



**HAL**  
open science

# Effets de l'élicitation par les UV-C et le peroxyde d'hydrogène sur le métabolisme de deux génotypes de piment

Coline Pons

► **To cite this version:**

Coline Pons. Effets de l'élicitation par les UV-C et le peroxyde d'hydrogène sur le métabolisme de deux génotypes de piment. Sciences de la Terre. Université d'Avignon, 2023. Français. NNT : 2023AVIG0614 . tel-04709900

**HAL Id: tel-04709900**

**<https://theses.hal.science/tel-04709900v1>**

Submitted on 26 Sep 2024

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

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

## THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

Ecole Doctorale n°536 Agrosciences & Sciences

**Spécialité / Discipline de doctorat :**  
Sciences agronomiques

**Unité Propre de Recherche et d'Innovation**  
**Plant Sciences, Interactions and Innovation**

Présentée par  
**Coline Pons**

---

# Effets de l'élicitation par les UV-C et le peroxyde d'hydrogène sur le métabolisme de deux génotypes de piment

---

Soutenue à huis clos le 04/07/2023 devant le jury composé de :

<b>Mme Nathalie GAVEAU, Professeure</b> EA4707 - USC INRAE1488, Université de Reims Champagne-Ardenne	<b>Rapporteure</b>
<b>Mr Christian JAY-ALLEMAND, Professeur</b> UMR IATE 1208, Université de Montpellier	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, Professeure</b> UMR 5557 Ecologie Microbienne - ISPB Lyon	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr Laurent URBAN, Professeur</b> UPRI ERIT PSII, Avignon Université	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mr Jawad AARROUF, Maître de conférences-HDR</b> UPRI ERIT PSII, Avignon Université	<b>Co-directeur de thèse</b>
<b>Mr Raphaël LUGAN, Maître de conférences-HDR</b> PSH INRAE, Avignon Université	<b>Encadrant</b>
<b>Mme Camille ROZIER, Dr. Responsable R&amp;D</b> ID4FEED	<b>Encadrante</b>

**Confidentiel**



# Résumé

ID4FEED est une société dont le siège est basé à Annecy (74), qui contribue à la recherche et au développement d'aliments complémentaires pour les animaux d'élevage, basés sur des extraits de plantes. Certains composés naturels des plantes renforçant les défenses immunitaires des animaux sont particulièrement prometteurs en tant qu'alternatives aux antibiotiques, comme les capsaïcinoïdes, qui, et les caroténoïdes. Ces deux familles de molécules sont accumulées simultanément et en quantités importantes dans les plantes du genre *Capsicum*. Plusieurs facteurs de stress biotiques ou abiotiques modulent les flux de biosynthèse du métabolisme secondaire des plantes et influencent notamment les concentrations en capsaïcinoïdes et caroténoïdes des piments. Parmi les facteurs physiques susceptibles de stimuler la synthèse de ces composés d'intérêt, les rayonnements UV-C sont actuellement très étudiés car ils amorcent des voies de signalisations moléculaires régulatrices du métabolisme secondaire.

Au cours de mes travaux de thèse, les effets des rayonnements UV-C, ainsi que du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un intermédiaire oxydatif des voies de signalisation du stress chez les végétaux, ont été étudiés sur la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes et des capsaïcinoïdes dans les fruits de deux génotypes de piment. Le premier objectif a été de développer des méthodes de profilage ciblées pour doser les métabolites d'intérêt, pour identifier les modalités d'application des traitements capables d'augmenter ces concentrations dans les fruits de deux génotypes de piment, *C. chinense* 'Habanero' et *C. frutescens* 'Bhut Jolokia'. L'innocuité des traitements de stimulation sur les plantes, fondamentale pour aboutir à un procédé valide industriellement, a été vérifiée systématiquement par la mesure de marqueurs physiologiques issus des courbes d'induction de la fluorescence maximale de la chlorophylle. Aucune des applications n'ayant permis d'augmenter la composition en caroténoïdes et capsaïcinoïdes des fruits, la réponse aux UV-C de plants de piment au stade végétatif a été étudiée. Des approches métabolomiques combinant profilages non ciblés et multiciblés en GC-MS et LC-MS/MS, couplées à des traitements de données par réseaux moléculaires et statistiques multivariées ont mis en évidence une protection très marquée des plantes traitées aux UV-C contre les effets physiologiques et métaboliques de la sécheresse. Les empreintes métaboliques (*fingerprints*) établies à partir de 1505 marqueurs ont révélé l'absence de perturbation du métabolome par le traitement UV-C, et au contraire une atténuation des symptômes métaboliques de stress hydrique lorsqu'un épisode de sécheresse suivait le traitement UV-C. L'identification d'une centaine de composés a en outre montré l'implication de l'acide pipécolique, élément essentiel de la SAR au côté du SA, dans l'élicitation UV-C.

En conclusion, les traitements d'élicitation testés n'ont pas permis de répondre à l'objectif industriel d'augmentation des concentrations en caroténoïdes et capsaïcinoïdes des fruits de piment. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'absence d'effets éliciteurs dans les fruits et sont discutés : comme la variabilité inter-individus, l'éclairage limitant dans nos conditions d'expérimentations ou simplement la physiologie des fruits. En revanche, lorsque la réponse a été étudiée à un stade plus précoce, sur des plantes en conditions contrôlées, les prétraitements aux UV-C ont amélioré considérablement la réponse des plantes au stress hydrique par effet de *priming*. La neutralité des traitements UV-C sur le métabolome et l'implication de l'acide pipécolique dans le *priming* aux UV-C sont rapportés, ouvrant à la fois des pistes de recherche inédites et des perspectives d'applications agronomiques.

Mots-clés : *Capsicum*, UV-C, peroxyde d'hydrogène, élicitation, caroténoïdes, capsaïcinoïdes, métabolomique



# Abstract

ID4FEED is a company based in Annecy (74), which contributes to the research and development of complementary feeds for farm animals based on plant extracts. Some natural plant compounds that strengthen the immune system of animals are particularly promising as alternatives to antibiotics, such as capsaicinoids and carotenoids. These two families of molecules are accumulated simultaneously and in significant quantities in plants of the genus *Capsicum*. Several biotic or abiotic stress factors modulate the biosynthetic fluxes of secondary plant metabolism and influence capsaicinoid and carotenoid concentrations in peppers in particular. Among the physical factors likely to stimulate the synthesis of these compounds of interest, UV-C radiation is currently being studied because it initiates molecular signaling pathways that regulate secondary metabolism.

During my thesis work, the effects of UV-C radiation, as well as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an oxidative intermediate of stress signaling pathways in plants, were studied on the synthesis and accumulation of carotenoids and capsaicinoids in fruits of two pepper genotypes. The first objective was to develop targeted profiling methods to assay the metabolites of interest, to identify the modalities of application of treatments capable of increasing these concentrations in the fruits of two chili genotypes, *C. chinense* 'Habanero' and *C. frutescens* 'Bhut Jolokia'. The safety of the stimulation treatments on the plants, which is fundamental for an industrially valid process, was systematically verified by measuring physiological markers from the induction curves of maximum chlorophyll fluorescence. As none of the applications were able to increase the carotenoid and capsaicinoid composition of the fruits, the response to UV-C of pepper plants at the vegetative stage was studied. Metabolomic approaches combining non-targeted and multi-targeted profiling in GC-MS and LC-MS/MS, coupled with data processing by molecular networks and multivariate statistics revealed a very marked protection of UV-C treated plants against the physiological and metabolic effects of drought. Fingerprints from 1505 markers revealed the absence of metabolome perturbation by UV-C treatment, and on the contrary an attenuation of metabolic symptoms of water stress when a drought episode followed the UV-C treatment. The identification of about 100 compounds also showed the involvement of pipercolic acid, an essential component of SAR, in addition to SA, in the UV-C elicitation.

In conclusion, the elicitation treatments tested did not meet the industrial objective of increasing carotenoid and capsaicinoid concentrations in pepper fruits. Several factors can explain the absence of eliciting effects in fruits and are discussed: such as inter-individual variability, limiting lighting in our experimental conditions or simply the physiology of the fruits. On the other hand, when the response was studied at an earlier stage, on plants under controlled conditions, the UV-C pretreatments considerably improved the response of the plants to water stress by priming effect. The neutrality of UV-C treatments on the metabolome and the involvement of pipercolic acid in UV-C priming are reported, opening both new research avenues and prospects for agronomic applications.

Keywords: *Capsicum*, UV-C, hydrogen peroxide, elicitation, carotenoids, capsaicinoids, metabolomics



# Remerciements

L'heure est venue pour moi de faire le bilan sur ces quatre dernières années, qui ont été à la fois intenses et enrichissantes.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail, Nathalie Gaveau, Christian Jay-Allemand et Marie-Geneviève Dijoux-Franca.

J'adresse ensuite mes remerciements à mes directeurs de thèse, Laurent Urban et Jawad Aarouf pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse et pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce travail.

Merci également à Raphaël Lugan, mon encadrant, pour tout ce que tu m'as apporté. Les machines ont désormais moins de secrets pour moi, et c'est grâce à toi. Merci pour tout le temps que tu as passé à me former, sur tous les domaines ! Merci pour tes précieux commentaires.

Je tiens également à remercier François Gautier, PDG d'ID4FEED pour la confiance qu'il a accordé à ce projet de recherche, ainsi que Michel Magnin, avec qui tout a commencé et à qui je souhaite encore une très belle retraite !

Je tiens également à remercier Camille Rozier, pour ton encadrement et pour tout le soutien dont tu as fait preuve. Merci d'avoir été là pour moi à toutes les étapes de ce voyage de quatre années, et pour les bons moments partagés. J'en profite pour remercier toutes les personnes d'ID4FEED qui ont pu croiser ma route : Emmanuelle, Cathy, Clémence, Delphine D, Delphine C, Amandine, Fanny, Lisa, Tiffany, Nabile. Les moments passés à vos côtés étaient de vrais SAS de décompression, et je regrette de ne pas avoir pu plus vous côtoyer au quotidien.

Je remercie les membres du comité qui ont contribué à l'avancement de ce projet par leurs conseils avisés : Anne-Laure Fanciullino, Bernard Caromel et Cécile Cabasson.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes du laboratoire Qualisud. Veronique et Sandrine, merci pour votre bonne humeur, votre aide et votre soutien de tous les instants. Merci également à Florence, Emmanuelle, Félicie, Dominique et Simon pour tous les moments partagés et votre joie de vivre (surtout Simon et son sourire légendaire...).

Un énorme merci à Olivier Chevallier, dont les compétences sont inversement proportionnelles à son degré d'optimisme ! Merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter, aussi bien techniquement que moralement. Tes conseils et ton aide ont été inestimables pour moi !



Je n'oublie pas ceux qui ont rendu la vie de laboratoire bien plus agréable : Gilles, merci pour tes idées de génie et ton soutien ; Saad, merci pour ta bonne humeur, ton énergie positive et pour ton soutien sans faille ; Doriane, merci pour ta douceur et ta positivité !

Merci à tous les stagiaires qui ont pu faire un passage dans le fameux bureau des stagiaires : je n'oublie pas les toutes premières, à m'avoir d'ailleurs accueillie : Estelle, Noémie et Claire ; et les plus récents, Amélie, Louis et Tanguy. Merci Amélie pour avoir broyé un nombre incalculable de piments avec moi... et encore désolée pour ces quintes de toux !

Ces années auraient été bien plus moroses sans vous ! Merci aux doctorants avec qui j'ai passé de très bons moments, dont l'amitié a été très précieuse pour moi : Fanny, Silué et Meriem pour vos passages appréciés dans le bureau, Lorraine (tu comptes même de loin) pour ton humour bien à toi que j'adore ; Nathalie, d'un soutien incontestable (je me souviens encore de l'aiguille du TQ cassée !) ; Cédric, pour tes desserts qui nous remontent le moral (non je rigole), pour ta faculté à nuancer les choses (non plus)... mais pour ta présence, ta personnalité, ton amitié, et surtout ton déhanché. Merci !

Merci à mes deux plus proches compères, Salah et Pauline. La vie serait bien plus triste sans vous. Je suis tellement reconnaissante d'être tombée sur vous à mon arrivée. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, pour votre soutien indéfectible et pour toutes les sorties et les bons moments passés ensemble ! Je n'oublierai rien. Vous avez plus que contribué à l'aboutissement de ce travail par votre présence et votre amitié, et je vous en serais toujours reconnaissante. Maintenant, je vous attends tous les vendredis soirs pour partir à l'aventure !

Enfin, merci à Thomas, pour ta clairvoyance, tes conseils avisés et toujours justes. Merci pour ton soutien très précieux et pour me rendre la vie plus belle. Le reste tu le sais.

Je remercie tous mes amis de l'Isère, qui ont fait semblant de s'intéresser à mon sujet de thèse (oui oui Mélanie, je parle de toi ;) ) et qui ont, malgré eux, accepté de me voir moins souvent ces derniers temps.

Tout cela n'aurait pu se faire sans eux : merci à toute ma famille, tout ceux chez qui j'ai pu trouver du repos et du soutien, et merci à mes parents et à mon frère qui m'ont toujours soutenue dans mes choix. J'espère vous rendre fiers.



