMT2 and TMT3 in TMT135SRNAi.2, TMT235SRNAi.6 and WT lines. B. Relative expression of SWEET16, SWEET17, VGT1, VGT2, SFP6 and SUT4, other sugar transporters located on the tonoplast. Error bars represent SD of five biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using ANOVA followed by turkey HSD test.

To evaluate the role of TMT1 and TMT2 in fruit growth, we generated transgenic lines using RNAi construction under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. The RNAi sequences were designed on TMT1 and TMT2 genes for TMT135SRNAi and TMT235SRNAi line respectively. The RNAi fragment of around 300 base pairs was chosen in a region that presents the highest homology between the two genes in order to target both genes at the same time. The two constructions were then used for tomato stable transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The T0 transgenic lines (17 independent

transformants) were then self-pollinated to obtain a T1 generation, which was phenotyped based on macroscopic traits (fruit and cell size), sugars and organic acids contents and transporter gene expression. Over the 17 independent transformants screened, 5 presented reduced growth and sugar content, whereas organic acids were increased (see Supplemental data – Chapter 1, Figure S2) and two of them, called TMT135S.2 and TMT235S.6, were selected. These two transformants were replicated and grown in the greenhouse to confirm their phenotype and further study their metabolism. The level of under expression of the targeted genes in the T2 generation was first assessed by real time quantitative PCR using 16 DPA fruit samples. As expected with the design of the RNAi fragments, and in agreement with the data obtained with the T1 generation, the expressions of TMT1 and TMT2 genes in TMT135S.2 plants were both significantly reduced compared to the WT, exhibiting respectively a decrease of 80% and 72% (Figure 2A). Interestingly, in TMT235S.6 fruit, TMT1 gene expression was not affected whereas TMT2 transcripts were decreased by 84% when compared to the WT. In both lines, the TMT3 gene expression was very low but significantly reduced in the TMT135S2 plants (Figure 2A). Taken together, these data show that the RNAi construction used for TMT1 under expression targeted at the same time the TMT1, TMT2 and TMT3 genes whereas the one used to repress TMT2 was specific.

The expression of the other tonoplastic sugar transporters, VGT1, VGT2, SUT4, SWEET16, SWEET17 and SFP6 were also measured. For all of them, no significant difference was observed compared to the WT, showing that the effect of the under expression of TMT1 and/or TMT2 is specific and that there was no apparent compensation by other transporters (Figure 2B).

Reduction of TMT1 and TMT2 expression affected fruit growth

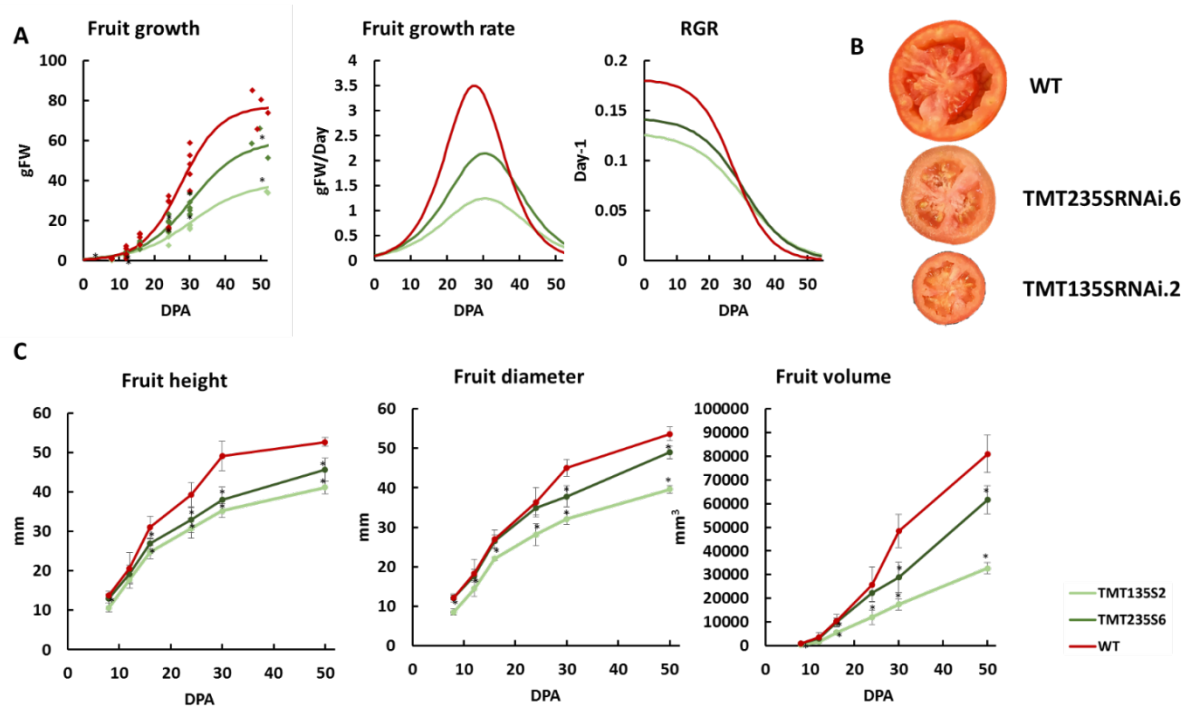


Figure 3: Fruit growth is affected in TMT135S.2 and TMT235S.6 lines under expressing TMT transporters. A. Left panel: Total fruit weight (g) evolution during fruit development. The dots represent the experimental points corresponding to 5 biological replicates per developmental stage (4, 8, 12, 16, 24, 30 DPA and mature stage). The line represents the fitting of a sigmoidal mathematical function. Middle panel: fruit growth rate calculated by derivation of the growth curve. Right panel: fruit relative growth rate calculated by dividing the growth rate with the actual fruit mass. B. Picture of half fruits at the mature stage for the WT, TMT135SRNAi.2 and TMT235SRNAi.6. C. Evolution of fruit height, fruit diameter and fruit volume during development. Error bars represent SD of five biological replicates and asterisks indicate significant differences from the control (WT) using ANOVA followed by the Tukey HSD test.

Macroscopic parameters were measured on fruit to evaluate the impact of the under expression of TMT1 and/or TMT2 on fruit growth and growth dynamics. Fruit growth followed a sigmoidal curve classically divided into 3 successive phases: a phase of exponential growth, followed by a quasi-linear phase where the growth rate reaches its maximum and finally the asymptotic phase where the growth rate decreased until the ripening phase where growth stopped (figure 3A left panel). In the WT, the fruits reached 72 ± 6 gFW at the end of the development. The fruits of TMT135S.2 presented significant reductions of their mass compared to the WT, all along development (except at 12DPA), with a two-fold decrease in fresh weight at maturity. TMT235S.6 fruits were less affected but the fresh weight was also significantly reduced by a factor 1.3 at the end of development (Figure 2A). Pericarp weight was also measured and the profiles were very similar to those observed for whole fruit, revealing a

correlation between these two measurements (Supplemental data figure S1).

The fruit diameter and height were also measured to assess if the fruit shape was affected. TMT135S.2 fruits showed a significant reduction of their diameter and height throughout development. In the case of TMT235S.6, we also observed reduction of diameter and height but the phenotype was delayed since the fruit diameter was significantly reduced compared to the WT after 24 DPA and the fruit height after 16 DPA (Figure 3C). Assuming an elliptical spheroid form, fruit volume was calculated using the formula, $Vol = 4/3 \cdot \pi \cdot (H \cdot D^2) / 6$ (Figure C, right pannel). Again, two different profiles were clearly seen according to the transgenic lines: the fruit volume of TMT135S.2 was affected very early during development since it was significantly reduced compared to the WT from 8DPA until the mature stage. In the case of TMT235S.6 fruits, no difference was observed in the first developmental phases in comparison to the WT (between 8 to 24 DPA), but the increase in volume was then severely slowed down. At the end of the growth, it should be observed that the final volume was reduced in the same range as for the fruit fresh weight (2.4 times for TMT35S.2 and 1.3 times for TMT235S.6), which reflects a reduction in fruit size in the 3 dimensions (Figure 3C).

The growth rate and the relative growth rate were estimated from the derivative of the growth curve figure 3A (middle and right panel). As expected, the maximum fruit growth rate of transgenic lines was affected. Indeed, in addition to being weaker for both transgenic lines (1.24 gFW.Day⁻¹, 2.14 gFW.Day⁻¹ and 3.49 gFW.Day⁻¹ for TMT135S.2, TMT235S.6 and the WT respectively), the peak was also delayed, as it was reached at 30 DPA for both lines and at 28 DPA for the WT. This delayed growth reflects a modification of growth dynamics and highlights growth retardation at the beginning of the development. Moreover, relative growth rate (RGR) appeared reduced immediately after anthesis in the transformants, indicating that fruit development was affected even during the division phase (Figure 3A – right panel).

TMTs under expression triggered changes of composition

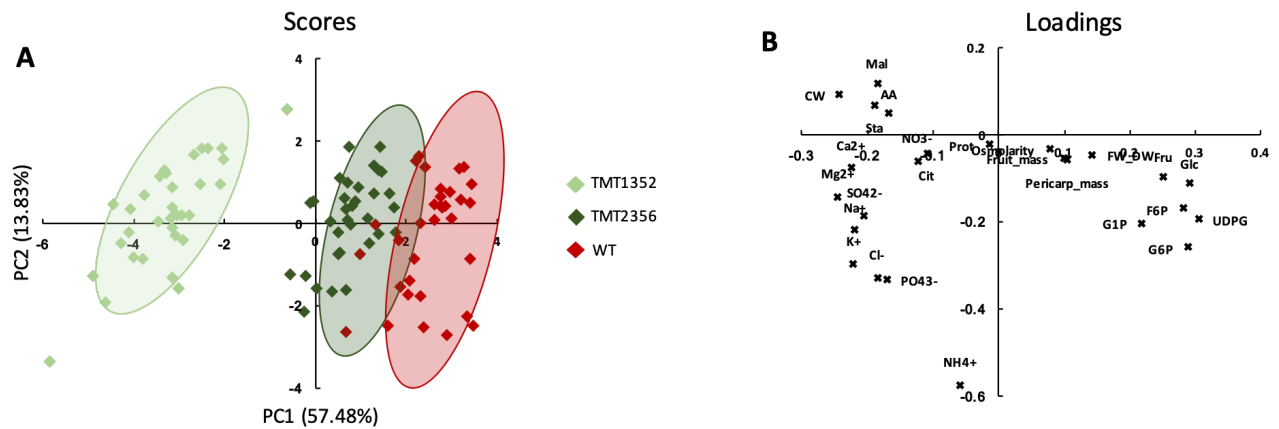


Figure 4: ANOVA-Principal component analysis (ANOVA-PCA) of metabolites, ions and fruit growth parameters determined for pericarp samples of the WT, TMT135SRNAi.2 and TMT235SRNAi.6 lines for the developmental stages studied (4, 8, 12, 16, 24, 30 DPA and mature stage). PCA was performed from the correlation matrix generated with a total of 39 variables, with 5 replicates per stages. PC1 and PC2 explained respectively 57.48% and 13.83% on the total variance. Biplot A shows observations discrimination by genotypes. Biplot B shows the corresponding loading.

Metabolite and ions contents were measured in both transgenic lines and in the WT and the data used to build a two-factor ANOVA-PCA (figure 4A and 4B). When separated by the genotype, the first two principal components (PC1 and PC2) explain more than 71% of the total variance and reveal differences in metabolite contents according to the genotype. The examination of the first PC accounting for more than 57% of the variance shows that the separation of genotypes was mainly due to ions composition, especially chloride, potassium, sodium, magnesium and calcium as well as carbon compounds such as starch, malate and cell wall on the negative extreme. On the contrary the separation on the positive extreme of PC1 involves sugar metabolites such as fructose, glucose, F6P, G6P, G1P and UDPG. The second PC accounts for approximately 14% of the variance and is mainly explained by ammonium composition.

TMTs under expression induces carbon reallocation

Looking more closely at the carbon composition of the three lines, the under-expression of TMTs induced important changes in carbon repartition, especially in the TMT135S.2 line. Among the compounds studied, only protein content was unchanged. Cell wall, starch, organic and amino acids were increased whereas free sugars, UDPG and phosphorylated sugars were decreased (Figure 5), as already seen with the ANOVA-PCA.

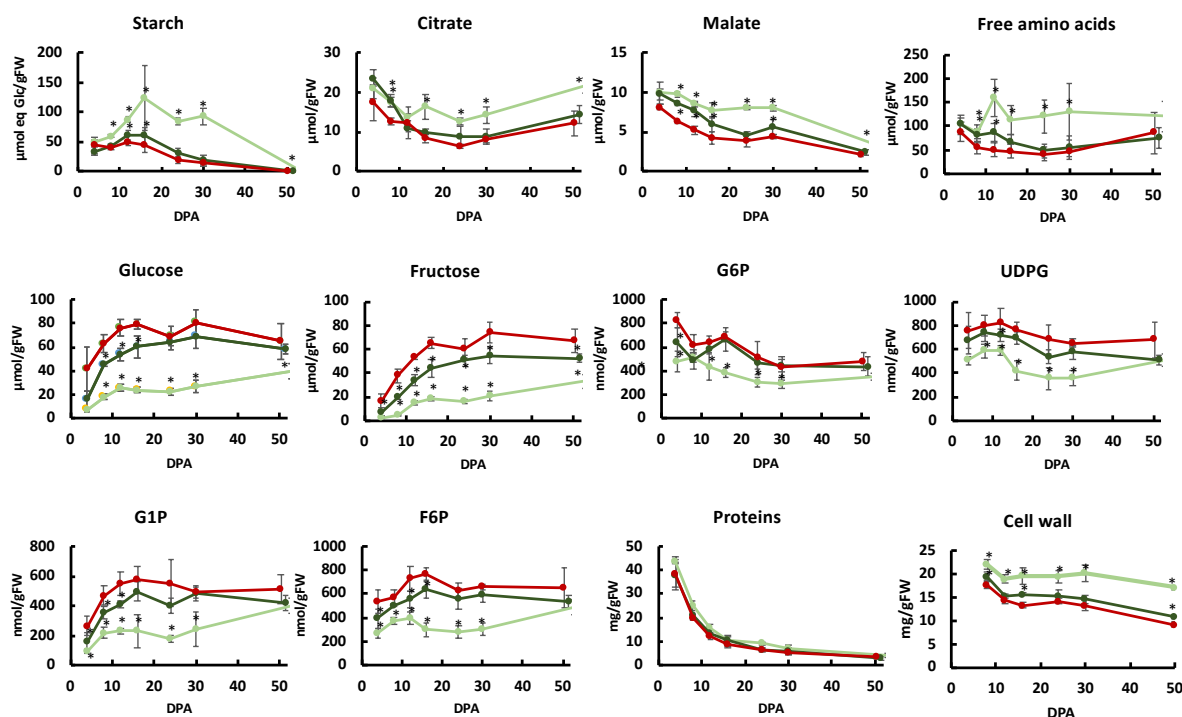


Figure 5: Evolution of the concentration of carbon-related metabolites in the pericarp of the two transgenic lines and in the WT during fruit development. Red line represents the WT, light green line and dark green line represent the corresponding concentration for TMT135SRNAi.2 and TMT235SRNAi.6 respectively. G6P: Glucose-6-Phosphate; UDPG: Uridine-di-Phosphate Glucose; G1P: Glucose-1-Phosphate, F6P: Fructose-6-Phosphate. Values represent the mean $\pm$ se (n = 5). Significant differences compare to the WT are shown by an asterisk according to one-way ANOVA followed by Tukey-HSD test.

Looking in more detail compounds that were accumulated in the transformants: starch was accumulated in the WT and TMT235.6 fruits, from the beginning of the development until 16 DPA (with a concentration of 45 ± 14 $\mu\text{mol/gFW}$ and 60 ± 13 $\mu\text{mol/gFW}$ for the WT and TMT235S6 respectively) and was then remobilized progressively to reach a concentration of 14 ± 5 $\mu\text{mol/gFW}$ at the end of the development in both lines. On the contrary, the accumulation of starch was largely increased in TMT135S.2, reaching a maximum at 16 DPA with a concentration of 122 ± 54 $\mu\text{mol/gFW}$. Moreover, its subsequent decrease due to dilution by

growth and remobilization was delayed, not starting before 30 DPA. At the end of the development, starch was low and close to that measured for the WT and TMT235S.6, which indicates that an important increase in the starch degradation flux took place in this line. Strikingly, at maturity this was mirrored in the fact that hexoses had levels comparable to those measured in the WT.

Regarding organic acids, the 3 tomato lines presented similar profiles. Indeed, the maximum levels of organic acids were observed at 4 DPA; they then decreased progressively until 16 DPA, remained quite stable up to 30 DPA and finally followed a mirror curve between 30 DPA and red ripe with an increase of citrate and a decrease of malate. However, both transgenic lines accumulated more citrate and malate compared to the WT. Interestingly, their profiles were not absolutely identical among development: whereas they both over accumulated similar citrate quantities between 4 and 12 DPA, the citrate content decreased more rapidly in the TMT235S.6 line to reach values close to those measured in the WT.

TMT135S.2 accumulated more amino acids throughout development, i.e. 1.2 to 3.2 times more than in the WT, depending on the developmental stage. On the other hand, the over-accumulation of amino acids in TMT235S.6 was only significant between 8 and 24 DPA, with a factor 1.2-1.7 compared to the WT.

Finally, TMT135S.2 presented a clear phenotype regarding the cell wall. In the WT, the highest cell wall content was observed for young stages (17.5 ± 0.8 g/gFW at 8DPA) and then decreased until 12 DPA, to reach a plateau between 12 and 30 DPA. This was followed by a remobilization phase where the cell wall content decreased until maturity. Regarding TMT135S.2, although the profile was similar to that of the the WT, it accumulated 1.2 ± 0.1 to 1.9 ± 0.1 times more cell wall then the WT. As a consequence, although the WT lost 48% of its cell wall content during maturation, TMT135S.2 only lost around 22%.

On the contrary, hexoses (Glc and Fru) and hexoses phosphate concentrations were decreased in both transgenic lines compared to the WT. Concerning Glc and Fru, the under expression of TMTs genes induced the reduction of their contents throughout the development. The free sugars followed similar profiles in the WT and TMT235S.6 lines, ie. an accumulation of hexoses between 8 and 12 DPA and then remained quite stable until the end of maturation. Surprisingly, in TMT135S.2, the profiles of free sugars were quite similar until 30 DPA, i.e. an accumulation between 8 and 12 DPA followed by a plateau phase, whereas after 30 DPA Glc and Fru both increased. As a consequence, they both reached their maximum at the end of

fruit development with values approaching those measured in the WT ($39 \pm 5.3 \mu\text{mol/gFW}$ of glucose and $32.9 \pm 0.38 \mu\text{mol/gFW}$ of fructose). Moreover, at 8 DPA, the ratio Glc / Fru was significantly affected by the TMT under-expression increasing from 1.66 ± 0.14 in the WT to 2.29 ± 0.19 in TMT235S.6 and 3.8 ± 0.31 in TMT135S.2.

Regarding hexoses phosphate, the contents in F6P, G1P and UDPG were reduced in both transgenic lines all along the development with the highest difference observed in TMT135S.2 and an intermediate situation for TMT235S.6. The G6P content was also reduced in TMT135S.2 independently to the developmental stage, whereas it was decreased in a lesser extent and only in fruits 8 and 12 days old in TMT235S.6.

TMT under expression induces dramatic changes in the capacities of enzymes involved in central metabolism

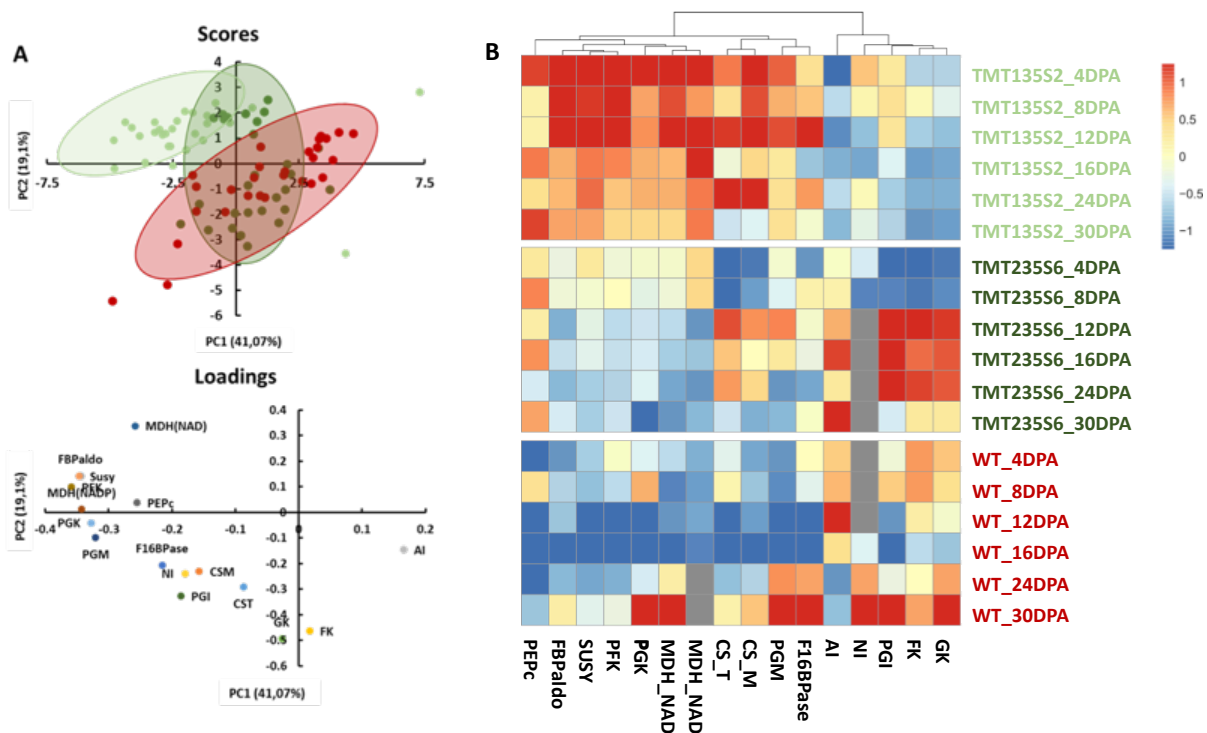


Figure 6: Multivariate analysis of activity profiles of enzyme involved in central metabolism in tomato fruits at different developmental stages in WT, TMT135S.2 and TMT235S.6 lines. A. Principal component analysis performed from the correlation matrix generated with a total of 16 variables, with 5 replicates per developmental stage. B. Hierarchical clustering analysis. Enzymes capacities are in the columns and genotypes are in the rows. Columns are mean-centered, with maximal enzyme capacity values represented by color (blue, low; red, high) as indicated in the legend. Enzyme capacities were determined in pericarp samples collected at 4, 8, 12, 16, 24, 30 DPA from fruits grown on WT, TMT135SRNAi.2 and TMT235SRNAi.6 lines. PEPc: pyruvate carboxylase; FBPaldo: Fructose, 1-6 bisphosphate aldolase; SUSY: Sucrose synthase; PFK: phosphofructokinase; PGK:

phosphoglycerokinase; MDHNADH: Malate dehydrogenase NADH-dependent; MDHNAD: Malate dehydrogenase NAD-dependent; CST: Total citrate synthase; CSM: Mitochondrial citrate synthase; PGM: phosphoglucomutase; F1,6Bpase: Fructose-1,6-bisphosphatase; AI: acidic invertase; NI: neutral invertase; PGI: phosphoglucose isomerase; FK: fructokinase; GK: glucokinase

The enzyme capacities of 16 enzymes involved in sugar metabolism, glycolysis and TCA cycle were measured at 6 developmental stages (4, 8, 12, 16, 24 and 30 DPA) in the WT, TMT135S.2 and TMT235S.6 lines (Figure 6). Most of the enzymes (CS, PGK, CS, MDH, PFK, SUSY and Aldolase) presented their highest capacity at the youngest stages, and then decreased to increase again in a more or less pronounced way, from 30 DPA. On the contrary, FK, GK and AI were low at the beginning of the development and increased at later stages. Finally, F1,6BPase, PEPc and PGI appeared stable throughout fruit development (Figure S2 supplemental data). Interestingly, this data contrasts with data previously obtained with the Money Maker cultivar (Biais *et al.*, 2014). Indeed, they found that FK and GK were highest during early growth, that PGI, PGM, F1,6BPase, MDH, PGK, PEPc and PFK were highest between 15 and 30DPA, and that CS, AI, NI and aldolase became highest during ripening. This result indicates that enzyme profiles and thus the programming of metabolism may vary depending on the variety and more specifically depending on the final fruit size (big fruits for Money Maker and medium ones for M82).

In order to compare the enzyme profiles between the WT and the transgenic lines, a two factor PCA was built (Figure 6A). When separated by the genotype, the first two principal components (PC1 and PC2), which explain more than 60% of the total variance, reveal differences in enzymes capacities according to the genotype and mainly separate TMT135S.2 from the two other genotypes. The first component, PC1 accounting for about 41% of the variance shows that the separation of TMT135S.2 was mainly due to MDH, PEPc, PGM, PGK, PFK, SUSY and FBP aldolase. The second PC, accounting for about 19% of the variance appears mostly driven by hexokinase and fructokinase (GK and FK). The clustering analysis (Figure 6B) revealed the two same clusters of enzymes that behave differently between TMT135S.2 and the WT. Thus, the capacities of Cluster 1 (PEPc, FBP-aldolase, SUSY, PFK, PGK, MDH, CS, PGM and aldolase) were highest in TMT135S.2, throughout fruit development. On the contrary, the capacities of Cluster 2 (AI, NI, PGI, FK and GK) were decreased. Interestingly, enzymes of Cluster 1 are involved in glycolysis and TCA-cycle whereas those of Cluster 2 are involved in sucrose metabolism.

As previously found at the levels of the metabolites, the phenotype of TMT135S.2 was more pronounced at young stages (between 4 and 12 DPA), especially for enzymes of Cluster 1. Regarding TMT235S.2, the profile in “two phases” observed for metabolites was also found for the enzymes. Indeed, although the enzyme profiles of TMT2135S.2 was globally similar to that of TMT125S.2 at young stages, it became similar to that of the WT at later stages.

TMT under expression induced an accumulation of cation and anion in the early stages of development

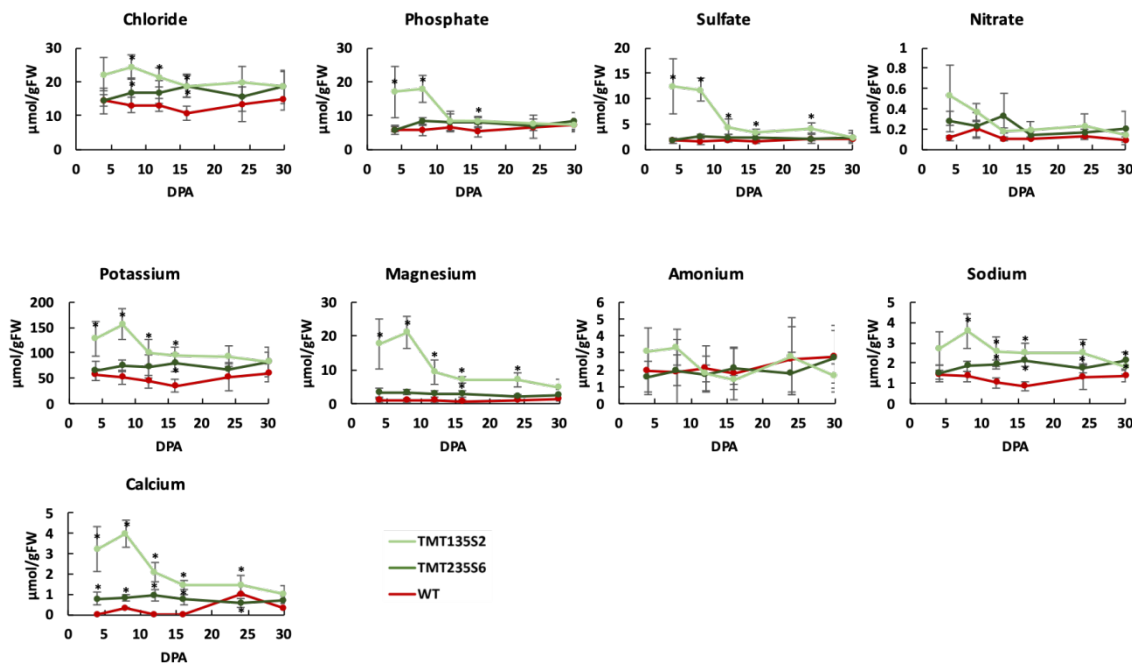


Figure 7: Evolution of the concentrations of anions (chloride, phosphate, sulfate and nitrate) and cations (potassium, magnesium, ammonium, sodium and calcium) in the pericarp of the two transgenics lines and in the WT during fruit development. The red line represents the WT, the light green line the TMT135S.2 line and the dark green line the TMT235S.6 one. Values represent the means $\pm$ SE (n=5). Significant differences with the WT are shown by an asterisk (one-way ANOVA followed by Tukey-HSD test).

The concentrations of the main soluble inorganic anions and cations were measured during fruit development to evaluate the effect of TMT under-expression (Figure 7). In the WT, ions were relatively stable throughout fruit development. In the TMT135S.2 line, most of them were strongly increased, especially during early growth. Indeed, during this early phase, TMT135S.2 fruits had accumulated 1.7 ± 0.4 , 2.3 ± 1.2 , 5.7 ± 3.5 , 18 ± 8 and 11 ± 1.4 times more chloride, phosphate, sulfate potassium, magnesium, sodium and calcium, respectively. Only ammonium and nitrate contents were not significantly affected. Consequently, TMT135S.2 accumulated 3.3 times more positive charges than the WT during early growth. Ion profiles were intermediate in the TMT235S.6 line, with increases that were statistically significant for

chloride, potassium, sodium, magnesium and calcium. However, on the contrary of TMT135S.2 the accumulation was stable during the entire development. Thus, in this line the increase in ion content resulted, on average and throughout fruit development, in an increase by a factor of 1.7 of the positive charges when compared to the WT.

Dry weight and carbon repartition are affected in the transgenic lines

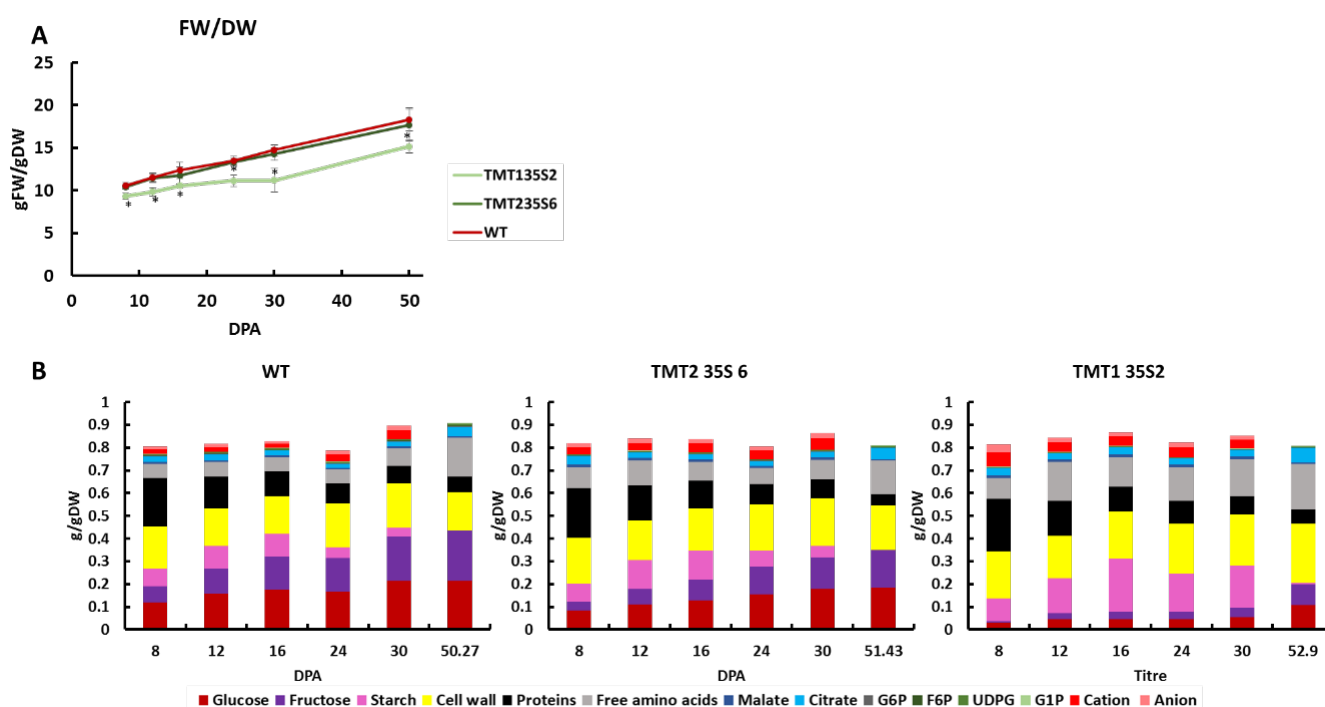


Figure 8: Evolution of dry weight composition during the development of the two transgenic lines and in the WT. A. Evolution of the pericarp fresh weight / dry way ratio during fruit development. The red line represents the WT, the light green line TMT135SRNAi.2 and the dark green line TMT235SRNAi.6 respectively. B. Histograms representing the major biomass components (between 80 and 90% of total dry biomass). G6P: Glucose-6-Phosphate; UDPG: Uridine-di-Phosphate Glucose; G1P: Glucose-1-Phosphate, F6P: Fructose-6-Phosphate. Values represent the mean $\pm$ se (n = 5). Significant differences compare to the WT are shown by an asterix according to one way ANOVA followed by Tukey-HSD test.

The ratio between fresh and dry weight increased during fruit development (Figure 8A), indicating the accumulation of water and a dilution of metabolites. Interestingly, for all stages TMT135S.2 had a lower FW/DW ratio than WT, while TMT235S.6 showed no difference. Indeed, during the development the ratio varies between 9.3 ± 0.38 and 15.1 ± 0.75 g/g for TMT135S.2 and between 10.6 ± 0.4 and 18.3 ± 1.3 g/g for the WT and TMT235S.6. To investigate carbon distribution in the dry weight, the data were expressed in g/gDW (Figure 8B). Biomass composition showed a clear difference between the three lines. It has to be noted that for the three lines, and considering all of the developmental stages considered, the measured compounds explained 80 to 90% of the dry biomass. It is likely that the remaining 10-20%

correspond to lipids, nucleotides and secondary metabolites that have not been measured. The metabolic traits analyzed can be classified in two categories: soluble metabolites (sugars, amino acids, organic acids, sugar phosphate and ions) and insoluble compounds (cell wall, protein and starch). In WT, the contribution of free sugars to the biomass increased during fruit growth, from 17% at 8 DPA to about 40% at ripeness, making them the major contributors. In TMT235S.6, their contribution was slightly but significantly reduced, ranging from 11% at 8 DPA to 34% at ripeness. In TMT135S.2, the reduction was more pronounced, as free sugars explained less than 8% during growth and about 18% at maturity. This decrease in sugars was compensated by increases in other compounds. Thus, amino acids represented 6 to 17%, 9 to 20% and 7 to 14% of the DW in the WT, TMT135S.2 and TMT235S.6, respectively. The contribution of organic acids was quite stable throughout the development with values between 2.3 - 5.4 %, 3.7 - 4.7% and 3.1 - 7% for the WT, TMT135S.2 and TMT235S.6 respectively. Ions were low contributors since they represent less than 2% of the DW, in all lines.