# Tables des matières

## Chapitre 1. Synthèse bibliographique

---

1	Le genre <i>Capsicum</i> .....	4
1.1	La grande diversité du genre <i>Capsicum</i> .....	4
1.2	Culture du piment dans les deux bassins de productions principaux .....	5
1.3	Evolution du fruit pendant la maturation .....	6
1.4	Intérêt du piment en alimentation animale.....	7
1.5	Présentation du produit ID PHYT CAPCIN P2T 02.50 développé par ID4FEED .....	8
2	Les caroténoïdes .....	9
2.1	Généralités .....	9
2.2	Classification des nombreux caroténoïdes.....	10
2.3	Biosynthèse des caroténoïdes.....	11
2.3.1	Description .....	11
2.3.2	Spécificité du genre <i>Capsicum</i> .....	13
2.3.1	Régulation génétique .....	14
2.4	Rôles des caroténoïdes chez les plantes supérieures .....	15
2.4.1	Dans les chloroplastes .....	15
2.4.2	Dans les chromoplastes.....	16
2.5	Dynamique d'évolution pendant la maturation.....	16
2.6	Rôles des caroténoïdes dans la nutrition/santé animale .....	18
2.7	Régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par les facteurs environnementaux .....	21
2.7.1	Température.....	22
2.7.2	Lumière.....	23
2.7.3	Statut hydrique.....	24
2.7.4	Nutrition minérale.....	27
2.8	Analyses des caroténoïdes .....	27
2.8.1	Colorimétrie.....	27
2.8.2	Extraction.....	27
2.8.3	Saponification.....	28
2.8.4	Analyses.....	29
3	Les capsaïcinoïdes .....	30
3.1	Généralités .....	30
3.2	Récepteurs TRPV .....	31
3.3	Voie de biosynthèse .....	32
3.3.1	Description .....	32
3.3.2	Régulation génétique .....	34
3.4	Dynamique d'évolution pendant la maturation.....	34
3.5	Les capsinoïdes.....	36
3.6	Rôles des capsaïcinoïdes en nutrition/santé animale .....	37
3.7	Influence des facteurs environnementaux sur les capsaïcinoïdes .....	38
3.7.1	Température.....	38
3.7.2	Lumière.....	38
3.7.3	Statut hydrique.....	39
3.7.4	Nutrition minérale.....	40
3.8	Extraction et analyses.....	41



3.8.1	Extraction des capsaïcinoïdes.....	41
3.8.1	Analyse .....	42
4	La stimulation des défenses des plantes, ou l'éllicitation .....	43
4.1	Concept de xénohormésis.....	43
4.2	Définition.....	44
4.3	Mise en place des défenses de la plante : concept de la résistance induite.....	45
4.4	<i>Priming</i> des défenses.....	46
4.5	Les différents types d'élliciteurs.....	47
4.5.1	Éliciteurs biotiques .....	48
4.5.2	Éliciteurs abiotiques .....	49
4.5.3	Les rayonnements UV-C.....	50
4.5.4	Association d'élliciteurs.....	52
4.6	Mécanismes physiologiques de réponse à un stress .....	53
4.6.1	Généralités .....	53
4.6.2	Le transfert d'électrons .....	54
4.6.3	Les paramètres de fluorescence.....	54
5	Hypothèses et objectifs .....	56

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

---

1	Matériel végétal .....	60
1.1	Choix des espèces et variétés étudiées.....	60
1.1	Mise en culture.....	61
2	Dispositif expérimental .....	61
2.1	Éliciteurs utilisés .....	61
2.1.1	UV-C.....	61
2.1.2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	62
2.2	Prélèvements des échantillons.....	62
3	Analyses statistiques .....	63

## Chapitre 3. Développement méthodologique en vue de la caractérisation des métabolites d'intérêt du piment et de la recherche de marqueurs

---

1	Optimisation de la préparation des échantillons.....	65
1.1	Caroténoïdes .....	65
1.2	Capsaïcinoïdes .....	66
2	Optimisation des méthodes d'analyses ciblées .....	67
2.1	Méthode chromatographique.....	67
2.1.1	Caroténoïdes .....	67
2.1.2	Capsaïcinoïdes .....	68
2.2	Développement de méthodes MRM pour l'identification et la quantification des composés .....	68
2.2.1	Démarche générale .....	68
2.2.2	Caroténoïdes .....	70
2.2.3	Capsaïcinoïdes .....	74
3	Profilage métabolique non ciblé dans des plantes en situation de stress physiologique .....	75
3.1	Analyses LC-MS/MS.....	76
3.2	Analyses en GC-EI-TOFMS .....	78
3.3	Utilisation des réseaux pour l'identification des métabolites discriminants .....	79



3.3.1	Description d'un outil de création de réseaux moléculaires : GNPS.....	79
3.3.2	Réseaux issus des données acquises en LC-MS/MS.....	80
3.3.3	Réseaux issus des données acquises en GC-MS.....	80

## Chapitre 4. Elicitation des concentrations en caroténoïdes et capsaïcinoïdes dans les fruits lors de différentes situations physiologiques

1	Introduction .....	83
2	Matériel et méthodes .....	85
2.1	Elicitation par le peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations.....	85
2.1.1	Calendrier de traitement et de récolte .....	85
2.1.2	Mesures des échanges gazeux .....	86
2.1.3	Mesures de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne (ChlF) .....	86
2.1.4	Dosages des caroténoïdes totaux par spectrophotométrie.....	87
2.1.5	Dosage des capsaïcinoïdes par UPLC-ESI-TQ-MS .....	87
2.2	Elicitation par les UV-C et combinaison de traitements .....	88
2.3	Réponses aux éliciteurs en situation de stress hydrique .....	88
2.3.1	Calendrier de traitement.....	88
2.3.2	Analyses non ciblées et dosages de métabolites secondaires .....	90
2.4	Analyses statistiques .....	90
3	Résultats .....	90
3.1	Evaluation de l'état physiologique de la plante : les traitements d'élicitation n'engendrent pas de perturbation physiologique .....	90
3.1.1	Les traitements d'élicitation ne modifient pas les échanges gazeux et la fluorescence chlorophyllienne.....	90
3.1.2	Les traitements d'élicitation influencent peu le métabolisme primaire dans les feuilles .....	91
3.2	Les teneurs en caroténoïdes présentent peu de variations significatives en fonction des traitements appliqués .....	93
3.2.1	En conditions d'arrosage non limitant .....	93
3.2.2	En condition de stress hydrique .....	94
3.3	Les teneurs en capsaïcinoïdes dans les fruits des deux variétés étudiées ne sont pas influencées par les traitements d'élicitation dans ces conditions .....	94
3.3.1	En condition d'arrosage non limitant.....	94
3.3.2	En conditions de stress hydrique .....	95
4	Discussion .....	95
4.1	Les traitements par H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> n'engendrent pas d'augmentation des métabolites secondaires.....	95
4.2	La variabilité génétique ainsi que l'environnement entraînent des réponses différentes .....	96
4.3	Les traitements UV-C n'ont pas été efficaces pour augmenter les composés d'intérêt.....	96
4.4	La saisonnalité a entraîné des différences de concentrations en caroténoïdes .....	98
4.5	La variabilité au sein des modalités reste importante .....	98
4.6	Peu de changements ont été observés en condition de stress hydrique .....	99
4.6.1	Sur la machinerie photosynthétique .....	99
4.6.1	Sur la concentration en métabolites d'intérêt .....	101
5	Conclusion .....	101



## Chapitre 5. Priming for drought resistance? UV-C flashes induced no growth or metabolic cost but triggered pipecolate accumulation and dehydration avoidance in *Capsicum chinense*

---

1	Avant-propos .....	103
2	Introduction .....	105
3	Experimental procedures .....	108
3.1	Plant material .....	108
3.2	UV-C treatments, water deprivation and plant sampling .....	108
3.3	Measurement of physiological variables.....	109
3.4	Metabolite extraction.....	109
3.5	Analytical procedures.....	109
3.5.1	Untargeted GC-EI-TOFMS analysis .....	109
3.5.2	Untargeted UPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis .....	110
3.5.3	Amino acids and phytohormones determination by UPLC-ESI-TQMS.....	110
3.6	Data analysis.....	110
4	Results .....	111
4.1	Effects of UV-C, drought or a combination of both on water status and growth parameters .....	111
4.2	Effects of UV-C, drought or a combination of both on leaf metabolome.....	111
4.3	Improvement of metabolites annotation and quantification by supervised data processing .....	112
4.4	Metabolic markers of UV-C treatment.....	113
4.5	Metabolic markers of drought stress .....	114
4.6	Metabolic markers of UV-C treatment in plants subsequently subjected to drought stress .....	114
5	Discussion .....	115
5.1	UV-C flashes pretreatment mitigated the dehydration of aerial parts and its costly metabolic consequences.....	115
5.2	UV-C flashes pretreatment primed the plants against drought stress. ....	117
5.3	Benefits of UV-C flashes over other UV stimulations.....	118
6	Conclusions and perspectives .....	120

## Chapitre 6. Discussion générale et perspectives

---

1	Comparaison des approches analytiques .....	123
1.1	Approches ciblées.....	123
1.2	Approches non ciblées .....	124
2	Seuils de déclenchement de l'éllicitation par les UV : effets dose et durée des expositions .....	125
3	Médiateurs potentiels de l'expression des gènes de voies de biosynthèse cibles .....	127
4	Élicitation UV-C au stade végétatif contre les effets de la sécheresse .....	128
5	Élicitations par flashs d'UV : acclimatation ou <i>priming</i> ? .....	129
6	Rôle de l'immunité systémique dans l'éllicitation UV-C .....	131
7	Conclusion .....	134

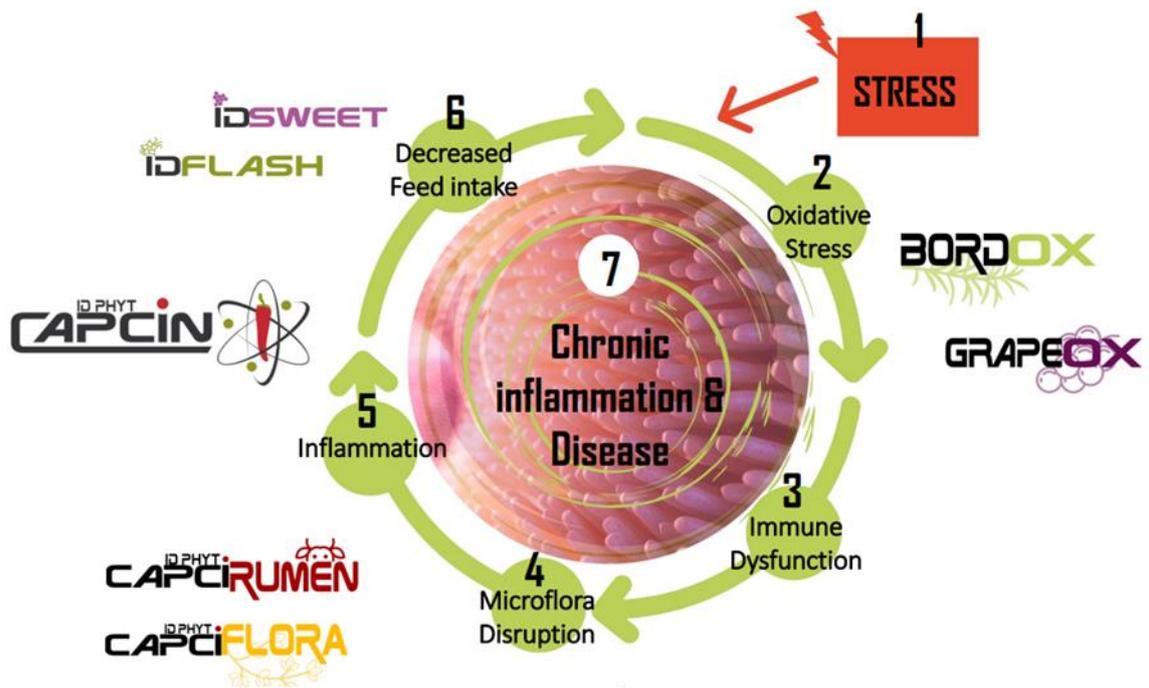


Figure 1. Le cycle oxydo-inflammatoire et l'étape d'action de chaque produit développé par ID4FEED (source ID4FEED).

# Avant-propos

Le projet est intégré dans une collaboration entre l'Université d'Avignon et l'entreprise ID4FEED (Ideas for Animal Feed) et financé par une bourse CIFRE. Il a débuté le 15 avril 2019 au sein de l'Université sous la direction de Laurent Urban et Jawad Aarrouf de l'UPRI ERIT PSII (Plant Science, Interactions and Innovation) et Raphaël Lugan de l'Université d'Avignon. Ce projet est piloté au sein de ID4FEED par Michel Magnin (directeur R&D puis consultant pour ID4FEED) et Camille Rozier (manager R&D).

ID4FEED est une entreprise fondée en 2017 par François Gautier, dont le siège est basé à Annecy (74). Les actionnaires d'ID4FEED sont des acteurs importants de la distribution de suppléments nutritionnels aux niveaux européen et mondial. ID4FEED développe et commercialise des suppléments nutritionnels (aliments composés, additifs, prémix...) pour animaux de rente à base de plantes et d'extraits végétaux, dans l'objectif global d'améliorer la santé et les performances animales dans des conditions d'élevage variées et propres à chaque pays. Les indicateurs de santé et performances animales comprennent l'immunité, le statut métabolique, le stress oxydatif, la mortalité, le gain de poids, une meilleure utilisation de l'énergie puis la qualité des produits (chair, œufs, lait).

Les produits développés par ID4FEED découlent d'un programme de recherche d'alternatives à des molécules de synthèse de plus en plus controversées et parfois interdites et à des antibiotiques sur- et mal- utilisés dans les dernières décennies. En effet, ces derniers ont été largement distribués en élevage en tant que promoteurs de croissance (AGP) jusqu'en 2006 et sont encore aujourd'hui, à titre préventif sur prescription, utilisés pour améliorer les « performances technico-économiques » des élevages (Bacanli and Başaran, 2019). Les restrictions d'utilisation des antibiotiques et des molécules de synthèse sont dépendantes des pays. Cette surutilisation d'AGP a entraîné l'apparition de phénomènes d'antibiorésistance et de persistance de résidus dans l'environnement (Martin et al., 2015). L'antibiorésistance constitue un pilier très important du concept « One Health », dans lequel les santés humaine, animale et environnementale sont étroitement liées (Atlas, 2013). La recherche d'alternatives doit permettre de limiter l'apparition et la dissémination des gènes d'antibiorésistance et apparaît comme une opportunité pour identifier de nouvelles molécules effectrices sur la physiologie des animaux, leur permettant de mettre en jeu leur propre système de défense.

Les produits développés par ID4FEED sont des aliments complémentaires principalement à base d'ingrédients naturels, agissant sur le cycle oxydo-inflammatoire, qui se dérégule suite à une exposition à un stress (par exemple alimentaire, pathologique, thermique ou encore de sevrage) (Sahin et al., 2017). Selon leur composition et leur fonction, ils agissent à différents niveaux de ce cycle (Figure 1) : ils peuvent avoir une fonction antioxydante, anti-inflammatoire, d'équilibre du microbiote, ou



d'amélioration de la prise alimentaire. Les matières premières employées sont diverses et comprennent le romarin (*Salvia rosmarinus*), le raisin (*Vitis vinifera*) ou encore le piment (*Capsicum*). Plusieurs familles de molécules possédant des propriétés intéressantes en nutrition animale sont présentes en quantités significatives chez les plantes du genre *Capsicum*, notamment deux : les caroténoïdes, qui sont de puissants antioxydants (Latscha, 1990), et les capsaïcinoïdes, possédant des fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires (Oh et al., 2016).

Parmi ces activités, ID4FEED a développé une gamme d'aliments complémentaires pour animaux à base de poudre de piment, contenant le *totum* de la plante non-extraite (matière première). ID PHYT CAPCIN P2T 02.50 stimule notamment la transformation et la digestion de l'aliment en favorisant les sécrétions enzymatiques digestives, permet de limiter les processus inflammatoires et de moduler l'immunité au sein du système digestif des animaux d'élevages tels que les porcs, ruminants et volailles (Messant, 2021; Kreuz et al., 2022; Moraes et al., 2022; Grigoletto et al., 2023). Il peut également conférer une couleur attrayante à la chair de l'animal qui en consomme ou au jaune d'œuf chez les volailles, en évitant l'utilisation de colorants synthétiques. Une couleur bien intense est non seulement bien acceptée par le consommateur qui l'apparente à une bonne qualité, mais elle est aussi interprétée comme un indicateur de bonne santé de l'animal (Delgado-Vargas et al., 2000; Fraser and Bramley, 2004; Niu et al., 2008).

L'entreprise a donc développé une expertise et un savoir-faire particuliers dans l'utilisation de ces molécules en alimentation animale : sélection de la génétique de *Capsicum*, management des conditions agronomiques, induction des défenses par élicitation (Brevet FR3100955, 2021), analyses, formulation, vectorisation, preuves de concept avec indicateurs *in vitro* et *ex-vivo* et expertise par espèce.



# Chapitre 1

---

Synthèse bibliographique



# 1 Le genre *Capsicum*

## 1.1 La grande diversité du genre *Capsicum*

Le piment désigne le fruit de 27 espèces différentes du genre *Capsicum*, de la famille des Solanaceae. Les cinq espèces les plus cultivées sont *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. chinense* et *C. frutescens* (Evrard et al., 2002). *C. annuum* est l'espèce la plus cultivée et celle comprenant le plus de diversité génétique. Les autres espèces sont restreintes à certaines régions particulières car elles sont plutôt adaptées à un climat de type tropical c'est-à-dire avec des températures et humidités élevées ainsi que des précipitations abondantes (Finger and Pereira, 2016). Le terme piment, qui regroupe toutes ces espèces, désigne la plante mais également le fruit. Pour la suite du manuscrit, lorsque le terme piment sera employé sans précision particulière, il fera référence au fruit.

Actuellement, 152 variétés sont inscrites au catalogue officiel français des espèces et variétés de plantes cultivées du GEVES, Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences (GEVES, 2022). Quatre « types » principaux sont distingués : 3 types de « poivrons » ou « piment doux », en fonction de la forme du fruit (types carré, rectangulaire ou triangulaire), et le type « piquant » (Evrard et al., 2002). Le premier hybride de piment, Lamuyo, a été obtenu par l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) en 1973, et est de type rectangulaire. C'est le type le plus cultivé en Europe. Parmi les variétés les plus réputées, on trouve le piment de Cayenne cultivé en France métropolitaine, le piment « végétarien » des Antilles, à la saveur de piment mais sans saveur « brûlante », ou encore le piment 'Carolina Reaper', officiellement le plus fort au monde selon le Guinness World Records. Les piments de type piquant doivent leur particularité à la production d'une famille d'alcaloïdes, les capsaïcinoïdes.

Les plantes du genre *Capsicum* sont principalement autogames mais une pollinisation croisée au sein des espèces et entre les espèces est également possible (Raw, 2000). L'ensemble de la végétation est glabre, avec des tiges droites à croissance déterminée, de hauteur et forme très variables selon les cultivars et les conditions de culture. De manière générale, les plants de piment peuvent mesurer de 0,75 à 1,80 m. La plante n'est pas particulièrement sensible à l'acidité du sol mais sa plage optimale de croissance est comprise entre 5,6 et 7,8 (Evrard et al., 2002). Elle est en revanche sensible à la température et demande des températures comprises entre 25 et 30°C pour la germination, et entre 20 et 30°C en cours de culture, dans un climat humide pour la croissance et plus sec lors de la maturation des fruits (Hussain and Abid, 2011).

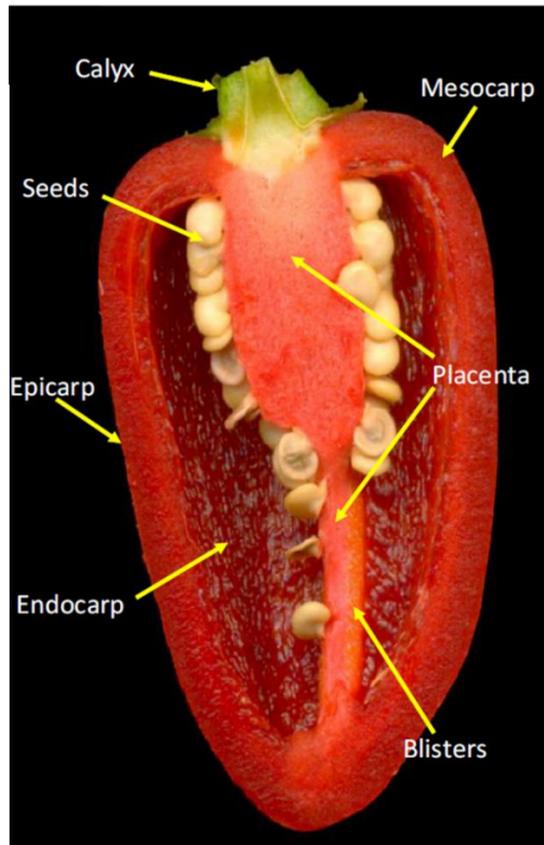


Figure 2. Coupe longitudinale d'un piment (Naves et al., 2019)

Les piments se présentent sous plusieurs formes, tailles et couleurs dans le monde entier. Le fruit est une baie constituée d'un péricarpe charnu plus ou moins épais selon les variétés, divisée en 2 à 4 loges carpellaires et d'un placenta où sont fixées les graines (Figure 2). Afin de limiter les pertes en eau du fruit, les parois cellulaires de l'épiderme sont épaisses et recouvertes d'une cuticule et les stomates sont rares. Le pédoncule, en revanche, possède de nombreux stomates et de grands espaces intercellulaires (O'Donoghue et al., 2018).

## 1.2 Culture du piment dans les deux bassins de productions principaux

Bien qu'il soit originaire d'Amérique centrale et du Mexique, le piment a depuis longtemps été disséminé dans le monde entier et il est utilisé dans de nombreux pays (Bosland, 1994). Le piment est l'épice la plus consommée au monde (FAO, 2022). En 2021, la production mondiale s'élevait à environ 4 800 000 T sur une surface de 1 600 000 ha, avec une croissance de la production de 30% sur les dix dernières années. En 2021, 90% de la production mondiale a été assurée par 14 pays. Parmi ce classement, le principal bassin de production se situe en Asie. L'Inde, le Bangladesh, la Thaïlande et la Chine sont les quatre pays produisant le plus de piment au monde avec 42% de la production mondiale réalisée uniquement par l'Inde, ce qui fait de lui le principal pays producteur de piment. Parmi les autres pays producteurs de ce même bassin asiatique, on trouve la Birmanie, le Pakistan, le Vietnam ou encore le Népal. Une autre zone géographique de production se distingue dans ce classement, dans le golfe de Guinée, en Afrique subsaharienne. On y trouve le Bénin, la Côte d'Ivoire, le Ghana et le Nigéria, et, encore un peu plus loin sur le continent africain, l'Éthiopie. En 14<sup>ème</sup> place en 2021, le Mexique a contribué à hauteur de 1,25% de la production mondiale avec environ 60 000 tonnes produites (FAO, 2021).

Le climat en Asie du Sud dépend de la latitude et de l'altitude mais, dans l'ensemble, le climat est considéré comme tropical à subtropical, avec des températures élevées et une forte humidité tout au long de l'année (WMO, 2022a). La mousson entraîne un fort apport d'air humide et de précipitations entre les mois de juin et septembre ; elle est à l'origine d'un climat qui convient bien à la croissance des plants de piment.

Dans le second bassin de production situé en Afrique subsaharienne, le climat est tropical avec une saison sèche qui dure généralement de novembre à mars et une saison des pluies s'étalant de mai à octobre. La température est relativement constante tout au long de l'année, avec des températures moyennes comprises entre 25 et 30°C.



Dans ces zones de production, l'agriculture pluviale est largement pratiquée (Wani et al., 2009). Ce type d'agriculture dépend uniquement des précipitations annuelles pour l'approvisionnement en eau des cultures. Ce management de culture n'est possible que dans les régions caractérisées par des saisons de pluies abondantes. En dessous de 200 mm annuels, l'agriculture pluviale n'a que peu de chance de produire une récolte (Wani et al., 2009). L'absence de gestion de l'irrigation des plants entraîne une forte dépendance au climat, dont les aléas sont importants. Sous l'influence du changement climatique, les précipitations fluctuantes peuvent entraîner une mauvaise irrigation des cultures et générer des stress hydriques (excès ou manque d'eau) (WMO, 2022b).

### 1.3 Evolution du fruit pendant la maturation

Le fruit présente différentes couleurs selon son stade de maturité, allant du vert clair au vert foncé avant maturité, au jaune, orange ou rouge lorsque les fruits sont mûrs. La phase de maturation est initiée lorsque les fruits ont atteint leur taille finale. A ce stade, ils sont considérés comme matures verts. Durant la phase de maturation du piment, la couleur verte disparaît du fait de la dégradation de la chlorophylle et de la lutéine, et de nouveaux composés comme des flavonoïdes et des caroténoïdes sont synthétisés (Howard et al., 2000).

Selon les variations de la respiration lors de la maturation, les fruits sont classés comme climactériques lorsqu'une augmentation du niveau de CO<sub>2</sub> et une production d'éthylène sont observées, ou non-climactériques si aucun pic d'éthylène n'est détecté. Par exemple, la tomate, la pomme et l'avocat sont classés comme des fruits climactériques, tandis que le citron, l'ananas et le piment représentent des modèles importants pour l'analyse des fruits non climactériques. Le piment présente une production limitée et non catalytique d'éthylène au cours de la maturation (Pretel et al., 1995; Aizat et al., 2013), en revanche, de fortes variations de production d'éthylène et de CO<sub>2</sub> au cours de la maturation existent entre les différents cultivars, dont certains montrent des caractéristiques climactériques (Villavicencio et al., 1999; Tan et al., 2012). Au cours du processus de la formation des fruits du piment, l'expression des gènes, l'accumulation des métabolites et l'activité antioxydante changent au cours des différents stades de croissance et de maturation (Jang et al., 2015). Ces changements seront détaillés dans la suite du manuscrit (voir Chapitre 1, parties 2.5 et 3.3).