Regarding insoluble compounds, proteins and cell wall contributed similarly in the WT and in the transformants: the cell wall explained 16 to 25% of the DW, depending on the developmental stage and the line, whereas protein contribution decreased as fruit grew, from average values of 21-23 % at 8 DPA to 5-7% at the end of fruit development. As expected from data seen in Figure 5 starch contribution to the DW was highly increased in TMT135S.2, especially between 12 and 30 DPA.

TMTs induce a decrease of cell osmolarity and global pH of the fruit

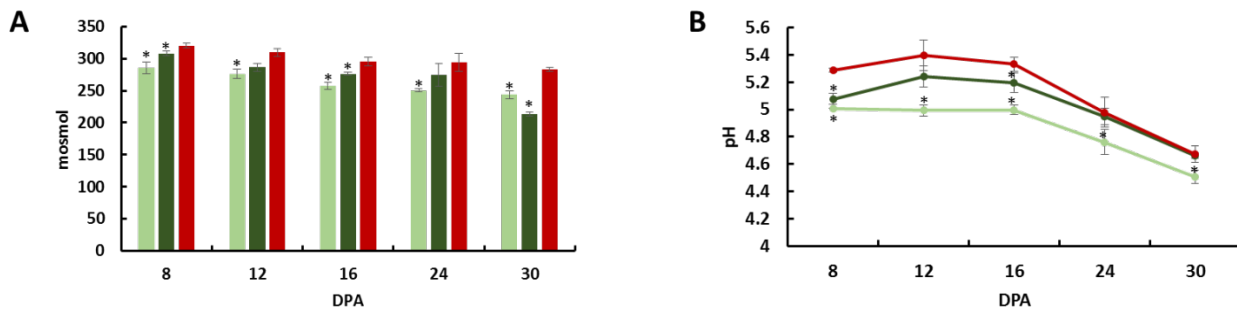


Figure 9: Impact of TMT under-expression on fruit global osmolarity and pH during fruit development. A. Fruit osmolarity measured in the two transgenic lines compared to the WT. B. Evolution of the pH of the fruit juice during development. The red line represents the WT, the light green line TMT135SRNAi.2 and the dark green line TMT235SRNAi.6. Values represent means $\pm$ SE ($n = 5$). Significant differences with the WT are shown by an asterisk (one way ANOVA followed by Tukey-HSD test).

The previous figure underlined the importance of the contribution of soluble metabolites to the dry weight, which implies that they are also major contributors to cell osmolarity, and thus water influx into the vacuole. The mean fruit cell osmolarity was measured throughout development, with an osmometer (Figure 9A). In WT, the osmolarity decreased progressively between 8 DPA and red ripe stages. In TMT235S.6 the evolution was similar but values were lower before 30 DPA. In contrast, osmolarity measured in TMT135S.2 was systematically lower than in the WT and TMT235S.6.

As transgenic lines accumulated more organic acids and ions, we next investigated the impact on the global fruit pH by measuring the pH of the fruit juice (Figure 9B). For the WT, the pH was highest (5.3 ± 0.01) at early phases of development (from 8 to 16 DPA) and then decreased constantly to reach a minimal value of 4.7 ± 0.1 at 30 DPA. TMT135S.2 fruit followed exactly the same profile, but the pH was lower during the entire development (4.8 during the plateau of the early developmental stage and 4.5 at 30 DPA). Regarding TMT235S.6, the pH was similar to that measured in TMT135S.2 at 8 DPA, remained lower than in the WT until 16 DPA, but increased at later developmental stages (24 DPA to ripeness) to reach values comparable to those observed in the WT.

Cell volume and cell division are affected in the transgenic lines

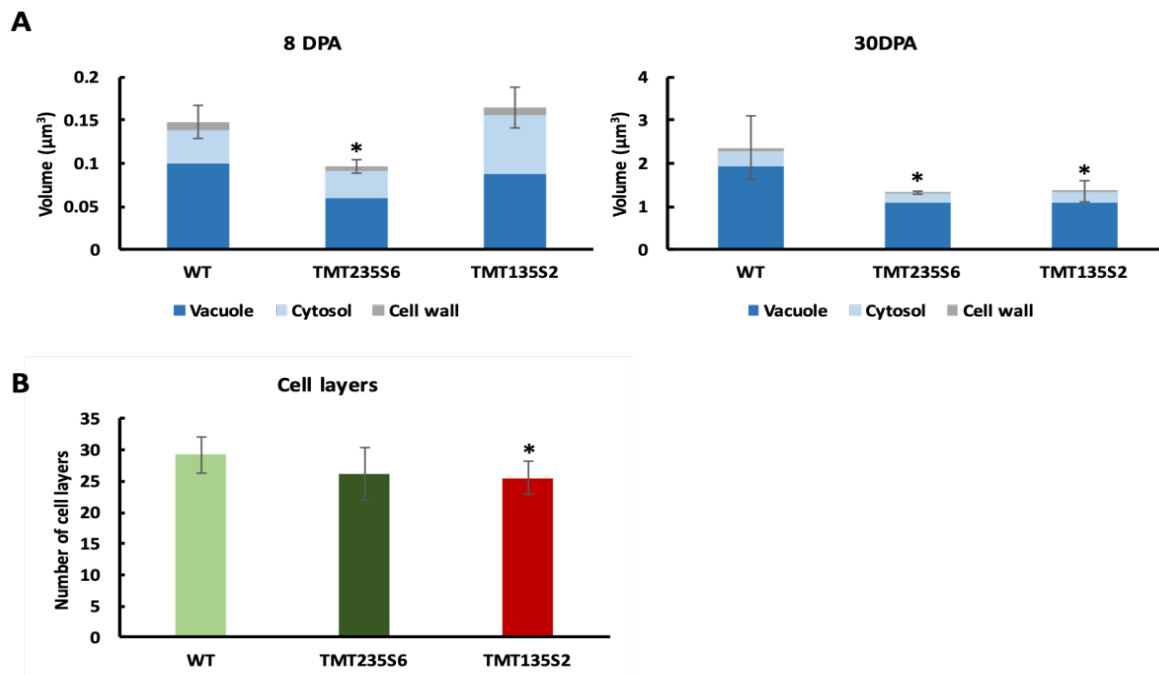


Figure 10: Impact of TMT under-expression on cell growth and cell division at two characteristic stages corresponding to the end of cell division phase (8 DPA) and the end of expansion phase (30 DPA) for the two transgenics and the WT lines. A. Volume of the major subcellular compartments, vacuole, cytosol and cell wall at 8DPA and 30DPA. The sum of the three volumes is considered as the cell volume. B. Number of cell layers observed in an equatorial section of the pericarp. The values represent the average $\pm$ SE ($n = 3$) of cell layers determined at 8 and 30 DPA. Significant differences with the WT are shown by an asterisk (one way ANOVA followed by Tukey-HSD test).

At the end of the division phase (8 DPA) TMT135S.2 did not show any difference in terms of cell volume compared to the WT line (Figure 10A). However, the fruit volume was smaller (Figure 3C), suggesting that there would be fewer cells. As expected, we found a decrease in the number of cell layers in the transgenic lines, with 29 layers in the WT, 26 in TMT135S.2 and 25 in TMT235S.6 (Figure 10B). Thus the reduction in the expression of TMT family genes had a negative impact on cell division. Moreover, we also found a reduction in cell volume at 30 DPA ($2.3 \mu\text{m}^3$ in the WT *versus* $1.4 \mu\text{m}^3$ in TMT135S.2 and $1.3 \mu\text{m}^3$ in TMT235S.6), which indicates that cell expansion was also impacted in the transgenic lines. When looking more precisely at cell growth, by scrutinizing the volumes of sub-cellular compartments, we found that at the end of cell division phase (8 DPA) the vacuole, cytosol and cell wall occupied respectively 69%, 25% and 6% of the total cell volume in the WT line and that there was no significant difference with the 2 transgenic lines. At 30 DPA, when the final fruit size is almost reach, the vacuole, cytosol and cell wall occupied 82%, 15% and 3% of the total cell volume in the WT as well as in the transgenic lines (Figure 10A). These results indicate that decreased cell growth was not due to a decrease in the growth of one of these subcellular

compartments, thus implying a fine crosstalk between vacuole and cytosol size, i.e. that the growth of one compartment would limit the growth of the other.

DISCUSSION

Tonoplast sugar transporters (TMTs) in tomato

Tomato is an important crop, as a result, fruit development and its regulation have been widely studied at multiple scales (gene, transcript, protein or metabolic scale). Fruit growth in fleshy fruit occurs via two overlapping phases, cell division in the very early days following anthesis and cell expansion. Because most of the cell volume is occupied by a large central vacuole, it has been postulated that vacuole expansion is the motor of cell growth, occurring via the osmotic driven enlargement of the vacuole. The osmotic strength is therefore mediated by the transport and storage of osmotically active compounds in the vacuole, among them, sugars and organic acids would play a critical role (Beauvoit *et al.*, 2014). However, knowledge of sugar transporters of the tomato fruit tonoplast in terms of capacity, specificity and energy requirement are still limited. In *Arabidopsis*, the TMTs family (tonoplast monosaccharide transporters) that includes three orthologue genes, TMT1, TMT2 and TMT3, has been shown to mediate sugar import into the vacuole (Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2011). Basing on the publicly accessible tomato (*Solanum lycopersicum*) genome (Tomato Genome Consortium 2012), we identified the homologous sequences to *Arabidopsis* in the tomato genome thanks to a BLAST analysis: SITMT1 (Soly03g032040), SITMT2 (Soly04g082700) and SITMT3 (Soly02g082410). In this study, we provided evidence that the tomato TMT1 and TMT3 proteins reside in the tonoplast using tomato protoplasts transiently transformed with TMT1- and TMT3-GFP expressing plasmids (Figure 1). Regarding TMT2, we were not able to obtain transformed protoplasts expressing the TMT2-GFP construct. This result is consistent with those obtained by Wormit *et al.*, 2006 who succeeded to show the tonoplast localization of AtTMT1 and AtTMT3 in protoplast from an *Arabidopsis* suspension cell culture but did not present any data for TMT2. However, in a view of the close similarity of sequences between SITMT1 and SITMT2 and with their *Arabidopsis* homologs, as well as of the presence of both proteins in the tonoplast proteome of *Arabidopsis* (Carter *et al.*, 2004), we made the assumption that SITMT2 was also localized at the tonoplast in tomato.

The analysis of TMTs relative expression in fruit pericarp, revealed that TMT1 and TMT2 are the most highly expressed ones and that TMT3 is very low, thus supporting previously data published for *Arabidopsis* (Wormit *et al.*, 2006). In order to characterize better the role of the TMTs during tomato fruit growth, we generated RNAi transgenic lines under the

control of a 35S constitutive promoter targeting TMT1 and TMT2 and studied the consequences of their under-expression at the level of growth and metabolism.

Fruit growth occurs via cell division followed by cell expansion, two processes implicating TMTs genes

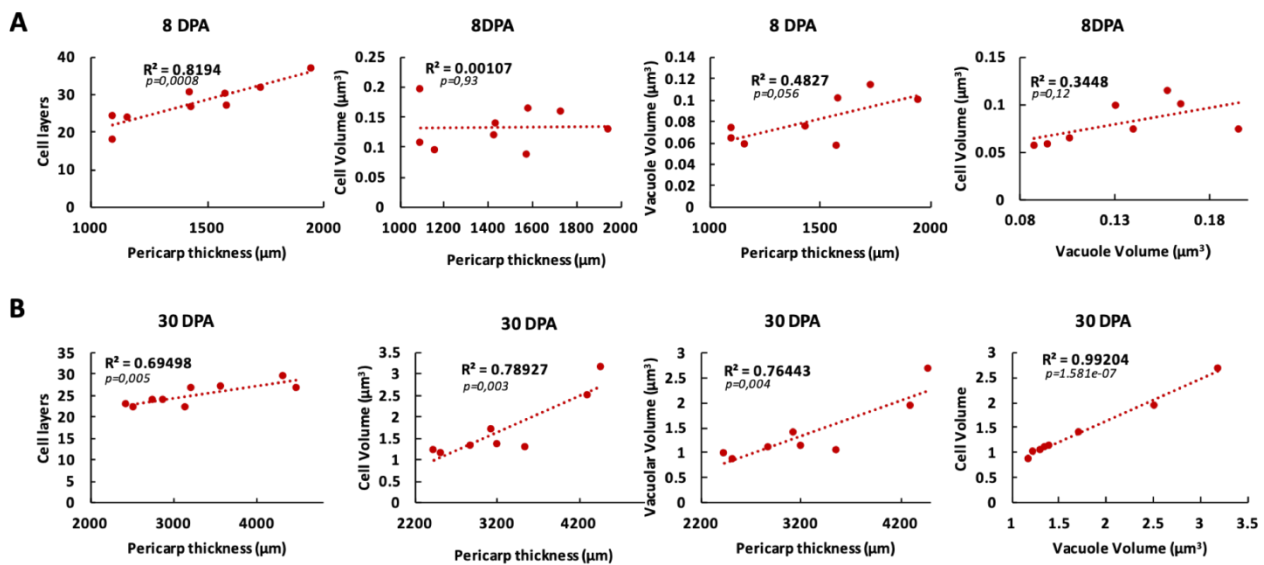


Figure 11: Correlation between number of cell layers, cell volume, vacuole volume and pericarp thickness at 8DPA and 30 DPA underline two growth dynamic corresponding to the two phases of pericarp growth (cell division and cell expansion) A. Correlation at 8DPA B. Correlation at 30DPA. The values correspond to the combined data obtained for the three lines at 8DPA and 30 DPA ($n = 3/\text{stage}$). Dots represent the experimental values and dotted lines represent a fitted linear function. Correlation test was performed to obtain the p-Value indicated on each graph (p).

As previously mentioned, the finale size of the fruit is the result of the succession of cell division that gives a « potential size » and cell expansion. In order to study fruit growth dynamics during these two phases, we investigated the relationship between pericarp thickness (which is closely correlated to fruit size), cell and vacuole volumes and the number of cell layers. As shown in figure 11, at the end of the cell division phase (8 DPA) the pericarp thickness was significantly correlated to the number of cell layers but not to cell volume. These observations indicate that during early development, pericarp thickness directly depends on the number of cells, in other terms, depends on the efficiency of cell division.

In addition, there was no significant correlation between the vacuole volume and the cell volume. This is probably due to the fact that during the division phase, the volume occupied by the vacuole is too small to ensure cell expansion. At 30 DPA when the cell expansion phase is

almost complete, the correlation between the pericarp thickness and the number of cell layer was lost to the profit of a significant correlation between pericarp thickness and cell volume. In addition, there is a perfect correlation between vacuole volume and cell volume and by extension, between pericarp thickness and vacuole volume, meaning that the pericarp thickness directly depends on vacuole expansion during the expansion phase. These results perfectly match the previous results published by Beauvoit *et al.*, 2014 showing that during the division phase, the vacuole is growing to the detriment of the cytosol without being accompanied by cell growth. When the vacuole reaches 80% of the total cell volume, both compartments continue their growth in the same proportion while the vacuole expansion ensures cell growth. Nevertheless, the mechanisms controlling the proportion between cytosol and vacuole remain unknown.

TMT135S.2 and TMT235S.6 both showed a reduction of fruit weight and fruit volume compared to the WT, with the strongest phenotype observed for TMT135S.2. As previously shown by Beauvoit *et al.*, 2014, the relative growth rate (RGR) of the fruit, was maximum at the very beginning of the development and decreased constantly until the fruit reached its final size, reflecting two distinct phases, i.e. a rapid growth phase mostly happening during cell division followed by the cell expansion phase during which the relative growth is slowed down. Interestingly, during the early developmental stages, the two transgenic lines showed a drastic reduction of their RGR compared to the WT. However, during the period at which RGR decreases, the latter was less affected. This result therefore underlines the link between TMT activities and the rapid growth rate phase from the very beginning of the development.

TMT1 and TMT2 harbor different functions and expression territories and cannot fully compensate each other.

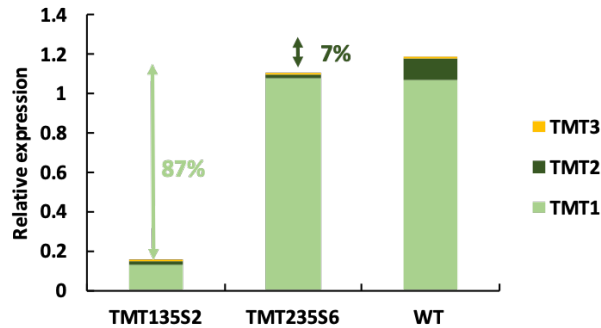


Figure 12: Quantification of TMTs global relative expression in TMT135S.2, TMT235S.6 and the WT lines in 16 DPA fruit pericarp samples. The percentages indicated represent the decrease of the TMTs total relative expression (Relative expression of TMT1+TMT2+TMT3) compared to the WT.

The RNAi lines used in this study both showed a reduction of the target gene expression. Indeed, we showed that TMT135S.2 was under-expressing TMT1 and TMT2, resulting in a global reduction of TMTs global expression of 87%. On the contrary TMT235S.6 repression was specific to TMT2 gene and led to a global reduction of TMTs relative expression of 7% (Figure 12). Interestingly, this small reduction in the global expression of TMTs genes resulted in a significant phenotype regarding growth and metabolism. It must be underlined that the phenotype observed in TMT235S.6 is not simply a "lighter" phenotype than the one observed in TMT135S.2. Indeed, the under-expression of TMT1 and/or TMT2 affected differentially the fruit shape index (ratio between fruit height and diameters). As shown in Figure 13, this ratio was higher in TMT135S.2 during the first 10 days post anthesis, revealing a more ovoid shape of the young fruits, and then similar to that measured in the WT. In TMT235S.6, it was similar to that measured in the WT for young stages and then smaller traducing a "flattening" of the fruit. Taken together, these observations suggest that TMT1 and TMT2 would have different roles and/or different expression territories and that TMT1 cannot compensate the loss of TMT2 activity.

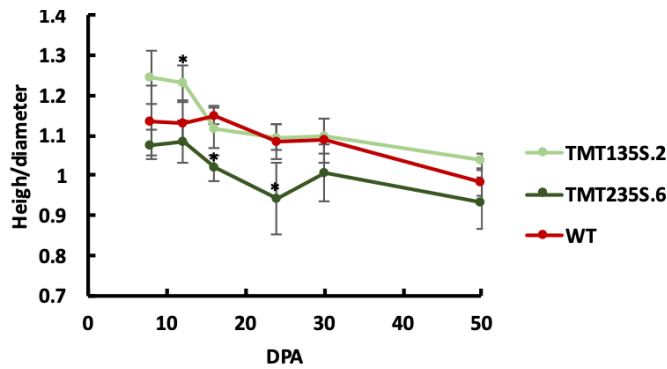


Figure 13: Evolution of the fruit index (height/diameter ration) during the development of TMT135S.2, TMT235S.6 and WT fruits. The dots represent the mean $\pm$ SE (n=5). Significant differences compared to the WT are shown by an asterix according to a one way ANOVA followed by a Tukey-HSD test.

Considering the change in the shape index, our results have clearly shown that the reduction of the diameter in young TMT135S.2 fruits was due to the reduction of the number of cell layers and not of cell size (Figure 10). This agrees with the major role of cell division in growth and the high mitotic activity, especially in the epidermis cells during the very beginning of development (Renaudin *et al.*, 2017). It has been shown that glucose was implicated in the regulation of the cell cycle. Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Hartig and Beck, 2006 showed a close correlation between the supply of glucose and the expression of cyclins (cycD2.1, D3.2, A3.2 and B1.2) required to drive G1/S and G2/M transitions. They also showed that glucose feeding alone was insufficient to trigger mitosis, and that auxin was also required for the completion of this process, indicating that the regulatory effect of glucose on the rate of cell division primarily results from signaling and crosstalk between sugar and auxin pathways rather than nutriment availability (Hartig and Beck, 2006). The decrease of glucose concentration in TMT135S.2 could be implicated, via signaling pathway, with the reduction of the cell division activity observed in TMT135S.2.

Regarding TMT235S.6 fruits, the number of cell layers was not significantly different from the WT, but the cell volume was smaller from 8 DPA to the end of development. Thus, the reduction of fruit diameters and height in TMT2 was more probably due to a reduction of cell expansion. Surprisingly, in TMT2 cell expansion was affected in very young fruits, which was not the case for TMT1. Then in older fruits, it was reduced in both lines. RNAseq data obtained on pericarp micro-dissection samples and published in the Tomato Expression Atlas of the Solgenomic data base, showed that TMT1 and TMT2 would have different expression territories in the pericarp (Figure 14). Thus, TMT1 would be expressed in the entire pericarp except in the bundle cells with its higher expression found in the small cells lining the outer

epidermis and in the inner epidermis; TMT2 would be weakly expressed in the entire pericarp, but strongly in the bundles cells. In young tomato fruit, it is assumed that sucrose is unloaded symplastically (Ruan and Patrick, 1995). In TMT235S.6, the cell size was reduced at 8 DPA whereas it was not affected in the TMT135S2. Moreover, only TMT2 has been under expressed in this latter, and twice as much as in TMT135S6. As a control, we also checked that the other transporters were not repressed (figure 2B). This result highlights the role of TMT2 at the very beginning of fruit development and suggests that it would play a role in the control of the composition of the vacuole and the sink size and/or strength, possibly by facilitating phloem unloading. This hypothesis agrees with previous modeling data showing that sucrose uptake, expressed on a gDW (Colombié *et al.*, 2015) or gFW (Beauvoit *et al.*, 2014) basis was high in young fruit and then decreased with time. Indeed, in the dividing phase, the RGR is maximal and sugars are necessary to sustain 1/ cell division, providing carbon skeletons for biosynthesis but also respiratory substrates for ATP production and 2/ metabolite accumulation in the vacuole for its expansion. Subsequently, fruit growth depends mainly on cell expansion and the RGR decreased with time, more rapidly in the WT than in the transgenic lines. According to the literature, sucrose unloading would be mainly apoplastic for later developmental stages (Ruan and Patrick, 1995), and the apoplastic invertase has been involved in the control of sink size (Kann *et al.*, 1996). Fruits under-expressing TMT1 and TMT2 are more affected than fruits under-expressing TMT2 only, thus indicating a complementary role of TMT1 that could play a major role in cell expansion, once the vacuole has grown to its maximal relative volume. This result shows that in addition to their potential differences in sugar transport affinity regarding hexoses vs. sucrose (Wormit *et al.*, 2006; Wingenter *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017) TMT1 and TMT2 differences could be more a question of spatial expression territories.

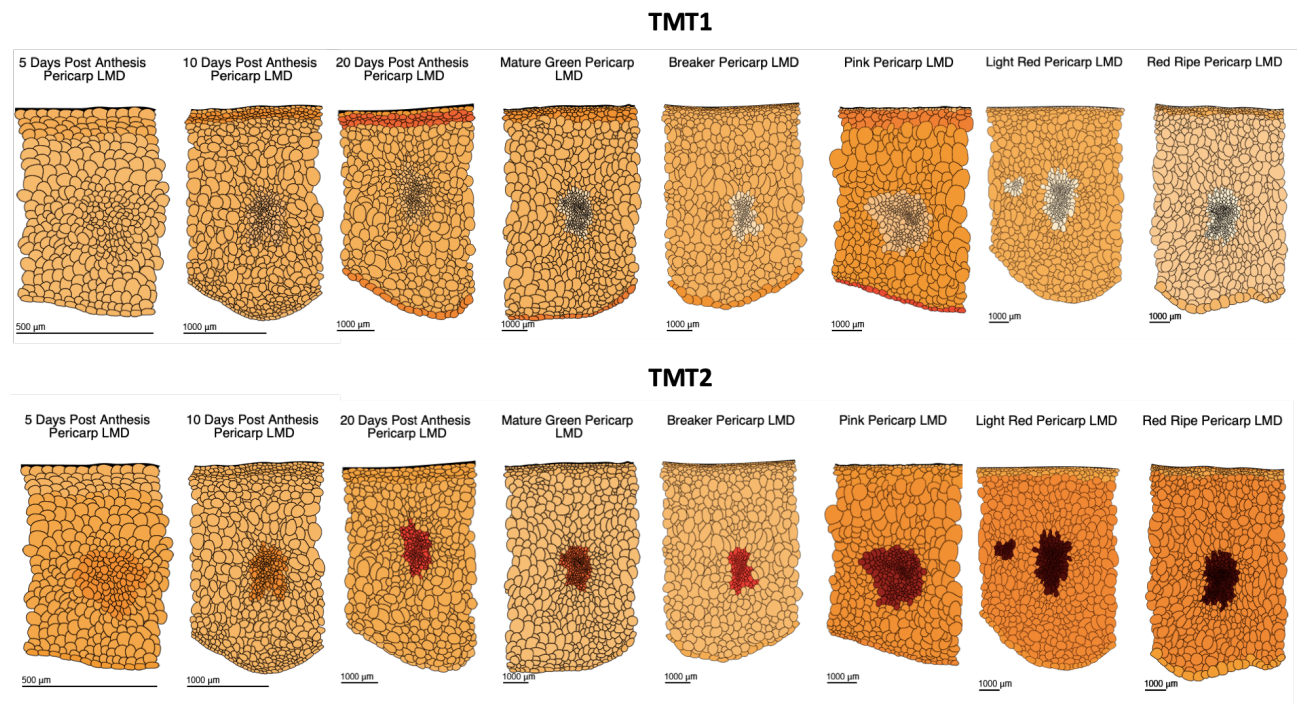


Figure 14: Expression territories of TMT1 and TMT2 in the pericarp of M82 tomato fruit during its development. LMD: lateral micro-dissection. Mature green: Fully expanded and the surface of the tomato is completely green in color; Breaker: definite break in color from green to tannish-yellow, pink or red on not more than 10% of the surface; Pink: More than 30% but not more than 60% of the surface, in the aggregate, shows pink or red color; Light red: More than 60% but not more than 90% of the surface, in the aggregate, shows pinkish-red or red; Red ripe: More than 90% of the surface, in the aggregate, shows red color. The degree of expression (expressed as reads per million mapped reads) is indicated by the red intensity (dark red: highly express, light red: low expressed). The data are extract from Tomato Expression Atlas (solgenomic).

Starch over accumulation is negatively correlated with fruit growth

Our results underline the impact of TMTs under-expression on fruit metabolism and more precisely on carbon reallocation between soluble and insoluble metabolic pools. Indeed, in TMT135S.2, the under expression of TMT1 and TMT2 led to a shift from hexose to starch accumulation. As a result, when starch was reaching its maximum concentration (16-30DPA), between 80 to 85% of the carbon that is normally used for hexose accumulation had been reallocated to starch, and the remaining 20% to cell wall. However, if it is usually admitted that starch accumulation is positively correlated to growth (Walker and Thornley, 1977), our results underline a significant negative correlation between starch content and fruit fresh or dry matter (-0.56 and -0.49 respectively) (figure 15), in other words, a negative correlation with fruit growth.

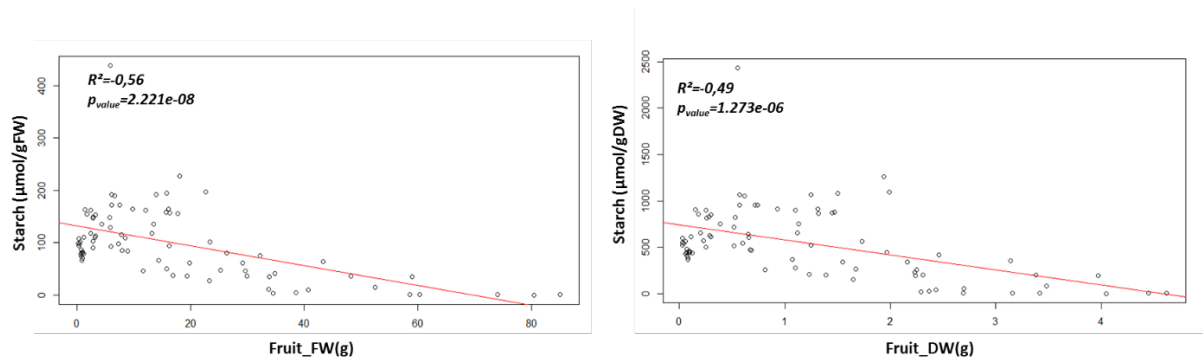


Figure 15: Correlation between starch content and fruit fresh or dry weight. A. Correlation between starch, expressed in $\mu\text{mol/gFW}$ and the fruit fresh weight. B. Correlation between starch, expressed in $\mu\text{mol/gDW}$ and the fruit dry weight. Correlation test was performed to obtain the p-Value indicated on each graph.

Fruit growth is ensured by the ability to import and accumulate soluble metabolites within the vacuole. It relies on leaf photosynthetic activity but also on the sink strength of the fruit itself, which depends on the capacity of the fruit to use the incoming sucrose. Once imported into the fruit, sucrose can follow two non-exclusive routes:

1. Be hydrolyzed by cytosolic invertase or SUSY to produce hexoses, which will then be phosphorylated to give G6P or F6P or directly UDPG in the case of SUSY. Hexose-P will subsequently be used for the synthesis of starch, or by glycolysis then by the TCA cycle to ensure biosynthesis (amino acids, organic acids, etc.) and the production of reducing power for respiration and ATP production.
2. Be transported into the vacuole via TMTs transporters where it will then be hydrolyzed by vacuolar invertase into glucose and fructose to be stored, in order to generate the osmotic strength necessary for vacuole growth and fruit growth.

Since TMTs gene expression was drastically decreased in TMT135S.2, we can assume that sucrose imports into the vacuole and by consequence, hexose accumulation were both reduced, thus explaining the decrease in the total osmolarity (figure 9A). In addition to sugars, many other compounds are accumulated in the vacuole to generate the osmotic strength allowing water import. Among them, we can cite organic acids, ions and amino acids (Martinoia *et al.*, 2000, Poucet *et al.*, 2021). In this study, we showed that TMTRNAi lines accumulated more ions, organic acids and amino acids, raising the question of the consequence on osmolarity. Interestingly, regarding the time-course of accumulation of the previously cited compounds, all of them were highly accumulated at the beginning of the development when the relative growth

rate was maximal. This matches perfectly with the vacuole requirement in osmotically active compounds since it is during this period that the highest growth rate of the vacuole is observed (Beauvoit *et al.*, 2014).

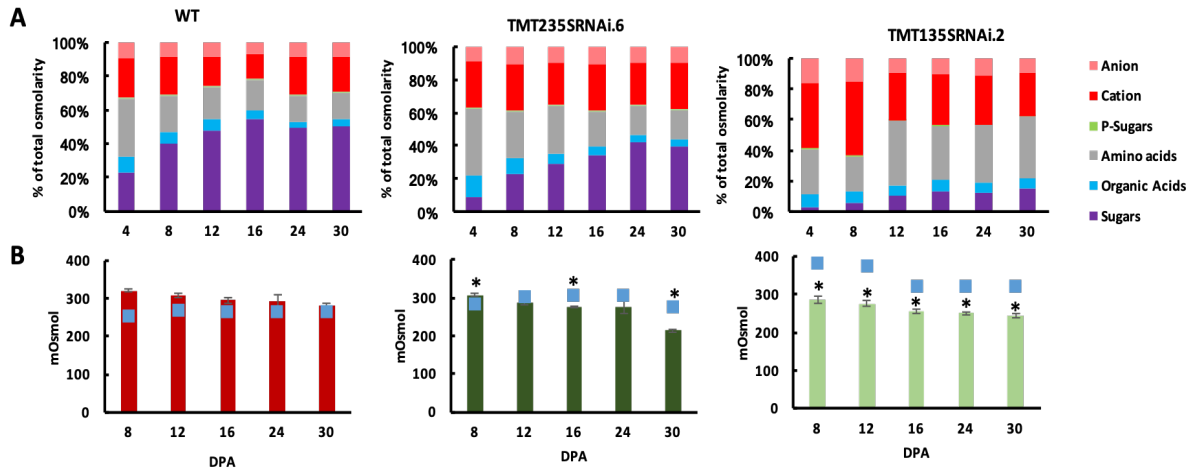


Figure 16: Evolution of the total fruit osmolarity during the development and the relative contribution of osmotically active compounds for WT, TMT235S.6 and TMT135S.2. A. Relative contribution of osmotically active compounds (Anions, cations, phosphorylated sugars, amino acids, organic acids and sugars) on the total osmolarity during fruit development. B. Calculated (blue square) and measured (colored bar) osmolarity of the fruit during the development. The values represent the mean ($n=5$) $\pm$ se. The significant differences with the WT are indicated with an Asterisk according to a one-way ANOVA followed by Tukey-HSD test.

Figure 16 presents the osmolarities measured and those calculated by adding osmotically active metabolite concentrations (blue squares, Figure 16B). The relative contribution of each metabolite is shown in Figure 16A. Although in the WT sugars were the main contributors (40-50% of the total osmolarity), this was not the case in TMT135S.2 (6- 14%) and in TMT235S.6 (20- 40%). On the contrary, the contribution of ions and amino acids was increased. TMT135S.2 showed two phases, the first eight days where ions were the main contributors (63% in TMT135S.2 versus 30% in the WT) and from 8 DPA to the end of the development where amino acids and ions contributed equally to around 40% each of the total osmolarity. However, despite their accumulation, ions and amino acids did not compensate the decrease in total osmolarity due to the repression of sugar import into the vacuole (Figure 9A and 16B).

Interestingly, for TMT135S.2, the calculated osmolarity was always overestimated compared to the measured one (Figure 16B). This result, previously observed in tomato leaf (Poucet *et al.*, 2021), was shown to be due to ions chelation especially with organic acids (Volk

et al., 2002; Li *et al.*, 2003; Poucet *et al.*, 2020). The absence of compensation of the total osmolarity in transgenic lines by ion accumulation is probably due, here again, to their chelation, making them osmotically inactive. As a result, if the sink strength of the fruit tends to be maintained by the overaccumulation of insoluble compounds (i.e. starch and cell wall), the side effect of the decrease in soluble compound accumulation to ensure vacuole growth can then explain the decrease of fruit size in the transgenic lines.

Starch accumulation that mobilizes hexose-phosphates leads to a competition between glycolysis and carbon storage

Interestingly, we showed that TMT135S.2 presented a strong decrease in hexose-phosphate content. If a higher glycolytic flux can be a part of the explanation regarding the increase of the glycolytic enzymes' capacities (Supplemental data figure S2), a high part of the cytosolic pool of hexoses-P was redirected toward starch synthesis in the plastid. Interestingly, TMT135S.2 also exhibited an increased glucose/fructose ratio during early fruit growth, when starch accumulates. Hexoses can be produced from sucrose by SUSY or invertases, or from starch degradation. In young fruits, especially in TMT135S.2, starch accumulated and its turnover was probably negligible in young developmental stages. The increase in SUSY capacity (figure S1 – Supplemental data) could lead to an increase in the fructose/glucose ratio whereas increased invertase would tend to equilibrate glucose and fructose in equimolar concentrations. As there is no other pathway leading to glucose synthesis without involving fructose synthesis, the increase in glucose/fructose ratio reflects either a better use of fructose and/or a less good use of glucose. In both cases, it implies a modification of the flux through the enzymes implicated in hexose metabolism in the early development. As shown previously, capacities of glucokinase and fructokinase were reduced between 8 and 24 DPA (Figure S2 – Supplemental data). On the other hand, SWEET17RNAi lines showed an increase in fructose accumulation when SWEET17 expression was reduced (Chapter 1, figure 5, 8DPA). We can then hypothesize that fructose produced in the vacuole is exported to the cytosol via the SWEET transporters, which have been shown to be fructose specific in *Arabidopsis* (Chardon *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Li-ping *et al.*, 2017). Once in the cytosol, it would be phosphorylated to supply the hexose-phosphate pool necessary to support starch production. As a result, starch accumulation could lead to a competition between glycolysis and starch synthesis, making the hexose-phosphate pool a bottleneck in carbon allocation.