Qin et al., (2014) ont comparé les profils d'expression génique entre la tomate et le piment pendant le mûrissement des fruits. Des différences importantes ont été identifiées notamment au niveau des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'éthylène. Aucun des huit gènes du piment codant pour la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (l'enzyme clé de la production

Tableau 1. Divers effets bénéfiques de la supplémentation de la ration par de la poudre de piment. Lorsqu'il est précisé, le principe actif responsable de l'effet est indiqué entre parenthèses. Adapté de Abd El-Hack et al. (2022).

Effet de la poudre de piment ou du principe actif	Reference
Activité antioxydante ( <i>Capsicum annum</i> ) : diminution de la peroxydation des lipides (caroténoïdes, acide ascorbique, tocophérols, provitamine A)	(Krinsky, 2001; Kogure et al., 2002; Conforti et al., 2007; Oboh et al., 2007)
Amélioration de l'intégrité de l'intestin chez les poulets de chair	(Al-Kassie et al., 2012)
Amélioration de la croissance chez les poulets de chair	(Atapattu and Belpagodagamage, 2011; Munglang and Vidyarthi, 2019)
Amélioration de l'indice de consommation	(Eldeeb et al., 2006)
Effets antimicrobiens et antibactériens ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Clostridium spp.</i> , et <i>Salmonella spp.</i> )	(Zeyrek and Oguz, 2005; Singletary, 2011; A Omolo, 2014; Agarwal et al., 2017)
Effets antioxydants, antiinflammatoires, antiallergiques, anticarcinogènes et de réduction du risque d'infection (capsaïcine)	(Lee et al., 2005a; Nishino et al., 2009; Munglang and Vidyarthi, 2019)
Effets d'intensification de la couleur du jaune d'œuf et d'amélioration des performances de ponte chez les volailles	(Özer et al., 2006)
Diminution de la concentration totale de cholestérol dans le sang	(Eldeeb et al., 2006; Puvača et al., 2015)
Réduction du stress thermique chez les oiseaux (acide ascorbique)	(Yoshioka et al., 2001; Al-Kassie et al., 2012; Abdelnour et al., 2018; Abd El-Hack et al., 2019; Munglang and Vidyarthi, 2019)

d'éthylène) n'était régulé à la hausse contre deux fortement induits chez la tomate, ce qui est cohérent avec l'observation d'une production d'éthylène plus faible chez le poivron que chez cette dernière (Villavicencio et al., 1999). Le nombre de gènes différentiellement exprimés liés à l'auxine et à l'acide abscissique (ABA) est plus important dans le piment que dans la tomate, ce qui est cohérent avec l'accumulation d'ABA pendant la maturation de la fraise, un autre fruit non climactérique (Symons et al., 2012).

Qin et al., (2014) ont observé également que des facteurs de transcription régulant négativement la sénescence ont été surexprimés, et que les gènes XTH, codant pour des hydrolases pariétales, donc impliqués dans la dégradation mécanique de la paroi des cellules, sont ont été sous exprimés. On suppose donc que ces derniers sont impliqués dans la remarquablement bonne conservation du piment.

#### 1.4 Intérêt du piment en alimentation animale

Traditionnellement, en alimentation humaine, les piments sont utilisés pour leur saveur, leur caractère pimenté et leur couleur, mais ils sont également appliqués pour soigner les maux de dents, les douleurs musculaires, les névralgies, les rhumatismes ou encore le diabète. Dans un contexte d'alimentation animale, les extraits de piment ont également été étudiés pour leurs potentiels en tant qu'agents antimicrobiens contre les champignons et les virus, et comme agents insecticides, vermifuges et larvicides (Oni, 2011; Ileke et al., 2013). De nombreuses propriétés bénéfiques ont largement été décrites : propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, anticancéreuses, anti-obésité, antiangiogéniques, protection cardiovasculaire, antithrombotiques et vasodilatatrices (Batiha et al., 2020). Au niveau des critères liés à l'élevage, des améliorations ont également été largement constatées lors d'une supplémentation de la ration par de la poudre de piment (Tableau 1). Les critères sur lesquels la supplémentation en poudre de piment a été efficace, comprennent les performances de croissance, de poids, la digestibilité des nutriments, le statut des antioxydants, la fonction immunitaire, la qualité de la viande, la consommation d'aliments, l'activité de la lipase duodénale ou encore l'activité des enzymes antioxydantes.

Ces propriétés sont portées par les composés bioactifs du piment. Ces derniers comprennent des capsaïcinoïdes, des caroténoïdes, des composés phénoliques et des composés volatiles. Le piment est également riche en acide ascorbique (vitamine C), tocophérols (vitamine E) et provitamine A, ce qui lui confère de nombreux avantages pour son utilisation en alimentation animale (Wahyuni et al., 2013). L'ensemble de ces métabolites peuvent être retrouvés dans la poudre de piment, contrairement aux extraits commercialisés en tant que tel.



## 1.5 Présentation du produit ID PHYT CAPCIN P2T 02.50 développé par ID4FEED

Le piment possède les métabolites permettant d'agir au niveau du cycle oxydo-inflammatoire, pouvant être dérégulé par l'occurrence de nombreux stress (Sahin et al., 2017). Actuellement, sur le marché de la santé animale, la capsaïcine ou le piment sont retrouvés sous différentes formes : capsaïcine pure de synthèse, capsaïcinoïdes, extraits type oléorésine issue d'extraction hexanique ou butane liquéfié, oléorésine ou capsaïcine intégrées dans des produits plus complexes avec des huiles essentielles.

L'ajout de capsaïcine de synthèse à la ration, par le biais du prémix, est aussi pratiquée, mais prive l'utilisateur final des bienfaits des tous les autres métabolites présents dans la poudre totale. Bien que le coût de ce type de produit soit plus faible, le contrôle de l'aspect piquant est de même un problème récurrent. L'oléorésine de piment ensuite, constitue une part importante du marché. Cet additif, très concentré (allant jusqu'à 10% de capsaïcinoïdes), est produit à partir d'extraction de poudre de piment dans l'hexane. La production de ces oléorésines, nécessite une grande consommation de solvant pétrochimique type hexane ou acétone. De même, la présence de résidus dans le produit final n'est pas à exclure. Enfin, la polarité très spécifique du solvant d'extraction réduit fortement le spectre du profil chimique du produit. Les extraits de *Capsicum* utilisés en nutrition animale sont développés, à l'origine, pour l'alimentation humaine. Ces extraits proviennent de cultures n'ayant pas été sélectionnées ou cultivées pour leurs capacités à produire des teneurs fortes en capsaïcinoïdes (0,5-1%), caroténoïdes ou autres métabolites secondaires, à des prix compétitifs (ID4FEED, communication personnelle).

Afin de se différencier du marché le produit phare développé par ID4FEED, ID PHYT CAPCIN, est un produit à base de poudre de piment, qui contient non seulement des caroténoïdes et des capsaïcinoïdes, mais également d'autres métabolites importants pour lutter contre les stress oxydo-inflammatoires chez les animaux (composés phénoliques, vitamine C, ...) (Medina-Juárez et al., 2012) (Figure 1). Ce produit est formulé à base d'un mélange de poudres de *Capsicum*, dont certaines élicitées, présentant chacune des métabolites intéressants pour la nutrition animale. Il possède une teneur standardisée en capsaïcinoïdes (minimum 0,5% de capsaïcinoïdes) et est encapsulé dans une matrice grasse afin de réduire le caractère piquant pour l'opérateur lors du mélange dans un prémix ou de l'incorporation dans l'aliment.

Outre l'impact environnemental, l'intérêt d'utiliser une poudre de piment en remplacement d'oléorésines, pourtant bien plus concentrées, réside dans le profil métabolique plus important (*totum*), l'absence de résidus, et le statut réglementaire. En effet, la poudre de piment possède le



statut de matière première, qui est une niche distincte sur le marché. En revanche, la concentration en actifs d'intérêt est réduite sans extraction, ce qui justifie l'intérêt d'augmenter les concentrations en métabolites d'intérêt dans le piment et d'approfondir les connaissances liées à l'application d'éliciteurs.

Aucun acteur de la filière ne travaille en amont de la production, au sein de la filière végétale afin d'augmenter les concentrations en actifs d'intérêt par des méthodes alternatives, tout en diminuant l'impact environnemental (ID4FEED, communication personnelle). ID4FEED a pour force de gérer tous les chaînons de la plante (agronomie, élicitation, métabolomique) à l'animal (activité biologique *in vitro*, *ex-vivo*, *in vivo* par collaboration) en passant par la formulation (encapsulation/vectorisation).

Dans ce but, la société est continuellement à la recherche de cultivars à haute teneur en capsaïcinoïdes et caroténoïdes. Afin de pouvoir travailler sur des cultivars résistants, productifs et adaptés aux climats de production, l'augmentation des teneurs au sein des fruits, à travers des nouvelles méthodes d'élicitation, a été proposée comme piste de travail. La recherche de nouveaux éliciteurs, en combinaison ou non, l'optimisation des méthodes ainsi que la compréhension des mécanismes sont des enjeux qui intéressent ID4FEED.

## 2 Les caroténoïdes

### 2.1 Généralités

Les caroténoïdes sont des pigments largement présents dans la nature, synthétisés par tous les organismes photosynthétiques (cyanobactéries, algues et plantes) mais aussi par des microorganismes non photosynthétiques comme les champignons ou certaines bactéries. A ce jour, 1204 caroténoïdes ont été isolés à partir de 722 organismes (<http://carotenoiddb.jp/>). Bien que des caroténoïdes en C30, C45 et C50 aient été retrouvés, la grande majorité des caroténoïdes d'origine naturelle possède 40 atomes de carbones, avec 1121 caroténoïdes en C40 rapportés à ce jour.

Les composés en C40 (ou dérivés de C40) sont synthétisés uniquement par les eucaryotes, tandis que les composés en C45 proviennent des bactéries et les composés en C30 et C50 sont synthétisés en majorité par les bactéries et les archéobactéries. Les organismes peuvent être classés selon leur quantité de caroténoïdes synthétisés. Ainsi, par ordre décroissant, la quantité est plus importante chez les plantes que chez les algues, levures, archéobactéries et eubactéries (Zia-Ul-Haq et al., 2021). Dans



les plantes, ces composés peuvent être présents dans les racines, les tiges, les feuilles ou encore dans les fleurs, les fruits et les graines, où ils sont particulièrement remarquables en raison de leur couleur. Cette couleur est due au système de double liaisons conjuguées qui permet d'absorber la lumière dans le spectre visible, ce qui donne une teinte jaune à rouge aux fruits et aux fleurs dans lesquels ils s'accumulent (Bartley and Scolnik, 1995).

La composition qualitative et quantitative en caroténoïdes des fruits est très variée. Selon Goodwin (1980), certains fruits présentent des teneurs faibles en caroténoïdes comme, par exemple, la poire, tandis que d'autres en revanche possèdent une teneur importante (raisin, citron...). Certaines espèces sont caractérisées par une concentration importante en un caroténoïde particulier (et ses dérivés), comme par exemple la tomate, avec une teneur élevée en lycopène, ou encore la pêche avec une prédominance du  $\beta$ -carotène (Saini et al., 2015). D'autres fruits présentent une majorité de caroténoïdes spécifiques à leur genre, comme par exemple le piment, du genre *Capsicum*, qui possède une concentration importante en capsanthine et capsorubine (Gómez-García and Ochoa-Alejo, 2013).

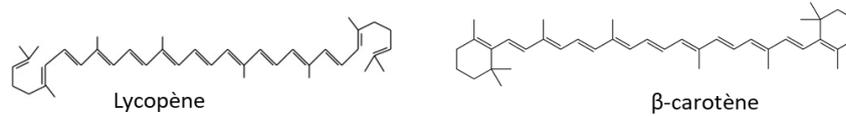
La grande diversité dans le genre *Capsicum* entraîne une variation importante des teneurs en caroténoïdes. Campos et al., (2013) ont analysé sept génotypes du type variétal Habanero (*C. chinense*), dont les teneurs en caroténoïdes dans les fruits rouges matures varient de 1 000 à 1 260  $\mu\text{g/g}$  MF. Wall et al. (2001) ont également analysé un génotype du type variétal Habanero qui présentait entre 348 et 446  $\mu\text{g/g}$  MF de caroténoïdes totaux selon l'année de culture, tandis que les cultivars de l'espèce *C. annuum* ont des teneurs en caroténoïdes comprises entre 1 et 1 173  $\mu\text{g/g}$  MF. Le profil de caroténoïdes au sein de chaque variété peut également varier. La capsanthine par exemple, représentait 45% des caroténoïdes totaux dans une étude comparant 226 accessions de *C. chinense* (Ko et al., 2022), entre 25 et 50% dans des accessions de *C. baccatum* et *C. pubescens* (Rodríguez-Burruezo et al., 2010), tandis que ce pourcentage atteignait 63% dans *C. annuum* 'Raruku' (Suzuki et al., 2007).