Interestingly, the hexose and hexose-P contents, which were strongly reduced during the first 30 days of development, were increased again between 30DPA and maturity, to end up close to the WT contents at the mature sage. This increase was perfectly correlated with the remobilization of starch occurring from 30 DPA, implying that glucose and G1P produced during starch degradation are used to produce G6P, F6P, and UDPG. In addition, as fructose content also increased again after 30DPA, it implies a re-synthesis of sucrose through SPS and SPase followed by its hydrolysis in the cytosol to give back hexoses.

Starch accumulation instead of hexose accumulation: an expensive way to maintain sink strength

As previously mentioned, sink strength is reflected by the capacity of the sink to use the incoming sucrose. Starch accumulation can participate to this process, but with the limit that it cannot participate in cell expansion since it is an insoluble molecule. On the contrary, when sucrose is imported into the vacuole and degraded into glucose and fructose, it participates in sink strength and contributes to maintain the vacuole water potential low. We showed that in TMT135S.2, sink strength was mainly ensured by the accumulation of insoluble compounds, i.e. starch and to a lesser extent, cell wall. The starch synthesis pathway of heterotrophic tissues is relatively well known. Thus, once imported in the fruit, sucrose is converted to UDP-glucose and fructose via SUSY. The UDP-glucose is then converted to G1P by the UGPase and fructose is phosphorylated in F6P via fructokinase. F6P, G6P and G1P are interconverted in the cytosol by the action of PGI and PGM. G6P enters the plastid in counter exchange for inorganic phosphate (Kammerer *et al.*, 1998) via the glucose-6-phosphate: phosphate translocator (GPT) and is converted back to G1P by the plastidial PGM. If these steps are shared with glycolysis, the first committed step in starch synthesis pathway is the conversion of G1P into ADPG by AGPase. This reaction requires ATP, which is imported from the cytosol via the amyloplastidial ATP/ADP translocator (AATPT) (Tjaden *et al.*, 1998). Starch is then formed from ADPG by starch synthases and starch branching enzymes. As a result, from an energy point of view, the synthesis of starch from one molecule of sucrose results in the consumption of between 1.5 and 2 molecules of ATP whereas the transport of one molecule of sucrose into vacuole costs only 1 ATP. In addition to the higher requirement in ATP for starch accumulation, TMT135S.2 also accumulates more amino acids and organic acids. Amino acids are for the most part synthesized from 2-oxoglutarate via the TCA cycle (Sweetlove *et al.*, 2010), thus implicating the activity of anaplerotic pathways, mainly through PEPc, to supply the cycle with carbonaceous

substrates. Regarding citrate, it is synthesized through the first reaction of the TCA cycle and malate can be either synthesized from the TCA cycle or directly via the cytosolic malate dehydrogenase (MDH). In the end, whether for the production of amino acids or organic acids, an important part of the PEP was probably reallocated to biosynthesis, i.e. via the PEPc activity, unbalancing the PK / PEPc ratio and the furniture of the TCA cycle to the detriment of respiration and ATP production. If we consider all these elements, on the one hand, a higher cost for sugar storage (starch instead of hexoses), on the other hand the need to decrease the respiratory flow to ensure the increase of the anaplerotic pathway for the production of amino acids and organic acids, it is conceivable that the production of ATP was limiting to ensure, in TMT135S.2, an optimal growth of the fruit.

TMT genes play a crucial role in fruit growth by a concomitant involvement in sink strength and the maintenance of water potential of the vacuole

This study clearly underlines that considering the pericarp as a global entity can be delicate when studying a process that depends on genes with specific expression territories. Based on the phenotype of TMT1 and TMT2 RNAi lines, we came up with the following model: In TMT235S.6 line, the kinetic accumulation of carbon compounds can be divided in two phases: The first fifteen days of the development where it follows the profile of TMT135S.2 for hexoses, hexoses-P and organic acids and from fifteen days to mature stage where the phenotype is rescue and follows the WT profile. Interestingly, these two distinct phases overlap with the RGR profile showing that growth is maximum during these first 15 days. As shown previously, TMT2 is specifically expressed in vascular bundles cells, potentially linking its role in the post phloem unloading process of sucrose. Indeed, TMT2 could be in charge of sucrose unloading during the rapid growth phase at the beginning of fruit development by importing sucrose into the vacuole of bundles surrounding cells, to provide the sink strength necessary to maintain a rapid sucrose import and ensure the « growth boost » of the vacuole. The sucrose and/or hexoses (if cell wall invertase is implicated) are then distributed to the rest of the pericarp. In the rest of the pericarp, TMT1 would be responsible for sucrose and/or hexose import in the vacuole to ensure vacuole enlargement and by extension cell growth and thus, it would be more linked to growth processes of the global pericarp. When the relative growth rate decreases, the import of sucrose inside the fruit also decreases (Beauvoit *et al.*, 2014). The involvement of TMT2 in the transport of sucrose then becomes less important: The resulting activity of the transporters would be sufficient to ensure the local sink strength for sucrose

unloading and its distribution to surrounding cells, which will explain that the metabolic phenotype of TMT235S.6 is rescued for later developmental stage

SUPPLEMENTAL DATA

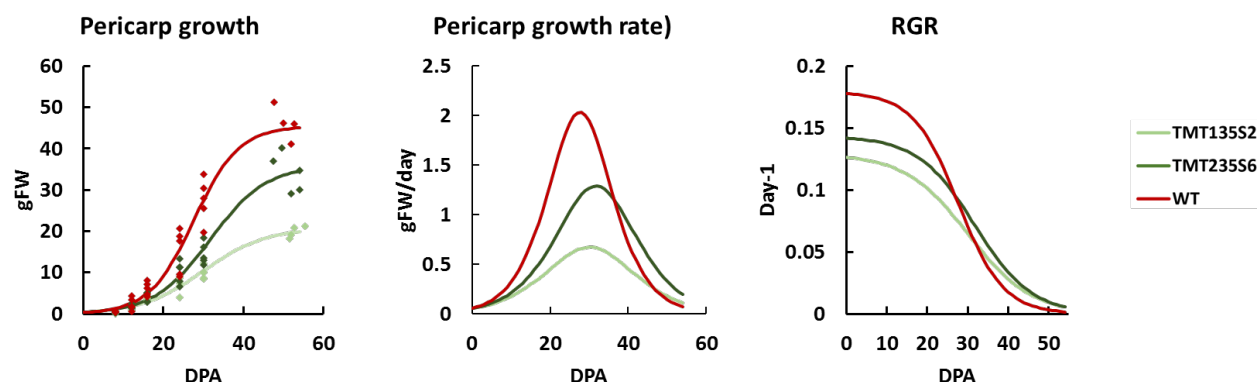


Figure S1: Pericarp growth parameters in the WT and the two selected transgenic lines, TMT135S.2 (light green) and TMT235S.6 (dark green) Left panel: Total pericarp fresh weight (g) evolution during the fruit development. The dots represent the experimental points corresponding to 5 biological replicates per the studied stages (4, 8, 12, 16, 24, 30 DPA and mature stage). The line represents the fitting curve using sigmoidal mathematical function. Middle panel: Pericarp growth rate calculated by derivation of the growth curve for each fitted point. Right panel: Relative growth rate of the pericarp during the development

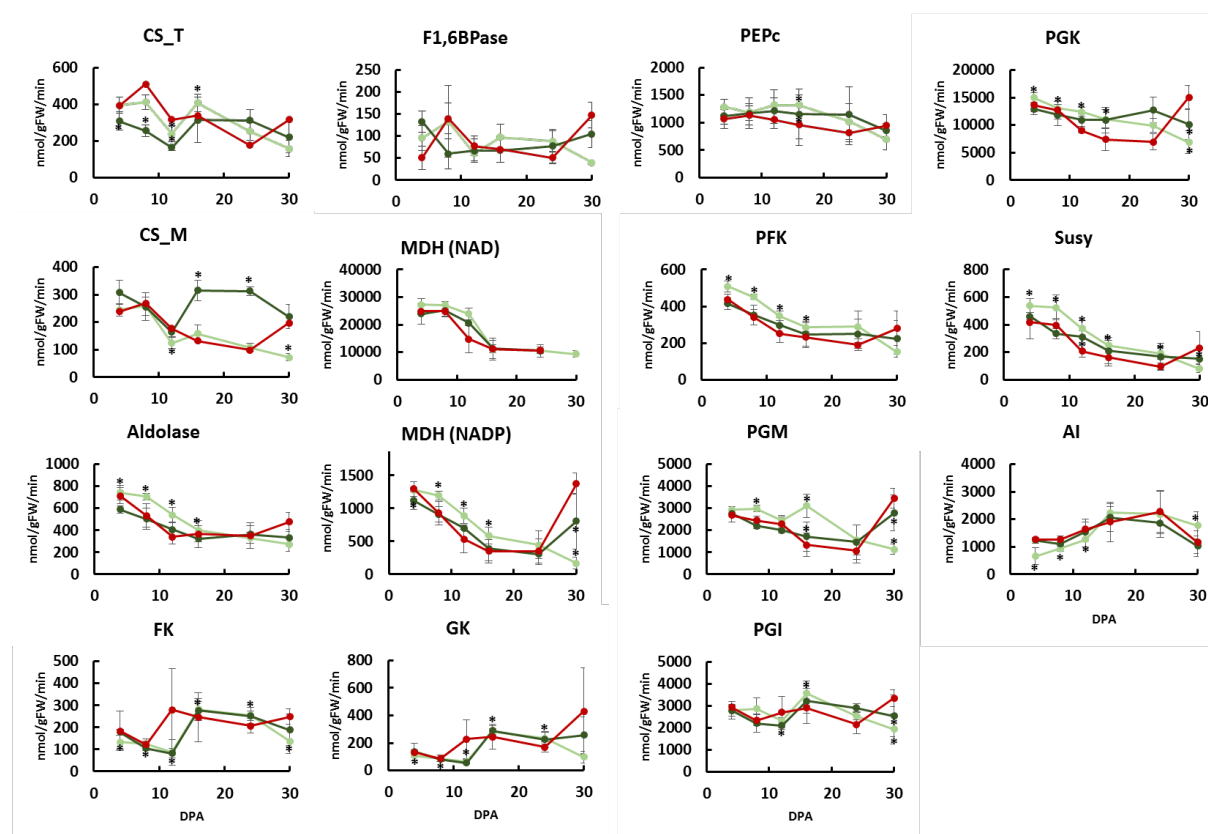


Figure S2: Maximal activities of 15 enzymes of central metabolism throughout tomato fruit development in the WT (red), TMT135S.2 (light green) and TMT235S.6 (dark green). Activities were measured in fruit pericarps harvest between 0 DPA and mature stage at substrate saturation and 25°C, and they are expressed as nmol/min/gFW $\pm$ SD (n=5). CS_T: total citrate synthase; F1,6BPase: cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase; PEPc:

pyruvate carboxylase; PGK: phosphoglycerokinase, CS_M: mitochondrial citrate synthase; MDH(NAD): NAD-dependent malate dehydrogenase; PFK: phosphofructokinase; SUSY: sucrose synthase, MDH(NADH): NADH-dependent malate dehydrogenase; PGM: phosphoglucomutase; AI: Acidic invertase, FK: fructokinase; GK: glucokinase, PGI: phosphoglucose isomerase

Chapter 4

FBA MODELING METHOD: A PRELIMINARY GLOBAL VISION OF FLUX REMODELING THROUGHOUT THE FRUIT DEVELOPMENT OF TRANSGENIC LINES

Chapter 4: FBA modeling method: a preliminary global vision of flux remodeling throughout the fruit development of transgenic lines

INTRODUCTION

In the previous chapter, we elaborated a hypothesis about metabolic remodeling that would occur in the transgenic lines under-expressing TMT genes. However, measuring the accumulation of carbon compounds only gave us a picture of the cell metabolism but the way it happened with in particular the distribution of fluxes through the different metabolic pathway remains speculative. In addition, the complexity of the metabolic network and its regulation make an intuitive analysis of these biological systems difficult. In order to investigate flux modifications (i.e. the conversion rate of metabolites in the network) between the WT and the transgenic lines, mathematical modeling of metabolism is suitable because it allows the characterization of the structure, dynamics and behavior of complex metabolic networks by integrating parameters such as growth, dry matter accumulation and enzyme activities as a whole. Indeed, if metabolic pathways provide constituents for biomass and energy, their description using flux models provides a dynamic description of the metabolic phenotype. For the moment, the most powerful technique allowing flux quantification probably is Metabolic Flux Analysis (13C-MFA or 13C-INST-MAF). This method relies on the use of labeled precursors and the study of the distribution of the labeling into the different intermediaries of the metabolic pathways to deduce fluxes (Allen *et al.*, 2009). In plant, this approach has been successfully used to quantify fluxes of intermediary metabolism in maize root tips (Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1995; Ana Paula Alonso *et al.*, 2007), tomato cells (Rontein *et al.*, 2002), sunflower embryos (Ana P. Alonso *et al.*, 2007), oilseed rape embryos (Schwender *et al.*, 2015), Arabidopsis cell culture (Williams *et al.*, 2008) or Arabidopsis plants (Szecowka *et al.*, 2013). However, 13C-MFA is faced with a number of limitations such as the size of the metabolic network or the quantity and complexity of experimental data necessary to generate a flux map. To address this limitation, other methods have been developed such as flux balance analysis (FBA).

FBA is a constraint-based modelling approach that allows the prediction of metabolic steady-state fluxes by applying mass balance constraints to a stoichiometric model. The fact that only the stoichiometry of the metabolic model needs to be known provides the advantage that specific kinetic parameters are not required. Mass balance information, such as growth rate, biomass composition and substrate consumption rate, are used to fix the boundaries of the flux solution space (Reed and Palsson, 2003). FBA has been applied to Arabidopsis thaliana

(Poolman *et al.*, 2009; Dal'Molin *et al.*, 2010; Mintz-Oron *et al.*, 2012), endosperm of barley seeds (Grafahrend-Belau *et al.*, 2009, 2013), oilseed rape embryos (Hay and Schwender, 2011), maize (Saha, Suthers and Maranas, 2011), rice leaf cells (Poolman *et al.*, 2013) and tomato fruit (Colombié *et al.*, 2015). However, if this technique is powerful because it allows the analysis of a very large network, it becomes limiting for solving duplicated and compartmentalized metabolic pathways, metabolic cycles or reversible reactions (Wiechert *et al.*, 2001).

Finally, kinetic modeling allows a dynamic description of the metabolic network, considering information about the enzymatic reactions (such as the Michaelis-Menten equation, binding constant, maximal activity), thermodynamic data concerning the reversibility of the reaction, the concentration of the input and output metabolites, and information on enzymes compartmentalization. Such modeling can also be coupled with isotopic labeling. The metabolic network is described by differential equations integrating enzymes parameters that can further be solved to estimate fluxes. Although the networks studied by this approach are still small, its major interest is to allow a sensitivity analysis, providing information on the control of the studied pathways (Morgan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Beauvoit *et al.*, 2014).

In this chapter, preliminary work using FBA modeling will be presented in order to investigate the flux remodeling in TMT transgenic lines compared to the WT. FBA modeling was used to describe fruit development from 4 to 54 DPA, by using data of mass composition and growth presented in chapter 2. The goal was to explore some of the hypotheses put forward in the previous chapter, namely:

- The potential modification of the flux of sucrose uptake in TMT135S.2
- The energy over cost of the accumulation of starch and amino acids in TMT135S.2, as well as the impact on the respiratory flux.
- A possible imbalance of the PK / PEPc ratio to favor the increase in the anaplerotic flux to provide the TCA cycle with the carbon necessary for the accumulation of amino acids

RESULTS

Method

The first step of FBA is to describe the metabolic network. Then, this network must be transcribed in the form of mathematical equations. The method consists in representing a numerical matrix that defines the stoichiometric coefficients of each reaction, based on the network topology (negative coefficient for the degraded metabolites, positive for the ones that are synthesized and 0 if the metabolite is not involved in the reaction). At metabolic steady state, the concentrations of metabolites are constant and the fluxes through each reaction can be written as a set of linear equations. This mass balance represents the major constraint in FBA. The next step is to define a phenotype that is used as a biological function (objective function) to solve the system. For example, in the study of (Grafahrend-Belau *et al.*, 2009) the maximization of growth per flux unit was used as the objective function. This objective function (Z) will be used to quantitatively define how much each reaction contributes to the phenotype. It can be written as $Z = cV$ where c represents the vector that defines the weight of each flux “ V ”. The final objective of FBA is to find the solution V that optimizes better Z . Linear programming is used to identify a flux distribution that maximizes or minimizes the objective function in the space defined by the fluxes (Lee *et al.*, 2006).

The stoichiometric model of tomato fruit

The common step to the three methods of flux modeling described below is the establishment of the network topology, meaning the description of the pathways implicated in the process of interest. The data acquired in this study are from all pericarp, composed of different cells having potentially different composition and role in the tissue. The model described here will consider tomato fruit pericarp as one cell corresponding to the average metabolism of the tissue. The network, built according previous work (Beurton-Aimar *et al.*, 2011; Colombié *et al.*, 2014) describes the central metabolism, including the breakdown and transformation of the external nutriment to produce energy and metabolic precursor of accumulated compounds (amino acids, proteins, starch, cell wall...). It includes glycolysis, TCA cycle, pentose phosphate pathway, starch, sucrose, cell wall, amino acids and protein metabolism, nucleotide biosynthesis, respiratory chain reaction and redox metabolism (Supplemental data table S1). As tomato fruit is mainly heterotrophic, the carbon source entering the fruit was referred as sucrose

uptake ($V_{\text{suc-up}}$). In addition, as green fruit potentially produces 14% of its photoassimilates by photosynthesis (Tanaka *et al.*, 1974), the carboxylation of rib1,5BP leading to triose phosphate was also included (V_{rbco}). In addition to sucrose, the main carbon source, glutamine uptake was added as a carbon and organic nitrogen source ($V_{\text{gln-up}}$) and nitrate as the mineral nitrogen source. The main biosynthetic processes were described (see Supplemental data table S1) with overall reactions for:

- Cell wall biosynthesis has been set up as the polymerization of cellulose, glucose, glucuronic acid, galacturonic acid, arabinose, xylose, galactose, rhamnose, mannose and fucose, and is referred as only one final reaction (V_{cws}). The degradation flux is referred as V_{cwd} .
- Protein synthesis (V_{protein}) with the molar proportion of four classes of amino acids (glutamate, serine, aspartate and alanine) according to the average's amino acids composition of protein in tomato (Friedman, 2002).
- Lipid synthesis as diacylglycerol (V_{dag}) from pyruvate and triose phosphate.
- Nucleotide synthesis (V_{nucleo}) as DNA and RNA from ribose-5-phosphate.
- Biosynthesis (V_{ss}) and degradation (V_{sd}) of starch.

All the accumulated compounds were described as a simple accumulation:

- Organic acids: malate ($V_{\text{ac-malate}}$) and citrate ($V_{\text{ac-citrate}}$).
- Soluble sugars: glucose ($V_{\text{ac-glc}}$), fructose ($V_{\text{ac-fru}}$) and sucrose ($V_{\text{ac-suc}}$).
- Free main amino acids: glutamate ($V_{\text{ac-glu}}$), aspartate ($V_{\text{ac-asp}}$), alanine ($V_{\text{ac-ala}}$) and serine ($V_{\text{ac-ser}}$), coming from 2-oxoglutarate, OAA, pyruvate and 3-phosphoglycerate respectively.

These 16 fluxes are defined as external fluxes. Except for V_{dag} , V_{nucleo} , $V_{\text{ac-glu}}$, $V_{\text{ac-asp}}$, $V_{\text{ac-ala}}$ and $V_{\text{ac-ser}}$, all the other fluxes have been determined experimentally. Glycolysis, pentose phosphate pathway and TCA cycle were written as described in the introduction of the manuscript with their associated reactions.

Biosynthesis of the main biomass components (cell wall, proteins, lipids and starch) require both ATP and NAD(P)H and thus the model is considering energy requirements. The co-factors NADP/NADPH were linked to biomass production and the cofactors NAD/NADH and FAD/FADH₂ were linked to ATP synthesis ($V_{\text{atpsynthase}}$) via two complexes of the mitochondrial respiratory chain (V_{rcc1} for NADH) and (V_{rcc2} for FADH₂). Recycling of AMP by adenylate kinase is referred as V_{adk} . The portion of synthesized ATP that is not used for growth has been balanced by the model as an ATP hydrolyzing reaction ($V_{\text{nga-ATPm}}$) that, physiologically,

represents cellular maintenance (Amthor, 2000). The redox metabolism has been described as 3 types of reactions implicated directly or indirectly in the glutathione/ ascorbate cycle:

- The enzymes implicated in ascorbate metabolism: galactose dehydrogenase ($V_{\text{gal dh}}$), ascorbate peroxidase (V_{apx}), dehydroascorbate reductase (V_{dhar}).
- The enzyme implicated in glutathione metabolism: glutathione reductase (V_{gr}).
- The enzyme implicated in NADP/NADPH: NADPH oxidase (V_{nox}).
- The enzymes strictly implicated in ROS metabolism: superoxide dismutase (V_{sod}) and catalase (V_{cat}).

Finally, all the co-factors were defined as internal metabolites, which means that they can be balanced, thus constraining the metabolic network not only through the carbon and nitrogen balance, but also through the redox and energy status. Among the metabolites of this network, 18 were external compounds: exogenous sucrose, glutamine, nitrate, CO_2 , sugars (glucose, fructose and sucrose), organic acids (malate and citrate), free amino acids (glutamate, aspartate, serine and alanine), proteins, cell wall polysaccharides, starch, lipids and nucleotides.

Constraints limiting the flux space and definition of the objective function

The constraints applied to limit the flux solution space were:

- A steady-state at each stage was assumed to describe the tomato fruit development (Colombié *et al.*, 2015)
- The thermodynamic property of the enzymes, ie. reversibility or irreversibility.
- The experimental concentrations of accumulated metabolites and biomass components at the 7 developmental stages (4, 8, 12, 16, 24, 30 and red ripe). In order to solve the model on a daily basis, the experimental data were fitted with a polynomial or sigmoidal function depending on the profile (Table 1) (Colombié *et al.*, 2015). The corresponding fluxes were determined by deriving the value for each time point. When the resulting derivate was positive, the flux was considered in the way of synthesis whereas a negative value was considered as remobilization. The resulting fitting curves are presented figure 1.
- The import of carbon and nitrogen as glutamine was fixed to a maximum of 10% of the sucrose uptake, based on the composition of phloemic sap measured in *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus* (Lohaus and Schwerdtfeger, 2014); and *Solanum lycopersicum* (Valle *et al.*, 1998; De Marco *et al.*, 2021).

The objective function chosen to solve the system consists in minimizing the sum of the squares of internal fluxes, in other word, this function follows the principle of “minimal effort” and minimal consumption of the available resources (Holzhütter, 2004; Colombié *et al.*, 2015; Colombié *et al.*, 2017).

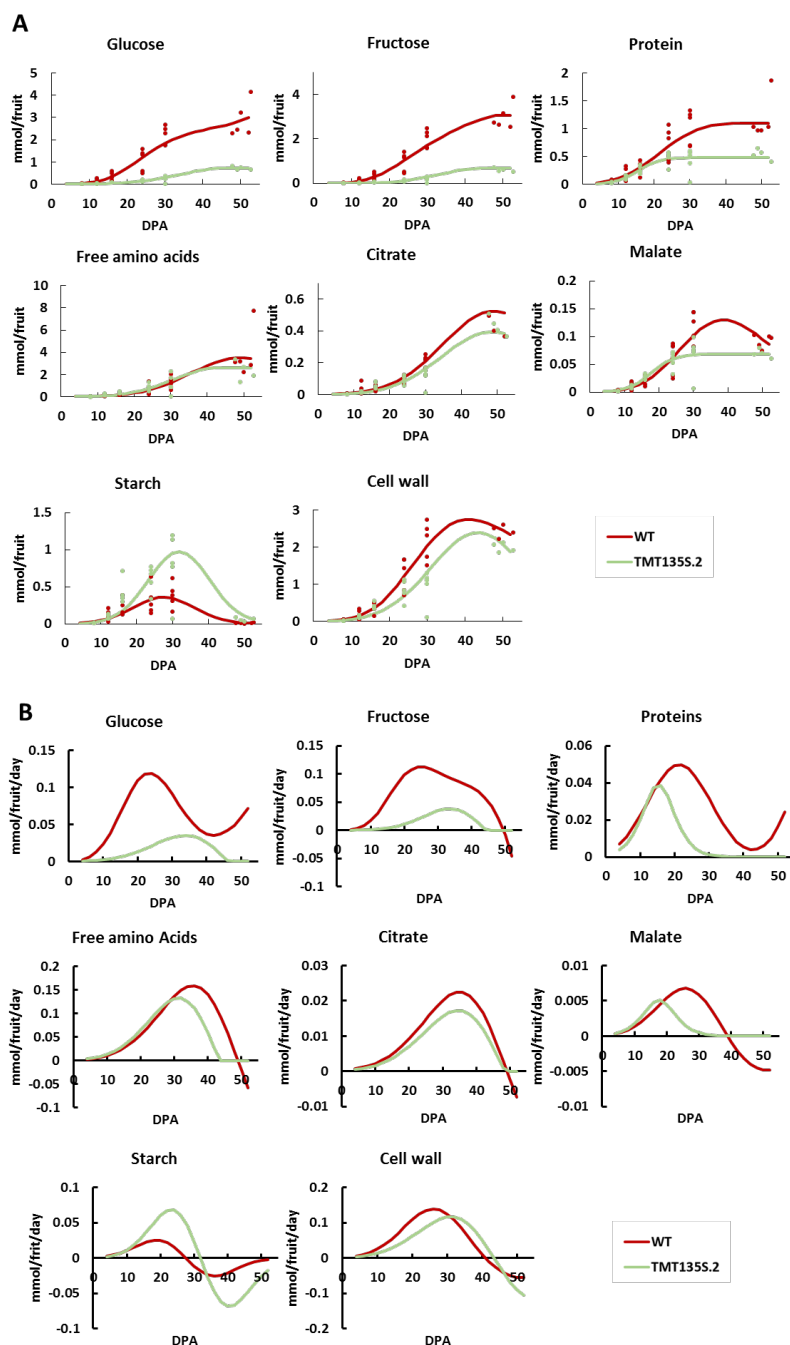


Figure 1: Calculation of the external fluxes of the metabolic model. A. Time course of the concentrations of the accumulated metabolites and the biomass components (point) associated to the fitted mathematical function (lines) as described in table 1. B. The corresponding fluxes calculated by derivative. Day post anthesis (DPA) is expressed in day, concentrations are in mmol/fruit and fluxes are in mmol/fruit/day.

	WT	TMT135S.2
Glucose	Polynomial function degree 4	Polynomial function degree 2
Fructose	Polynomial function degree 2	Polynomial function degree 2
Proteins	Polynomial function degree 3	Sigmoidal function
Free amino acids	Polynomial function degree 2	Polynomial function degree 2
Citrate	Polynomial function degree 2	Polynomial function degree 2
Malate	Polynomial function degree 3	Sigmoidal function
Starch	Polynomial function degree 2	Polynomial function degree 2
Cell wall	Polynomial function degree 3	Polynomial function degree 2

Table 1: Mathematical functions used for the fitting of metabolic concentration of accumulated compounds in the WT and TMT135S.2

FBA: a way to estimate the flux carbon flux entering the fruit

As we potentially affect the sink strength of the fruit by decreasing sugars accumulation in the vacuole, the question of whether or not sucrose import was affected is crucial. In the WT, when expressed in mmol/gFW/day, sucrose import showed an increase during the early stages of development, from 8 to 12 DPA, corresponding to the more active phase (cell division) of the fruit. It was then followed by a decrease during cell expansion. If sucrose import was clearly decreased in TMT135S.2 during the first 20 days of development compared to the WT, it became higher during the expansion phase (Figure 2A, left panel). On the contrary, when expressed per fruit, sucrose import was lower in TMT135S.2 whatever the fruit age, with values 0.7 to 2.5 times lower than the WT (Figure 2A, right panel).

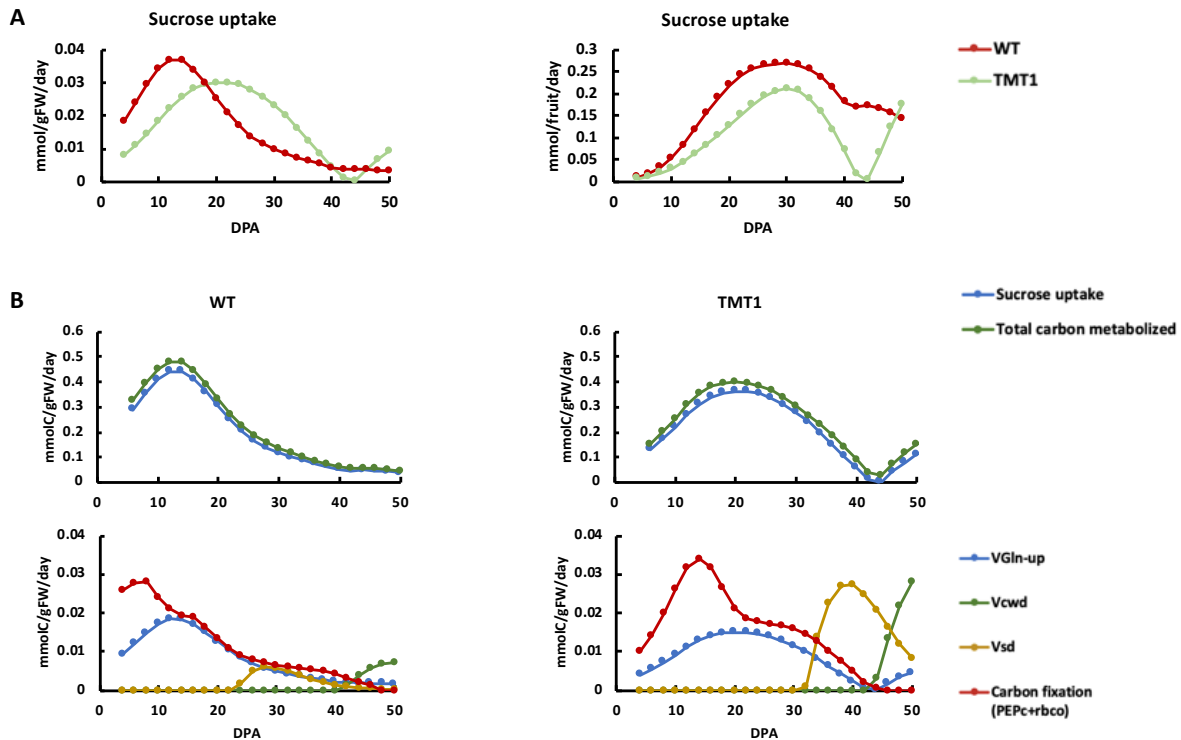


Figure 2: Carbon metabolized throughout tomato fruit development. A. Sucrose uptake throughout tomato fruit development in WT (red line) and TMT135S.2 (green line). The data were expressed in mmol/gFW/day (left panel) and in mmol/fruit/day (right panel). B. Upper panel: total carbon metabolized and sucrose uptake. Lower panel: glutamine uptake, starch degradation, cell wall degradation and CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase (V_{pepc}) and rubisco (V_{rbco}). Fluxes are expressed in mmol carbon/gFW/day.

As expected, sucrose uptake was the main carbon source for both lines, independently of the stage of development (Figure 2B, upper panel). The flux of carbon demand, in other words the metabolized carbon, was compared at each developmental stage for the WT and TMT135S.2. It was expressed as the sum of sucrose and glutamine uptake ($V_{\text{suc_up}}$ and $V_{\text{gln_up}}$), the reactions of carboxylation via phosphoenolpyruvate carboxylase (V_{pepc}) and the photosynthetic activity (V_{rbco}) and when it occurred, starch and cell wall degradation (V_{sd} and V_{cwd}), these latter being considered as endogenous carbon sources (figure 2B, lower panel). In WT, the contribution of substrate carboxylation, via PEPc activity and fruit photosynthesis, to total carbon metabolized was highest (8%) at the very beginning of development, and then progressively decreased. On the contrary, in TMT135S.2, the contribution of substrate carboxylation was low in very young fruit, then increased to reach its maximum (about 10% of the total carbon metabolized) between 12 to 16 DPA. If the flux through PEPc represented the highest contribution, fruit photosynthesis accounts for 33-40% in TMT135S.2 (from 33 to 48% in the WT) (figure 2B). Interestingly, this higher flux of substrate carboxylation, especially via

the anaplerotic pathway, overlaps the period of starch accumulation. This entry of carbon via the carboxylation of PEP could be necessary to compensate for the carbon deviation through starch synthesis (via the pool of hexose phosphates) and sustain the TCA cycle with the carbon necessary for biosynthesis. Similarly, in the transgenic line it stayed relatively high from 20 to 30 DPA whereas it is largely decreased in the WT, probably to support the high demand in carbon for amino acids accumulation.

Interestingly, at the end of the growing phase, starch degradation became the major contributor to the total carbon metabolized in TMT135S.2, representing 77% at the mature green stage (44 DPA). In the WT, the contribution of starch degradation was earlier but also lower, since it reached a maximum of 15% at 30 DPA. Finally, the contribution of cell wall degradation, which appeared specific to the ripening stage, was also more important in TMT135S.2, since it represented 18% against 15% in the WT (Figure 2B).

Respiration and energy balance

CO₂ efflux is a net flux resulting from decarboxylation (ie., isocitrate dehydrogenase, V_{idh} ; 2-oxoglutarate dehydrogenase, V_{kgdh} ; pyruvate dehydrogenase, V_{pdh} ; malic enzyme, V_{me} , and glucose-6-phosphate dehydrogenase, V_{g6pdh}) and carboxylation (V_{pepc} and V_{rbco}). The values estimated by the model are presented Figure 3A. Interestingly CO₂ efflux was always higher in TMT135S.2 whatever the developmental stage. When expressed in mmol/gFW/day, CO₂ released was drastically increased between 12 and 20 DPA in TMT135S.2 compared to WT. The reactions that mainly contributed to this production are pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase and G6PDH that were all enhanced in TMT135S2. Since CO₂ released is closely linked to respiration and ATP synthesis, we investigated ATP production during the development in both lines (Figure 2B). ATP was synthesized by kinase activities (V_{pk} , V_{scol} , V_{pgk}) and by oxidative phosphorylation in the mitochondrial respiratory chain (V_{atpase}). It was consumed to ensure cell growth through recycling by adenylate kinase (V_{adk}) and its hydrolysis for cell maintenance ($V_{nga-ATPm}$). When expressed in mmol/gFW/day, in the WT the ATP production profile showed an increase at the beginning of cell division, a decrease during cell expansion and a slight re-increase at ripening. Regarding TMT135S.2 and comparing to WT, the ATP production can be again divided in three main phases: 1/ between 4 and 12 DPA: ATP production increased with time, but remained 4 to 1.2 times lower than in the WT; 2/ between 12 and 42 DPA: the ATP production decreased but became always higher than in the WT. 3/ the re-increase during the ripening phase that was exacerbated in TMT135S2. Independently to

the development stage, ATP was mainly produced by oxidative phosphorylation, about 75% in the WT (as previously reported in Colombié *et al.*, 2015) and 65% in TMT135S.2.

The re-increase in ATP production at the end of the growth phase has been previously showed by Colombié *et al.*, 2015, 2017. It coincides with the climacteric respiration, known to occur just before the ripening phase and it was shown to be dependent on starch and cell wall remobilization at the end of the fruit development (Colombié *et al.*, 2017). As expected, the over-accumulation of starch in TMT135S2 resulted in an excessive supply of carbon whereas growth and hence carbon demand dropped.