## 2.2 Classification des nombreux caroténoïdes

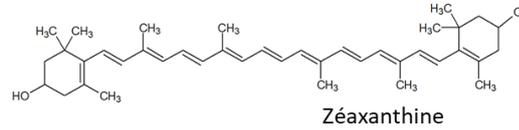
Les caroténoïdes peuvent être acycliques (lycopène), monocycliques ( $\gamma$ -carotène) ou bicycliques ( $\beta$ -carotène) (Rodríguez-Amaya and Kimura, 2004) mais de nombreuses structures existent résultant de différents réarrangements (cyclisation, hydrogénation, déshydrogénation, introduction de fonctions oxygène, raccourcissement de chaîne, etc...).

On trouve deux classes de caroténoïdes : les carotènes et les xanthophylles. Les carotènes contiennent uniquement des atomes de carbone et d'hydrogène (lycopène,  $\beta$ -carotène). Ce sont des

## Carotènes



## Xanthophylle



## Xanthophylle estérifié

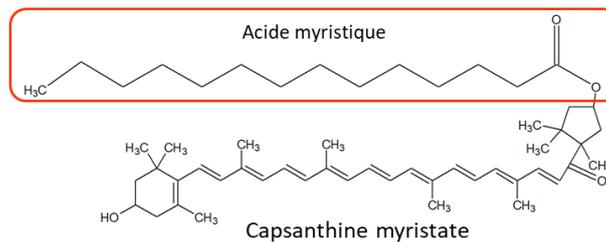


Figure 3. Structures des différentes classes de caroténoïdes

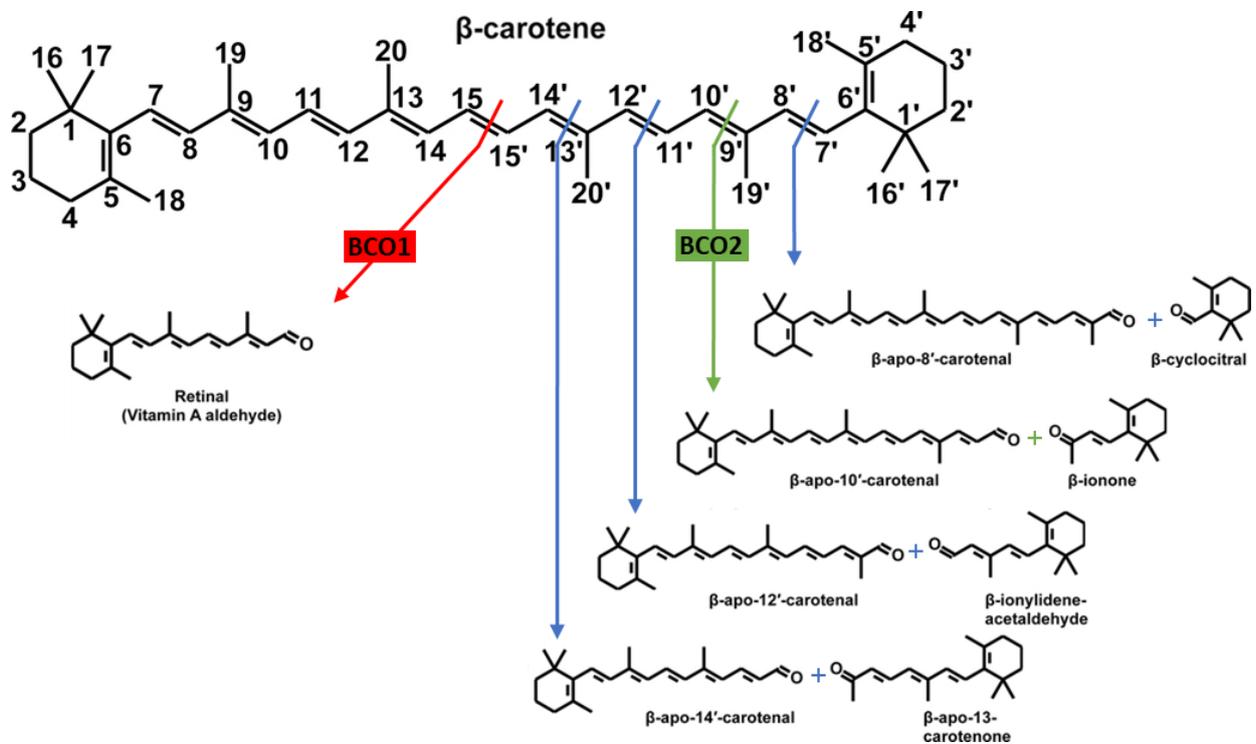


Figure 4. Produits du clivage du β-carotène. Le clivage oxydatif du β-carotène au niveau de la double liaison 15,15' est catalysé par l'enzyme β-carotène 15,15'-oxygénase 1 (BCO1) et conduit à la génération de deux molécules de rétinaldéhyde (β-apo-15-caroténal). Le clivage au niveau d'autres doubles liaisons conduit à la formation de β-apocaroténals et de β-apocaroténones. Par exemple, le clivage au niveau de la double liaison 9',10' est catalysé par la β-carotène 9',10'-oxygénase 2 (BCO2) et conduit à la formation de β-apo-10'-caroténal et de β-ionone. D'après Eroglu and Harrison (2013).

caroténoïdes apolaires, très lipophiles en raison de leur structure hydrocarbonée, dépourvus de groupes fonctionnels polaires. Les xanthophylles contiennent en plus des atomes d'oxygène. Les groupements dérivés de l'oxygène les plus fréquents sont des groupements hydroxyle ( $\beta$ -cryptoxanthine), carbonyle (canthaxanthine) ou époxyde (violaxanthine) qui augmentent la polarité des xanthophylles. Suite à la présence de ces atomes d'oxygène, les xanthophylles sont souvent présentes sous forme estérifiée avec des acides gras (Figure 3).

Selon les classifications, il arrive qu'une troisième classe de caroténoïdes soit définie: les apocaroténoïdes (Buttery et al., 1988). Ces métabolites sont les produits d'un clivage oxydatif non enzymatique ou enzymatique des caroténoïdes en C40 résultant de l'action des CCDs (carotenoid cleavage dioxygenases). Une de ces enzymes, la 9-*cis*-époxy-caroténoïde dioxygénase (NCED) est impliquée dans la biosynthèse de l'ABA, en catalysant la réaction permettant le clivage de la neoxanthine ou de la violaxanthine pour former la xanthoxine, précurseur de l'acide abscissique (ABA). Elle a été identifiée pour la première fois par Schwartz et al. en 1997.

Le rétinol (aldéhyde de la vitamine A) est issu du clivage du  $\beta$ -carotène et peut également être nommé  $\beta$ -apo-15-caroténal, qui indique un clivage au niveau de la double liaison centrale 15, 15' par la BCO1 ( $\beta$ -carotène-15,15'-oxygénase 1). D'autres clivages peuvent se produire à différents endroits (Figure 4).

Dans le piment, il est possible de classer les caroténoïdes en deux familles de couleur : les pigments rouges et les pigments jaunes. La fraction rouge est composée de pigments spécifiques au genre *Capsicum* comme la capsanthine, la capsanthine 5,6-époxyde et la capsorubine, tandis que la fraction jaune contient d'autres caroténoïdes communs à de nombreux genres tels que la violaxanthine, la zéaxanthine, le  $\beta$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine par exemple (Hornero-Méndez et al., 2000).

## 2.3 Biosynthèse des caroténoïdes

### 2.3.1 Description

Les caroténoïdes dérivent de deux voies de biosynthèse qui forment un précurseur des différents isoprénoïdes présents chez les plantes, l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) (Cunningham and Gantt, 1998) (Figure 5). L'IPP peut être synthétisé dans le cytoplasme via la voie du mévalonate (MEV), qui utilise l'acétyl-CoA en provenance de la glycolyse, et par

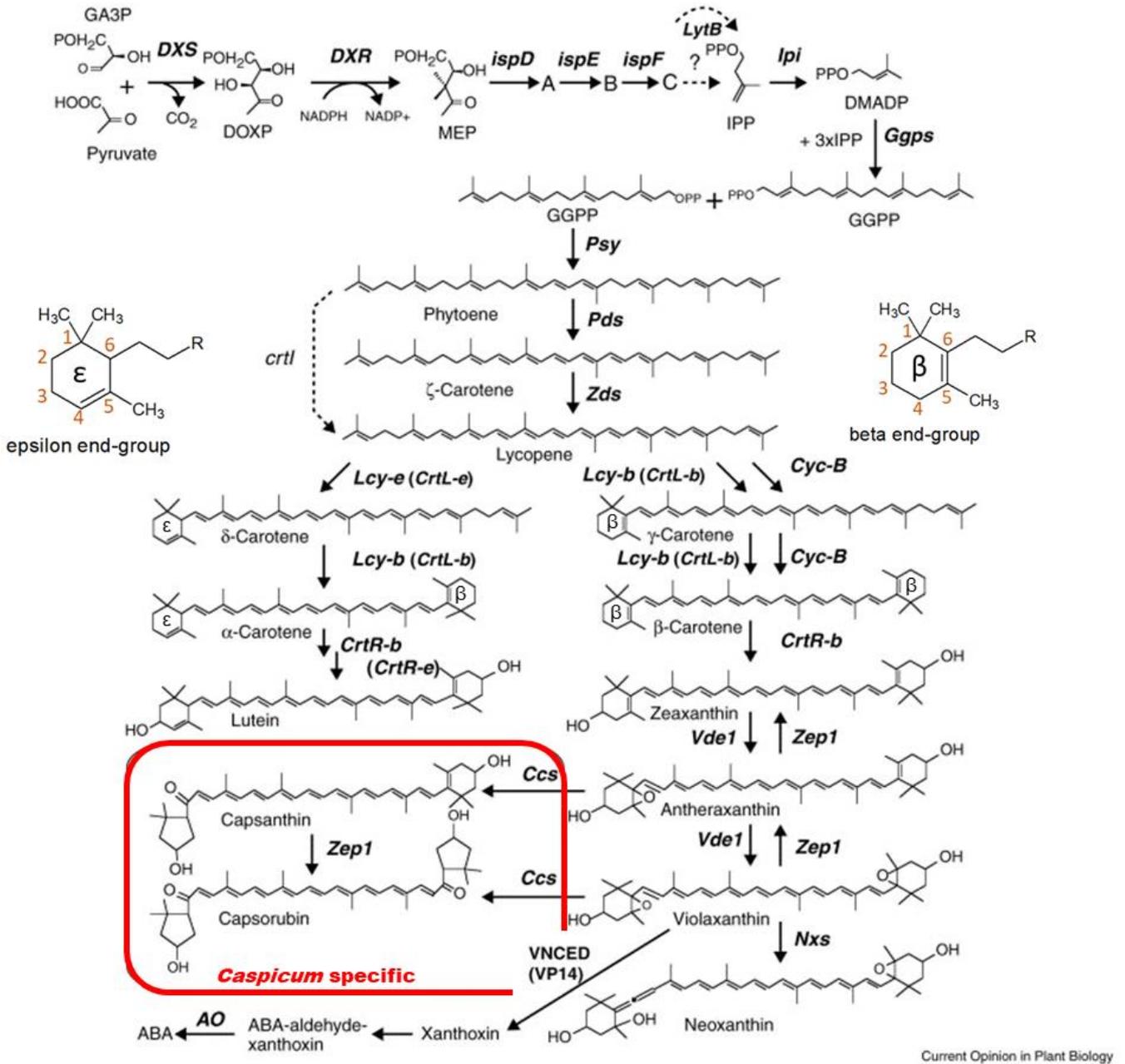


Figure 5. Voie de biosynthèse des caroténoïdes. A, DPME; B, 4-diphospho-cytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate; C, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate. AO, aldehyde oxidase; Ccs, capsanthin-capsorubin synthase; CrtR-b,  $\beta$ -ring hydroxylase; CrtR-e,  $\epsilon$ -ring hydroxylase; Cyc-B, chromoplast-specific lycopene cyclase; DMADP, dimethylallyl diphosphate; DXR, DOXP reductoisomerase; DXS, DOXP synthase; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; Ggps, GGPP synthase; Ipi, IPP isomerase gene; IPP, isopentenyl diphosphate; ispD, DPME synthase; ispE, DPME kinase; ispF, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; Lcy-b/CrtL-b, lycopene  $\beta$ -cyclase; Lcy-e/CrtL-e, lycopene  $\epsilon$ -cyclase; LytB, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; Nxs, neoxanthin synthase gene; Pds, phytoene desaturase; Psy, phytoene synthase; Vde1, violaxanthin deepoxidase1; VNCED, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; Zds,  $\zeta$ -carotene desaturase; Zep1, zeaxanthin epoxidase1. D'après Hirschberg, 2001.

condensation, donne le mévalonate qui est phosphorylé puis décarboxylé en IPP. Il peut également être produit dans les plastes via la voie du méthylérythritol 4-phosphate (MEP) à partir de pyruvate et de glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP) (Rohmer, 1999). Lors de l'étiollement des plantules par exemple, la voie du MEP contribue à la synthèse de caroténoïdes (Rodriguez-Concepcion et al., 2004). Néanmoins, les échanges de molécules précurseurs d'isoprénoïdes entre compartiments cellulaires étant limités, les caroténoïdes présents dans les plastes sont principalement synthétisés à partir de l'IPP issu de la voie du MEP (Rodríguez-Concepción et al., 2013).