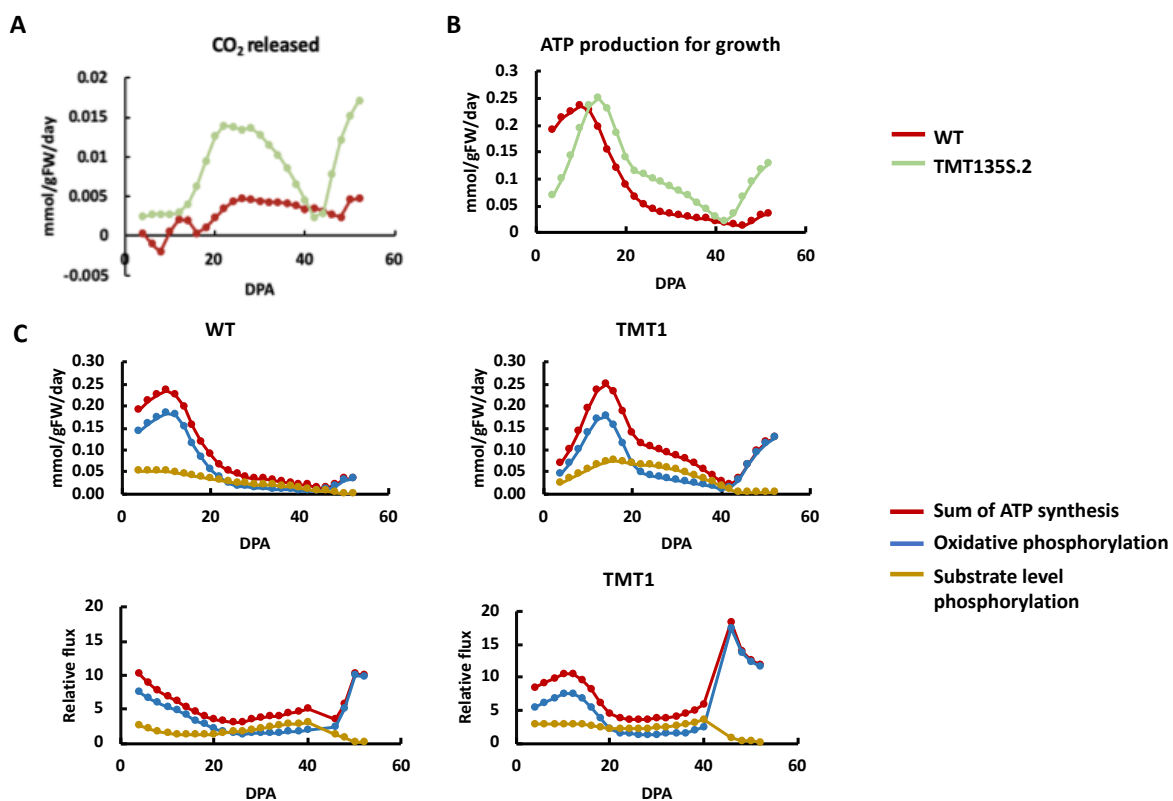


Figure 3: Respiration and energy balance throughout tomato fruit development. A. CO₂ released resulting from carboxylation reactions [phosphoenolpyruvate carboxylase (V_{pepc}) and rubisco (V_{rbco})] that were conventionally negative, and decarboxylation reactions [isocitrate dehydrogenase (V_{idh}), malic enzyme (V_{me}), pyruvate dehydrogenase (V_{pdh}) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (V_{g6pdh})] were positive. B. ATP synthesis from oxidative phosphorylation (V_{atpase}) and from substrate level phosphorylation ($V_{\text{pk}} + V_{\text{succ}} + V_{\text{pgk}}$). All fluxes were expressed in mmol ATP/fruit/day or as relative fluxes normalized with sucrose uptake.

Carbon partitioning between the main biosynthetic pathways

From the calculated fluxes, we examined the partitioning of carbon between the main biosynthetic pathways. In order to compare the WT and TMT135S.2, the fluxes were normalized to the rate of sucrose influx. As previously described, once entered into the fruit, sucrose can be either hydrolyzed by the invertase leading to fructose and glucose (1:1) or by the SUSY leading to fructose and UDPG. Glucose and fructose are then phosphorylated by glucokinase and fructokinase respectively. In both lines, the flux of SUSY and invertase remained relatively similar, ranging from 0.44 to 0.50 mmol/gFW/day and 0.41 and 0.47 mmol/gFW/day for SUSY (in the way of sucrose degradation) and 0.49 to 0.52 mmol/gFW/day and 0.52 and 0.58 mmol/gFW/day for invertase in TMT135S.2 and WT, respectively. Interestingly if the difference between both lines was relatively low regarding sucrolytic enzymes, a big difference in hexokinase and fructokinase fluxes has to be noted. Indeed, in the WT the ratio GK/FK was relatively constant from 8 to 24 DPA (0.18 at 8 DPA to 0.15 at 24 DPA). Regarding TMT135S.2, both activities were increased, but the GK/FK ratio was multiplied by 2 to 5 according to the developmental stage, traducing that in relative values, the phosphorylation of glucose became higher than that of fructose. (Table 2).

WT					TMT135S.2				
(DPA)	8	16	24	30	(DPA)	8	16	24	30
V_{gapdh}	1.29	0.86	1.18	1.64	V_{gapdh}	2.19	1.96	1.67	1.82
V_{gk}	0.13	0.06	0.08	0.25	V_{gk}	0.43	0.47	0.37	0.35
V_{fk}	0.73	0.58	0.56	0.62	V_{fk}	0.96	0.94	0.88	0.84
V_{susy}	0.47	0.46	0.45	0.41	V_{susy}	0.48	0.44	0.51	0.50
V_{inv}	0.52	0.54	0.55	0.59	V_{inv}	0.52	0.56	0.49	0.50
PK/PEPc	0.99	0.96	0.96	0.96	PK/PEPc	0.97	0.95	0.94	0.86

Table 2: Fluxes in glycolysis, sucrolytic enzymes, hexokinase and anaplerotic pathways. The fluxes are normalized with sucrose uptake and expressed in mmol/gFW/day.

Interestingly, independently of the developmental stages, the relative flux through glycolysis (V_{gapdh}) was predicted to be higher in TMT1 35S.2 compared to the WT (From 2.19 to 1.65 and 0.86 to 1.64 in the WT) (Table 2). An important crossroad at the end of glycolysis is the partitioning of the carbon flux through respiration and biosynthesis involving pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxylase (anaplerotic pathway), respectively. In both lines the ratio PK/PEPc was close to 1 independently of the developmental stages: 50% of the PEP was used to sustain respiration, 50% to sustain biosynthesis. However, as the glycolytic flux was

increased in TMT135S.2, the carbon flux into both pathways was higher, reflecting once again the higher cost of TMT135S.2 metabolism, both in term of energy and carbon to ensure biosynthesis (Table 2).

DISCUSSION

Accumulating sugars as the better way to ensure vacuole growth

One of the major intakes of FBA modeling was the ability of modeling the sucrose uptake which is a difficult parameter to evaluate without using labeling experiment. From 0 to 18 DPA, sucrose uptake expressed in mmol/gFW/day was reduced in TMT135S.2 compared to the WT, potentially reflecting a sink strength deficit in this transgenic line at the beginning of the development. Indeed, as previously shown, TMT135S.2 exhibited a drastic reduction of TMT2 gene expression. As we hypothesized, TMT2 would be implicated in generating the sink strength necessary for the rapid sucrose phloem unloading in the bundle surrounding cells, necessary at the very beginning of the development, when the RGR is at its maximum. This deficit of sucrose import agrees with a major role of TMT2 in generating the sink strength in young fruit. In the same time, during this period of development, the production of ATP was predicted to be between 1.2 to 4 times lower than in the WT and thus probably became limiting to sustain the high energy demand for cell division and more generally biomass production (explaining the reduction of the number of cell layers shown in TMT135S.2). On the contrary, from 18 DPA to the end of development sucrose uptake expressed in mmol/gFW/day was higher in TMT135S than in WT. Consequently, the sink strength of TMT135S.2 cells would have been maintained thanks to the overaccumulation of starch and amino acids. We highlighted in the previous chapter the increase in amino acids, as a way to compensate partially the decrease in free sugars for osmotic strength. We suggested that the PEPc would be increased at the expense of the respiration. The model predicted that the ratio PEPc / PK, close to 1 in the WT, was in fact not modified in the transformant. The increase in PEPc, required for amino acids and organic acids production, was accompanied by a general increase of the glycolytic flux, a way to sustain the anaplerotic replenishment of the TCA cycle as well the ATP production. Consequently, the reduction of the hexose phosphate pool previously observed in chapter 2 could be due to their reallocation to the plastids for starch synthesis but also to the increase in glycolytic flux. Taken together, these data suggest that although the sink strength of TMT135S.2 cells was partially maintained during the cell growth phase due to the accumulation of starch and amino acids, the demand for ATP to ensure the metabolism of these fruits, particularly their growth, was increased.

By integrating the phenotyping data and those provided by modeling, we can conclude that under-expressing the TMTs genes impaired drastically the vacuolar accumulation of sugar.

Starch and amino or organic acids are thus produced to maintain sink strength for the first, and compensate the loss of osmotic solutes for the second. However, the energetic cost of this metabolism is much higher than the simple accumulation of sugars into the vacuole, with as a consequence the reduction of growth (lot of carbon lost as CO₂).

The modeling approach: an indispensable tool for understanding metabolism despite some limitations

The model that we proposed in this work tries to depict the metabolism in pericarp, integrating major pathways active in a plant cell. It allowed us to highlight, for example, the increase in the glycolytic flux in the transgenic line. It also allowed us to explain in an objective way the change in the ratio Glc/Fru that increased in the transformed line. We interpreted this data as a better use of fructose.

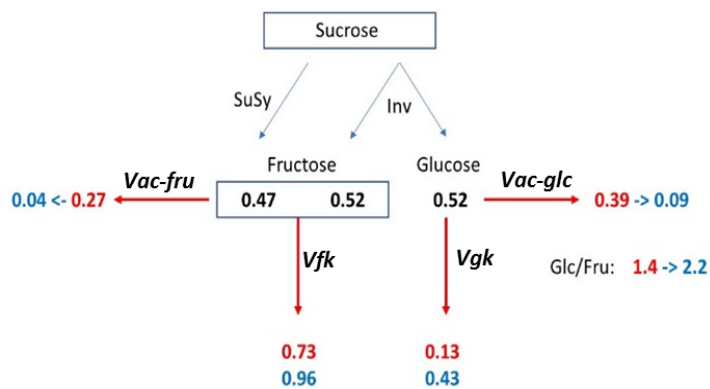


Figure 4: The intake of FBA modeling to explain the increase of Glc/fru ration in the transgenic lines. The values correspond to the fluxes, in black, common to both lines; in red, the fluxes of the WT and in blue the fluxes of TMT135S.2. Vac-fru: flux of fructose accumulation; Vac-glc: flux of glucose accumulation; Vfk: flux of fructokinase, Vgk: flux of glucokinase; SUSY: sucrose synthase; Inv: invertase; glc: glucose; fru: fructose

However, this is not what the model proposed. In fact, both sugars and in particular glucose would be better phosphorylated to ensure the accumulation of starch and the glycolytic flux in TMT135S.2 (0.96 and 0.43 in the transformant; 0.73 and 0.13 in the WT). As a consequence, the fluxes toward hexose accumulation are severely decreased. In conditions where fructose is quantitatively more produced than glucose, the increase in both HK and FK fluxes affects more fructose than glucose thus leading to a significant increase in the ratio Glc/Fru (Figure 4). This result underlines the importance of modeling to help for the interpretation of metabolomic data.

On the other hand, this model also has some limitations that are worth mentioning and that will need to be improved in the future. For instance, some pathways have probably been underestimated. According to literature the ratio between the pentose phosphate pathway and glycolysis ($V_{\text{ppp}}/V_{\text{gly}}$), which varies depending on plant tissue, remained significantly higher than the value found in our model. Indeed, $V_{\text{ppp}}/V_{\text{gly}}$ was estimated to 0.55 in *Brassica napus* embryos (Schwender *et al.*, 2003), 1.2 in a tomato cell culture (Rontein *et al.*, 2002), 2.89 in an *Arabidopsis* cell culture (Masakapalli *et al.*, 2010) and 0.8 in tomato fruit (Colombié *et al.*, 2015). It could be due, among other possibilities, to the under-estimation of lipid accumulation. Indeed, the major constraint to estimate the flux through the PPP is the need for NADPH used for protein and lipid biosynthesis only. In the absence of experimental data concerning lipids, the flux was kept free and estimated by the model close to 0.

The other difficulty was to constrain the uptake of amino acids into the cell. According to the literature, we fixed glutamine uptake to 10% of the sucrose uptake. In a previous study, performed with tomato fruit var. Moneymaker, this percentage was enough to sustain nitrate requirement and no additional nitrogen source was necessary (Colombié *et al.*, 2017). In our case, the model predicted a high import of nitrogen through mineral source (nitrate) to sustain the over accumulation of amino acids in TMT135S.2 (V_{no_3} , supplemental data table S3). Nitrogen assimilation could occur in the fruit but it is generally accepted that they import nitrogen mainly as organic matter. It would be interesting to measure the capacity of the enzymes involved in nitrogen assimilation (i.e. nitrate reductase, GS and GOGAT) in order to see if they are at least present in tomato fruit. Finally, the analysis of the phloem sap composition close to the fruit (in the petiole for example) would give us information about the composition of the pool of amino acids entering the fruit and thus, enable a more realistic constraining of the organic source of nitrogen.

The model predicted a flux of ATP used for maintenance of only $5.08\text{E-}14$ mmol/fruit/day, suggesting that almost all synthesized ATP was used for growth, unlike what was reported previously, i.e. 0.177 mmol/fruit/day (Colombié *et al.*, 2017). Energy costs associated with ‘non-growing associated ATP-maintenance’ are required to run physiological processes, such as the turnover of proteins, maintaining the electrochemical potential differences across the plasmalemma and the tonoplast via ATP and PPi-dependent proton pumps. Alternatively, maintenance flux can also be viewed as a non-growth-associated respiration that is necessary to balance the reducing power generated by metabolism. As a

result, it seems highly impossible to have such a small flux through $V_{\text{nga-atpm}}$ reflecting a default in the model settings.

As a conclusion, if these preliminary results of FBA modeling tend to confirm the previous conclusions drawn in chapter 2, especially on the role of TMT2, it raised new hypotheses especially regarding the higher flux through glycolysis. It allowed us to confirm the higher energy cost of starch and amino acids accumulation instead of hexoses in physiological conditions, as well as the inefficiency of this type of metabolism to rescue the growth phenotype of TMT135S.2. However, the setting of the model faced some limits that still have to be improved especially on nitrogen metabolism. In addition, because the subcellular compartmentation was not considered, the energy requirements for sugar transports and other compounds including mineral ions in the vacuole were neglected, leading to an under estimation of ATP consumption.

SUPPLEMENTAL DATA

ID	Reaction name	Reaction
Vpgi	Phosphoglucose isomerase	1 G6P = 1 F6P
Vald	Aldolase	1 F16bP = 1 DHAP + 1 GAP
Vtpi	Triosephosphate isomerase	1 DHAP = 1 GAP
Vgapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1 GAP + 1 NAD = 1 dPG + 1 NADH
Vpgk	Phosphoglycerate kinase	1 dPG + 1 ADP = 1 PG + 1 ATP
Veno	Enolase	1 PG = 1 PEP
Vaco	Aconitase	1 Cit = 1 ICit
Vidh	Isocitrate dehydrogenase	1 ICit + 1 NAD = 1 aKG + 1 CO ₂ + 1 NADH
Vkgdh	2-oxoglutarate dehydrogenase	1 aKG + 1 NAD = 1 CO ₂ + 1 NADH + 1 SuccCoA
Vscol	Succinyl-CoA synthetase	1 SuccCoA + 1 ADP => 1 Succ + 1 ATP
Vsdh	Succinate dehydrogenase	1 Succ + 1 FAD = 1 FADH ₂ + 1 Fum
Vfum	Fumarase	1 Fum = 1 Mal
Vmdh	Malate dehydrogenase	1 Mal + 1 NAD = 1 NADH + 1 OAA
Vepi	Ribulose 5-Phosphate 3-Epimerase	1 Ru5P = 1 X5P
Vriso	Ribulose 5-Phosphate Isomerase	1 Ru5P = 1 Ri5P
Vtk1	Transketolase	1 S7P + 1 GAP = 1 Ri5P + 1 X5P
Vtk2	Transketolase	1 F6P + 1 GAP = 1 E4P + 1 X5P
Vtald	Transaldolase	1 S7P + 1 GAP = 1 E4P + 1 F6P
Vpgm	Phosphoglucomutase	1 G1P = 1 G6P
Vsusy	Sucrose synthase	1 Fru + 1 UDPG = 1 Suc + 1 UDP
Vserat	Serine aminotransferase	1 PG + 1 Glu + 1 NAD = 1 Ser + 1 aKG + 1 NADH
Valaat	Alanine aminotransferase	1 Pyr + 1 Glu = 1 Ala + 1 aKG
Vaspat	Aspartate aminotransferase	1 OAA + 1 Glu = 1 Asp + 1 aKG
Vgdh	Glutamate dehydrogenase	1 NH ₄ + 1 aKG + 1 NADH = 1 Glu + 1 NAD
Vadk	Adenylate kinase	1 AMP + 1 ATP = 2 ADP
VSuc_up	Sucrose uptake	1 Suc_in => 1 Suc
VGln_up	Glutamine uptake	1 Gln_in => 1 Gln
Vfk	Fructokinase	1 ATP + 1 Fru => 1 ADP + 1 F6P
Vgk	Glucokinase	1 ATP + 1 Glc => 1 ADP + 1 G6P
Vpfk	Phosphofructokinase	1 ATP + 1 F6P => 1 ADP + 1 F16bP
Vpfp	Ppi-dependent phosphofructokinase	1 PPI + 1 F6P => 1 F16bP
Vfpb	Fructose 1,6-bisphosphatase	1 F16bP => 1 F6P
Vpk	Pyruvate kinase	1 PEP + 1 ADP => 1 ATP + 1 Pyr
Vpepc	Phosphoenolpyruvate carboxylase	1 CO ₂ + 1 PEP => 1 OAA
Vpepck	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1 OAA + 1 PPI => 1 CO ₂ + 1 PEP
Vpdh	Pyruvate dehydrogenase	1 Pyr + 1 NAD => 1 CO ₂ + 1 AccoA + 1 NADH
Vcs	Citrate synthase	1 OAA + 1 AccoA => 1 Cit
Vme	Malic enzyme	1 Mal + 1 NAD => 1 CO ₂ + 1 NADH + 1 Pyr
Vg6pdh	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1 G6P + 2 NADP => 1 CO ₂ + 1 Ru5P + 2 NADPH
Vrbco	RuBisCo (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/c	1 Ru5P + 1 CO ₂ => 2 DHAP
Vaggpase	ADP-Glucose pyrophosphorylase	1 G1P + 1 ATP => 1 PPI + 1 ADPG
Vugpase	UDP-Glucose pyrophosphorylase	1 G1P + 1 UTP => 1 UDPG + 1 PPI
Vinv	Invertase	1 Suc => 1 Fru + 1 Glc
Vsps	Sucrose-phosphate synthase	1 F6P + 1 UDPG => 1 SucP + 1 UDP
Vspase	Sucrose phosphatase	1 SucP => 1 Suc
Vgs	Glutamine synthetase	1 Glu + 1 ATP + 1 NH ₄ => 1 Gln + 1 ADP
Vgogat	Glutamine oxoglutarate aminotransferase	1 Gln + 1 aKG + 1 NADPH => 2 Glu + 1 NADP
Vnr	Nitrate reductase	1 NO ₃ + 1 NADH => 1 NH ₄ + 1 NAD
Vfas	Fatty acid synthase	8 AccoA + 7 ATP + 14 NADPH => 1 FA16 + 7 AMP + 7 PPI + 14 NADP
Velong	Fatty acid elongase	1 AccoA + FA16 + 1 ATP + 1 NADPH => 1 FA18 + 1 AMP + 1 PPI + 1 NADP
Vglyc3Pdh	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase	1 DHAP + 1 NADH + 1 ATP => 1 Glyc3P + 1 NAD + 1 ADP
Vrcc1	resp. chain complex 1 and ND dehydrogenase	1 NADH + 1 UQ + 2 Hi => 1 NAD + 1 UQH ₂ + 2 He
Vrcc2	resp. chain complex 2	1 FADH ₂ + 1 UQ => 1 FAD + 1 UQH ₂
Vnrj3	uridine diphosphate kinase	1 ATP + 1 UDP => 1 UTP + 1 ADP
Vnga_ATPm	non-growth associated ATP maintenance	ATP => ADP
Vppi	pyrophosphatase	PPI => Pi
Vrcc34	resp. chain complex 3 and 4	6 Hi + 1 UQH ₂ + 1/2 O ₂ => 6 He + 1 UQ + 1 H ₂ O
Vaox	alternative oxidase	1 UQH ₂ + 1/2 O ₂ => 1 UQ
Vucp	UCP and proton leak	1 He => 1 Hi
Vatpsynthase	ATP synthase, ATP/ADP and Pi carriers	4 He + 1 ADP => 4 Hi + 4 ATP

Vacc	AcetylCoA Carboxylase ACC	1 AcCoA + 1 CO2 => MaloCoA
Vshik	overall enzymes / shikimate pathway	1 E4P + 1 PEP + 1 ATP + 1 NADPH => 1 Shik + 1 ADP + 1 NADP .
Vphe	overall enzymes / phenylalanine enzymes	1 Shik + 1 Glu => 1 aKG + 1 CO2 + 1 Phe
Vpal	Phénylalanine ammonia-lyase	1 Phe => 1 Cinn + 1 NH4
Vcoum	C4H and 4CL	1 Cinn + 1 NADPH + 1 ATP => 1 CoumCoA + 1 NADP + 1 AMP + PPi
Vnox	NADPH oxydase	1 NADPH + 1 O2 => 1 O2 ⁻ + 1 NADP
Vsod	Superoxyde dismutase	2 O2 ⁻ + 2H+ => 1 O2 + 1 H2O2
Vcat	Catalase	1 H2O2 => 1/2 O2 + 1 H2O
Vgaldh	galactose dehydrogenase and co	1 GDPgal + 1 NAD => 1 Asa + 1 GMP + 1 NADH
Vapx	APX ascorbate peroxidase (+mdar, no MDHA met	2 Asa + 1 NADPH + H2O2 => 1 Asa + 1 DHA (merged with mdhar)
Vdhar	dehydroascorbate reductase	2 GSH + 1 DHA => 1 GSSG + 1 Asa
Vgr	glutathione reductase	1 GSSG + 1 NADPH => 2 GSH + 1 NADP
Vugd	UGD UDP_ glucose dehydrogenase	1 UDPG + 2 NAD => 1 UDPglua + 2 NADH
Vgae	UGlCAE UDPglucuronic acid 4-epimerase, also call	1 UDPglua <=> 1 UDPgala
Vaxs	AXS UDP-xylose synthase	1 UDPglua => 1 UDPxyl + 1 CO2
Vuxe	UXE UDP-xylose 4-epimerase	1 UDPxyl <=> 1 UDPara
Vrhnm	RHM (UDP-L-rhamnose synthase), epimerase-red	1 UDPG + 1 NAD + 1 NADPH => 1 UDPrha + 1 NADH + 1 NADP
Vgmp	GMP (vtc1)	1 F6P + 1 ATP => 1 GDPman + 1 ppi + 1 GMP
Vgmd	GMD (GDP-D-mannose-4,6-dehydratase) GER (Gl	1 GDPman + 1 NADPH => 1 GDPfuc + 1 NADP
Vgme	GME GDP-D-mannose 3,5-epimerase	1 GDPman <=> 1 GDPgal
Vuge	UGE (UDP-D-glucose 4-epimerase)	1 UDPG <=> 1 UDPgal
Vcel4cws	synthesis of cell wall cellulose	1 UDPG => 1 cel4CW + 1 UMP
Vglc4cws	synthesis of cell wall glucose	1 UDPG => 1 glc4CW + 1 UMP
Vglua4cws	synthesis of cell wall glucuronic acid	1 UDPglua => 1 glua4CW + 1 UMP
Vgala4cws	synthesis of cell wall galacturonic acid	1 UDPgala => 1 gala4CW + 1 UMP
Vara4cws	synthesis of cell wall arabinose	1 UDPara => 1 ara4CW + 1 UMP
Vxyl4cws	synthesis of cell wall xylose	1 UDPxyl => 1 xyl4CW + 1 UMP
Vgal4cws	synthesis of cell wall galactose	1 UDPgal + 1 GDPgal => 2 gal4CW + 1 UMP + 1 GMP
Vrha4cws	synthesis of cell wall rhamnose	1 UDPrha => 1 rha4CW + 1 UMP
Vman4cws	synthesis of cell wall mannose	1 GDPman => 1 manCW + 1 GMP
Vfuc4cws	synthesis of cell wall fucose	1 GDPfuc => 1 fucCW + 1 GMP
Vasa	Reduced ascorbate accumulation	1 Asa => 1 Asa_ac
Vdha	Oxidised Asa = DehydroAsa MDA accumulation	1 DHA => 1 DHA_ac
Vdag	outflux towards lipids (diacyl glycerol) synthesis	1 Glyc3P + 1 ATP + 0.67 FA16 + 1.33 FA18 => 1 DAG + 1 ADP
Vcwd	influx from cell wall polysaccharides	1 CW + 1 ATP => 1 G1P + 1 ADP
Vac-Glu	outflux towards glutamate accumulation	1 Glu => 1 Glu_ac
Vac-Asp	outflux towards aspartate accumulation	1 Asp => 1 Asp_ac
Vac-Ala	outflux towards alanine accumulation	1 Ala => 1 Ala_ac
Vac-Ser	outflux towards serine accumulation	1 Ser => 1 Ser_ac
Vprotein	outflux towards protein synthesis	0.44 Glu + 0.17 Asp + 0.21 Ala + 0.11 Ser + 4.3 ATP + 0.32 NADPH => 1 protein + 0.32 NADP + 4.3 ADP
Vac-cit	outflux towards citrate accumulation	1 Cit => 1 Cit_ac
Vac-mal	outflux towards malate accumulation	1 Mal => 1 Mal_ac
Vac-glc	outflux towards glucose accumulation	1 Glc => 1 Glc_ac
Vac-fru	outflux towards fructose accumulation	1 Fru => 1 Fru_ac
Vac-suc	outflux towards sucrose accumulation	1 Suc => 1 Suc_ac
Vss	outflux towards starch synthesis	1 ADPG => 1 STARCH + 1 ADP
Vsd	influx from starch degradation	1 STARCH + 1 ATP => 1 G1P + 1 AMP
Vnucleo	outflux towards DNA and RNA synthesis	3 Ri5P + 3 CO2 + 2.1 Asp + 6.3 Gln + 22 ATP => DNA-RNA + 2.1 Fum + 6.3 Glu + 4.5 AMP + 22 ADP + 3 PPi
Vtpc	outflux towards Total Phenolic Compounds accu	4 CoumCoA + 12 MaloCoA + 6 NADPH + 5 aKG + 2 UDPG => 1 TPC + 21 CO2 + 6 NADP + 5 Succ + 2 UDP
Vac-NH4	outflux towards ammonium accumulation	1 NH4 => 1 NH4_ac
VO2	outflux of O2	1 O2 => 1 O2_ext
VCO2	outflux of CO2	1 CO2 => 1 CO2_ext

Table S1: List of the reactions implicated in the model

ID	Metabolite
ADPG	ADP-Glucose
aKG	2-oxoglutarate
Ala	Alanine
Asp	Aspartate
AcCoA	Acetyl-coenzyme A
Cit	Citrate
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
dPG	Diphosphoglycerate
E4P	Erythrose 4-phosphate
F16bP	Fructose-1,6-biphosphate
F6P	Fructose-6-phosphate
FA16	Fatty acids with a 18-carbon chain
FA18	Fatty acids with a 16-carbon chain
Fru	Fructose
Fum	Fumarate
G1P	Glucose-1-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
Glu	Glutamate
Glyc3P	Glycerol 3-phosphate
ICit	Isocitrate
Mal	Malate
OAA	Oxaloacetate
PEP	Phosphoenolpyruvate
Pyr	Pyruvate
PG	Phosphoglycerate
Ri5P	Ribose-5-phosphate
Ru5P	Ribulose-5-phosphate
S7P	Sedoheptulose-7-phosphate
Ser	Serine
Suc	Sucrose
Succ	Succinate
SuccCoA	Succinyl-coenzyme A
SucP	Sucrose-phosphate
UDPG	Uridine diphosphate-glucose
X5P	Xylulose-5-phosphate
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
UTP	Uridine triphosphate
FADH2	Flavin adenine dinucleotide
PPi	Pyrophosphate
NH4	Ammonium
UQH2	Ubiquinone
He	Proton
Asa	Ascorbic Acid (reduced form)
DHA	Dehydro Ascorbic Acid (oxydized form)
GSH	Glutathione reduced
GSSG	Glutathione oxydized
UDPglua	UDP glucuronic acid
UDPgala	UDP galacturonic acid
UDPara	UDP arabinose
UDPxyl	UDP xylose
UDPgal	UDP galactose
UDPrha	UDP rhamnose
GDPgal	GDP mannose
GDPman	GDP fucose
GDPfuc	GDP galactose
MaloCoA	Malony-coenzyme A
Shik	Shikimate
Phe	Phenylalanine
Cinn	Cinnamate
CoumCoA	Coumaroyl-coenzyme A
O2 ⁻	anion superoxyde
H2O2	peroxyde d'hydrogene
O2	Dioxygene
CO2	Dioxyde de carbone

Table S2: List of metabolites implicated in the model

(DPA)	WT (mmol/gFW/day)												
	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Vpgi	-0.0040	-0.0078	-0.0105	-0.0089	-0.0046	-0.0005	0.0008	0.0018	0.0023	0.0022	0.0011	-0.0011	-0.0021
Vald	0.0075	0.0076	0.0103	0.0076	0.0080	0.0081	0.0074	0.0067	0.0059	0.0047	0.0029	0.0006	-0.0002
Vtpi	0.0308	0.0335	0.0257	0.0234	0.0169	0.0120	0.0096	0.0083	0.0071	0.0057	0.0029	0.0006	-0.0002
Vgapdh	0.0360	0.0381	0.0348	0.0294	0.0242	0.0201	0.0172	0.0151	0.0132	0.0105	0.0061	0.0017	0.0000
Vpgk	0.0360	0.0381	0.0348	0.0294	0.0242	0.0201	0.0172	0.0151	0.0132	0.0105	0.0061	0.0017	0.0000
Veno	0.0286	0.0298	0.0264	0.0216	0.0173	0.0141	0.0118	0.0103	0.0089	0.0070	0.0039	0.0014	0.0000
Vaco	0.0100	0.0102	0.0090	0.0074	0.0062	0.0053	0.0047	0.0042	0.0038	0.0030	0.0017	-0.0001	0.0004
Vidh	0.0100	0.0102	0.0090	0.0074	0.0062	0.0053	0.0047	0.0042	0.0038	0.0030	0.0017	-0.0001	0.0004
Vkgdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008
Vscol	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008
Vsdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008
Vfum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0003	0.0003	0.0001	0.0000	0.0008
Vmdh	-0.0006	-0.0008	-0.0009	-0.0008	-0.0006	-0.0004	-0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0004
Vepi	-0.0045	-0.0060	-0.0025	-0.0031	-0.0015	0.0000	0.0003	0.0002	0.0003	0.0002	0.0005	0.0009	0.0009
Vriso	-0.0023	-0.0030	-0.0013	-0.0016	-0.0008	0.0000	0.0003	0.0005	0.0006	0.0005	0.0004	0.0004	0.0005
Vtk1	0.0023	0.0030	0.0013	0.0016	0.0008	0.0000	-0.0001	-0.0001	-0.0002	-0.0001	-0.0002	-0.0004	-0.0005
Vtk2	0.0023	0.0030	0.0013	0.0016	0.0008	0.0000	-0.0001	-0.0001	-0.0002	-0.0001	-0.0002	-0.0004	-0.0005
Vtald	-0.0023	-0.0030	-0.0013	-0.0016	-0.0008	0.0000	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0002	0.0004	0.0005
Vpgm	-0.0030	-0.0076	-0.0103	-0.0076	-0.0027	0.0000	0.0004	0.0006	0.0005	0.0002	0.0008	0.0002	-0.0007
Vsusy	-0.0096	-0.0141	-0.0164	-0.0156	-0.0126	-0.0077	-0.0048	-0.0032	-0.0016	-0.0003	-0.0019	-0.0024	-0.0018
Vserat	0.0074	0.0083	0.0084	0.0078	0.0069	0.0060	0.0053	0.0048	0.0043	0.0034	0.0021	0.0003	0.0000
Valaat	0.0028	0.0031	0.0027	0.0019	0.0012	0.0007	0.0003	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0014	0.0000
Vaspat	0.0023	0.0025	0.0022	0.0016	0.0010	0.0005	0.0004	0.0004	0.0003	0.0003	0.0001	0.0001	0.0000
Vgdh	0.0207	0.0212	0.0185	0.0153	0.0127	0.0108	0.0100	0.0096	0.0085	0.0068	0.0040	0.0014	-0.0007
Vadk	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0013	0.0014	0.0011	0.0009	0.0004	0.0001	0.0000
VSuc-up	0.0186	0.0295	0.0369	0.0341	0.0254	0.0170	0.0115	0.0084	0.0063	0.0044	0.0040	0.0035	0.0034
VGlIn-up	0.0019	0.0029	0.0037	0.0034	0.0025	0.0017	0.0011	0.0008	0.0006	0.0004	0.0004	0.0004	0.0003
Vfk	0.0160	0.0214	0.0234	0.0196	0.0141	0.0096	0.0068	0.0053	0.0040	0.0025	0.0026	0.0031	0.0034
Vgk	0.0039	0.0038	0.0038	0.0019	0.0003	0.0014	0.0022	0.0028	0.0033	0.0032	0.0012	0.0000	0.0000
Vpfk	0.0045	0.0000	0.0000	0.0000	0.0053	0.0069	0.0061	0.0054	0.0048	0.0040	0.0016	0.0000	0.0000
Vpfp	0.0030	0.0076	0.0103	0.0076	0.0027	0.0012	0.0013	0.0013	0.0011	0.0007	0.0013	0.0013	0.0014
Vfbp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0016
Vpk	0.0143	0.0148	0.0130	0.0106	0.0084	0.0069	0.0058	0.0050	0.0042	0.0033	0.0018	0.0014	0.0000
Vpepc	0.0143	0.0150	0.0134	0.0110	0.0088	0.0072	0.0060	0.0053	0.0047	0.0038	0.0021	0.0000	0.0000
Vpepck	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vpdh	0.0114	0.0117	0.0103	0.0087	0.0073	0.0062	0.0055	0.0049	0.0044	0.0035	0.0020	0.0000	0.0004
Vcs	0.0114	0.0117	0.0103	0.0087	0.0073	0.0062	0.0055	0.0049	0.0044	0.0035	0.0020	0.0000	0.0004
Vme	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0003	0.0002	0.0000	0.0004
Vg6pdh	0.0049	0.0040	0.0039	0.0032	0.0022	0.0020	0.0017	0.0015	0.0015	0.0013	0.0009	0.0013	0.0014
Vrbco	0.0117	0.0130	0.0077	0.0079	0.0045	0.0019	0.0011	0.0008	0.0006	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000
Vagpase	0.0030	0.0076	0.0103	0.0076	0.0027	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vugpase	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0006	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0019
Vinv	0.0091	0.0154	0.0205	0.0185	0.0128	0.0092	0.0066	0.0052	0.0047	0.0041	0.0021	0.0011	0.0016
Vsps	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vspase	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000
Vgogat	0.0019	0.0029	0.0037	0.0034	0.0025	0.0017	0.0007	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0003
Vnr	0.0223	0.0221	0.0193	0.0195	0.0191	0.0177	0.0155	0.0136	0.0121	0.0097	0.0079	0.0034	0.0049
Vfas	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Velong	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vglyc3Pdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vrcc1	0.0213	0.0243	0.0238	0.0177	0.0121	0.0086	0.0070	0.0060	0.0052	0.0042	0.0035	0.0029	0.0045
Vrcc2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008
Vnrj3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0006	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0019
Vnga-ATPn	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0009	0.0007	0.0004	0.0000	0.0000
Vppi	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0019	0.0030
Vrcc34	0.0164	0.0207	0.0218	0.0132	0.0054	0.0014	0.0005	0.0002	0.0001	0.0000	0.0001	0.0020	0.0040
Vaox	0.0049	0.0036	0.0020	0.0046	0.0067	0.0072	0.0065	0.0058	0.0052	0.0042	0.0033	0.0009	0.0013
Vleak	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0010	0.0010	0.0009	0.0009	0.0007	0.0005	0.0000	0.0000