Trois molécules d'IPP et une molécule de DMAPP (diméthylallyl diphosphate), un isomère de l'IPP formé par l'IPP isomérase sont condensées par la GGPP synthase pour former le GGPP (géranylgeranyl diphosphate) (Dogbo and Camara, 1987; Kuntz et al., 1992). La condensation de deux molécules de GGPP par la phytoène synthase (PSY) forme le premier caroténoïde : le phytoène. Ce dernier est composé d'une chaîne polyénique de 40 carbones avec des doubles liaisons conjuguées, qui forment le squelette des caroténoïdes végétaux et déterminent leurs propriétés physiques et biologiques. La biosynthèse du phytoène se réalise exclusivement dans le plaste (Camara, 1984).

Pour former le lycopène à partir du 15-cis-phytoène, quatre étapes de désaturation et isomérisation catalysées par la phytoène désaturase (PDS), purifiée dans le piment en 1992 (Hugueney et al., 1992), et la  $\zeta$ -carotène désaturase (ZDS). Ces étapes permettent d'augmenter la série de doubles liaisons conjuguées, qui constituent le chromophore et donnent la couleur rouge au lycopène à partir du phytoène, incolore (Cunningham and Gantt, 1998).

Le lycopène peut ensuite subir deux types de cyclisation en bout de chaîne pour créer un cycle  $\beta$  ou un cycle  $\epsilon$ , avec la double liaison en position 5 ou 4 respectivement. La lycopène  $\beta$ -cyclase (LYCB) catalyse une réaction à deux étapes pour créer un cycle  $\beta$  à chaque extrémité de la molécule de lycopène, qui va produire du  $\beta$ -carotène, *via* le  $\gamma$ -carotène. L'autre possibilité est que la lycopène- $\epsilon$ -cyclase (LCYE) ajoute un cycle  $\epsilon$  à une extrémité pour former le  $\delta$ -carotène, puis que la LYCB ajoute un cycle  $\beta$  à l'autre extrémité pour former l' $\alpha$ -carotène, précurseur de la lutéine. Les caroténoïdes avec deux cycles  $\beta$  sont les plus fréquemment retrouvés dans les plantes, comme le  $\beta$ -carotène ou la zéaxanthine, servant principalement à protéger contre la photo-oxydation et/ou à dissiper l'énergie lumineuse (Goodwin, 1980). Les caroténoïdes qui contiennent un cycle  $\beta$  et un cycle  $\epsilon$  sont également communs dans les plantes, comme, par exemple, la lutéine, le caroténoïde prédominant dans les antennes collectrices du photosystème II. Les caroténoïdes avec deux cycles  $\epsilon$  ne sont que très rarement retrouvés chez les plantes et les algues (Goodwin, 1980).



Les étapes d'hydroxylation suivantes permettent de former les xanthophylles, qui sont des produits d'oxydation dérivés de l' $\alpha$  et du  $\beta$ -carotène. Après deux hydroxylation par la  $\beta$ -carotène hydroxylase (CRTZ), le  $\beta$ -carotène donne séquentiellement la  $\beta$ -cryptoxanthine puis la zeaxanthine. Cette dernière est facilement convertie en violaxanthine via l'antheraxanthine en introduisant des groupes 5,6-époxy dans les cycles  $\beta$  3-hydroxy par l'action de la zeaxanthine époxydase (ZEP). En cas d'intensité lumineuse trop élevée la violaxanthine dé-époxydase catalyse une réaction en deux étapes de dé-époxydation, qui transforme la violaxanthine en zéaxanthine afin de dissiper l'excès d'énergie au niveau des antennes collectrices de lumière (Demmig-Adams and Adams, 1996) (voir la partie 2.4.1).

La violaxanthine peut être convertie en xanthoxine, un apocaroténoïde, par l'intermédiaire de la 9-cis-epoxycaroténoïde dioxygénase (NCED) ou en néoxanthine par l'action de la néoxanthine synthase (NSY), qui peut également être réduite en xanthoxine par la NCED (Schwartz et al., 2003). La formation de l'ABA se fait ensuite par deux étapes nécessitant deux enzymes : une SDR (déshydrogénase/réductase à chaîne courte) et une AO (aldéhyde oxydase) (Seo and Koshiba, 2002).

### 2.3.2 Spécificité du genre *Capsicum*

Deux cétocaroténoïdes (qui contiennent une fonction cétone) sont spécifiques au genre *Capsicum* : la capsanthine et la capsorubine. Ils sont synthétisés à la suite d'un réarrangement du cycle epoxy-cyclohexenyl de l'antheraxanthine et de la violaxanthine respectivement, des xanthophylles ayant deux cycles  $\beta$ . La conversion des 5,6-époxyxanthophylles en cétoxanthophylles a lieu au niveau des membranes des chromoplastes du fruit (Camara, 1985). Cette réaction est catalysée par la capsanthine-capsorubine synthase (CCS) qui a été isolée et caractérisée par Bouvier et al. (1994). Ces deux cétocaroténoïdes sont majoritairement retrouvés lorsque les piments deviennent rouges (De, 2003).

En effet, en clonant l'ADNc du gène *CCS*, l'analyse de l'expression dans les feuilles des plants de piments et dans les fruits pendant la maturation a montré que le gène *CCS* était spécifiquement exprimé dans le chromoplaste des fruits rouges matures (Bouvier et al., 1994). D'autres études ont montré que l'expression du gène *CCS* était induite par une blessure (Huguenev et al., 1996; Bouvier et al., 1998). En effet, l'analyse de la séquence du promoteur (-588 pb) du gène *CCS* a révélé la présence d'éléments *cis*-régulateurs *ABA* (sensible à l'acide abscissique), *ELI* (sensible à l'éliciteur), *HD* (homéodomaine) et *WUN* (sensible à la blessure) suggérant la possibilité de la régulation de l'expression de *CCS* par ces facteurs (Bouvier et al., 1998).



### 2.3.1 Régulation génétique

Il a été établi que la couleur du piment était déterminée par trois *loci*, situés sur trois paires de gènes indépendantes : *c1*, *c2* et *y* (Hurtado-Hernandez and Smith, 1985). Lefebvre et al. en 1998, ont ensuite démontré que le gène *CCS* était associé à la couleur du fruit, et que le locus *y*, codant pour la *CCS*, contrôlait la couleur rouge du fruit. La couleur jaune du piment a été associée à une délétion du gène *CCS*, tandis que la couleur orange résulte d'une réduction de l'activité de la *PSY* plutôt qu'un manque de pigments rouges (Huh et al., 2001). En effet, lors du croisement d'une variété rouge (*C. annum* cv TF68) et d'une variété Orange (*C. chinense* cv Habanero), la couleur rouge est dominante dans la descendance F1. Différents gènes candidats impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été étudiés : *GGPS*, *PSY*, *PDS*, *LCY-B* et *CCS*. Le gène *PSY* est co-ségrégé avec la couleur dans la population F2, suggérant que ce gène, qui correspond au locus *c2*, est responsable de l'accumulation de la couleur rouge. Il a donc ensuite été proposé que l'enzyme correspondante soit une enzyme clé de la régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Huh et al., 2001). D'autres observations ont permis d'identifier une mutation sur le gène *PSY* entraînant une activité défectueuse de *PSY* et donc une couleur orange correspondant à l'accumulation de zéaxanthine et de lutéine (Kim et al., 2010b).

Une autre étude sur la couleur jaune réalisée par Ha et al. (2007) a montré que le gène *CCS* était présent dans deux variétés de *Capsicum* dont la couleur à maturité est jaune. Les analyses de séquence ont révélé deux mutations structurelles sur ce gène, entraînant soit un codon stop, soit un décalage de cadre. Les transcrits du gène *CCS* n'étant pas détectables dans les piments jaunes, il semble que la couleur jaune soit due à la non expression du gène *CCS*, et non à sa suppression.

Une étude récente rapporte que le locus *c1* contrôle la couleur blanche des fruits et code pour un gène homologue de « *Arabidopsis pseudo response regulator2-like* » (*APRR2*) (Jeong et al., 2020).

Plusieurs études sur la régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes sont disponibles chez les fruits non climactériques dont le piment fait partie. Des études transcriptomiques ont révélé que, bien qu'il existe un ensemble commun de gènes qui contrôle la biosynthèse et l'accumulation des caroténoïdes, certains régulateurs spécifiques pourraient différer entre les fruits climactériques et non-climactériques (Grassi et al., 2013). Chez *Arabidopsis*, deux types de facteurs de transcription ont été identifiés comme interagissant avec le promoteur du gène *PSY* : *RAP2.2* (de la famille des ERF, ethylene response factor) et les PIFs (phytochromes interacting factors) (Welsch et al., 2007; Toledo-Ortiz et al., 2010). Villa-Rivera et al., (2022) ont procédé à une analyse transcriptomique afin de tenter d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes chez le piment. 83 facteurs de transcription ont été sélectionnés comme régulateurs potentiels des gènes

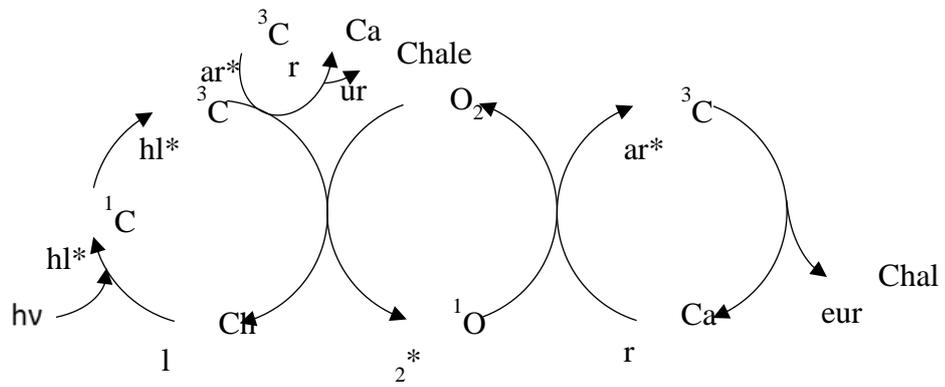


Figure 6. Représentation schématique du rôle des caroténoïdes dans la dissipation de l'énergie accumulée en excès par les chlorophylles.  $h\nu$  : photons, énergie lumineuse. Adapté de Alscher and Hess (1993).

de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Les recherches sont à poursuivre afin de mieux caractériser ces gènes chez le piment.

## 2.4 Rôles des caroténoïdes chez les plantes supérieures

### 2.4.1 Dans les chloroplastes

Dans les chloroplastes, les caroténoïdes sont associés aux chlorophylles pour former des complexes chlorophylles/caroténoïdes/protéines au niveau des membranes des thylakoïdes. Dans les photosystèmes, les caroténoïdes ont deux fonctions essentielles.

Premièrement, ils ont un rôle important de pigment accessoire dans la photosynthèse, en particulier les xanthophylles. En absorbant les radiations bleues-vertes, entre 450 et 570 nm, ils collectent l'énergie lumineuse et la transfèrent aux chlorophylles qui passent alors à un état excité. Ils permettent d'étendre la gamme de longueurs d'onde absorbées (Frank and Cogdell, 1996).

Deuxièmement, ils ont un rôle de photoprotection en protégeant les antennes collectrices des phénomènes de la photooxydation dus à l'état excité de la chlorophylle (Figure 6). Les caroténoïdes, en particulier les xanthophylles, présents dans les thylakoïdes du chloroplaste, captent l'énergie de la chlorophylle excitée dans le photosystème II, ce qui évite la formation de l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$ . Ce processus fait partie du quenching non photochimique (NPQ) (Demmig-Adams and Adams, 1996), et permet l'adaptation des plantes aux niveaux de lumière variables en évitant les dégradations dues au rayonnement excessif (Müller et al., 2001; Robert et al., 2004). Chez les plantes, la violaxanthine joue un rôle essentiel dans la dissipation de l'énergie au niveau des antennes chlorophylliennes à travers le cycle des xanthophylles, un processus enzymatique réversible et rapide (Demmig-Adams and Adams, 1996). Lorsque l'intensité lumineuse augmente, la violaxanthine est convertie en antheraxanthine puis en zéaxanthine grâce à l'activation de la violaxanthine dé-époxydase, en condition de pH acide dans le lumen et en présence d'acide ascorbique comme cofacteur (Hieber et al., 2000). La zéaxanthine permet la dissipation de l'énergie accumulée en excès par les chlorophylles sous forme de chaleur. Lorsque l'intensité lumineuse diminue, le processus est inversé. En présence de NADPH et d'oxygène, la zéaxanthine est convertie en antheraxanthine puis en violaxanthine via l'action de la zéaxanthine époxydase (Ze) dans le stroma (Demmig-Adams and Adams, 1996).



### 2.4.2 Dans les chromoplastes

Certains caroténoïdes ont également un rôle de pigmentation. Ils ont une couleur perceptible lorsqu'ils possèdent au moins 7 doubles liaisons conjuguées (Rodriguez-Amaya, 2001). Ils donnent leur couleur aux fleurs et aux fruits, dans lesquels ils s'accumulent. Dans les chromoplastes, leur principale fonction est de rendre l'organe attractif pour la pollinisation et la dissémination des graines par les animaux à partir des fruits (Bartley and Scolnik, 1995). Ils sont responsables notamment de la couleur des fruits allant de jaune à rouge, et sont présents en grande quantité dans les fruits du genre *Capsicum*. La composition des fruits en caroténoïdes varie entre chaque variété et selon le stade de maturation. Ainsi une variété rouge possède majoritairement de la capsanthine et de la capsorubine. Dans les variétés oranges, la zéaxanthine est majoritairement présente et un peu de capsanthine et capsorubine peuvent également être trouvées. Dans les variétés jaunes, en revanche, ces deux composés, ainsi que leur précurseur, la violaxanthine, sont absents, et on retrouve des pigments jaunes en grande quantité, comme la lutéine (Todd et al., 2016).

Les caroténoïdes ont également une activité antioxydante dans les fleurs et les fruits et protègent plus globalement la plante entière, des phénomènes d'oxydation dus aux ROS. De plus, ils protègent également les membranes en raison de leur caractère lipophile (Stahl and Sies, 2003).

## 2.5 Dynamique d'évolution pendant la maturation

Les piments accumulent des caroténoïdes jaunes, oranges et rouges pendant la maturation. Lors des premiers stades de la maturation, les fruits sont de couleur verte en raison de la présence de chloroplastes. Ces organites subissent de profondes modifications lors de l'avancement de la maturation, pour devenir des chromoplastes et accumuler des caroténoïdes (Camara and Brangeon, 1981). Les caroténoïdes dans les chromoplastes ne sont pas directement accessibles. 95% des caroténoïdes sont accumulés dans des substructures spécifiques : les microfibrilles (Deruère et al., 1994). Ces fibrilles sont alignées le long des axes longitudinaux des chromoplastes et contiennent des galactolipides, des phospholipides et une protéine de 32 kDa appelée fibrilline, associée aux caroténoïdes présents sous forme d'esters. Un modèle d'architecture des fibrilles suggère que les caroténoïdes s'accumulent au centre des fibrilles et sont entourés par une couche de lipides polaires (galactolipides et phospholipides), qui, à leur tour, sont entourés par une couche externe de fibrilline, celle-ci directement attachée au stroma plastidial (Deruère et al., 1994).

Lors du processus de maturation, les différentes couleurs du fruit sont induites par différents pigments. La couleur verte est principalement due aux chlorophylles. Les anthocyanes donnent la



couleur violet/pourpre. La couleur jaune/orangée est assurée par l' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène, la zéaxanthine, la lutéine et la  $\beta$ -cryptoxanthine, tandis que la couleur rouge est due à des céto-caroténoïdes comme la capsanthine, la capsorubine ou la capsanthine-5,6-époxyde, qui possèdent un ou plusieurs groupes carbonyle dans leur cycle  $\beta$ -ionone (Sun et al., 2007).

La composition en caroténoïdes évolue lors de la maturation du fruit, aussi bien de manière quantitative que qualitative. Ces changements sont affectés par les conditions de culture ou de conservation mais également par le génotype. Les poivrons (*C. annuum*) présentent une teneur en caroténoïdes croissante entre les stades vert et rouge, passant de 8,2  $\mu\text{g/g}$  MF à 16,7  $\mu\text{g/g}$  MF (Zhang and Hamazu, 2002). La concentration en caroténoïdes des fruits d'un génotype du type variétal 'Habanero' (*C. chinense*) augmente d'un facteur 6 entre le stade vert immature et le stade rouge mature (627  $\mu\text{g/g}$  MF à 3 620  $\mu\text{g/g}$  MF) (Menichini et al., 2009).

Cette concentration augmente à partir de 50 jours après la floraison dans des fruits de *C. annuum* var *annuum* 'Karayatsubusa' (Iwai et al., 1979a) et peut augmenter jusqu'à un facteur 60 selon les variétés et les conditions environnementales (Gómez-García and Ochoa-Alejo, 2013).

Ces changements sont déterminés par deux processus métaboliques : (1) la transformation des pigments photosynthétiques existants (dégradation de la lutéine) et (2) la synthèse *de novo* des caroténoïdes (Howard et al., 2000).

Dans les fruits des cultivars 'Bola' et 'Agridulce' (*C. annuum*), les pigments chlorophylliens présents aux stades vert et tournant disparaissent aux stades rouges I et II (fruit mature) tandis que les concentrations en intermédiaires de synthèse des pigments rouges ( $\beta$ -carotène et violaxanthine) augmentent et que d'autres pigments sont synthétisés *de novo* : zéaxanthine, capsanthine, capsorubine,  $\beta$ -cryptoxanthine et capsolutéine (Minguez-Mosquera and Hornero-Mendez, 1994). Dans les fruits de couleur jaune/orange des espèces *C. baccatum*, *C. pubescens* et *C. annuum*, la violaxanthine est le caroténoïde majoritaire, et représente 37 à 68 % des caroténoïdes totaux, suivi par la cis-violaxanthine, l'anthéroxanthine et la lutéine qui représentent, eux, de 5 à 14% (Rodríguez-Burruezo et al., 2010).

La capsanthine peut représenter jusqu'à 63% des caroténoïdes totaux dans les stades avancés de la maturation (Gómez-García and Ochoa-Alejo, 2013). C'est un pigment rouge principalement synthétisé dans les fruits du genre *Capsicum* mais aussi dans les espèces *Lilium*, *Aesculus* et *Berberis*, et dans les fruits de *Asparagus officinalis* (Valadon and Mummery, 1977; Deli et al., 2000).

Dans le piment, les xanthophylles sont présents majoritairement sous forme estérifiée avec des acides gras, ce qui les rend liposolubles et facilite leur accumulation dans les globules lipophiles des



chromoplastes (Matsufuji et al., 1998). Cette estérification est considérée comme un processus directement lié à la transformation du chloroplaste en chromoplaste permettant l'accumulation des xanthophylles dans les plastoglobules riches en lipides (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera, 2000). La capsanthine, par exemple, est estérifiée au cours de la maturation. Dans un fruit rouge mature, la capsanthine non estérifiée représente 20 à 30% de la capsanthine totale, tandis que les formes mono- et di-estérifiées représentent 20 à 30% et 40 à 50%, respectivement (Camara and Monéger, 1978; Mínguez-Mosquera and Hornero-Mendez, 1994). Les monoesters de capsanthine sont principalement des acides gras insaturés comme l'acide linoléique, tandis que les diesters de capsanthine sont majoritairement des acides gras saturés comme les acides laurique, myristique et palmitique (C12, C14, C16 respectivement) (Biacs et al., 1989). Cette estérification ne modifie pas le chromophore et donc le spectre d'absorption de la molécule est le même avec ou sans estérification (Britton, 1996). Elle diminue la polarité de la molécule et augmente le poids moléculaire, ce qui, lors de l'analyse chromatographique, augmente le temps de rétention, qui devient plus élevé que celui des carotènes lorsqu'ils sont séparés en phase inverse (C18 ou C30) (Bunea et al., 2014).

La maturation des fruits de piment affecte le pouvoir antioxydant des caroténoïdes. Les fruits verts non matures montrent un pouvoir antioxydant plus faible que les fruits rouges matures, ce qui est expliqué par l'augmentation des concentrations en caroténoïdes, flavonoïdes, composés phénoliques et acide ascorbique (Sun et al., 2007). De plus, le pouvoir antioxydant peut être modifié par le génotype, les conditions de culture et la conservation post-récolte (Deepa et al., 2007).

La voie de biosynthèse des caroténoïdes a été bien décrite et plusieurs mécanismes de régulation ont été suggérés, notamment l'éthylène, la lumière ou la disponibilité des substrats (Fanciullino et al., 2014). Cependant, d'après les observations de Fraser et al. (1994), l'accumulation des caroténoïdes et l'activité de certaines enzymes comme la PSY et la PDS ne sont pas corrélées durant la maturation du fruit, suggérant que la teneur en caroténoïdes finale pourrait être déterminée de manière précoce par la taille et la densité des plastes (Fanciullino et al., 2014).

## 2.6 Rôles des caroténoïdes dans la nutrition/santé animale

Certaines plantes riches en caroténoïdes sont utilisées en tant qu'aliments, comme par exemple la luzerne (*Medicago sativa*) ou le maïs (*Zea mays*). Ces végétaux, pouvant constituer la ration de base des animaux, ont une teneur élevée en caroténoïdes, pigmentant en jaune les produits. Les aliments complémentaires, comme par exemple le souci (*Tagetes erectus*), le paprika ou le piment, sont apportés en quantité plus faible mais possèdent des teneurs en caroténoïdes plus importantes (Breithaupt, 2007).



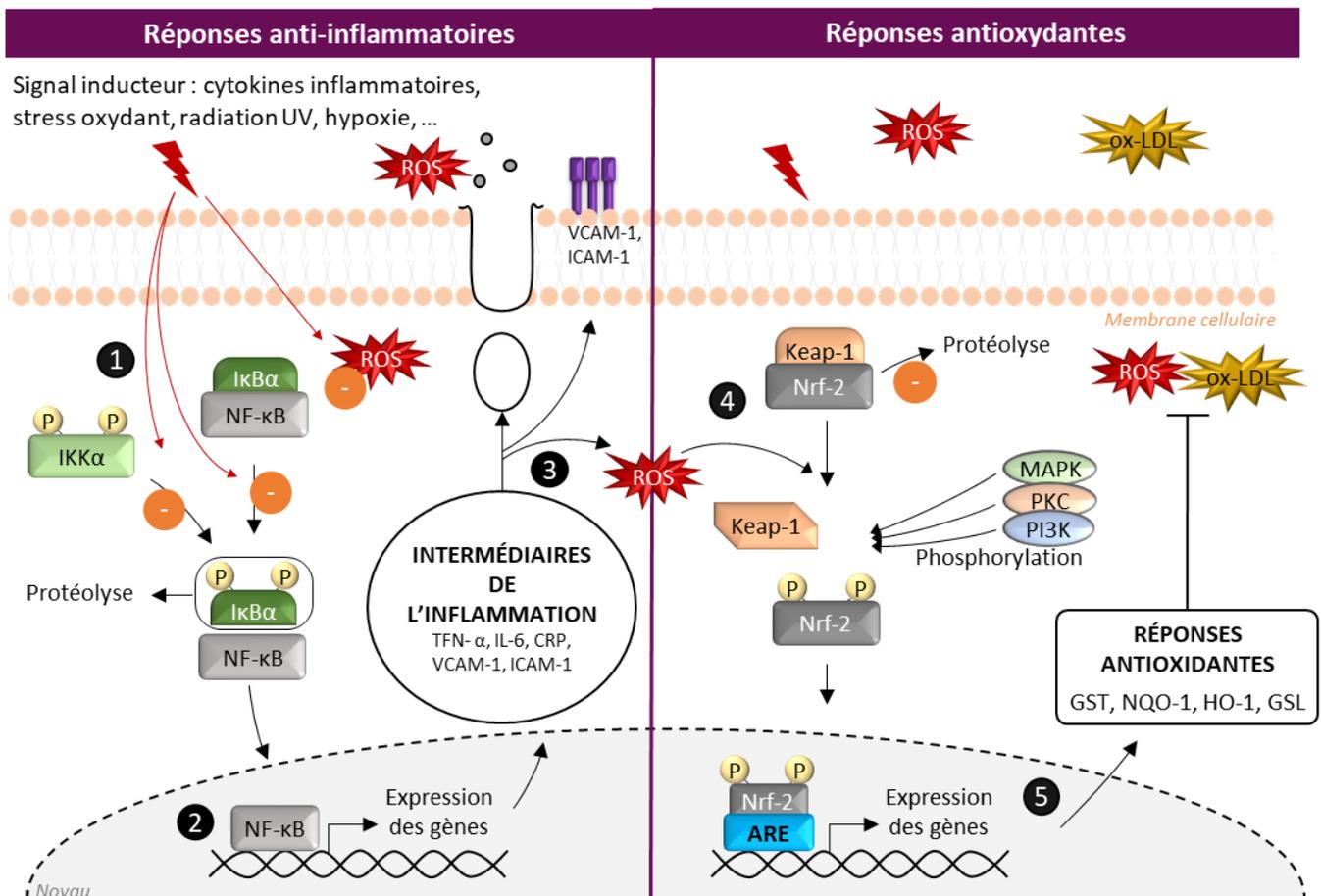
Certains caroténoïdes figurent dans le registre des additifs alimentaires de l'Union Européenne comme la capsanthine, la lutéine, la zéaxanthine, la citranaxanthine, la canthaxanthine et l'ester éthylique de l'acide  $\beta$ -apo-8'-caroténique. Ils sont autorisés dans le domaine de l'alimentation animale afin d'augmenter les performances productives (poids de l'animal), la stabilité oxydative des produits ou la coloration des jaunes d'œufs et de la peau des volailles (Ševčíková et al., 2008; Marounek and Febriansyah, 2018). Les caroténoïdes peuvent également être apportés dans des matières premières, telle que la poudre de piment, et ne sont, dans ce cas-là, plus soumis à la réglementation.