Vatpsyntha	0.0353	0.0431	0.0446	0.0286	0.0141	0.0061	0.0040	0.0031	0.0025	0.0020	0.0018	0.0044	0.0083
Vacc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vshik	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vphe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vpal	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vcoum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vnox	0.0012	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0006	0.0009	0.0010	0.0008	0.0002	0.0000	0.0000
Vsod	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0005	0.0005	0.0004	0.0001	0.0000	0.0000
Vcat	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0003	0.0005	0.0005	0.0004	0.0001	0.0000	0.0000
Vgaldh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vapx	0.0012	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0006	0.0009	0.0010	0.0008	0.0002	0.0000	0.0000
Vdhar	0.0012	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0006	0.0009	0.0010	0.0008	0.0002	0.0000	0.0000
Vgr	0.0012	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0006	0.0009	0.0010	0.0008	0.0002	0.0000	0.0000
Vugd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.0022	0.0025
Vgae	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vaxs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0011	0.0012
Vuxe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vrhm	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0011	0.0012
Vgmp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0005	0.0007	0.0007	0.0003	0.0013	0.0022	0.0025
Vgmd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0011	0.0012
Vgme	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0007	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000
Vuge	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0007	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000
Vcel4cws	0.0048	0.0070	0.0082	0.0078	0.0063	0.0040	0.0026	0.0014	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vglc4cws	0.0048	0.0070	0.0082	0.0078	0.0063	0.0040	0.0026	0.0014	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vglua4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgala4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vara4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vxyl4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgal4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0007	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000
Vrha4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vman4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vfuc4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vasa	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vdha	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vdag	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vcwd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0011	0.0012
Vac-Glu	0.0059	0.0067	0.0070	0.0068	0.0063	0.0056	0.0051	0.0047	0.0042	0.0034	0.0021	0.0003	0.0000
Vac-Asp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0000
Vac-Ala	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0014	0.0000
Vac-Ser	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vprotein	0.0135	0.0147	0.0128	0.0092	0.0057	0.0031	0.0016	0.0008	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-cit	0.0014	0.0015	0.0014	0.0012	0.0011	0.0009	0.0008	0.0007	0.0006	0.0005	0.0003	0.0001	0.0000
Vac-mal	0.0006	0.0008	0.0009	0.0008	0.0006	0.0004	0.0003	0.0002	0.0001	0.0000	-0.0001	-0.0001	-0.0001
Vac-glc	0.0052	0.0117	0.0167	0.0166	0.0125	0.0078	0.0044	0.0024	0.0014	0.0009	0.0009	0.0011	0.0016
Vac-fru	0.0026	0.0080	0.0135	0.0145	0.0113	0.0074	0.0046	0.0031	0.0023	0.0018	0.0013	0.0005	0.0000
Vac-suc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vss	0.0030	0.0076	0.0103	0.0076	0.0027	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vsd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0010	0.0008	0.0005	0.0002	0.0001	0.0001	0.0000
Vnucleo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000
Vtpc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-NH4	0.0016	0.0009	0.0007	0.0041	0.0064	0.0069	0.0055	0.0041	0.0034	0.0025	0.0039	0.0020	0.0056
VO2	-0.0109	-0.0122	-0.0119	-0.0089	-0.0060	-0.0044	-0.0036	-0.0032	-0.0029	-0.0023	-0.0018	-0.0014	-0.0027
VCO2	0.0004	-0.0020	0.0021	0.0004	0.0023	0.0044	0.0046	0.0043	0.0041	0.0034	0.0031	0.0024	0.0048

TMT135S.2 (mmol/gFW/day)													
(DPA)	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52
Vpgi	-0.0011	-0.0024	-0.0040	-0.0050	-0.0045	-0.0028	0.0004	0.0029	0.0034	0.0026	0.0013	-0.0025	-0.0050
Vald	0.0057	0.0088	0.0126	0.0178	0.0230	0.0235	0.0217	0.0176	0.0123	0.0058	0.0007	-0.0004	-0.0009
Vtpi	0.0123	0.0241	0.0382	0.0394	0.0288	0.0254	0.0235	0.0201	0.0138	0.0067	0.0007	-0.0004	-0.0009
Vgapdh	0.0176	0.0316	0.0485	0.0554	0.0518	0.0490	0.0455	0.0379	0.0265	0.0128	0.0016	0.0005	0.0001
Vpgk	0.0176	0.0316	0.0485	0.0554	0.0518	0.0490	0.0455	0.0379	0.0265	0.0128	0.0016	0.0005	0.0001
Veno	0.0132	0.0241	0.0372	0.0411	0.0359	0.0325	0.0299	0.0250	0.0177	0.0089	0.0016	0.0005	0.0001
Vaco	0.0050	0.0091	0.0139	0.0158	0.0147	0.0140	0.0131	0.0109	0.0075	0.0035	0.0005	0.0011	0.0012
Vidh	0.0050	0.0091	0.0139	0.0158	0.0147	0.0140	0.0131	0.0109	0.0075	0.0035	0.0005	0.0011	0.0012
Vkgdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0017	0.0023
Vscol	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0017	0.0023
Vsdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0017	0.0023
Vfum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0009	0.0010	0.0004	0.0000	0.0006	0.0017	0.0023
Vmdh	-0.0004	-0.0008	-0.0013	-0.0016	-0.0011	-0.0001	-0.0002	0.0001	-0.0002	-0.0001	0.0006	0.0011	0.0012
Vepi	-0.0009	-0.0026	-0.0047	-0.0037	0.0000	0.0003	0.0005	0.0005	0.0008	0.0007	0.0005	0.0027	0.0040
Vriso	-0.0005	-0.0013	-0.0024	-0.0019	0.0000	0.0010	0.0016	0.0017	0.0010	0.0004	0.0002	0.0013	0.0020
Vtk1	0.0005	0.0013	0.0024	0.0019	0.0000	-0.0001	-0.0002	-0.0002	-0.0004	-0.0004	-0.0002	-0.0013	-0.0020
Vtk2	0.0005	0.0013	0.0024	0.0019	0.0000	-0.0001	-0.0002	-0.0002	-0.0004	-0.0004	-0.0002	-0.0013	-0.0020
Vtald	-0.0005	-0.0013	-0.0024	-0.0019	0.0000	0.0001	0.0002	0.0002	0.0004	0.0004	0.0002	0.0013	0.0020
Vpgm	-0.0022	-0.0050	-0.0091	-0.0129	-0.0142	-0.0115	-0.0058	-0.0009	0.0020	0.0031	0.0020	0.0015	0.0010
Vsusy	-0.0044	-0.0069	-0.0098	-0.0126	-0.0145	-0.0150	-0.0130	-0.0096	-0.0058	-0.0020	0.0004	-0.0068	-0.0109
Vserat	0.0044	0.0075	0.0113	0.0143	0.0159	0.0165	0.0155	0.0129	0.0087	0.0039	0.0000	0.0000	0.0000
Valaat	0.0009	0.0019	0.0031	0.0028	0.0012	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vaspat	0.0007	0.0016	0.0025	0.0022	0.0009	0.0008	0.0010	0.0010	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgdh	0.0102	0.0186	0.0286	0.0322	0.0296	0.0305	0.0297	0.0247	0.0167	0.0071	0.0000	-0.0014	-0.0022
Vadk	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.0020	0.0023	0.0047	0.0046	0.0035	0.0020	0.0009
VSuc-up	0.0080	0.0144	0.0224	0.0283	0.0302	0.0294	0.0257	0.0201	0.0124	0.0047	0.0002	0.0068	0.0109
VGln-up	0.0008	0.0014	0.0022	0.0028	0.0030	0.0029	0.0026	0.0020	0.0012	0.0005	0.0000	0.0007	0.0011
Vfk	0.0078	0.0139	0.0214	0.0265	0.0275	0.0260	0.0219	0.0165	0.0096	0.0032	0.0001	0.0068	0.0109
Vgk	0.0029	0.0063	0.0108	0.0132	0.0126	0.0109	0.0091	0.0072	0.0039	0.0011	0.0000	0.0000	0.0000
Vpfk	0.0035	0.0038	0.0035	0.0049	0.0088	0.0120	0.0135	0.0129	0.0084	0.0036	0.0000	0.0000	0.0000
Vpfp	0.0022	0.0050	0.0091	0.0129	0.0142	0.0115	0.0081	0.0047	0.0039	0.0022	0.0013	0.0037	0.0051
Vfbp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0041	0.0060
Vpk	0.0065	0.0119	0.0182	0.0200	0.0175	0.0158	0.0139	0.0116	0.0083	0.0043	0.0011	0.0005	0.0001
Vpepc	0.0067	0.0123	0.0190	0.0211	0.0184	0.0167	0.0160	0.0134	0.0094	0.0046	0.0005	0.0000	0.0000
Vpepck	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vpdh	0.0056	0.0099	0.0151	0.0172	0.0164	0.0158	0.0148	0.0125	0.0089	0.0044	0.0011	0.0011	0.0012
Vcs	0.0056	0.0099	0.0151	0.0172	0.0164	0.0158	0.0148	0.0125	0.0089	0.0044	0.0011	0.0011	0.0012
Vme	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0010	0.0009	0.0006	0.0001	0.0000	0.0006	0.0011
Vg6pdh	0.0019	0.0037	0.0057	0.0052	0.0028	0.0022	0.0030	0.0034	0.0025	0.0016	0.0007	0.0040	0.0060
Vrbco	0.0033	0.0076	0.0128	0.0108	0.0029	0.0009	0.0009	0.0012	0.0008	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000
Vagpase	0.0022	0.0050	0.0091	0.0129	0.0142	0.0115	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vugpase	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0018	0.0015	0.0021	0.0042	0.0053
Vinv	0.0037	0.0075	0.0126	0.0157	0.0157	0.0144	0.0127	0.0105	0.0066	0.0028	0.0006	0.0000	0.0000
Vsps	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vspase	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0010	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgogat	0.0008	0.0014	0.0022	0.0028	0.0030	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0000	0.0007	0.0011
Vnr	0.0131	0.0216	0.0317	0.0401	0.0454	0.0450	0.0420	0.0351	0.0247	0.0122	0.0033	0.0131	0.0187
Vfas	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Velong	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vglyc3Pdh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vrcc1	0.0088	0.0171	0.0271	0.0288	0.0226	0.0200	0.0181	0.0152	0.0107	0.0054	0.0038	0.0127	0.0176
Vrcc2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0017	0.0023
Vnrj3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0018	0.0015	0.0021	0.0042	0.0053
Vnga-ATPm	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0014	0.0033	0.0027	0.0019	0.0004	0.0000	0.0000	0.0000
Vppi	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019	0.0078	0.0111
Vrcc34	0.0044	0.0109	0.0189	0.0162	0.0044	0.0009	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0038	0.0112	0.0153
Vaox	0.0044	0.0061	0.0082	0.0125	0.0182	0.0190	0.0179	0.0150	0.0105	0.0052	0.0006	0.0032	0.0046
Vleak	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0023	0.0030	0.0030	0.0025	0.0017	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000

Vatpsynthas	0.0110	0.0249	0.0420	0.0387	0.0174	0.0106	0.0085	0.0072	0.0051	0.0028	0.0076	0.0232	0.0318
Vacc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vshik	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vphe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vpal	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vcoum	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vnox	0.0005	0.0010	0.0015	0.0011	0.0003	0.0009	0.0016	0.0020	0.0017	0.0009	0.0001	0.0000	0.0000
Vsod	0.0003	0.0005	0.0007	0.0006	0.0002	0.0005	0.0008	0.0010	0.0008	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000
Vcat	0.0003	0.0005	0.0007	0.0006	0.0002	0.0005	0.0008	0.0010	0.0008	0.0005	0.0000	0.0000	0.0000
Vgaldh	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vapx	0.0005	0.0010	0.0015	0.0011	0.0003	0.0009	0.0016	0.0020	0.0017	0.0009	0.0001	0.0000	0.0000
Vdhar	0.0005	0.0010	0.0015	0.0011	0.0003	0.0009	0.0016	0.0020	0.0017	0.0009	0.0001	0.0000	0.0000
Vgr	0.0005	0.0010	0.0015	0.0011	0.0003	0.0009	0.0016	0.0020	0.0017	0.0009	0.0001	0.0000	0.0000
Vugd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0011	0.0073	0.0108
Vgae	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vaxs	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0037	0.0054
Vuxe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vrhbm	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0037	0.0054
Vgmp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0023	0.0014	0.0007	0.0011	0.0073	0.0108
Vgmd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0007	0.0000	0.0000	0.0006	0.0037	0.0054
Vgme	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0015	0.0014	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000
Vuge	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0015	0.0014	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000
Vcel4cw	0.0022	0.0035	0.0049	0.0063	0.0072	0.0075	0.0064	0.0045	0.0031	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000
Vglc4cws	0.0022	0.0035	0.0049	0.0063	0.0072	0.0075	0.0064	0.0045	0.0031	0.0014	0.0000	0.0000	0.0000
Vglua4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgala4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vara4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vxyl4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vgal4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0015	0.0014	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000
Vrha4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vman4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vfuc4cws	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0010	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vasa	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vdha	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vdag	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vcwd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0037	0.0054
Vac-Glu	0.0039	0.0065	0.0096	0.0128	0.0153	0.0163	0.0155	0.0128	0.0087	0.0039	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-Asp	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-Ala	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-Ser	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vprotein	0.0043	0.0092	0.0149	0.0132	0.0055	0.0014	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-cit	0.0006	0.0009	0.0012	0.0015	0.0017	0.0018	0.0018	0.0016	0.0013	0.0010	0.0005	0.0001	0.0000
Vac-mal	0.0004	0.0008	0.0013	0.0016	0.0011	0.0004	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-glc	0.0007	0.0012	0.0019	0.0025	0.0032	0.0035	0.0036	0.0033	0.0027	0.0017	0.0006	0.0000	0.0000
Vac-fru	0.0003	0.0006	0.0011	0.0018	0.0027	0.0034	0.0038	0.0036	0.0028	0.0016	0.0001	0.0000	0.0000
Vac-suc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vss	0.0022	0.0050	0.0091	0.0129	0.0142	0.0115	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vsd	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0038	0.0046	0.0035	0.0020	0.0009
Vnucleo	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0004	0.0005	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vtpc	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Vac-NH4	0.0029	0.0031	0.0031	0.0078	0.0157	0.0146	0.0121	0.0094	0.0080	0.0051	0.0033	0.0145	0.0208
VO2	-0.0045	-0.0088	-0.0139	-0.0147	-0.0114	-0.0102	-0.0095	-0.0081	-0.0057	-0.0029	-0.0022	-0.0072	-0.0100
VCO2	0.0024	0.0028	0.0030	0.0063	0.0126	0.0138	0.0136	0.0115	0.0086	0.0045	0.0029	0.0122	0.0171

Table S3: Fluxes calculated for each reaction implicated in the model, expressed in mmol/gFW/day

GENERAL CONCLUSIONS

GENERAL CONCLUSIONS

This work aimed to understand the control of vacuole growth and the relation between sugar metabolism and cell growth in tomato fruit. Previous study, aiming at modeling fruit growth at the metabolic level, emphasis the crucial role of tonoplastic sugar transporters on the control of vacuole growth especially for young developmental stages when the relative growth rate of the vacuole is the highest (Beauvoit *et al.*, 2014). Indeed, sugar import in the vacuole participate in generating the osmotic strength of this later, allowing the water import necessary for its expansion and thus for cell growth. In a more integrative view, it also permits to maintain the cytosolic sucrose concentration low enough to maintain the sink strength of the cell and thus allowing sucrose import in the fruit. In order to explore this hypothesis, we chose a strategy aiming at repressing the expression of the transporters involved in sugar import/export between the cytosol and the vacuole. A comparative analysis between *Arabidopsis* and tomato genome allowed us to identify and select the genes and the subsequent proteins known to be implicated in tonoplastic sugar transports. As a result, a set of 9 candidate genes have been selected, 4 proteins implicated in sugar export (SFP6, SUC4, two active secondary transporters and SWEET16 and SWEET 17, two passive carriers) and 5 implicated in sugar import (TMT1, TMT2, TMT3, VGT1 and VGT2, corresponding to sugars/H⁺ antiporters). In order to study their implication in the control of vacuole growth, RNAi lines, targeting the 9 different transporters were generated using either a 35S cauliflower constitutive promotor or the fruit specific promotor, PP2C (Fernandez *et al.*, 2009). The resulting lines were phenotyped in T1 generation based on macroscopic parameters (fruit size and weight), metabolic composition, gene expression and pericarp cell size. From this phenotyping, two lines, under the control of the 35S promotor and presenting interesting phenotype were selected: TMT135S.2 (affected on TMT1 and TMT2 gene expression) and TMT235S.6 (affected on TMT2 gene expression only). The phenotyping of the T2 generation for these two lines revealed interesting phenotypes, with a line more affected than the other: TMT135S.2 and one intermediary: TMT235S6. Both transgenic lines were highly affected on the final fruit size, with a fruit 2 times smaller for TMT135S.2 and 1.3 times smaller for TMT235S.6 compared to the WT resulting in a decrease of the size both in diameter and in height. The severe decrease of the RGR immediately after anthesis in the transgenic lines indicated that fruit development was affected even during the cell division phase of the fruit. The study of TMT1 and TMT2 expression territories in the pericarp revealed that both genes were expressed in different and somehow non-overlapping

tissues. Indeed, TMT2 was shown to be highly expressed in the cells surrounding the vessels whereas TMT1 was expressed in the entire pericarp (except the area of TMT2 expression) and more intensively in the cells lining the outer epidermis. These differences have direct consequences on their role and we hypothesized that TMT2 is implicated in the sink strength of the cells surrounding the vessels to promote the sucrose phloem unloading in the very beginning of the fruit development. On the contrary, TMT1 would be more associated to cell expansion.

One of the major intakes of this study is the establishment of a negative effect on growth, with a shift from a hexose accumulating metabolism to a starch/amino acid accumulating metabolism. Indeed, we showed that both transgenic lines accumulated less hexoses and hexose phosphate. In addition, despite the accumulation of higher quantity of starch, amino acids, ions and to a lesser extent, organic acids and cell wall, the total osmolarity was not compensated, leading to the reduction of fruit size.

Finally, the preliminary results obtained by modeling the metabolism of TMT1352.2 using flux balance analysis reveals the higher cost, in terms of ATP and carbon, of maintaining the fruit sink strength and the growth by accumulating starch and amino acids. In addition, it emphasizes the potential controlling role of hexokinase in the production of the hexose phosphate pool necessary for starch accumulation. However, this first modeling approach did not consider subcellular compartmentation. It could be done by kinetic modeling of the metabolism of the transgenic lines. It requires to integrate enzymatic parameters and subcellular compartmentation. This model will allow us to have a more precise idea of the impact of TMTs down expression on sucrose metabolism and more extensively on the sucrolytic flux partitioning between the vacuole and the cytosol. However, if this work is still ongoing regarding the parametrization of the kinetic modeling, we can already say without any doubt that TMTs down expression induced profound metabolic remodeling, not only on sugar metabolism but on the entire carbon metabolism. However even if the fluxes differences were visible when comparing relative fluxes, the consequences of the perturbation of the leaf metabolism due to the use of a 35S promoter are difficult to evaluate (especially regarding fruit sucrose uptake). This underlines the necessity to study interesting PEPc candidates and compare them to the 35S lines to underline the processes specifically linked to TMTs fruit down expression. This work was unfortunately the lock down linked to the COVID epidemic forced us to stop the culture. However, it stayed one of the biggest perspectives of this work.

Chapter 5

METERIELS & METHODS

Chapitre 5 – Matériels et méthodes

I- Matériel biologique

1- Matériel végétal et conditions de culture

Cette étude a été réalisée sur la variété de tomate (*Solanum lycopersicum*) M82 Israël sous sa forme déterminée. Les plants de tomate sont cultivés soit en serre, soit *in vitro* en conditions axéniques dans du milieu Murashige and Skoog (MS) (Murasnige, 1962), dans les conditions de photopériode de 16h de jour/8h de nuit et de thermopériode de 25°C le jour/20°C la nuit. Les graines de tomate, préalablement décontaminées par un traitement de 15min à l'hypochlorite de sodium 4,5% (v/v) et 0,05% (v/v) de Tween 20 puis rincées trois fois à l'eau mQ stérile, sont semées sur du milieu MS dilué au ¼ ou séchées sous hotte à flux laminaire puis conservées déshydratées dans des boîtes de Petri scellées.

Dans cette étude, plusieurs générations ont été cultivées en serre. La culture de la génération T1, provenant de l'autofécondation des individus T0 (issus de la culture *in vitro*), a été réalisée de Mars à Octobre 2019. Les génotypes mis en cultures sont détaillés tableau 1 et correspondent à des lignées indépendantes issues de différents événements d'insertion du même transgène. Les plantes ont été randomisées et réparties sur 5 tables de deux rangées de 24 plantes (chaque rangée contenant un individu WT). Pour cette génération, le poids total du fruit (sans les sépales) de 7-9 DPA, 16 DPA, 30 DPA et stade rouge ainsi que les deux diamètres et la hauteur ont été mesurés. Une bande centrale de 1cm d'épaisseur dans le péricarpe des fruits a été récoltée, coupée en tronçons de 1mm et congelée dans l'azote liquide dans des tubes à scintillation (Polyvials V, Natural high density polyethylene, 20 ml). Pour chaque lignée et pour chaque stade, 1 fiole contenant au moins trois fruits provenant de plantes différentes au sein de la lignée est récoltée.

Gène ciblé	Promoteur	Lignée	Nombre d'individus
SWEET 16	OE PEPc	1	4
SWEET 16	OE PEPc	2	4
SWEET 16	OE PEPc	3	4
SWEET 16	OE PEPc	4	4
SWEET 16	OE PEPc	5	4
SWEET 17	35S RNAi	1	4
SWEET 17	35S RNAi	2	4
SWEET 17	35S RNAi	3	4
SWEET 17	35S RNAi	4	5
SWEET 17	35S RNAi	5	4
SWEET 17	OE PEPc	1	4
SWEET 17	OE PEPc	2	4
SWEET 17	OE PEPc	4	4

SFP6	35S RNAi	2	4
SFP6	35S RNAi	3	5
SFP6	35S RNAi	5	4
SFP6	35S RNAi	6	5
SFP6	PEPc RNAi	2	4
SFP6	PEPc RNAi	4	4
SFP6	PEPc RNAi	5	3
SFP6	PEPc RNAi	6	4
SIVP1	PEPc RNAi	2	4
SIVP1	PEPc RNAi	3	3
SIVP1	PEPc RNAi	5	4
SIVP1	PEPc RNAi	6	4
SIVP1	PEPc RNAi	10	4
TMT1	35S RNAi	2	4
TMT1	35S RNAi	4	4
TMT1	35S RNAi	5	1
TMT1	PEPc RNAi	1	4
TMT1	PEPc RNAi	2	4
TMT1	PEPc RNAi	4	4
TMT1	PEPc RNAi	5	5
TMT1	PEPc RNAi	6	4
TMT2	35S RNAi	2	4
TMT2	35S RNAi	3	4
TMT2	35S RNAi	4	4
TMT2	35S RNAi	5	3
TMT2	35S RNAi	6	4
TMT2	PEPc RNAi	2	4
TMT2	PEPc RNAi	3	4
TMT2	PEPc RNAi	4	4
TMT2	PEPc RNAi	5	4
VG2	35S	1	4
VG2	35S	4	4
WT			10

Tableau 1: Génotypes et nombre d'individus cultivés pour la génération T1

La génération T2 provenant de l'autofécondation des individus T1 sélectionnés pour leurs caractères phénotypiques a été cultivée de décembre 2019 à Avril 2020. Les génotypes ainsi que le nombre d'individus mis en culture sont détaillés tableau 2. Les plantes ont été randomisées et réparties sur 1 table de deux rangées de 15 plantes. Cinq fioles d'au moins trois fruits correspondant à 5 reliquats biologiques ont été récoltés pour les stades 0 DPA (anthèse), 8 DPA, 12DPA, 16DPA, 24DPA, 30DPA, et rouge. Pour cette génération, le fruit entier (sans les sépales) a été pesé et mesuré (de la même façon que pour la génération T1), disséqué pour enlever la columelle, les graines et le gel ainsi que les septums, pesés séparément. Le poids du péricarpe est obtenu par soustraction du poids total du fruit moins le poids des éléments centraux. Au final, le péricarpe a été récolté de la même façon que pour la génération T1. Ce mode de récolte est appliqué à tous les stades sauf les anthèses ou seul le poids du fruit a été mesuré. Pour le stade 8 DPA, seul le poids du fruit total, les deux diamètres et la hauteur ont été mesurés.

Gène ciblé	Promoteur	Lignée	Nombre d'individus
TMT2	PEPc RNAi	5	6
TMT2	35S RNAi	6	6
TMT1	35S RNAi	2	6
TMT1	PEPc RNAi	6	6
WT			6

Tableau 2 : Génotypes et nombre d'individus cultivés pour la génération T2

La génération T2 bis a été conduite de Mars à Aout 2020. Les génotypes ainsi que le nombre d'individus mis en cultures sont détaillés tableau 3. Les plantes ont été randomisées et réparties sur 1 table et demi (1 rangée de 12 plantes et une rangée de 6 plantes). Cinq fioles d'au moins trois fruits correspondant à 5 reliquats biologiques ont été récoltées pour les stades 4DPA, 8 DPA, 12DPA, 16DPA, 24DPA, 30DPA et rouge. L'échantillonnage et les mesures ont été menés de la même façon que pour la première T2. Pour le stade 4 DPA, le fruit entier a été récolté et congelé.

Gène ciblé	Promoteur	Lignée	Nombre d'individus
TMT2	35S RNAi	6	6
TMT1	35S RNAi	2	6
WT			6

Tableau 3 : Génotypes et nombre d'individus cultivés pour la génération T2 bis

2- Souche bactérienne et milieu de culture

La souche d'*Escherichia Coli* (E. Coli) TOP10 (Invitrogen) a été utilisée pour le clonage et la propagation des différents plasmides. La souche d'*E. Coli* DB3.1 est utilisée pour la propagation des plasmides Gateway non recombinés (contenant l'opéron ccdB).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a été utilisée comme vecteur de transformation pour générer les plantes transgéniques.

Les deux souches d'*E. Coli* sont cultivées à 37°C et celle d'*Agrobacterium tumefaciens* est cultivée à 28°C. Toutes les souches bactériennes sont cultivées dans du milieu LB ((Bactotryptone 1%(p/v) ; extrait de levure 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v)) en présence ou non d'antibiotiques. La nature et la concentration de l'antibiotique utilisé sont déterminées par le gène de résistance porté par le plasmide d'intérêt.

Antibiotique	Solution de solubilisation	Concentration cultures bactériennes	Concentration sélection des tomates
Kanamycine	H2O mQ	50 µg/mL	150µg/mL
Chloramphénicol	Ethanol absolu	10µg/mL	
Gentamycine	H2O mQ	40 µg/mL	-
Spéctinomycine	H2O mQ	100 µg/mL	-
Ampicilline	H2O mQ	100 µg/mL	
Rifampicine	DMSO	25 µg/mL	
Timentin (ticarcillin-clavulanate)	H2O	-	250 mg/L

Tableau 4 : Concentration finale des antibiotiques de sélection utilisés pour les cultures bactériennes et la sélection des plantes transformées.

II- Manipulation et analyse des acides nucléiques

1- Extraction des acides nucléiques

a. Extraction de l'ADN génomique de tomate

L'extraction d'ADN génomique est effectuée à partir de jeunes feuilles ou de péricarpe de fruit (30mg environ) congelés dans l'azote liquide et broyés en plaque 96 puits avec une bille tungstène à l'aide du broyeur MM300 Retsch 2*1min à 25Hz/sec en inversant la plaque entre les deux broyages.

Tampon µPrep		Pour 100 mL
Tampon d'extraction	0.35M sorbitol, 0.1M Tris Base, 5mM Na ₂ EDTA	6.38g sorbitol 1.21g Tris Base 0.23g Na ₂ EDTA
Tampon de lyse	0.2M Tris Base, 0.05M EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB	2.42 g Tris Base 2.26 g EDTA 11.69g NaCl 2g CTAB
Sarcosyl	5% (p/v) dans eau mQ	5g
Bisulfite	0.33 %	0.33 g
Mélanger tous les éléments et chauffer 1h à 65°C au bain Marie		

Tableau 5: Composition des tampons et solutions nécessaires à l'extraction des acides nucléiques.

Une fois broyés, les échantillons sont centrifugés 1min à 5000g (4°C) puis 250µL/tube de tampon µPrep sont ajoutés (Tableau 5). Les tubes sont homogénéisés au broyeur 2x30sec à 25Hz puis placés au bain Marie à 65°C pendant 1 heure en homogénéisant régulièrement par inversion.

Au bout d'une heure, 225µL de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1 v/v) sont ajoutés et l'ensemble est homogénéisé par inversion manuelle puis centrifugé 10 minutes à 5000g à 20°C. Les phases aqueuses sont récupérées dans de nouveaux tubes puis additionnées de 250µL d'isopropanol 100% froid et homogénéisées par inversion jusqu'à précipitation de l'ADN. Une fois précipités, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 5500 rpm à 4°C, l'isopropanol est éliminé et les culots sont rincés avec 250µL d'éthanol 70%. Enfin, les tubes sont centrifugés 10 minutes

à 5000g à 4°C, l'éthanol est éliminé par inversion des tubes et les culots sont séchés au speedvaac 15 minutes à 65°C. Le culot est finalement repris dans 50µL d'eau mQ et stocké à -20°C

b. Extraction d'ADN plasmidiques de bactérie

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 5mL ou de 50mL de culture en phase stationnaire de croissance, en utilisant respectivement les systèmes d'extraction PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) ou le kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), selon le protocole décrit par le fournisseur. L'ADN plasmidique est élué dans 50µL ou 500µL d'eau mQ stérile selon le système utilisé et quantifié par mesure d'absorbance à 260 nm via un spectrophotomètre.

c. Extraction d'ARN totaux et Rétrotranscription

Extraction au TRIZOL (Sigma)

Les extractions d'ARN ont été réalisées à partir de 50 mg de matériel végétal congelé dans l'azote liquide et broyé avec une bille tungstène à l'aide du broyeur MM300 Retsch 2*1min à 25Hz/sec en inversant les tubes entre les deux broyages. L'extraction a été faite en utilisant la solution TRIZOL (Sigma) en suivant le protocole du fournisseur pour l'extraction des ARN. Les ADN contaminants sont éliminés en traitant les extraits à l'aide du kit RQ1 RNase-free DNase (Promega). La qualité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les ARNs sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue® (GE Healthcare). Afin de contrôler la présence de contaminations par de l'ADN, une PCR ciblant le gène de référence ACTINE est réalisée sur les échantillons d'ARN. L'absence d'amplification permet de considérer la contamination comme négligeable et n'ayant pas d'impact pour les analyses d'expression.

Extraction ARNs robotisée

Les extractions d'ARN ont été réalisées partir de 50 mg de matériel végétal congelé dans l'azote liquide et broyé avec une bille tungstène à l'aide du broyeur MM300 Retsch 2*1min à 25Hz/sec en inversant les tubes entre les deux broyages. L'extraction a été faite en utilisant le kit Maxwell RSC Plant RNA kit (Promega) et le robot d'extraction Maxwell RSC instrument, en suivant les indications du fournisseur. A la fin de l'extraction, les ARN sont repris dans 50µL d'eau mQ nucléase free. La qualité des ARNs est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue® (GE Healthcare). La qualité des ARNs

est vérifiée comme pour l'extraction au TRIZOL précédemment décrite.

Rétrotranscription (RT)

Les réactions de rétrotranscription ont été réalisées soit à l'aide du kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) avec random hexamers soit avec le kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad) en suivant les indications du fournisseur.

2- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de PCR de routine sont réalisées avec la GoTaq® DNA Polymerase (Promega) selon les conditions préconisées par le fournisseur à partir d'ADNg, d'ADNc ou d'ADN plasmidique purifiés. Dans le cas des amplifications avant séquençage et pour le clonage, les PCR ont été réalisées avec le kit Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs) ou avec le kit PrimeStarMax (Takara) afin de minimiser le risque d'erreurs de séquence.

3- PCR en temps réelle

qPCR classique

Les préparations des échantillons pour les analyses en PCR quantitatives (qPCR) sont réalisées en utilisant le master mix du kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) selon les conditions conseillées par le fournisseur, sur des ADNc dilués au 100^e. Les réactions de qPCR sont réalisées sur un thermocycleur CFX96 Biorad™. Pour chaque gène étudié et afin d'évaluer l'efficacité du couple de primers, une gamme de dilution de cDNA du 10^e au 10000^e est utilisée. Les échantillons de cette gamme sont soumis aux mêmes conditions de qPCR. Les amorces utilisées pour la qPCR sont listées dans le tableau 6. La normalisation de l'expression est réalisée à partir de deux gènes de références, ACTINE et EIF4, choisis pour leurs niveaux d'expression relativement constants. Des triplicats techniques sont réalisés sur chaque échantillon. Les résultats sont donc exprimés en unité arbitraire d'expression relative.

qPCR robotisée

Les qPCRs robotisées sont réalisées en utilisant le master mix du kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Les qPCR sont faites en plaques 96 puits.

- Préparation des cDNA

Pour chaque échantillon de cDNA, 1µL de cDNA (dilué au 10^e par rapport à la réaction de reverse transcription) sont mélangés à 5µL de mix GoTaq® qPCR Master Mix. Vf=6µL

- Préparation des plaques d'amorce.

Pour chaque réaction, un mix d'amorces sens/anti-sens est préparé comme suit : 0.2µL d'amorce sens, 0.2µL d'amorce anti-sens (concentration 20 pmol/µL), 3.6µL d'eau mQ. Vf=4µL

- Préparation des plaques qPCR

Pour chaque puit, 6µL de mélange cDNA/mix sont mélangés à 4µL de mélange d'amorces sens/anti-sens. Les réactions de qPCR sont faites dans un thermocycleur CFX96 Biorad™. Des duplicatas techniques sont réalisés pour chaque échantillon de cDNA.

Amorce	Gène ciblé	Séquence (5'-3')
SWEET16_qPCR1_Fwd	SWEET16	GGAGGTTTACTAGTGGTCACAG
SWEET16_qPCR1_Rev		TGATTGAATCTTGAGAGGTTCCGG
SWEET17_qPCR1_Fwd	SWEET17	GGAAACTCTTCCTTTCATCATTGG
SWEET17_qPCR1_Rev		TCTGAATGTCCCTACCGGTG
SFP6_qPCR2_Fwd	SFP6	GGAATGGCTGTTAGTCTCCT
SFP6_qPCR2_Rev		ATCTTAACCGGTAGAATCTCAGAC
SUT4_qPCR1_Fwd	SUT4	GTTAGGAGTAACATAGACATTGGC
SUT4_qPCR1_Rev		ACTGTACGTTATAGCTAGTGGGA
VGT2_qPCR1_Fwd	VGT2	ACATCCTCTGCTACAATTTCCA
VGT2_qPCR1_Rev		CTTCTTCTCCCAAGCCAGTC
TMT1_qPCR2_Fwd	TMT1	GAAGATGTCTCAGGTGAAATGG
TMT1_qPCR2_Rev		ATGAAAGACCCTCTTCAGCTC
TMT2_qPCR1_Fwd	TMT2	ACTCTAAGGAACTTATGGATCAGC
TMT2_qPCR1_Rev		CCATTTATACCAGAGAACTGTTGC
TMT3_qPCR1_Fwd	TMT3	TGATGATAACCAGGAGCATGC
TMT3_qPCR1_Rev		TTCATGACATACACTCCCATGAC
VHA-a1_qPCR2_Fwd	VHA-a1	CGTTCAGCTTATCATTCTGC
VHA-a1_qPCR2_Rev		TTCGGCATTTAGATCACGGA
VHA-a2_qPCR2_Fwd	VHA-a2	AAAGGAACAAATGACGAAGGC
VHA-a2_qPCR2_Rev		CAAGTTTGACCTCCAATTCATCC
VHA-a3_qPCR2_Fwd	VHA-a3	GTTCATACAATGAGCTTGTGGA
VHA-a3_qPCR2_Rev		AGTCACTGCTTCTGTTCTG
SIVP1_qPCR1_Fwd	SIVP1	GCAATTGATGCATATGGTCCC
SIVP1_qPCR1_Rev		AGCAAATCCCTTTCCAATAGCA
SIVP2_qPCR1_Fwd	SIVP2	GGCTATTACTGGATATGGACTTGG
SIVP2_qPCR1_Rev		ATTATCAGCAATCACAGCAGGA
SIVP3_qPCR1_Fwd	SIVP3	TCTTCAGAACTCAGTATGGGAC
SIVP3_qPCR1_Rev		GATGTTACCCTGCCTAAGCC

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

III- Clonage moléculaire

1- Clonage moléculaire par la technologie Gateway

La séquence codante des gènes d'intérêts de cette étude a été obtenue à partir du génome de référence Heinz disponible sur la base de données Solgenomics (<https://solgenomics.net/>). Pour les clonages, cette séquence a été synthétisée et clonée dans un vecteur commercial (Twist bioscience) portant la résistance au chloramphenicol. Pour les besoins des clonages, les séquences ont été domestiquées pour être adaptées au clonage Moclo en éliminant les sites de restriction des enzymes Bsa1 et Bpi1. A chaque extrémité, les sites Bsa1 ont été rajoutés (GGGGTCTCGA/GCTTCGAGACCCC)

- Amplification de la séquence d'intérêt et insertion dans les vecteurs d'entrée

Dans cette étude, les vecteurs Gateway® (Invitrogen) ont été utilisés pour la construction des plasmides RNAi. Les fragments RNAi d'environ 300 paires de bases sont designés pour chaque gène. Pour les familles multigéniques, les fragments RNAi sont designés dans les zones présentant le plus d'homologies entre les gènes de la famille. Les fragments sont obtenus par amplification PCR sur les vecteurs Twist de synthèse à l'aide de la polymérase haute-fidélité Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs) selon les recommandations du fournisseur, en utilisant les amorces listées dans le tableau 7, dont la séquence contient les extrémités attb nécessaires à la recombinaison pour le clonage.

Les fragments PCR ainsi obtenus sont purifiés sur gel d'agarose. Le clonage du fragment attB-PCR purifié dans le vecteur d'entrée pDONR™ 201 ou pDONR™ 207 est réalisé grâce à la réaction de "recombinaison BP" selon le protocole du fournisseur (Invitrogen).

- Clonage dans les vecteurs de destination

Le clonage est réalisé par recombinaison dite "LR". Il permet de transférer la séquence d'intérêt dans différents vecteurs de destination. Cette réaction s'effectue sur le plasmide issu de la "recombinaison BP" après sélection et amplification des clones recombinants. La réaction est réalisée selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). La présence de la séquence d'intérêt dans le plasmide porté par les bactéries sélectionnées est évaluée par PCR à l'aide des amorces listées tableau 7 (sans les extrémités attb). La séquence du fragment inséré est ensuite vérifiée par séquençage.

- Vecteurs utilisés pour la transformation des plantes

Dans cette étude, deux vecteurs de destination ont été utilisés : le vecteur RNAi pK8GWIWG-PPC2-B4 (VIB collection) dont la construction RNAi est sous la dépendance du promoteur fruit spécifique PP2C et le vecteur pK7GWIWG2(I) (VIB collection) dont la construction RNAi est sous la dépendance du promoteur constitutif p35S. Ces deux plasmides portent le gène de résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries transformées. Les deux sites de recombinaisons en orientation inverse et séparés par un intron (attR1/attR2-Intron-attR2/attR1) permettent d'obtenir la structure tige boucle caractéristique des constructions RNAi. Il s'agit de vecteurs binaires contenant entre les sites LB et RB de l'ADN-T, les séquences du promoteur CaMV 35S ou PP2C et du terminateur du gène VI du CaMV ou OCS terminator entre lesquelles sont insérés des sites de recombinaison attR Gateway® bordant le gène ccdB. La sélection des plantes est permise grâce au gène de sélection conférant la résistance à la kanamycine (KanR)

2- Clonage moléculaire par la technologie Modular Cloning (Moclo)

Cette méthode de clonage a été utilisée pour la construction des plasmides nécessaires à déterminer la localisation subcellulaire des protéines d'intérêts ainsi que pour la construction des plasmides de surexpression des gènes SWEET16 et SWEET17. L'ensemble des vecteurs ont été commandés auprès d'Addgene (www.addgene.org). Les constructions ont été réalisées en utilisant la méthode de clonage GoldenGate décrite par Weber *et al.*, 2011.

- Vecteurs utilisés pour déterminer la localisation subcellulaire des protéines d'intérêts

Les plasmides de niveau 0 correspondent aux vecteurs « Twist ». Les vecteurs de niveau 0 Twist, BJ10 contenant la séquence codant pour la eGFP et pICH41414 (Addgene n°50337) contenant la séquence du terminateur CaMV35S sont assemblés dans le vecteur de niveau 1 pICH47742 (Addgene n°48001) comme décrit dans Weber *et al.*, 2011. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB + Ampicilline (100µg/mL)+ X-Gal (2µg/mL) + IPTG (0.1mM). Le plasmide de niveau 1 est ensuite purifié comme décrit en II-1-b et contrôlé par PCR avec des amorces spécifiques de la séquence du gène cible (Tableau 7).

Le plasmide de niveau 1 précédemment obtenu ainsi que le plasmides pICH47732::NOSp::NPTII (Addgene n°51144) contenant la cassette de résistance à la kanamycine pour la sélection des plantes transformées et pICH41744 (Addgene n°48017)

permettant la fermeture du plasmide autour des cassettes précédentes ont été assemblés dans le vecteur de niveau 2 pICSL4723 (Addgene n° 86173). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB + Kanamycine (50µg/mL). Le plasmide de niveau 2 est ensuite purifié comme décrit en II-1-b et contrôlé par séquençage.

- Vecteurs utilisés pour la surexpression de SWEET16 et SWEET17 sous la dépendance du promoteur PP2C

Amplification et clonage du promoteur PP2C

Le promoteur PP2C a été amplifié grâce au kit PrimeStarMax à partir du vecteur pK8GWIWG-PPC2-B4 (VIB collection) en utilisant des amorces spécifiques auxquelles on a rajouté les sites de restriction BpiI (tableau 7). Le fragment a été par la suite purifié sur gel d'agarose 1% et contrôlé par séquençage. Le promoteur PP2C a été cloné dans le vecteur de niveau 0 pICH41295 (Addgene n°47997). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB + Spectinomycine (100µg/mL) + X-Gal (2µg/mL) + IPTG (0.1mM). Le plasmide obtenu pICH41295::PP2C est par la suite purifié et contrôlé par séquençage en utilisant les amorces spécifiques du promoteur PP2C (tableau 7).

Construction des vecteurs de surexpression sous la dépendance du promoteur PP2C

Le plasmides de niveau 0 pICH41295::PP2C, Twist-SWEET16 ou Twist-SWEET17, et pICH41432 (Addgene n°50343) contenant la séquence du terminateur AtOcs sont assemblés dans le vecteur de niveau 1 pICH47742 (Addgene n°48001) comme décrit dans *Weber et al., 2011*. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB + Ampicilline (100µg/mL) + X-Gal (2µg/mL) + IPTG (0.1mM). Le plasmide de niveau 1 pICH47742-PP2C::SWEET16/SWEET17::Tocs est ensuite purifié comme décrit en II-1-b et contrôlé par PCR.

Le plasmide de niveau 1 pICH47742-PP2C::SWEET16/SWEET17::Tocs ainsi que les plasmides pICH47732::NOSp::NPTII (Addgene n°51144) contenant la cassette de résistance à la kanamycine pour la sélection des plantes transformées et pICH41744 (Addgene n°48017) permettant la fermeture du plasmide autour des cassettes précédentes ont été assemblés dans le vecteur de niveau 2 pICSL4723 (Addgene n° 86173). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB + Kanamycine (50µg/mL). Le plasmide de niveau 2 est ensuite purifié et contrôlé par séquençage.

Amorces	Gène cible	Type de clonage	Séquence 5'-3'
TMT1 RNAi fwd	TMT1	Gateway	AAGGGCTAATTGTTGCGATGTC
TMT1 RNAi rev			TTCCAAGGGAACCGGTGAAC
TMT1 RNAi attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGG GCTAATTGTTGCGATGTC
TMT1 RNAi attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCC AAGGGAACCGGTGAAC
TMT2 RNAi fwd	TMT2	Gateway	ATATATCTGAGACTGCTCCATCAG
TMT2 RNAi rev			AAACATCCTCTATGCCACGC
TMT2 RNAi attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATA TCTGAGACTGCTCCATCAG
TMT2 RNAi attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAAC ATCCTCTATGCCACGC
SIVP1 RNAi fwd	SIVP1	Gateway	GGTGTGGGAAGGCTTTTATTG
SIVP1 RNAi rev			TTCTAGGATCATCTTCAGGAATGTTC
SIVP1 RNAi attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTGT TGGGAAGGCTTTTATTG
SIVP1 RNAi attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCT AGGATCATCTTCAGGAATGTTC
SIVP2 RNAi fwd	SIVP2	Gateway	CTGATAATGTTGGGGATAATGTTG
SIVP2 RNAi rev			TAAGAGCAGTTGATATAATAAGTTGG
SIVP2 RNAi attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGAT AATGTTGGGGATAATGTTG
SIVP2 RNAi attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAG AGCAGTTGATATAATAAGTTGG
Sweet17 RNAi1 fwd	SWEET17	Gateway	ATAGCCTTCCCTACATTTGTACATTG
Sweet17 RNAi1 rev			TGATGATGTTTAAACATGTGGCC
Sweet17 RNAi1 attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATAGC CTCCCTACATTTGTACATTG
Sweet17 RNAi1 attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGAT GATGTTTAAACATGTGGCC
SFP6 RNAi2 fwd	SFP6	Gateway	GTTGGCTTTCATCTCGTTTG
SFP6 RNAi2 rev			CCAACCACCGAGGAGATTC
SFP6 RNAi2 attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTTGG CTTCCATCTCGTTTG
SFP6 RNAi2 attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCCAA CCACCGAGGAGATTC
VGT2 RNAi1 fwd	VGT2	Gateway	TTGACAAGGGTGAAAATTCGTC
VGT2 RNAi1 rev			CAATTTGGAAAGCAACAGCAG
VGT2 RNAi1 attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGAC AAGGGTGAAAATTCGTC
VGT2 RNAi1 attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAT TTGGAAAGCAACAGCAG
VHA-a2 RNAi1 fwd	VHA-a2	Gateway	GTGTTTGTATCTTTACTCTGGAG
VHA-a2 RNAi1 rev			GCATTCTTTGTCACATCAAAAC
VHA-a2 RNAi1 attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGTT TGTTATCTTTACTCTGGAG
VHA-a2 RNAi1 attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCAC TTCTTTGTCACATCAAAAC
VHA-a3 RNAi2 fwd	VHA-a3	Gateway	GGCTTGTTATCTTCTCTACATCTGC
VHA-a3 RNAi2 rev			GGATGGATCAGTCACTGCTTC
VHA-a3 RNAi2 attbfwd			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCTT GTTATCTTCTCTACATCTGC
VHA-a3 RNAi2 attbrev			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGGAT GGATCAGTCACTGCTTC
F-SIPP2C-Bpi1	Promoteur PP2C	GoldenGate	TTGAAGACAAGGAGATACATTCTACTTTGAAG TTGTTT
R SIPP2C-Bpi1			TTGAAGACAACATTAACCCCTTTTTACTCAA CTAC
F-SIPEPC	Promoteur PP2C	GoldenGate	ATACATTCTACTTTGAAGTTGTTTAA
R-SIPEPC			AACCCCTTTTTACTCAAACCTAC

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour le clonage

3- Transformation d'E. Coli par électroporation

La transformation de *E. Coli* est effectuée par électroporation en utilisant le Micropulser™ (BioRad). Quarante µL de bactéries électrocompétentes sont décongelés dans la glace et additionnés à 1µL du mélange de produit de ligation ou à une certaine quantité de plasmides. Le mélange, placé dans une cuve à électroporation (fente 1 mm), est soumis à une impulsion électrique de 1800 Volt et d'environ 5 millisecondes. Les bactéries sont ensuite incubées dans 1mL de milieu LB, sous agitation (200 rpm), pendant 45 min à 37°C. Une fraction de la culture est étalée sur du milieu LB solide additionné de l'antibiotique de sélection approprié.

IV- Méthode de transgène et de sélection des plantes transgéniques

	KCMS solide	KCMS liquide	2Z	Milieu d'enracinement (ENR)	MS 1/2
Volume	1L	1L	1L	1L	1L
MS (Basal salt, Duchefa, MO221)	-	-	-	2.2g	-
MS (including vitamins, Duchefa, MO222)	4.4g	4.4g	4.4g	-	2.2g
Saccharose	20g	20g	30g	10g	15g
KH₂PO₄	200 mg	200 mg	200 mg	-	-
pH	5.8	5.7	5.8	5.8	5.9
Agar	8g	-	4g	7g	8g
	Autoclave	Autoclave	Autoclave	Autoclave	Autoclave
Thiamine Cs:10mg/mL	90µL Cf: 0.9 mg/L	90µL Cf: 0.9 mg/L	-	-	-
Acetophenone Cs:100mM (Dans EtOH)	2mL Cf: 200µM	2mL Cf: 200µM	-	-	-
2.4D Cs:10mg/mL (Dans EtOH)	20µL Cf:200µg/L	-	-	-	-
Kinetine Cs:1mg/mL	100µL Cf:100µg/L	-	-	-	-
Vitamins de Nitsh 1X Cs :1000X (5.426g/50mL)+3goutte KOH 0.1M			1mL	1mL	
Zeatin Ribosid Cs : 2mg/mL			1 mL Cf : 2mg/L		

Tableau 8 : Composition des milieux de culture pour la transformation stable

1- Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* et préparation des cultures pour la transformation stable

La transformation est effectuée par électroporation en utilisant le Micropulser™ (BioRad). 40 µL d'*Agrobacteries* électrocompétentes GV3101 sont décongelés dans la glace et additionnés à 1µL de plasmide purifié à 100ng/µL. Le mélange, placé dans une cuve à électroporation (fente 1 mm), est soumis à une impulsion électrique de 2500 Volt et d'environ 5 millisecondes. Les bactéries sont ensuite incubées dans 1mL de milieu LB, sous agitation (200 rpm), pendant 1 heure à 28°C. Une fraction de la culture est étalée sur du milieu LB solide + Rifampicine (25µg/ml) + Gentamycine (40µg/mL) ainsi que de l'antibiotique de sélection approprié. Les bactéries sont incubées 48 heures à 28°C. Une fraction de la culture solide est prélevée et mise en culture liquide dans 10mL de LB + Rifampicine (25µg/ml) + Gentamycine (40µg/mL) + antibiotique de sélection pendant 24 heures à 28°C sous agitation (200rpm). 80µL de cette pré-culture sont ensuite prélevés et remis en culture dans 40mL de LB + Rifampicine (25µg/ml) + Gentamycine (40µg/mL) + antibiotique de sélection (dilution au 500^e) pendant 24 heures à 28°C sous agitation (200rpm). Lorsque la DO_{600nm} de la culture a atteint 0.4, la suspension est prête pour la transformation. La culture est centrifugée 15 minutes à 3500g, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 40mL de milieu LB+ Acetocyringone 200µM. La suspension est remise en culture 15 minutes à 28°C pour rincer les antibiotiques. La culture est ensuite centrifugée 15 minutes à 3500g, le surnageant est éliminé et le culot est finalement resuspendu dans 40mL de KCMS (Tableau 8)

2- Transgénése et sélection des plantes de tomate

La transformation de tomate est effectuée à partir de fragments de cotylédons par agroinfection. Les cotylédons de tomate M82 sont prélevés en condition axénique à partir de plantules de 7 jours semées sur milieu MS1/4, coupées en 3 explants puis mises en culture sur milieu KCMS solide (tableau 8) pendant 48h dans l'obscurité. Les explants sont ensuite immergés pendant 30min dans la solution KCMS + bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt. Après élimination de l'excès de culture bactérienne sur du papier absorbant stérile, les explants sont co-cultivés sur du milieu KCMS solide pendant 48 h dans l'obscurité. Les explants sont ensuite rincés 5 fois avec de l'eau additionnée de Tween20 0,05% (v/v) et mis en culture sur milieu de sélection 2Z + Kanamycine 150 µg/mL + Ticarciline et acide clavulanique (rapport 15/1) à 300µg/mL. Les explants sont repiqués sur du milieu neuf toutes les semaines. Les plantules se formant à partir des cals sont repiquées en pots contenant du milieu ENR (tableau 8) + mélange de Ticarciline et acide clavulanique (rapport 15/1) à 300µg/mL + kanamycine à 150 µg/mL

pour enracinement. L'intégration du transgène et son expression sont ensuite contrôlées par PCR et RT-PCR en temps réel pour vérifier l'intégration du transgène et son expression avant de transférer les plantes enracinées en serre.

3- Purification et transformation de protoplastes

	Milieu K4	Milieu K3	W5	MMM	Solution de transformation
Volume	1L	1L	1L	100mL	60mL
Gamborg B5 including vitamins	3.16g	3.16g	-	-	-
Saccharose	Cf :0.4M	Cf :0.3M	-	-	-
NaCl	-	-	9g Cf : 154mM	-	-
CaCl₂	-	-	13.87g Cf : 125mM	-	-
KCl	-	-	0.37g Cf : 5mM	-	-
Glucose	-	-	0.9g Cf : 5mM	-	-
Mannitol	-	-	-	9.1g Cf : 0.5M	4.38g Cf : 0.4M
MES	-	-	-	0.1g Cf : 0.1%	-
MgCl₂	-	-	-	0.14g Cf : 15mM	-
PEG 6000	-	-	-	-	12g Cf : 20% (p/v)
Ca(NO₃)₂					1.41g Cf : 0.1M
PH	5.7 avec KOH	5.7 avec KOH	5.7 avec KOH	5.7 avec KOH	pH8
	Autoclave	Autoclave	Autoclave	Filtration 0.45µm	Filtration 0.45µm

Tableau 9 : Milieu de culture pour la purification et la transformation transitoire de protoplastes de tomate

Les protoplastes sont préparés à partir de cotylédons de tomate M82 prélevés en condition axénique à partir de plantules de 12 jours semées sur milieu MS1/4 + Saccharose 7.5 g/L. Deux boîtes Magenta contenant chacune 25 plantules/transformation sont utilisées.

- Digestion enzymatique des parois

La digestion des parois se fait grâce à un mélange de milieu K4 (Tableau 9)+ 1.2% Cellulase (Onozuka) + 0.6% macerozyme. La solution est mise 30 minutes sous agitation pour dissolution des poudres et centrifugée 10 minutes à 5000g. Le surnageant est récupéré et filtré avec un filtre stérile 0.45µm. Les cotylédons prélevés sont ensuite lacérés sur la face inférieure avec un scalpel stérile directement dans la solution de digestion dans une boîte de pétri. L'ensemble est incubé à 28°C pendant 24h.

- Purification des protoplastes

Après incubation, les boîtes de pétris sont mises sous agitation lente pendant 30 minutes. La solution est filtrée au travers d'un filtre stérile de 100µm et 8mL sont transférés dans des tubes de 12mL. Après ajout de 1mL de solution W5 (Tableau 9), les tubes sont centrifugés 10 minutes à 80g avec une accélération/décélération lente. A l'issue de la centrifugation, les protoplastes se retrouvent à l'interface entre le K4 et le W5 ; ils sont prélevés et rassemblés dans des nouveaux tubes de 12mL pour atteindre environ 4mL. Dans chaque tube, 10 mL de W5 sont rajoutés, l'ensemble est agité très doucement par inversion et mis à centrifuger 5 minutes à 80g. Le surnageant est éliminé et cette étape de rinçage est répétée 2 fois. A l'issue des rinçages, les tubes sont incubés 2 heures à 4°C. Le nombre de protoplastes est estimé en utilisant un comptage sur cellule de Malasse.

- Transformation des protoplastes

Après incubation, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 80g puis le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans de la solution MMM (Tableau 9) de façon à avoir 2.5×10^6 protoplastes/mL.

Par transformation, 1 tube de 12 mL est préparé comme suit : 20µg de plasmide, 300µL de PEG, 300µL de solution de protoplastes. L'ensemble est agité et incubé 5 minutes à température ambiante. 2 mL de solution K3 (Tableau 9) sont ensuite ajoutés à chaque tube et incubés pendant 2 heures à température ambiante. A l'issue des 2h les protoplastes transformés sont rincés avec 10 mL de W5, centrifugés 5 minutes à 80g. Enfin, le surnageant est éliminé, les protoplastes sont resuspendus dans 3mL de solution K3 et incubé 24 heures à température ambiante à l'obscurité. Après 24 heures, les protoplastes vivants flottent à la surface et peuvent être observés.

V- Dosages biochimiques

1- Préparation des extraits

a- Broyage et conservation

Les échantillons sont conservés dans des tubes à scintillation (Polyvials V, Natural high density polyethylene, 20 ml) et broyés en conditions cryogéniques (N2 liquide) à l'aide de la station Genogrinder 2010 Mixer Mill à 30 Hz pendant 45 s. L'opération a été répétée 2 à 3 fois en fonction des échantillons. Le broyage est fait grâce à trois billes acier/inox de 8 mm de diamètre. Les poudres sont conservées à -80°C.

b- Lyophilisation des échantillons

Les poudres sont lyophilisées sous vide en utilisant le lyophilisateur de type PILOTE COMPACT (Cryotec) suivant des paliers de température successifs sur une durée de 5 jours selon la programmation suivante :

Température	-20°C	-20°C	-10°C	-10°C	0°C	0°C	10°C	10°C	20°	23°C
Durée du palier	20min	14H	30min	14H	20min	16H	20min	15H	20min	18H

Les poudres lyophilisées sont ensuite conservées à -20°C dans des poches scellées contenant du Silica gel.

c- Extraction éthanolique

Pour la quantification absolue du glucose, du fructose, du saccharose, du citrate, du malate, des acides aminés totaux, de l'amidon et des protéines solubles, 20 mg (+/- 3mg) de matière fraîche broyée ont été pesés en conditions cryogéniques, randomisés sur des roboracks (Micronic, 1,1 ml) et extraits de manière robotisée (station de pipetage Star 96 ML 6649 Hamilton). Dans une première étape, 250 µL de tampon HEPES/KOH 10 mM pH 6 contenant 80% d'éthanol (EtOH, 80:20, v/v) sont ajoutés aux poudres congelées. Les tubes sont ensuite chauffés pendant 20 min à 80 °C puis centrifugés 5 min à 2916 g (Centrifuges 5810R, Eppendorf). Le premier surnageant (S1) est transféré dans un nouveau tube Micronic et stocké à 4 °C à l'abri de la lumière. La seconde extraction a été réalisée sur le culot en ajoutant 150 µl de la même solution et incubé à 80°C pendant 20 min. Après centrifugation, le second surnageant (S2) est ajouté à S1 et conservé à 4°C à l'abri de la lumière. Une troisième et dernière extraction est réalisée sur le culot par ajout de 250 µl d'une solution de tampon HEPES/KOH 10mM pH 6 contenant 50% d'EtOH (50:50, v/v) puis l'extrait est incubé à 80 °C pendant 20 min. Après centrifugation, le troisième surnageant (S3) est ajouté aux deux autres (S1 + S2). Les surnageants (S1+S2+S3) ainsi que les culots ont été stockés à -20 °C en attendant l'analyse des métabolites, de l'amidon et des protéines solubles.

d- Extraction des enzymes solubles

L'extraction des enzymes solubles a été réalisée à partir de 20 mg de matière fraîche broyée auxquels ont été rajoutés environ 20 mg de PVPP insoluble afin de neutraliser les polyphénols. 500 µL de tampon d'extraction contenant 20% de glycérol (v/v), 0.25% de BSA (v/v), 1 % de triton (v/v), 50 mM de tampon HEPES/KOH à pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 1 mM d'acide egtazique (EGTA), 10 mM de

leupeptine et 0,5 mM de DTT sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont ensuite agités vigoureusement et centrifugés 10 min à 2916 g (centrifugeuse 5810R, Eppendorf) à 4°C. Les surnageants sont ensuite récupérés, une partie d'extrait non dilué est conservée et une partie du surnageants est diluée 2, 4 ou 8 fois avec du tampon d'extraction pour procéder au dosage des activités enzymatiques.

Extraction pour le dosage de l'invertase neutre et acide

Les invertases acides et neutres nécessitent une étape de « dessalage » de l'extrait pour éliminer les sucres solubles. Celle-ci a été réalisée sur des colonnes de résine Sephadex G-25 16% préalablement conditionnées avec une solution de tampon contenant 50 mM d'HEPES/KOH pH 7,5. 80 µl d'extrait ont été ajoutés sur chaque colonne et centrifugés pendant 1 min à 800g (centrifugeuse 5810R, Eppendorf). Les surnageants sont récupérés, une partie non diluée est conservée et le reste est dilué 2 fois. Les extraits sont conservés dans la glace jusqu'à la mesure.

e- Extraction des ions

L'extraction des ions est réalisée à partir de 20mg de matière fraîche broyée et congelée. 1mL d'eau milli-Q extra pure est ajouté et les tubes sont homogénéisés 1 minute à 27 Hz (MM400 Retsch). Les extraits sont ensuite chauffés 10 minutes à 80°C au bain Marie puis centrifugés 20 minutes à 13200g à 4°C. Les surnageants sont collectés et filtrés au travers de filtres 0.22 µm PVDF.

2- Dosages de métabolites

	Glucose, Fructose, Saccharose	Citrate	Malate	Acides aminés	Protéines	Amidon
Volume d'extrait (µL)	5µL	30µL	30µL	3µL	7µL	20µL

Tableau 10 : Volume d'extrait utilisé pour la quantification des métabolites en fonction des stades de développement des fruits

Les mesures de densité optique sont effectuées au spectrophotomètre lecteur de plaque 96 puits (SAFAS MP96)

a- Dosage des hexoses : glucose, fructose, saccharose

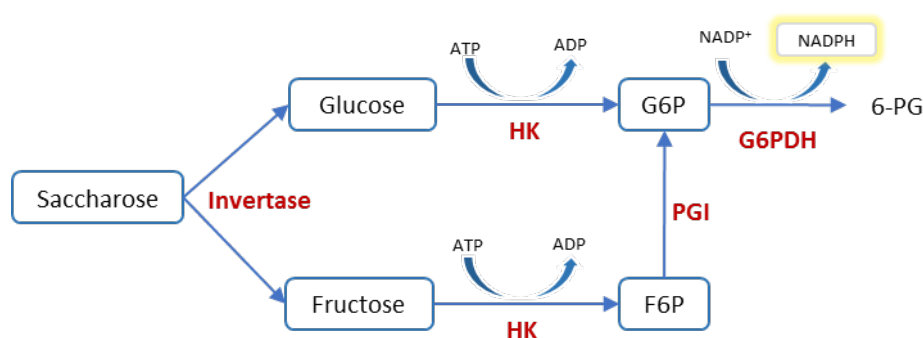


Figure 1 : Principe du dosage des hexoses

Les sucres solubles sont mesurés en microplaque par couplage de réactions enzymatiques impliquant l'hexokinase (HK), la phosphoglucose isomérase (PGI), l'invertase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La production de NADPH est ensuite mesurée à 340 nm. Entre 5 µl d'extrait éthanolique sont ajoutés à 160µL de mix réactionnel.

Mix réactionnel

150 µL HEPES/KOH 0.1M, 3 mM MgCl₂, pH 7

4.64 µL ATP 100mM

4.64 µL NADP⁺ 45mM

0.8 µL G6PDH grade II 700 u/mL

Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C et l'apparition de NADPH est mesuré à 340nm jusqu'à atteindre un plateau (OD1), ensuite les enzymes suivantes sont ajoutées successivement :

- 1 µL de HK 900 u/mL. Puis lorsqu'un plateau de DO est atteint (OD2),
- 1µL de PGI 1000 u/mL. Puis lorsqu'un plateau de DO est atteint (OD3),
- 1µL d'invertase (300 mg dans 3 mL HEPES/KOH 0.1M, 3 mM MgCl₂, pH 7). La réaction stoppée lorsque le dernier plateau est atteint (OD4)

La différence de DO entre deux plateaux consécutifs (ΔDO) est calculée. $\Delta DO1 = OD2 - OD1$ permet de quantifier le glucose, $\Delta DO2 = OD3 - OD2$ permet de quantifier le fructose et $\Delta DO3 = OD4 - OD3$ permet de quantifier le saccharose. La quantité de NADPH produite à chaque réaction est proportionnelle à la quantité du métabolite mesuré et est calculée comme suit :

$$NADPH (\mu mol) = \frac{\Delta DO_{340nm}}{l * \varepsilon}$$

Avec ε , le coefficient d'extinction de NADPH à 340 nm ($\varepsilon = 6,22 \text{ mmol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et l la longueur du trajet optique ($l = 2850 \text{ cm.l}^{-1}$). La quantité de sucre soluble est finalement exprimée en μmol d'équivalent glucose par gramme de matière fraîche.

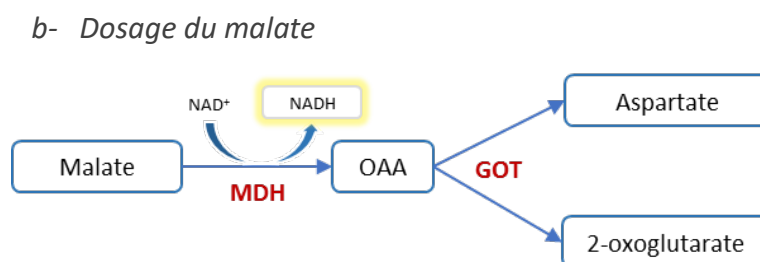


Figure 2 : Principe du dosage du malate.

En présence de NAD^+ , le malate est oxydé par la MDH en oxaloacétate libérant une molécule de NADH par malate consommé. L'oxaloacétate produit et le glutamate du mix réactionnel sont ensuite utilisés par la glutamate-oxoglutarate aminotransférase (GOT) pour donner de l'aspartate et du 2-oxoglutarate pour déplacer l'équilibre de la première réaction.

30 μL d'extrait éthanolique sont ajoutés à 90 μL mix réactionnel suivant :

Mix réactionnel

69 μL Tricine/KOH 0.1M pH9

10 μL NAD^+ 30 mM

10 μL Glutamate 20 mM

1 μL GOT 200 u/mL dans 100 mM Tricine/KOH pH9

Une première mesure du blanc réactionnel est effectuée à 340 nm, ensuite 1 μL de MDH à 6000 u/ml est ajouté au mélange pour la mesure du malate. Le ΔDO entre les deux plateaux est ensuite calculé. La même formule que pour le NADPH (Partie V-2-a) est utilisée pour calculer la quantité de NADH dans le puits.

c- Dosage du citrate

Le citrate a été mesuré en utilisant le kit Citric Acid Assay Kit (Megazyme) en suivant les recommandations du fournisseur.

d- Dosage de protéines totales solubles

Le dosage des protéines est réalisé à partir des culots issus de l'extraction éthanolique auxquels ont été rajouté 400 μ L de NaOH 0.1M. Les extraits sont ensuite chauffés 30 minutes à 95 °C puis centrifugés 5 minutes à 2500g. Le dosage des protéines est réalisé sur les surnageants. Pour ce faire, entre 5 μ L d'extraits sont ajoutés à 180 μ L de Bradford prêts à l'emploi (Biorad). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la DO est mesurée à 595 nm. La quantité de protéines est calculée à partir d'une courbe de calibration réalisée avec de la BSA (Bovine Serum Albumine – 0/80/160/230/640 μ g/mL dans NaOH 0.1M).

e- Dosage de l'amidon

Le dosage de l'amidon se fait sur les culots issus de l'extraction éthanolique et après le dosage des protéines. Le pH des extraits est neutralisé en ajoutant 80 μ L de 0.5M HCl/0.1M sodium-acétate, pH 4.9. L'amidon est ensuite digéré grâce à l'ajout de 100 μ L de mix de digestion (Amyloglucosidase 140 u/mL + α -amylase 100u/mL dans du tampon acétate 50 mM pH4.9). Les extraits sont ensuite incubés 16 heures à 37°C. Après centrifugation, le dosage de l'amidon est réalisé sur le surnageant en dosant le glucose de la même façon que décrit en V-2-a

f- Dosage des acides aminés libres totaux

Pour le dosage des acides aminés, 3 μ L d'extrait éthanolique sont ajoutés au mix réactionnel suivant :

Mix réactionnel

15 μ L tampon borate 0.1M pH8

90 μ L fluorescamine 0.1% dans acetonitrile

100 μ L H₂O

Après 5 min d'incubation à température ambiante la fluorescence est mesurée avec une excitation à 405 nm et une émission à 485 nm. La quantité d'acides aminés totaux est calculée grâce à une courbe de calibration du glutamate (0-100-200-400-800 μ M dans EtOH70%/HEPES KOH 10mM)

g- Dosage des ions

Les ions sont quantifiés sur les surnageants extraits comme décrit en V-1-d par chromatographie ionique (DIONEX ICS-5000). La séparation des ions se fait grâce à deux colonnes échangeuses d'ions :

- Les anions sont séparés sur une colonne Dionex IonPac AS19-4 μ M protégée par une colonne de garde Dionex IonPac AG19-4 μ m.
- Les cations sont séparés sur une colonne Dionex IonPac CS16-4 μ m équipée d'une colonne de garde Dionex IonPac CS16-4 (50-4 mm id)

Le courant électrique appliqué au suppresseur de conductivité AERS 500 2mm est de 28 mA pour les anions et celui appliqué sur le suppresseur Dionex CERS-500 4mm est de 50 mA pour les cations. Le volume d'injection pour les cations et les anions est de 2.5 μ L. L'éluant Dionex EGC 500 KOH est utilisé sur la colonne Anion Trap ATC 500 pour les anions et de l'acide méthanesulfonique est utilisée pour les cations. Le débit est de 0.25 mL/min pour les anions et 0.16 mL/min pour les cations.

h- Estimation des parois et de la matière sèche

Les parois sont mesurées à partir de 100 mg de matière fraîche, les masses exactes des poudres sont reportées (FW). Les tubes vides et secs sont préalablement pesés (M_{TV}). Les poudres sont ensuite lyophilisées comme décrit en V-1-b et les tubes sont de nouveau pesés (M_{TLP}) pour estimer la matière sèche ($DW = M_{TLP} - M_{TV}$). Une extraction éthanolique est réalisée de la même façon que décrit en V-1-c mais en utilisant 1mL d'ETOH 80% pour la première extraction, 1mL d'ETOH 80% pour la deuxième extraction et 1mL d'ETOH 50% pour la troisième extraction. Les protéines sont extraites comme décrit en V-2-d mais avec 800 μ L de NaOH 0.1M. Le pH des extraits est neutralisé avec 160 μ L d' HCl 0.5M/0.1M sodium-acétate, pH 4.9. L'amidon est ensuite digéré grâce à l'ajout de 200 μ L de mix de digestion (Amyloglucosidase 140 u/mL + α -amylase 100u/mL dans du tampon acétate 50 mM pH4.9). Les extraits sont ensuite incubés 16 heures à 37°C et les surnageants sont éliminés. Les culots sont rincés avec 1mL d'eau mQ. Après centrifugation, les surnageants sont éliminés et le culot restant, qui contient les composés insolubles est assimilé aux parois. Les culots sont ensuite lyophilisés et pesés avec une balance de précision (M_P). La quantité de parois en gramme par gramme de matière fraîche est estimée de la façon suivant $P = M_P / FW$.

3- Dosage des activités enzymatiques

a. Dosage direct

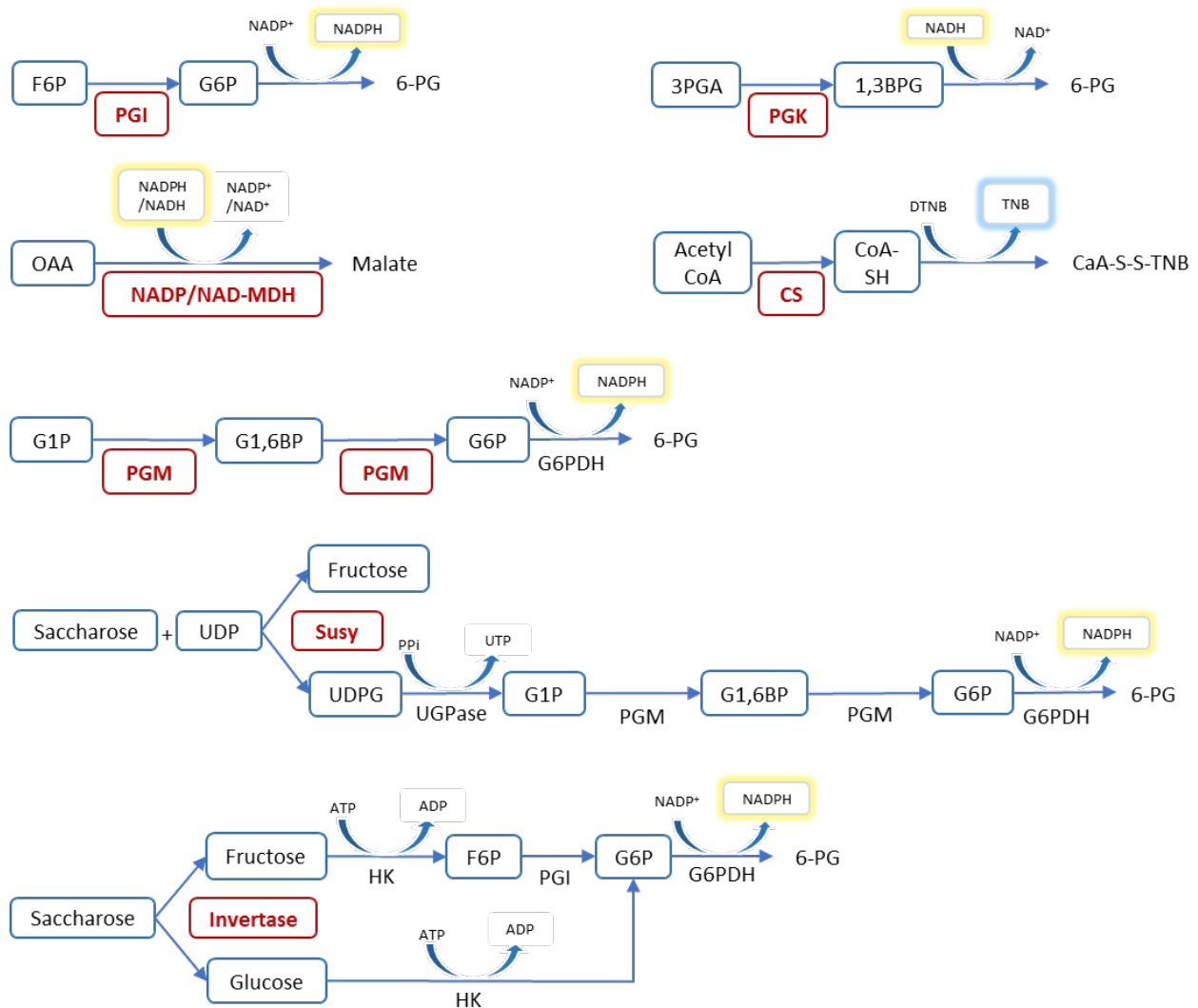


Figure 3 : Principe des dosages en direct des activités enzymatiques

Encadré en rouge les capacités enzymatiques mesurées ; encadré jaune, détection à 340 nm de la disparition ou apparition du NADH/NADPH ; encadré bleu, détection à 418 nm du TNB formé. Abréviations: 1,3BPG : glycérate-1,3-bisphosphate; 3PGA : 3-phospho-glycérate; 6PG : 6-phosphogluconolactone ; CS : citrate synthase; DTNB : acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque); F6P: fructose-6-phosphate; G1P : glucose-1-phosphate; G6P : glucose-6-phosphate; G1,6P : glucose-1,6-bisphosphate; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase; HK : hexokinase; NADP-IDH, isocitrate déshydrogénase ; MDH : malate déshydrogénase; OAA : oxaloacétate; Pentose-P, pentose phosphate; PEP, phosphoénolpyruvate; PGI : phosphoglucose isomérase; PGK : Phosphoglycerokinase ; PGM : phosphoglucomutase; PPi : pyrophosphate ; UGPase : UDP-glucose-pyrophosphorylase

Phosphoglucose isomérase (PGI EC 5.3.1.9)

Pour déterminer l'activité de la PGI, 5 μL d'extrait (V-1-d) non dilué sont mélangés à 95 μL de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

21 μL d' H_2O

20 μL de tampon (MgCl_2 0.5M, Tricine/KOH 0.5M pH8, EDTA 10mM, BSA 2.5% p/v, Triton x100 0.25%)

6 μL NADP^+ 20mM

2 μL G6PDH grade II 50 u/mL dans 200mM Tricine/KOH Ph8, 10mM MgCl_2)

1 μL MgCl_2 1M

45 μL H_2O (V0) ou 45 μL Fructose-6-Phosphate (Vsat)

La production de NADPH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la PGI est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol NADPH/gFW/min}$

NADP-Malate déshydrogénase (NADP-MDH EC 1.1.1.82)

Pour déterminer l'activité de la NADP-MDH, 5 μL d'extrait (V-1-d) dilués deux fois sont mélangés à 20 μL de tampon d'activation (Tricine/KOH 100mM pH8, KCl 180 mM, Triton X100 0.5%, DTT 150 mM). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante puis 75 μL de mix réactionnel préparé comme suit sont ajoutés :

Mix réactionnel

20 μL de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, Triton X100 0.25%, 0.5M EDTA)

9 μL H_2O

1 μL NADPH 50 mM

45 μL H_2O (V0) ou 45 μL Oxaloacétate 2.5 mM (Vsat)

La disparition de NADPH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la NADP-MDH est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol NADPH/gFW/min}$.

NAD-Malate déshydrogénase (NAD-MDH EC 1.1.1.37)

Pour déterminer l'activité de la NAD-MDH, 5 μ L d'extrait (V-1-d) dilués 4 fois sont mélangés à 95 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μ L de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, Triton X100 0.25%, 0.5M EDTA)

28 μ L H₂O

2 μ L NADH 60 mM

45 μ L H₂O (V₀) ou 45 μ L Oxaloacétate 2.5 mM (V_{sat})

La disparition de NADH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la NADP-MDH est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V₀ à la pente obtenue avec le mix V_{sat} (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol NADPH/gFW/min

Phosphoglucumutase (PGM EC 5.4.2.2)

Pour déterminer l'activité de la PGM, 5 μ L d'extrait (V-1-d) dilués 2 fois sont mélangés à 95 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μ L de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, MgCl₂ 50mM, Triton X100 0.25%, EDTA 10 mM)

20 μ L H₂O

6 μ L NADP⁺ 20 mM

2 μ L G6PDH Grade II 50 u/mL dans 200mM Tricine/KOH pH8, 10mM MgCl₂

2 μ L glucose-1,6-bisphosphate 50 μ M

45 μ L H₂O (V₀) ou 45 μ L glucose-1-phosphate 7 mM (V_{sat})

L'apparition de NADPH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la PGM est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V₀ à la pente obtenue avec le mix V_{sat} (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol NADPH/gFW/min

Citrate synthase (CS EC 2.3.3.1)

Pour le citrate synthase, deux activités sont mesurées : l'activité totale et l'activité de l'isoforme mitochondriale. Pour l'activité totale, 5 μ L d'extrait (V-1-d) non dilué sont mélangés à 87 μ L de mix réactionnel préparés comme suit :

Mix réactionnel

20 μ L de tampon (Tricine/KOH 500mM pH8)

4 μ L oxaloacétate 5 mM

63 μ L H₂O

Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 4 μ L de DTNB 2 mM (5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) et 4 μ L d'H₂O (V0) ou 4 μ L d'acetylCoA 10 mM (Vsat) sont ajoutés.

Pour l'activité mitochondriale, 5 μ L d'extrait (V-1-d) dilué 2 fois sont mélangés à 87 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μ L de tampon (Tricine/KOH 500mM pH8)

63 μ L H₂O

4 μ L DTNB

Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 4 μ L d'oxaloacétate 5mM et 4 μ L d'H₂O (V0) ou 4 μ L d'acetylCoA 10mM sont ajoutés

Pour les deux activités, l'absorbance est mesurée à 418nm pendant 30 minutes à 25°C. L'activité des CS est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol /gFW/min

Saccharose synthase (SUSY EC 2.4.1.13)

Pour déterminer l'activité de la SUSY, 5 μ L d'extrait (V-1-d) non dilués sont mélangés à 95 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μ L de tampon (HEPES/KOH 0.25M pH7.5, Mg Acétate 15mM, Triton X100 0.25%, EDTA 2.5mM, NaF 15mM)

39 μ L H₂O

10 μ L saccharose 1M

5 μ L NADP⁺ 25 mM

5 μ L PPi 10mM

2 μ L Glucose-1,6-bisphosphate (G1,6BP) 50 μ M

1 μ L DTT 500mM

1 μ L d'UDP-Glucose pyrophosphorylase (UGPase) 100 u.ml-1 dans 50 mM HEPES/KOH pH 7.5

1 μ L PGM 100 u.ml-1 in 50 mM HEPES/KOH pH 7.5

2 μ L G6PDH Grade II 100 u/mL dans 50 mM HEPES/KOH pH 7.5

10 μ L H₂O (V0) ou 10 μ L UDP 100 mM (Vsat)

L'apparition de NADPH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la SUSY est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol NADPH/gFW/min}$.

Phosphoglycerokinase (PGK EC 2.7.2.3)

Pour déterminer l'activité de la PGK, 5 μL d'extrait (V-1-d) dilués 8 fois sont mélangés à 95 μL de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μL de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH7.8, MgCl_2 100mM, Triton X100 0.25%, EDTA 10mM, KCl 250mM)

47 μL H₂O

10 μL 3PGA 40 mM

10 μL DTT 50mM

2 μL NAD-GAPDH 50 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2

1 μL NADH 60 mM

5 μL H₂O (V0) ou 5 μL ATP 100 mM (Vsat)

La disparition de NADH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la PGK est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol NADPH/gFW/min}$

Invertase neutre (NI EC 3.2.1.26)

Pour déterminer l'activité de la NI, 5 μL d'extrait (V-1-d) dessalés non dilués sont mélangés à 95 μL de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

20 μL de tampon (HEPES/KOH 1M pH7.5)

0.2 μL MgCl_2 1M

2 μL ATP 100 mM

2 μL NADP⁺

83 μL H₂O

1 μL mix d'enzyme (Pour 1 micro-plaque 5 μL G6PDH grade II, 60 μL d'Hexokinase, 30 μL Phosphoglucose isomérase. Les enzymes sont centrifugées et le culot du mélange est resuspendu dans 200 μL of HEPES/KOH 50mM pH 7.5, MgCl_2 30mM)

2 μL H₂O (V0) ou 2 μL saccharose 1M (Vsat)

L'apparition de NADPH est mesurée à 340 nm pendant 20 minutes à 25°C. L'activité de la NI est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol NADPH/gFW/min}$

b. Dosages indirects

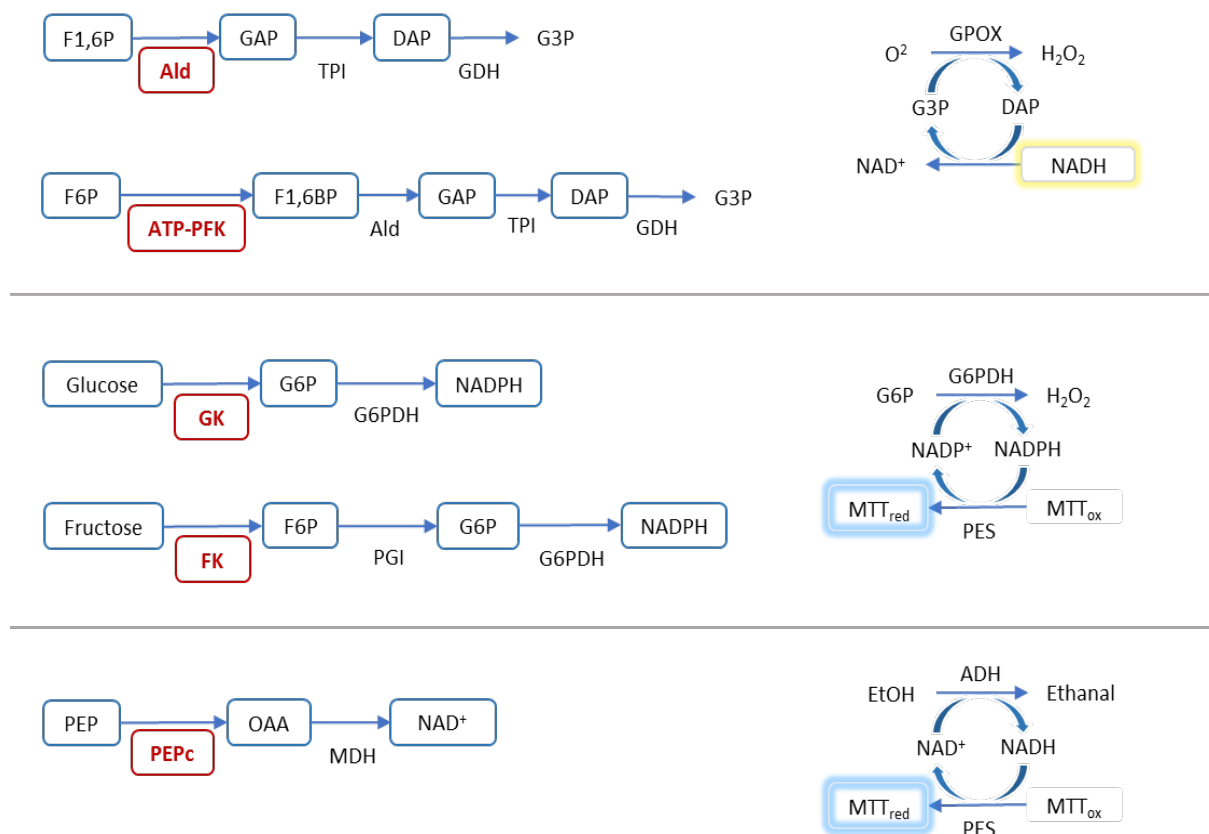


Figure 4 : Principe des dosages indirects des activités enzymatiques

Encadré en rouge les capacités enzymatiques mesurées ; encadré jaune, détection à 340 nm de la disparition ou apparition du NADH/NADPH; encadré bleu, détection à 570 nm du MTT formé. Abréviations: F6P : fructose-6-phosphate ; GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate ; F1,6BP : fructose-1, 6-bisphosphate ; DAP : dihydroxyacétone phosphate ; G3P : Glycérol-3-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, O₂ : dioxygène, OAA : oxaloacétate, MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, PES : Phenazine ethosulfate, Ald : Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase ; GK : glucokinase, FK : fructokinase ; PEPc : phosphoénol pyruvate carboxylase

Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase (F-1,6-BPase EC 4.1.2.13)

Pour déterminer l'activité de la F-1,6-BPase, 2 μL d'extrait (V-1-d) dilués 2 fois sont mélangés à 18 μL de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

- 4 μL de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8.5, MgCl_2 25mM, EDTA 5mM, Triton X100 0.25%)
- 8.5 μL H_2O
- 0.2 μL Triose-P isomerase 100 u.ml-1 dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2
- 0.2 μL Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase 200 u.ml-1 dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2
- 0.1 μL NADH 60mM
- 5 μL H_2O (V0) ou 5 μL fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 20mM (Vsat)

L'ensemble est incubé à 25°C pendant 20 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de 20 μL HCl 0.5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9. Après 10minutes d'incubation à température ambiante, le pH est neutralisé en ajoutant 20 μL de NaOH 0.5M. Enfin, l'activité est mesurée en ajoutant 50 μL de mix de détermination préparé comme suit :

Mix de détermination

- 10 μL Tricine/KOH 1M pH8
- 37.3 μL H_2O
- 0.2 μL MgCl_2 1M
- 0.5 μL Triose-P isomerase 100 u.ml-1 in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2
- 0.5 μL Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase 200 u.ml-1 dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2
- 0.5 μL GPOX 500 u.ml-1 in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl_2
- 1 μL NADH 60mM

L'absorbance est lue à 340 nm pendant 10 minutes à 25°C. L'activité de la F1,6-BPase est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en $\mu\text{mol/gFW/min}$

ATP-Phosphofructokinase (ATP-PFK EC 2.7.1.11)

Pour déterminer l'activité de l'ATP-PFK, 2 μL d'extrait (V-1-d) dilués 4 fois sont mélangés à 18 μL de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

- 4 μL de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, MgCl_2 25mM, Triton X100 0.25%)

12.8 μ L H₂O

0.2 μ L F6P 500 mM

0.2 μ L Triose-P isomérase 100 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂

0.2 μ L Aldolase 100 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂

0.2 μ L Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase 200 u.ml⁻¹ in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10 mM MgCl₂

0.2 μ L NADH 25mM

0.2 μ L H₂O (V₀) ou 0.2 μ L ATP 100mM (V_{sat})

L'ensemble est incubé à 25°C pendant 20 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de 20 μ L HCl 0.5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le pH est neutralisé en ajoutant 20 μ L de NaOH 0.5M. Enfin, l'activité est mesurée en ajoutant 50 μ L de mix de détermination préparé comme suit :

Mix de détermination

10 μ L Tricine/KOH 1M pH8

37.3 μ L H₂O

0.2 μ L MgCl₂ 1M

0.5 μ L Glycerol-3-Phosphate dehydrogenase 200 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂

0.5 μ L GPOX 500 u.ml⁻¹ in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂

1 μ L NADH 60mM

L'absorbance est lue à 340 nm pendant 10 minutes à 25°C. L'activité de l'ATP-PFK est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V₀ à la pente obtenue avec le mix V_{sat} (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol/gFW/min

Hexokinase (Fructokinase EC 2.7.1.3 – Glucokinase EC 2.7.1.1)

Pour déterminer l'activité des hexokinase, 2 μ L d'extrait (V-1-d) dilués 4 fois pour la fructokinase et 2 μ L d'extrait non dilué pour la glucokinase sont mélangés à 18 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

4 μ L de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, MgCl₂ 25mM, Triton X100 0.25%)

10.7 μ L H₂O

0.5 μ L NADP⁺

0.4 μ L G6PDH grade II 50 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂

0.2 μ L PGI 100 u.ml⁻¹ dans 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10mM MgCl₂ (**Fructokinase**) ou 0.2 μ L H₂O (**Glucokinase**)

0.2 μ L glucose 200mM (**glucokinase**) ou 0.2 μ L fructose 200mM (**fructokinase**)

2 μ L H₂O (V₀) ou μ L ATP 8mM (V_{sat})

L'ensemble est incubé à 25°C pendant 20 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de 20 μ L de NaOH 0.5M. Après 10 minutes d'incubation à 95°C, le pH est neutralisé en ajoutant 20 μ L de HCl 0.5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9. Enfin, l'activité est mesurée en ajoutant 50 μ L de mix de détermination préparé comme suit :

Mix de détermination

10 μ L Tricine/KOH 1M pH9

18.5 μ L H₂O

10 μ L MTT 10mM

4 μ L EDTA 200mM

2 μ L G6P 250mM

0.5 μ L G6PDH grade I 500 u.ml⁻¹ in 200 mM Tricine/KOH pH 9, 10mM MgCl₂

5 μ L Phenazine ethosulfate (PES) 4mM

L'absorbance est lue à 570 nm pendant 10 minutes à 25°C. L'activité des hexokinases est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V₀ à la pente obtenue avec le mix V_{sat} (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol/gFW/min

Phosphoénolpyruvate Carboxylase (PEPc EC 4.1.1.31)

Pour déterminer l'activité de la PEPc, 2 μ L d'extrait (V-1-d) dilués 4 fois sont mélangés à 18 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

4 μ L de tampon (Tricine/KOH 0.5M pH8, MgCl₂ 100mM, Triton X100 0.25%, NaHCO₃ 50mM)

9.6 μ L H₂O

2 μ L Malate dehydrogenase 100 u.ml⁻¹ in 200 mM Tricine/KOH pH 8, 10 mM MgCl₂ buffer

0.4 μ L NADH 5mM

2 μ L H₂O (V₀) ou μ L phosphoénol pyruvate (PEP) 20mM (V_{sat})

L'ensemble est incubé à 25°C pendant 20 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de 20 μ L HCl 0.5 M / Tricine/KOH 100 mM pH 9. Après 10minutes d'incubation à 95°C, le pH est neutralisé en ajoutant 20 μ L de NaOH. Enfin, l'activité est mesurée en ajoutant 50 μ L de mix de détermination préparé comme suit :

Mix de détermination

10 μ L Tricine/KOH 1M pH9

18 μ L H₂O

10 μ L MTT 10mM

4 μ L EDTA 200mM

2 μ L Ethanol 50%

1 μ L Alcohol dehydrogenase 2000 u.ml⁻¹ in 200 mM Tricine/KOH pH 9, 10mM MgCl₂

5 μ L Phenazine ethosulfate (PES) 4mM

L'absorbance est lue à 570 nm pendant 10 minutes à 25°C. L'activité de la PEPc est ensuite calculée en soustrayant la pente obtenue avec le mix V0 à la pente obtenue avec le mix Vsat (Bénard et Gibon, 2016). L'activité est exprimée en μ mol/gFW/min

Invertase acide (AI EC 3.2.1.26)

Pour déterminer l'activité de l'invertase acide, 5 μ L d'extrait (V-1-d) dilués 2 fois sont mélangés à 45 μ L de mix réactionnel préparé comme suit :

Mix réactionnel

10 μ L de tampon (Acétate/KOH 0.25M pH5, Saccharose 100mM, Triton X100 0.15%, NaHCO₃ 50mM)

35 μ L H₂O

L'ensemble est incubé à 25°C pendant 0 ou 40 minutes puis la réaction est stoppée par ajout de 30 μ L d'imidazole 4M pH7.6. Après 10minutes d'incubation à 98°C, l'activité est mesurée en ajoutant 100 μ L de mix de détermination préparé comme suit :

Mix de détermination

90 μ L de tampon HEPES/KOH 1M pH 7.0, MgCl₂ 30mM

3 μ L ATP 100mM

3 μ L NADP⁺ 20mM

1 μ L G6PDH grade II dans 100 u.ml⁻¹ in HEPES/KOH 0.1M pH7

L'absorbance correspondant au blanc de réaction est mesurée jusqu'à stabilisation et le glucose et le fructose produits par l'activité invertase sont mesurés par ajout simultané de 1 μ L d'hexokinase et 1 μ L de phosphoglucose isomérase. L'activité est calculée en faisant la différence de ΔD_0 entre le temps 40 et le temps 0.

VI- Analyses cytologiques

1- Coloration au bleu de toluidine – Mesure des surfaces cellulaires, nombre d'assise cellulaire et épaisseur du péricarpe

a- Coloration

Les mesures de surface cellulaire ont été réalisées sur des fruits fraîchement récoltés à 30 DPA sur la génération T1. Trois répliquas biologiques par génotype ont été utilisés. Après récolte, les deux pôles du fruit sont coupés de façon à conserver une bande de 1 cm dans la zone centrale du péricarpe. Un tronçon d'environ 2 cm entre deux septums est ensuite coloré au bleu de toluidine 0.05% pendant 30 secondes. La coupe est observée au stereomicroscope (Olympus SZX16, Olympus). Pour chaque fruit, 2 tronçons sur des zones différentes du péricarpe central sont analysés.

b- Analyses d'image

Les analyses d'image sont réalisées grâce au logiciel ImageJ.

Mesure de l'épaisseur du péricarpe

L'épaisseur du péricarpe est mesurée en traçant sur chaque image, 3 transects perpendiculaires à l'épiderme externe grâce à l'outil « Straight ». Les transects sont réalisés au centre d'une zone entre deux faisceaux vasculaires. Les trois mesures sont ensuite moyennées.

Nombre d'assise cellulaire

Pour chaque transect précédemment tracé, le nombre de cellules traversées par ces derniers est compté grâce à l'outil « Cell counter ». Les trois valeurs sont ensuite moyennées.

Surface cellulaire moyenne

Les surfaces cellulaires moyennes sont mesurées dans la zone supérieure du péricarpe « ZS » (zone entre l'épiderme externe et les faisceaux conducteurs) et dans la zone inférieure « ZI » (zone entre les faisceaux conducteurs et l'épiderme interne). Dans chacune des zones, une zone secondaire est dessinée en faisant le contour des cellules grâce à l'outil « Polygon ». Chacune des sous-zones contient entre 200 et 300 cellules en excluant les 4 premières assises sous l'épiderme externe et les 2 premières assises au-dessus de l'épiderme interne. Les aires respectives de la ZS et de la ZI sont mesurées et le nombre de cellules dans chaque zone est compté grâce à l'outil « Cell counter ». La surface moyenne des cellules dans chaque zone est ensuite obtenue en divisant l'aire totale de la zone par le nombre de cellules.

2- Détermination des volumes de compartiments subcellulaires

Les mesures des volumes des compartiments subcellulaires sont réalisées sur des fruits fraîchement récoltés de 8, 16 et 30 DPA sur la génération T2bis. 3 fruits par stade et par génotype sont prélevés sur des plantes différentes.

a- Fixation et coloration

Après récolte, les deux pôles du fruit sont coupés de façon à conserver une bande d'environ 5 mm dans la zone centrale du péricarpe. 3 tronçons de 5mm sont ensuite détaillés entre deux septums et dans trois zones différentes de la bande centrale du péricarpe.

Tampon de fixation (Pour 200mL)

Paraformaldehyde 4%, - 8g

NaCl 0.9% - 1.8g

80 mL d'eau DEPC sont ajoutés et le mélange est mis sous agitation 1 heure à 60°C au bain Marie. La solution est ensuite clarifiée en ajoutant quelques gouttes de NaOH 10N jusqu'à ce que le mélange devienne limpide. Une fois clarifié le tampon est refroidi dans la glace et 100mL d'éthanol absolu et 10mL d'acide acétique glacial sont ajoutés. Finalement, le volume final est ajusté à 200mL avec de l'eau DEPC. Le tampon de fixation est préparé en frais pour chaque fixation.

Les morceaux de fruit sont placés dans des HISTOSETTE® (1 histosette/génotype et par stade) et incubés dans le tampon de fixation. L'ensemble est mis sous vide pendant 30 minutes puis le vide est cassé et les échantillons sont incubés 45 minutes supplémentaires dans le tampon. Le tampon de fixation est ensuite renouvelé et l'ensemble est incubé 24 heures à 4°C. A l'issue de ces 24 heures, le tampon de fixation est éliminé, les échantillons sont rincés dans de l'éthanol 50% DEPC. Finalement, les histosettes sont conservées dans de l'éthanol 70% DEPC à 4°C jusqu'à l'observation.

Déshydratation

La déshydratation s'effectue en bain successif d'éthanol de concentration croissante puis dans de l'histosol de la façon suivante :

ETOH 70% - 1 heure

ETOH 95% - 1 heure

ETOH 95% - 1 heure

ETOH 100% - 1 heure

ETOH 100% - 2 heures

ETOH 100% - 16 heures

ETOH 100% - 30 minutes

Histosol - 2 heures

Histosol - 2 heures

Histosol - 2 heures

Les histosettes sont ensuite stockées dans de la paraffine maintenue à l'état liquide.

Inclusion en paraffine

A l'issue de la fixation, chaque morceau de fruits est inclus individuellement dans de la paraffine en utilisant des moules d'inclusion 15mmx15mm et des cassettes d'inclusion adaptées. Une fois sec, les blocs de paraffine sont démoulés et conservés à 4°C.

Coupe au microtome

Des coupes de 4 microns sont réalisées dans les blocs de paraffine en utilisant un microtome. Les bandes de paraffine sont ensuite mise sur lame et séchées 48 heures à 55°C.

Déparaffinage et coloration

Le déparaffinage des coupes est réalisé en incubant les lames dans des bains successifs d'histosol 100%, d'éthanol de concentration décroissante et enfin d'eau de la façon suivante :

Histosol 100% - 10 minutes

Ethanol 95% - 3 minutes

Histosol 100% - 5 minutes

Ethanol 70% - 3 minutes

Histosol 100% - 5 minutes

Ethanol 50% - 3minutes

Ethanol 100% - 3 minutes

Ethanol 30% - 3 minutes

Ethanol 100% - 3 min

Eau mQ - 1 minute

Ethanol 100% - 3 minutes

Les lames sont ensuite incubées dans de l'acide tanique 1% pendant 30 minutes. Après un rinçage à l'eau distillée, les lames sont colorées 45 secondes dans du bleu de toluidine 0.1%. L'excédent de colorant est éliminé par deux rinçages successifs d'une minute dans de l'eau distillée et les lames sont mises à sécher 24 heures à température ambiante. Pour être observée, une lamelle est ensuite collée et les lames sont conservées en boîte à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à observation.

b- Analyses d'images

Les coupes sont observées au microscope à épi fluorescence Axioimager équipé d'une camera Coolsnap HQ2. Les images ont été acquises avec l'objectif x63, grâce au logiciel d'acquisition Micromanager fonctionnant sous ImageJ. L'ensemble de l'épaisseur du péricarpe est scanné sous forme de mosaïque contenant entre 800 et 1000 acquisitions. La mosaïque est par la suite reconstituée en utilisant le plugin Stitching disponible sous le logiciel FIJI. Les analyses d'images sont réalisées en utilisant le logiciel image J.

Pour chaque image, un rectangle dans l'épaisseur du péricarpe est tracé entre deux faisceaux conducteurs et constitue la zone concernée par les mesures dont la surface est notée **S**. Les cinq premières assises coté péricarpe externe et les deux dernières assises coté péricarpe interne sont exclues de la zone de travail. En fonction de la qualité des images, un filtre Gaussien est appliqué à l'image ou alors la résolution est passée en 8bit.

- Estimation de la proportion de paroi

Dans le rectangle défini précédemment, le contour de chaque cellule représentant la paroi est tracé en utilisant l'outil « trait segmenté » et en fixant une épaisseur de 13µm. Les valeurs des surfaces de paroi sont obtenues grâce à l'outil d'analyse « area » et la somme totale est notée **ST_{paroi}**.

%paroi (%P)
$\%P = \frac{(ST_{paroi} * 100)}{S}$

- Estimation de la surface des cellules, de la proportion de vacuole (%) et de la proportion de cytosol (%)

Estimation de la surface moyenne des cellules

Le contour complet de chaque cellule contenue en totalité ou partiellement dans le rectangle définit précédemment est réalisé en utilisant l'outil « polygon » et les cellules sont comptées avec l'outil « cell counter ». Le nombre de cellules est noté **N_{cellules}**. Chaque contour est enregistré, la moyenne de la surface des cellules est calculée et notée **S_{cellule}**. Pour les cellules dont la forme ne peut pas être clairement définie ou pour les cellules ouvertes, une cellule de surface équivalente en dehors du rectangle est alors contourée pour la remplacer.

Estimation du pourcentage totale de vacuole et de cytosol

Cette étape est réalisée avec l'outil « baguette magique » dont la tolérance est réglée en fonction de l'image. L'outil est utilisé en cliquant dans une zone blanche correspondant à la vacuole et pour toutes les cellules précédemment délimitées. La surface totale est reportée, moyennée et notée $ST_{vacuole}$.

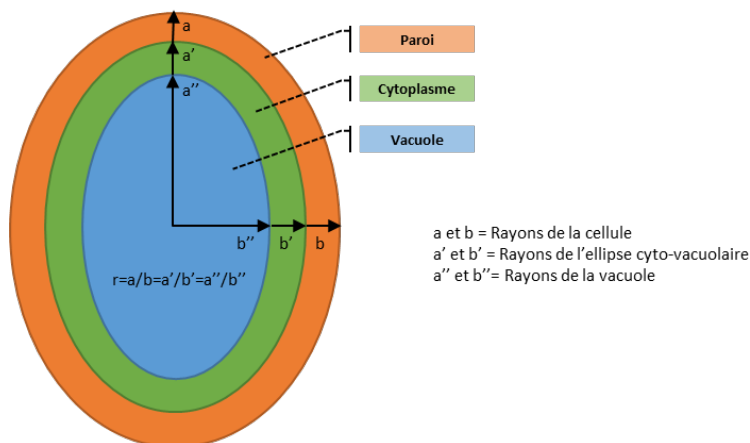
%Vacuole (%Vac)	%cytosol (%Cytosol)
$\%Vac = \frac{(ST_{vacuole} * 100)}{Scellule}$	$\%cytol = 100 - \%paroi - \%Vacuole$

Surface vacuole moyenne ($S_{vacuole}$)	Surface cytoplasme moyenne ($S_{cytoplasme}$)	Surface cytosol moyenne ($S_{cytosol}$)
$S_{vacuole} = \frac{(Scellule * \%Vac)}{100}$	$S_{cytoplasme} = \frac{Scellule - (1 - \%paroi)}{100}$	$S_{cytosol} = S_{cytoplasme} - S_{vacuole}$

- Obtention des rayons a , a' , a'' et b , b' , b''

L'estimation des volumes des compartiments subcellulaires (cytoplasme, vacuole et paroi) est réalisée sur la base de l'hypothèse d'une forme ellipsoïde des cellules du péricarpe.

Pour les cellules précédemment délimitées, l'outil « fit ellipse » permet de simuler une ellipse et d'obtenir les « ferret max » et « ferret min » qui correspondent respectivement à $2*a$ et $2*b$. Ces valeurs sont ensuite utilisées pour calculer le rapport moyen $r=a/b$.



Rapport des rayons (r)	a	b	a'	b'	a''	b''
$r = \frac{a}{b}$	$a = r * b$	$b = \sqrt{\frac{Scellule}{3.14 * r}}$	$a' = r * b'$	$b' = \sqrt{\frac{Scytoplasme}{3.14 * r}}$	$a'' = r * b''$	$b'' = \sqrt{\frac{Svacuole}{3.14 * r}}$

- Calculs des volumes de compartiments subcellulaires

Les volumes sont calculés en utilisant la formule du volume d'une ellipse. Les résultats sont exprimés en μm^3 .

Volume cellule moyen ($V_{cellule}$)	Volume cytoplasme moyen ($V_{cytoplasme}$)	Volume vacuole moyen ($V_{vacuole}$)	Volume cytosol moyen ($V_{cytosol}$)
$V_{cellule} = \frac{4}{3} \pi * a * b * b$	$V_{cytoplasme} = \frac{4}{3} \pi * a' * b' * b'$	$V_{vacuole} = \frac{4}{3} \pi * a'' * b'' * b''$	$V_{cytosol} = V_{cytoplasme} - V_{vacuole}$

BIBLIOGRAPHIE

- Affourtit, C. et al. (2002)** 'Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis', *FEBS Letters*, 510(3), pp. 121–126.
- Allen, D. K., Ohlrogge, J. B. and Shachar-Hill, Y. (2009)** 'The role of light in soybean seed filling metabolism', *Plant Journal*, 58(2), pp. 220–234
- Almeida, A. M. et al. (1999)** 'Protein-Sustained Respiration during Postharvest Ripening of Tomato Fruit', *Plant Physiology*, 119(April 1999), pp. 1323–1329.
- Alonso, A. P. et al. (2005)** 'A New Substrate Cycle in Plants. Evidence for a High Glucose-Phosphate-to-Glucose Turnover from in Vivo Steady-State and Pulse-Labeling Experiments with [13C]Glucose and [14C]Glucose', *Plant physiology*, 138(August), pp. 2220–2232.
- Alonso, Ana Paula et al. (2007)** 'A metabolic flux analysis to study the role of sucrose synthase in the regulation of the carbon partitioning in central metabolism in maize root tips', *Metabolic Engineering*, 9(5–6), pp. 419–432.
- Alonso, Ana P. et al. (2007)** 'Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos', *Plant Journal*, 52(2), pp. 296–308.
- Aluri, S. and Bu, M. (2007)** 'Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1', *Pnas*, 104(7), pp. 2537–2542.
- Amemiya, T. et al. (2006)** 'Fruit-specific V-ATPase suppression in antisense-transgenic tomato reduces fruit growth and seed formation', *Planta*, 223(6), pp. 1272–1280.
- Amir, J. and Cherry, J. H. (1972)** 'Purification and Properties of Adenosine Diphosphoglucose Pyrophosphorylase from Sweet Corn', *Plant Physiology*, 49(6), pp. 893–897
- Amthor, J. S. (2000)** 'The McCree-de Wit-Penning de Vries-Thornley respiration paradigms: 30 Years later', *Annals of Botany*, 86(1), pp. 1–20.
- Andreo, C. S., Gonzalez, D. H. and Iglesias, A. A. (1987)** 'Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation', *FEBS Letters*, 213(1), pp. 1–8.
- ap Rees, T. (1985)** 'The Organization of Glycolysis and the Oxidative Pentose Phosphate Pathway in Plants', *Higher Plant Cell Respiration*, 2, pp. 391–417.

- Apse, M. P. et al. (1999)** ‘Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in Arabidopsis’, *Science*, 285(5431), pp. 1256–1258.
- Azzi, L. et al. (2015)** ‘Fruit growth-related genes in tomato’, *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, pp. 1075–7086.
- Bageshwar, U. K. et al. (2005)** ‘Two isoforms of the A subunit of the vacuolar H⁺-ATPase in *Lycopersicon esculentum*: Highly similar proteins but divergent patterns of tissue localization’, *Planta*, 220(4), pp. 632–643.
- Baldet, P. et al. (2002)** ‘Contrasted responses to carbohydrate limitation in tomato fruit at two stages of development’, *Plant, Cell and Environment*, 25(12), pp. 1639–1649.
- Barker, L. et al. (2000)** ‘SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements’, *Plant Cell*, 12(7), pp. 1153–1164.
- Barrieu, F. et al. (1999)** ‘Desiccation and osmotic stress increase the abundance of mRNA of the tonoplast aquaporin BobTIP26-1 in cauliflower cells’, *Planta*, 209(1), pp. 77–86. doi: 10.1007/s004250050608.
- Beauvoit, B. et al. (2014)** ‘Model-Assisted Analysis of Sugar Metabolism throughout Tomato Fruit Development Reveals Enzyme and Carrier Properties in Relation to Vacuole Expansion’, *The Plant Cell*, 26(8), pp. 1–20.
- Beebe, D. U. and Russin, W. A. (1999)** ‘Plasmodesmata in the Phloem-Loading Pathway’, *Plasmodesmata*.
- Bénard, C. et al. (2015)** ‘Metabolomic profiling in tomato reveals diel compositional changes in fruit affected by source-sink relationships’, *Journal of Experimental Botany*, 66(11), pp. 3391–3404.
- Beurton-Aimar, M. et al. (2011)** ‘Comparison between elementary flux modes analysis and 13C-metabolic fluxes measured in bacterial and plant cells’, *BMC Systems Biology*. BioMed Central Ltd, 5(1), p. 95.
- Biais, 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(3), pp. 1204–1221.
- Bourdon, M. et al. (2010)** *Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits*.

- Bourdon, M. et al. (2012)** ‘Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth’, *Development (Cambridge)*, 139(20), pp. 3817–3826.
- Brukhin, V. et al. (2003)** ‘Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. sweet cherry’, *Sexual Plant Reproduction*, 15(6), pp. 311–320.
- Canel, C., Bailey-Serres, J. N. and Roose, M. L. (1995)** ‘In vitro [¹⁴C] citrate uptake by tonoplast vesicles of acidless Citrus juice cells’, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(3), pp. 510–514.
- Carnal, N. W. and Black, C. C. (1979)** ‘Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 86(1), pp. 20–26.
- Carter, C. et al. (2004)** ‘The Vegetative Vacuole Proteome of *Arabidopsis thaliana* Reveals Predicted and Unexpected Proteins’, 16(December), pp. 3285–3303.
- Cecchini, G. (2003)** ‘Function and structure of complex II of the respiratory chain’, *Annual Review of Biochemistry*, 72, pp. 77–109.
- Cerana, R., Giromini, L. and Colombo, R. (1995)** ‘Malate-Regulated Channels Permeable to Anions in Vacuoles of *Arabidopsis thaliana*’, *Australian Journal of Plant Physiology*, 22(2), pp. 115–121.
- Chardon, F. et al. (2013)** ‘Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*’, *Current Biology*, 23(8), pp. 697–702.
- Chen, L. Q. et al. (2010)** ‘Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens’, *Nature*. Nature Publishing Group, 468(7323), pp. 527–532.
- Chen, L. Q. et al. (2012)** ‘Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport’, *Science*, 335(6065), pp. 207–211.
- Chen, X., Alonso, A. P. and Shachar-Hill, Y. (2013)** ‘Dynamic metabolic flux analysis of plant cell wall synthesis’, *Metabolic Engineering*. Elsevier, 18, pp. 78–85.
- Cheng, J. et al. (2017)** ‘Overexpression of the tonoplast sugar transporter CmTST2 in melon fruit increases sugar accumulation’, *Journal of Experimental Botany*, 2(January).
- Cheng, N. H. et al. (2003)** ‘The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis,

development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters', *Plant Cell*, 15(2), pp. 347–364.

Cheniclet, C. et al. (2005) 'Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth', *Plant Physiology*, 139(4), pp. 1984–1994.

Chevalier, C. et al. (2014) 'Endoreduplication and fruit growth in tomato: Evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory', *Journal of Experimental Botany*, 65(10), pp. 2731–2746.

Chincinska, I. A. et al. (2008) 'Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response', *Plant Physiology*, 146(2), pp. 515–528.

Coleman, J., Blake-Kalff, M. and Emyr, D. (no date) 'Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation', *Cell*, 2(4), pp. 144-151,.

Colombié, S., Nazaret, C., Bénard, C., Biais, Benoit, et al. (2015) 'Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicum* (tomato) fruit', *Plant Journal*, 81(1), pp. 24–39.

Colombié, S., Nazaret, C., Bénard, C., Biais, Benoît, et al. (2015) 'Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicum* (tomato) fruit', *Plant Journal*, 81(1), pp. 24–39.

Colombié, S. et al. (2017) 'Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling', *New Phytologist*, 213(4), pp. 1726–1739.

Cui, Y. et al. (2019) 'A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in *Arabidopsis* root cells', *Nature Plants*. Springer US, 5(1), pp. 95–105.

D'Aoust, M. A., Yelle, S. and Nguyen-Quoc, B. (1999) 'Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit', *Plant Cell*, 11(12), pp. 2407–2418.

Dal'Molin, C. G. de O. et al. (2010) 'AraGEM, a genome-scale reconstruction of the primary metabolic network in *Arabidopsis*', *Plant Physiology*, 152(2), pp. 579–589.

Damon, S. et al. (1988) 'Sink Metabolism in Tomato Fruit: II. Phloem Unloading and Sugar Uptake', *Plant Physiology*, 87(3), pp. 731–736.

Dettmer, J. et al. (2006) 'Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and

Secretory Trafficking in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 18(March), pp. 715–730.

Dieuaide-Noubhani, M. et al. (1995) 'Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from ^{13}C - or ^{14}C -labeled glucose', *Journal of Biological Chemistry*, pp. 13147–13159.

Drozdowicz, Y. M., Kissinger, J. C. and Rea, P. a (2000) 'H $^{+}$ -Translocating Inorganic Pyrophosphatase from Arabidopsis 1', 123(May), pp. 353–362.

Dry, I. B. et al. (1989) 'Regulation of alternative pathway activity in plant mitochondria: Nonlinear relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 273(1), pp. 148–157.

Eicks, M. et al. (2002) 'The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants', *Plant Physiology*, 128(2), pp. 512–522.

Emmerlich, V. et al. (2003) 'The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), pp. 11122–11126.

Endler, A. et al. (2006) 'Identification of a Vacuolar Sucrose Transporter in Barley and Arabidopsis Mesophyll Cells by a Tonoplast Proteomic Approach 1', 141(May), pp. 196–207.

Erb, M. and Kliebenstein, D. J. (2020) 'Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]', *Plant Physiology*, 184(1), pp. 39–52.

Fatland, B. L., Nikolau, B. J. and Wurtele, E. S. (2005) 'Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in Arabidopsis', *Plant Cell*, 17(1), pp. 182–203.

Feng, C. Y. et al. (2015) 'Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato', *Gene*. Elsevier B.V., 573(2), pp. 261–272.

Fernandez, A. I. et al. (2009) 'Flexible Tools for Gene Expression and Silencing in Tomato', *PLANT PHYSIOLOGY*. American Society of Plant Biologists (ASPB), 151(4), pp. 1729–1740.

Fettke, J. et al. (2004) 'The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: Identification, linkage analysis and subcellular localization', *Plant*

Journal, 39(6), pp. 933–946.

Frei, B. et al. (2018) ‘Purification and functional characterization of the vacuolar malate transporter tDT from Arabidopsis’, *Journal of Biological Chemistry*, 293(11), pp. 4180–4190.

Friedman, M. (2002) ‘Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), pp. 5751–5780.

Fulton, D. C. et al. (2008) ‘ β -Amylase4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in Arabidopsis chloroplasts’, *Plant Cell*, 20(4), pp. 1040–1058.

Gao, Z. and Loescher, W. H. (2000) ‘NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves’, *Plant Physiology*, 124(1), pp. 321–330.

Gaxiola, R. A. et al. (2001) ‘Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp. 11444–11449.

Gerhardt, R. and Heldt, H. W. (1984) ‘Measurement of Subcellular Metabolite Levels in Leaves by Fractionation of Freeze-Stopped Material in Nonaqueous Media’, *Plant Physiology*, 75(3), pp. 542–547.

Gillaspy, G., Ben-David, H. and Gruissem, W. (1985) ‘A developmental perspective’, *Issues in Comprehensive Pediatric Nursing*, 8(1–6), pp. 3–24.

Gonzalez, N. et al. (2007) ‘The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit’, *Plant Journal*, 51(4), pp. 642–655. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03167.x.

Gout, E. et al. (1993) ‘¹³C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), pp. 3986–3992.

Graeve, K., von Schaewen, A. and Scheibe, R. (1994) ‘Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.)’, *The Plant Journal*, 5(3), pp. 353–361..

Grafahrend-Belau, E. et al. (2009) ‘Flux Balance Analysis of Barley Seeds: A Computational

Approach to Study Systemic Properties of Central Metabolism', *Plant Physiology*, 149(1), pp. 585–598.

Grafahrend-Belau, E. et al. (2013) 'Multiscale Metabolic Modeling: Dynamic Flux Balance Analysis on a Whole-Plant Scale', *Plant Physiology*, 163(2), pp. 637–647..

Graus, D. et al. (2018) 'High V-PPase activity is beneficial under high salt loads, but detrimental without salinity', *New Phytologist*, 219(4), pp. 1421–1432.

Guillet, C. et al. (2012) 'Regulation of the fruit-specific pep carboxylase SLPPC2 promoter at early stages of tomato fruit development', *PLoS ONE*, 7(5).

Guo, W.-J. et al. (2014) 'SWEET17, a Facilitative Transporter, Mediates Fructose Transport across the Tonoplast of Arabidopsis Roots and Leaves', *Plant Physiology*, 164(2), pp. 777–789.

Hackel, A. et al. (2006) 'Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways', *Plant Journal*, 45(2), pp. 180–192.

Hafke, J. B. et al. (2003) 'Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier', *Plant Journal*, 35(1), pp. 116–128.

Hammes, U. Z. et al. (2005) 'Nematode-induced changes of transporter gene expression in Arabidopsis roots', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(12), pp. 1247–1257.

Hanson, J. and Smeekens, S. (2009) 'Sugar perception and signaling - an update', *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), pp. 562–567.

Hara-Nishimura, I. and Hatsugai, N. (2011) 'The role of vacuole in plant cell death', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 18(8), pp. 1298–1304.

Hartig, K. and Beck, E. (2006) 'Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle', *Plant Biology*, 8(3), pp. 389–396.

Hay, J. and Schwender, J. (2011) 'Computational analysis of storage synthesis in developing *Brassica napus* L. (oilseed rape) embryos: Flux variability analysis in relation to ¹³C metabolic flux analysis', *Plant Journal*, 67(3), pp. 513–525.

Hedrich, R., Sauer, N. and Neuhaus, H. E. (2015) 'Sugar transport across the plant vacuolar membrane: Nature and regulation of carrier proteins', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 25, pp. 63–70.

Hirst, J. (2010) 'Towards the molecular mechanism of respiratory complex I', *Biochemical*

Journal, 425(2), pp. 327–339.

Ho, L. C. (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(1), pp. 355–378.

Ho, L. C. (1996) ‘The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato’, *Journal of Experimental Botany*, 47(Special Issue), pp. 1339–1243.

Hofmann, J. et al. (2009) ‘The arabidopsis *Thaliana* sucrose transporter gene *atSUC4* is expressed in *meloidogyne incognita*-induced root galls’, *Journal of Phytopathology*, 157(4), pp. 256–261.

Holzhütter, H. G. (2004) ‘The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks’, *European Journal of Biochemistry*, 271(14), pp. 2905–2922.

Hu, L. et al. (2011) ‘Phloem unloading follows an extensive apoplastic pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit from anthesis to marketable maturing stage’, *Plant, Cell and Environment*, 34(11), pp. 1835–1848.

Hurth, M. A. et al. (2005) ‘Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast’, *Plant Physiol.*, 137(3), pp. 901–910..

Imamura, H. et al. (2003) ‘Evidence for rotation of V1-ATPase’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), pp. 2312–2315.

Jacob, J. and Auzac, J. D. (1972) ‘du latex d’ *Heuea brasiliensis*’, 265, pp. 255–265.

Johansson, I. et al. (1998) ‘Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation’, *Plant Cell*, 10(3), pp. 451–459.

Joubes, J. and Chevalier, C. (2000) ‘Endoreduplication in higher plants’, *Plant Molecular Biology*, 43(5–6), pp. 735–745.

Juhnke, H. et al. (1996) ‘Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress’, *Molecular and General Genetics*, 252(4), pp. 456–464.

- Kammerer, B. et al. (1998)** ‘Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: The glucose 6-phosphate/phosphate antiporter’, *Plant Cell*, 10(1), pp. 105–117.
- Kanes, P. M. et al. (1992)** ‘Assembly and Targeting of Peripheral and Integral Membrane Subunits of the Yeast Vacuolar H⁺ -ATPase *’
- Klemens, P. a. W. et al. (2013)** ‘Overexpression of the Vacuolar Sugar Carrier AtSWEET16 Modifies Germination, Growth, and Stress Tolerance in Arabidopsis’, *Plant Physiology*, 163(3), pp. 1338–1352.
- Klemens, P. a W. et al. (2014)** ‘Overexpression of a proton-coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination’, *New Phytologist*, 202(1), pp. 188–197.
- Knight, J. S., Emes, M. J. and Debnam, P. M. (2001)** ‘Isolation and characterisation of a full-length genomic clone encoding a plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Nicotiana tabacum*’, *Planta*, 212(4), pp. 499–507.
- Kopriva, S., Koprivova, A. and Süß, K. H. (2000)** ‘Identification, cloning, and properties of cytosolic D-ribulose-5- phosphate 3-epimerase from higher plants’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), pp. 1294–1299.
- Kovermann, P. et al. (2007)** ‘The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family’, *Plant Journal*, 52(6), pp. 1169–1180.
- Kruger, N. J. and Von Schaewen, A. (2003)** ‘The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation’, *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), pp. 236–246.
- Kühn, C. et al. (1997)** ‘Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements’, *Science*, 275(5304), pp. 1298–1300.
- Kühn, C. and Grof, C. P. L. (2010)** ‘Sucrose transporters of higher plants’, *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), pp. 287–297.
- Lancien, M. et al. (2002)** ‘Arabidopsis glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway’, *Plant Journal*, 29(3), pp. 347–358.
- Latzko, E. . and Kelly, G. J. (1983)** ‘Many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants’, *Physiologie Vegetale*, 21, pp. 805–15.
- Lee, J. M., Gianchandani, E. P. and Papin, J. A. (2006)** ‘Flux balance analysis in the era of

metabolomics', *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), pp. 140–150.

Li-ping, H. et al. (2017) 'Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the SWEET gene family in cucumber', *Journal of Integrative Agriculture*, 16(0).

Li, J. et al. (2005) 'Plant Science: Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development', *Science*, 310(5745), pp. 121–125.

Li, X. et al. (2003) 'Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells', *Plant Physiology*, 133(2), pp. 549–559..

Li, Y. et al. (2017) 'Spatiotemporal Expression and Substrate Specificity Analysis of the Cucumber SWEET Gene Family', *Frontiers in Plant Science*, 8(October), pp. 1–10.

Liu, R. et al. (2017) 'Identification and Functional Characterization of a Tonoplast Dicarboxylate Transporter in Tomato (*Solanum lycopersicum*)', *Frontiers in Plant Science*, 8(February), pp. 1–9.

Lohaus, G. and Schwerdtfeger, M. (2014) 'Comparison of sugars, iridoid glycosides and amino acids in nectar and phloem sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica napus*', *PLoS ONE*, 9(1), pp. 1–8.

Maeshima, M. (2000) 'Vacuolar H⁺ -pyrophosphatase', *Main*, 1465, pp. 37–51.

Manolson, M. F. et al. (1994) 'STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H⁺-ATPase subunit Vph1p', *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), pp. 14064–14074.

Marcelis, L. F. M. (1996) 'Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant', *Journal of Experimental Botany*, 47(SPEC. ISS.), pp. 1281–1291..

De Marco, F. et al. (2021) 'Involvement of SUT1 and SUT2 sugar transporters in the impairment of sugar transport and changes in phloem exudate contents in phytoplasma-infected plants', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), pp. 1–23..

Marin, B., Smith, J. A. C. and Lüttge, U. (1981) 'The electrochemical proton gradient and its influence on citrate uptake in tonoplast vesicles of *Hevea brasiliensis* Bernard', *Planta*, 153, pp. 486–493.

Martin, L. B. B. and Rose, J. K. C. (2014) 'There's more than one way to skin a fruit: Formation and functions of fruit cuticles', *Journal of Experimental Botany*, 65(16), pp. 4639–

4651. doi: 10.1093/jxb/eru301.

Martinoia, E. et al. (1985) 'Energy-dependent uptake of malate into vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts', *BBA - Bioenergetics*, 806(2), pp. 311–319.

Martinoia, E. et al. (2012) 'Vacuolar transporters in their physiological context', *Annual Review of Plant Biology*, 63, pp. 183–213.

Martinoia, E., Maeshima, M. and Neuhaus, H. E. (2007) 'Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism', *Journal of Experimental Botany*, 58(1), pp. 83–102.

Martinoia, E., Massonneau, A. and Frangne, N. (2000) 'Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants', *Plant and Cell Physiology*, 41(11), pp. 1175–1186..

Martinoia, E. and Rentsch, D. (1992) 'Uptake of Malate and Citrate into Plant Vacuoles', *Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes*, (1987), pp. 101–109.

Marty, F. (1978) 'Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of Euphorbia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(2), pp. 852–856.

Masakapalli, S. K. et al. (2010) 'Subcellular Flux Analysis of Central Metabolism in a Heterotrophic Arabidopsis Cell Suspension Using Steady-State Stable Isotope Labeling', *Plant Physiology*, 152(2), pp. 602–619.

Mathieu-Rivet, E. et al. (2010) 'Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato', *Plant Journal*, 62(5), pp. 727–741.

Matile, P. and Moor, H. (1968) 'Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells', *Planta*, 80(2), pp. 159–175.

Maurel, C. et al. (1997) 'Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), pp. 7103–7108.

Mazzeo, M. F. et al. (2018) 'Response mechanisms induced by exposure to high temperature in anthers from thermo-tolerant and thermo-sensitive tomato plants: A proteomic perspective', *PLoS ONE*, 13(7), pp. 1–21.

- Micallef, B. J. et al. (1995)** 'Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis', *Planta*, 196, pp. 327–334.
- Millar, A. H. et al. (2011)** 'Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants', *Annual Review of Plant Biology*, 62, pp. 79–104.
- Milner, I. D., Ho, L. C. and Hall, J. L. (1995)** 'Properties of proton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit', *Physiologia Plantarum*, 94(3), pp. 399–410.
- Mintz-Oron, S. et al. (2012)** 'Reconstruction of Arabidopsis metabolic network models accounting for subcellular compartmentalization and tissue-specificity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), pp. 339–344.
- Mohammed, S. A. et al. (2012)** 'Role of vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase in tomato fruit development', *Journal of Experimental Botany*, 63(2), pp. 695–709..
- Mohr, W. . and Stein, M. (1969)** 'Fine structure of fruit development in Tomato', *Canadian Journal of Plant Science*, 49, pp. 549–553.
- Moore, A. L., Dry, I. B. and Wiskich, J. T. (1988)** 'Measurement of the redox state of the ubiquinone pool in plant mitochondria', *FEBS Letters*, 235(1–2), pp. 76–80.
- Morgan, J. et al. (2010)** 'A kinetic model describes metabolic response to perturbations and distribution of flux control in the benzenoid network of *Petunia hybrida*', *Plant Journal*, 62(1), pp. 64–76..
- Münch (1930)** 'Die Stoffbewegungen in Der Pflanze'.
- Müntz, K. (2007)** 'Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles', *Journal of Experimental Botany*, 58(10), pp. 2391–2407.
- Murasnige, T. (1962)** 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures', 15.
- Mustroph, A. et al. (2013)** 'Characterization of the phosphofructokinase gene family in rice and its expression under oxygen deficiency stress', *Frontiers in Plant Science*, 4(MAY), pp. 1–16.
- Nguyen-Quoc, B. et al. (1999)** 'Overexpression of sucrose phosphate synthase increases sucrose unloading in transformed tomato fruit', *Journal of Experimental Botany*, 50(335), pp.

785–791.

Nitsch, J. P. (1970) ‘Hormonal factors in growth and development’, *Food Science and Technology* (ed. A.C. Hulme), 1, pp. 427–472.

Oleski, N., Mahdavi, P. and Bennett, A. B. (1987) ‘Transport Properties of the Tomato Fruit Tonoplast’, *Plant Physiology*, 84(4), pp. 997–1000.

Palmgren, M. G. and Nissen, P. (2011) ‘P-Type ATPases’, *Annual Review of Biophysics*, 40(1), pp. 243–266.

Pizzio, G. a., Hirschi, K. D. and Gaxiola, R. a. (2017) ‘Conjecture Regarding Posttranslational Modifications to the Arabidopsis Type I Proton-Pumping Pyrophosphatase (AVP1)’, *Frontiers in Plant Science*, 8(September), p. 1572.

Plaxton, W. C. (1996) ‘The organization and regulation of plant glycolysis’, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), pp. 185–214.

Pnueli, L. et al. (1998) ‘The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1’, 1989, pp. 1979–1989.

Poczai, P. et al. (2014) ‘Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana.’, *Genetic resources and crop evolution*, 61(1), pp. 796–815.

Poolman, M. G. et al. (2009) ‘A genome-scale metabolic model of Arabidopsis and some of its properties.’, *Plant physiology*, 151(3), pp. 1570–81.

Poolman, M. G. et al. (2013) ‘Responses to light intensity in a genome-scale model of rice metabolism’, *Plant Physiology*, 162(2), pp. 1060–1072.

Poschet, G. et al. (2011) ‘A Novel Arabidopsis Vacuolar Glucose Exporter Is Involved in Cellular Sugar Homeostasis and Affects the Composition of Seed Storage Compounds’, *Plant Physiology*, 157(4), pp. 1664–1676.

Pressman, E., Peet, M. M. and Pharr, D. M. (2002) ‘The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers’, *Annals of Botany*, 90(5), pp. 631–636.

Rasmusson, A. G., Geisler, D. A. and Møller, I. M. (2008) ‘The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria’, *Mitochondrion*, 8(1), pp.

47–60.

Ratajczak, R. (2000) ‘Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase’, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1465(1–2), pp. 17–36.

Rea, P. A. (2007) ‘Plant ATP-binding cassette transporters’, *Annual Review of Plant Biology*, 58, pp. 347–375.

Redinbaugh, M. G. and Campbell, W. H. (1998) ‘Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays* L.) root plastids: Induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels’, *Plant Science*, 134(2), pp. 129–140..

Reed, J. L. and Palsson, B. (2003) ‘Thirteen years of building constraint-based in silico models of *Escherichia coli*’, *Journal of Bacteriology*, 185(9), pp. 2692–2699.

Reinders, A. et al. (2008) ‘Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*’, *Plant Molecular Biology*, 68(3), pp. 289–299.

Renaudin, J. P. et al. (2017) ‘Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp’, *Journal of Experimental Botany*, 68(7), pp. 1613–1623.

Rennie, E. A. and Turgeon, R. (2009) ‘A comprehensive picture of phloem loading strategies’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), pp. 14162–14167.

Reuscher, S. et al. (2017) ‘The Sugar Transporter Inventory of Tomato : Genome-Wide Identification and Expression Analysis’, 55(September), pp. 1123–1141..

Riou-Khamlichi, C. et al. (2000) ‘Sugar Control of the Plant Cell Cycle: Differential Regulation of Arabidopsis D-Type Cyclin Gene Expression’, *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), pp. 4513–4521.

Ritte, G. et al. (2006) ‘Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases’, *FEBS Letters*, 580(20), pp. 4872–4876.

Roberts, J. K. M. et al. (1982) ‘Regulation of Cytoplasmic and Vacuolar pH in Maize Root Tips under Different Experimental Conditions’, *Plant Physiology*, 69(6), pp. 1344–1347.

Roch, L. et al. (2020) ‘Biomass composition explains fruit relative growth rate and discriminates climacteric from non-climacteric species’, *Journal of Experimental Botany*,

71(19), pp. 5823–5836.

Rontein, D. et al. (2002) ‘The metabolic architecture of plant cells: Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), pp. 43948–43960.

Ruan, Y. L. and Patrick, J. W. (1995) ‘The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit’, *Planta: An International Journal of Plant Biology*, 196(3), pp. 434–444.

Rumpho, M. E., Edwards, G. E. and Loescher, W. H. (1983) ‘A Pathway for Photosynthetic Carbon Flow to Mannitol in Celery Leaves’, *Plant Physiology*, 73(4), pp. 869–873.

Saha, R., Suthers, P. F. and Maranas, C. D. (2011) ‘Zea mays irs1563: A comprehensive genome-scale metabolic reconstruction of maize metabolism’, *PLoS ONE*, 6(7)..

Sato, S. et al. (2012) ‘The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution’, *Nature*, 485(7400), pp. 635–641.

Scagliarini, S. et al. (1990) ‘Glyceraldehyde 3-phosphate: NADP⁺ reductase of spinach leaves: Steady state kinetics and effect of inhibitors’, *Plant Physiology*, 94(3), pp. 1337–1344.

Schaffer, A. A. and Petreikov, M. (1997) ‘Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation’, *Plant Physiology*, 113(3), pp. 739–746..

Schneider, S. et al. (2012) ‘Vacuoles release sucrose via tonoplast-localised SUC4-type transporters’, *Plant Biology*, 14(2), pp. 325–336.

Schopfer, P. (2006) ‘Biomechanics of plant growth’, *American Journal of Botany*, 93(10), pp. 1415–1425.

Schultz, B. E. and Chan, S. I. (2001) ‘Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes’, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 30(February 2001), pp. 23–65.

Schulz, A. et al. (2011) ‘Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2’, *Plant Journal*, 68(1), pp. 129–136.

Schwender, J. et al. (2015) ‘Quantitative multilevel analysis of central metabolism in developing oilseeds of oilseed rape during in vitro culture’, *Plant Physiology*, 168(3), pp. 828–848.

- Schwender, J., Ohlrogge, J. B. and Shachar-Hill, Y. (2003)** 'A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos', *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), pp. 29442–29453.
- Sharma, S. S., Dietz, K. J. and Mimura, T. (2016)** 'Vacuolar compartmentalization as indispensable component of heavy metal detoxification in plants', *Plant Cell and Environment*, 39(5), pp. 1112–1126.
- Shimada, T. et al. (2006)** 'Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells', *Planta*, 224(2), pp. 472–480.
- Shimada, T. et al. (2018)** 'Plant Vacuoles', *Annual Review of Plant Biology*, 69, pp. 123–145.
- Shimaoka, T. et al. (2004)** 'Isolation of intact vacuoles and proteomic analysis of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 45(6), pp. 672–683.
- Shitan, N. and Yazaki, K. (2013)** 'New Insights into the Transport Mechanisms in Plant Vacuoles', *International Review of Cell and Molecular Biology*, 305, pp. 383–433.
- Slama, I. et al. (2015)** 'Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress', *Annals of Botany*, 115(3), pp. 433–447.
- Steingröver, E., Ratering, P. and Siesling, J. (1986)** 'Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity', *Physiologia Plantarum*, 66(3), pp. 550–556..
- Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K. (2003)** "'Big it up": Endoreduplication and cell-size control in plants', *Current Opinion in Plant Biology*, 6(6), pp. 544–553.
- Suzuki, Y., Maeshima, M. and Yamaki, S. (1999) 'Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its expression during the development of pear fruit', *Plant and Cell Physiology*, 40(8), pp. 900–904.
- Sweetlove, L. J. et al. (2010)** 'Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 15(8), pp. 462–470.
- Sze, H. et al. (2002)** 'A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase', *Trends in Plant Science*, 7(4), pp. 157–161.
- Szecowka, M. et al. (2013)** 'Metabolic Fluxes in an Illuminated *Arabidopsis* Rosette', *The*

Plant Cell, 25(2), pp. 694–714.

Szymkowiak, E. J. and Irish, E. E. (2006) ‘JOINTLESS suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato’, *Planta*, 223(4), pp. 646–658.

Taiz, L. (1986) ‘Are biosynthetic reactions in plant cells thermodynamically coupled to glycolysis and the tonoplast proton motive force?’, *Journal of Theoretical Biology*, 123(2), pp. 231–238.

Tanaka, A., Fujita, K. and Kikuchi, K. (1974) ‘Nutrio-physiological studies on the tomato plant III. Photosynthetic rate of individual leaves in relation to the dry matter production of plants’, *Soil Science and Plant Nutrition*, 20(2), pp. 173–183.

Thakur, A. et al. (2019) ‘Hypersensitive Responses in Plants’, *Agricultural Reviews*, 40(of), pp. 113–120.

Theodorou, M. E. and Plaxton, W. C. (1993) ‘Metabolic Adaptations of Plant Respiration to Nutritional Phosphate Deprivation’, *Plant physiology*, 101(1993), pp. 339–344.

Tjaden, J. et al. (1998) ‘Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch’, *Plant Journal*, 16(5), pp. 531–540.

Torimitsu, K. et al. (1984) ‘Effect of external pH on the cytoplasmic and vacuolar phs in mung bean root-tip cells: A ³¹P nuclear magnetic resonance study’, *Plant and Cell Physiology*, 25(8), pp. 1403–1409.

Valle, E. M., Boggio, S. B. and Heldt, H. W. (1998) ‘Free amino acid composition of phloem sap and growing fruit of *Lycopersicon esculentum*’, *Plant and Cell Physiology*, 39(4), pp. 458–461.

Viotti, C. et al. (2013) ‘The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*’, *Plant Cell*, 25(9), pp. 3434–3449.

Volk, G. M. et al. (2002) ‘The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves’, *Plant Biology*, 4(1), pp. 34–45.

Walker, A. J. and Thornley, J. H. M. (1977) ‘The tomato fruit: Import, growth, respiration and carbon metabolism at different fruit sizes and temperatures’, *Annals of Botany*, 41(5), pp. 977–985.

- Wareing, P. and Patrick, J. (1975)** ‘Source-sink relations and the partitioning of assimilates in the plant’, *Cooper JP, ed. Photosynthesis and productivity in different environments. Cambridge University Press.*
- Warren Wilson, J. (1972)** ‘Control of crop processes’, *Crop processes in controlled Environments*, pp. 7–30.
- Weise, A. et al. (2000)** ‘A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleate sieve elements of plants’, *Plant Cell*, 12(8), pp. 1345–1355..
- Wiechert, W. et al. (2001)** ‘A Universal Framework for ... Metabolic Flux Analysis’, *Metabolic engineering*, 3(3), pp. 265–283.
- Williams, J. F., Arora, K. K. and Longenecker, J. P. (1987)** ‘The pentose pathway: A random harvest. Impediments which oppose acceptance of the classical (F-type) pentose cycle for liver, some neoplasms and photosynthetic tissue. The case for the L-type pentose pathway’, *International Journal of Biochemistry*, 19(9), pp. 749–817.
- Williams, T. C. R. et al. (2008)** ‘Metabolic network fluxes in heterotrophic Arabidopsis cells: stability of the flux distribution under different oxygenation conditions’, *Plant physiology*, 148(2), pp. 704–718.
- Wingenter, K. et al. (2010)** ‘Increased Activity of the Vacuolar Monosaccharide Transporter TMT1 Alters Cellular Sugar Partitioning, Sugar Signaling, and Seed Yield in Arabidopsis’, *Plant Physiology*, 154(2), pp. 665–677.
- Wormit, A. et al. (2006)** ‘Molecular Identification and Physiological Characterization of a Novel Monosaccharide Transporter from Arabidopsis Involved in Vacuolar Sugar Transport’, *the Plant Cell Online*, 18(12), pp. 3476–3490.
- Xu, F. et al. (2012)** ‘The role of alternative oxidase i tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene’, *Journal of Experimental Botany*, 63(2), pp. 5705–5716.
- Yamada, K. et al. (2010)** ‘Functional analysis of an Arabidopsis thaliana abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(2), pp. 1138–1146.
- Ye, J. et al. (2017)** ‘An InDel in the Promoter of Al-activated malate transporter 9 Selected During Tomato Domestication Determines Fruit Malate Contents and Aluminum Tolerance’, *The Plant Cell*, p. tpc.00211.2017.

Zeeman, S. C., Kossmann, J. and Smith, A. M. (2010) ‘Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants’, *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp. 209–234.

Zhang, L. Y. et al. (2004) ‘Evidence for apoplastic phloem unloading in developing apple fruit’, *Plant Physiology*, 135(1), pp. 574–586.

Zheng, H. and Andrew Staehelin, L. (2011) ‘Protein storage vacuoles are transformed into lytic vacuoles in root meristematic cells of germinating seedlings by multiple, cell type-specific mechanisms’, *Plant Physiology*, 155(4), pp. 2023–2035.