Les xanthophylles, caroténoïdes plutôt polaires, sont accumulés dans la peau des poulets et le jaune d'œuf, leur donnant une couleur appréciée des consommateurs, contrairement aux caroténoïdes plus apolaires. Les apocaroténoïdes, la canthaxanthine et la zéaxanthine peuvent être utilisés pour la coloration du jaune (Nys, 2000). Le paprika ou piment doux est utilisé pour ses propriétés de pigmentation rouge. Il contient divers xanthophylles le plus souvent estérifiés et notamment de la capsanthine principalement, de la capsorubine, du  $\beta$ -carotène, et d'autres caroténoïdes qui lui confèrent sa coloration propre.

Certains caroténoïdes, comme le  $\beta$ - ou l' $\alpha$ -carotène, sont des précurseurs de la vitamine A (provitamine A) (Olson, 1989). Le  $\beta$ -carotène possède l'activité vitamine A la plus importante car le clivage de cette molécule entraîne la formation de deux molécules de vitamine A ou rétinol, tandis que les autres caroténoïdes possédant une activité pro-vitaminique A, comme l' $\alpha$ -carotène ou la  $\beta$ -cryptoxanthine, ne forment qu'une seule molécule de rétinol. Les aliments complémentaires pour le bétail à base de  $\beta$ -carotène permettent de supplémer les rations pour maintenir les niveaux de provitamine A et également assurer la couleur jaune des produits laitiers et matières grasses (Britton, 1996).

Une autre raison principale de leur usage est leur fonction antioxydante. Les caroténoïdes protègent les structures biologiques des attaques dues aux ROS, et principalement à l'oxygène singulet. Cette fonction confère aux caroténoïdes des propriétés anticarcinogènes et antimutagènes. Les activités antioxydantes de chaque caroténoïde sont différentes. La supplémentation de la ration alimentaire d'une espèce de goéland (*Larus michahellis*) par de la lutéine a augmenté la capacité antioxydante totale du plasma et les niveaux de vitamine E, tandis que la supplémentation en  $\beta$ -carotène n'a pas eu cet effet (Lucas et al., 2013).

L'estérification des molécules ne modifie pas la capacité antioxydante des caroténoïdes. La capsanthine, par exemple, possède 11 doubles liaisons, avec une cétone et un cyclopentane, et son activité antioxydante est plus importante que celle du  $\beta$ -carotène (Maoka et al., 2001). La capsanthine



- Inhibition par les caroténoïdes

Figure 7. Réponses anti-inflammatoires et antioxydantes chez les animaux et étapes inhibées par les caroténoïdes. L'étape 1 représente la libération de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription qui régule la réponse cellulaire à l'inflammation, par la dégradation de la fraction protéique I $\kappa$ B $\alpha$  suite à sa phosphorylation par IKK $\alpha$ . Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B va ensuite induire la synthèse de gènes codants pour des molécules pro-inflammatoires et d'adhésion (étape 2) qui vont être libérés hors de la cellule, ou se fixer sur la membrane cellulaire (étape 3). L'augmentation des ROS intracellulaires déclenche le changement de conformation de la protéine Keap-1, libérant le facteur de transcription Nrf-2, qui régule la réponse cellulaire au stress oxydatif (étape 4). Lorsqu'il n'y a pas de stimulation, le complexe est maintenu inactif et peut être dégradé par le protéasome. Après phosphorylation, Nrf-2 va entrer dans le noyau, se fixer sur des séquences ARE (antioxydant responsive elements) et induire l'expression de nombreux gènes codants pour des protéines à pouvoir antioxydant (étape 5). Les caroténoïdes ont une action anti-inflammatoire par inhibition de la phosphorylation et libération du NF- $\kappa$ B (étape 1) et une action antioxydante par inhibition directe sur les ROS (représentée à l'étape 1), et sur la protéolyse du complexe (étape 4).

ox-LDL : lipoprotéine de faible densité oxygée; ARE : éléments de réponse antioxydante (antioxidant responsive elements); CRP : C-reactive protein; GSL : glutaminase; GST : glutathione S-transférase; HO-1 : hème oxygénase 1; ICAM-1 : molécules d'adhésion; I $\kappa$ B $\alpha$  : sous-unité inhibitrice de NF- $\kappa$ B; IKK $\alpha$  : I $\kappa$ B kinase; IL-6 : Interleukine-6; Keap-1 : Kelch Like ECH Associated Protein 1; MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase; NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B; NQO-1 : NAD(P)H quinone déshydrogénase 1; Nrf-2 : NF-E2-related factor 2; PI3K : phosphoinositide 3-kinase; PKC : protéine kinase C; TFN- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor; VCAM-1 : molécules d'adhésion. D'après Kaulmann and Bohn, 2014; Goszcz et al., 2017; Singh et al., 2020.

estérifiée partiellement ou totalement avec des acides gras limite l'oxydation du méthyl-linoléate d'une manière similaire à la capsanthine non estérifiée, ce qui signifie que le pouvoir antioxydant serait principalement dû à la chaîne polyène, et en particulier au groupe céto conjugué (Matsufuji et al., 1998).

Le  $\beta$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine ont le même nombre de doubles liaisons que la capsanthine mais leur pouvoir antioxydant est plus faible. En effet, Hirayama et al. (1994) ont montré que le pouvoir antioxydant des caroténoïdes augmente avec le nombre de doubles liaisons, mais varie selon la structure de la chaîne et la présence de groupes fonctionnels. Ainsi, un groupe cétone augmenterait le pouvoir antioxydant, tandis qu'un groupe hydroxyle (R-OH), époxy (R-COC-R) ou méthoxy (R-O-CH<sub>3</sub>) auraient tendance à le diminuer. La capsorubine, qui possède deux groupes cétones, a un pouvoir antioxydant plus élevé que la capsanthine (Maoka et al., 2001).

Il semblerait que les poules pondeuses, volailles adultes, hydrolysent efficacement les xanthophylles estérifiés et qu'une saponification préalable n'améliore pas la bioassimilation des xanthophylles dans le sang des poules et dans le jaune d'œuf (Breithaupt, 2007). Il convient de distinguer bioassimilation et biodisponibilité. La bioassimilation se définit par la capacité des caroténoïdes à être absorbés par les entérocytes (Ekesa et al., 2012), alors que la biodisponibilité désigne le fait d'être mis à profit des fonctions physiologiques de l'organisme (Sy et al., 2012). La bioassimilation est donc un des critères de la biodisponibilité (Amorim-Carrilho et al., 2014). La meilleure biodisponibilité entre la forme libre et la forme estérifiée des xanthophylles est toujours en discussion ; néanmoins elle dépend également de la morphologie des chromoplastes. Par exemple, le  $\beta$ -carotène et le lycopène sous la forme de très petits cristalloïdes dans les chromoplastes des fruits de papaye ont été associés à une meilleure biodisponibilité par rapport au  $\beta$ -carotène et au lycopène sous la forme de grands cristalloïdes, tels qu'on peut les trouver dans la tomate et la carotte (Schweiggert et al., 2014).

Les caroténoïdes jouent un rôle important dans les réponses anti-inflammatoire et antioxydante des animaux (Figure 7). Par exemple, le  $\beta$ -carotène prévient l'inflammation intestinale induite par le sevrage en modulant le microbiote intestinal chez les porcelets (Li et al., 2021), et le lycopène inhibe la réponse inflammatoire et augmente la capacité antioxydante chez les porcs d'engraissement, ce qui induit le maintien de la santé intestinale (Liu et al., 2022a).

En conditions d'homéostasie, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B impliqué dans la réponse à l'inflammation, est lié à sa protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  dans le cytoplasme. Lors d'une stimulation, c'est-à-dire en présence d'un stress oxydatif, de cytokines inflammatoires ou en condition d'hypoxie, la protéine I $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylée par le complexe IKK $\alpha$ , entraînant une ubiquitination et protéolyse de



cette protéine (Figure 7, étape 1). Le NF- $\kappa$ B, libre est alors transloqué dans le noyau entraînant l'expression des gènes codant pour les cytokines de l'inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP), ou pour des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) qui entraînent le recrutement des leucocytes (Figure 7, étapes 2 et 3) (Tak and Firestein, 2001). Linnewiel-Hermoni et al., (2014) suggèrent que les caroténoïdes ou leurs dérivés peuvent interagir avec les résidus cystéine des sous-unités IKK $\alpha$  et/ou NF- $\kappa$ B lors de l'étape 1, et ainsi inactiver la voie du NF- $\kappa$ B en empêchant la libération du NF- $\kappa$ B et donc l'expression des gènes associés.

Outre leur action de neutralisation des ROS, les caroténoïdes peuvent agir sur l'oxydation par des voies indirectes. Plusieurs études montrent que la production de ROS va entraîner la modulation de facteurs de transcription, et notamment le Nrf-2 (Lee et al., 2005b; Na and Surh, 2008). Le facteur Nrf-2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) est retrouvé sous forme inactive dans la cellule, lié à la protéine Keap-1, qui une fois activée, se détache de Nrf-2. Cette activation correspond à un changement de conformation, qui est déclenché par la présence de ROS et de certaines protéines kinases (Sahin et al., 2013). Le facteur va ensuite être transporté dans le noyau et se lier aux promoteurs des séquences « Antioxydant responsive element » (ARE) déclenchant l'expression des gènes codants pour des enzymes de détoxification comme la glutathion-S-transférase (GST), la glutaminase (GSL), la NAD(P)H quinone déshydrogénase 1 (NQO-1) ou l'hème oxygénase (HO-1), ce qui favorise la cytoprotection (Lee et al., 2005b; Kim et al., 2010a). Sans activation de la protéine Keap-1, le complexe Keap-1/Nrf-2 est dégradé par ubiquitinylation, empêchant donc la transcription des gènes codants pour les enzymes détoxifiantes (Kansanen et al., 2013). Les caroténoïdes semblent agir sur la protéine Keap-1, en modifiant sa conformation, permettant la libération de la protéine Nrf-2 (Jung and Kwak, 2010).

## 2.7 Régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes par les facteurs environnementaux

La composition biochimique des piments est étroitement liée au génotype, au processus de maturation et aux conditions environnementales. Les facteurs environnementaux qui affectent la biosynthèse, le métabolisme et l'accumulation des métabolites secondaires comprennent entre autres la lumière, la température, la disponibilité en eau du sol, et la fertilisation des plantes. Les stress abiotiques entraînent la production de ROS, qui à leur tour favorisent la biosynthèse des caroténoïdes par le biais de la signalisation redox (Fanciullino et al., 2014). Bouvier et al. (1998) ont démontré *in vivo* que les ROS induisent l'expression des gènes de synthèse des caroténoïdes dans le piment. Dans les fruits, l'augmentation des ROS peut stimuler indirectement la production de caroténoïdes en



favorisant le développement du fruit et la conversion des chloroplastes en chromoplastes (Fanciullino et al., 2014).

Le statut carboné, et plus précisément la concentration en sucres peut également agir sur l'accumulation des caroténoïdes. L'impact des sucres sur la production de caroténoïdes est conditionné par l'ontogenèse du fruit et est probablement indirect : l'accumulation de sucres solubles pendant les premiers stades du développement du fruit exerce une influence négative sur le développement des plastes. Par conséquent la biosynthèse des caroténoïdes est impactée : elle est directement liée à la taille et aux nombres de plastes (Poiroux-Gonord et al., 2013). Aux stades suivants, une fois les chromoplastes formés, l'impact négatif n'a plus lieu. Ainsi, l'accumulation de sucres augmente la production de caroténoïdes en favorisant la maturation des fruits, et plus probablement, en fournissant des niveaux plus élevés de précurseurs (Fanciullino et al., 2014). L'accumulation finale des caroténoïdes ne dépend pas simplement de la maturation mais également des processus qui se produisent au début du développement du fruit, des facteurs environnementaux et d'une régulation post-transcriptionnelle (Marty et al., 2005; Fanciullino et al., 2014).

Dans les tissus photosynthétiques, l'augmentation des caroténoïdes suite à un stress peut être expliquée par leur rôle d'antioxydants, et leur rôle de dissipation de l'excès d'énergie à travers le cycle des xanthophylles (Mozzo et al., 2008; García-Plazaola et al., 2012).

Les principaux facteurs environnementaux affectent la concentration en caroténoïdes sur les piments en culture ou après récolte de différentes façons.

### 2.7.1 Température

La température impacte les métabolites secondaires dans la plante ou dans le fruit lors de la culture, mais également dans le fruit en conservation après récolte. Une température sub-optimale en cours de culture est souvent corrélée avec une luminosité faible. Ces deux stress combinés ont permis d'augmenter les concentrations en zéaxanthine dans les feuilles d'un facteur 6 à 8 en comparaison avec des plants témoins dans les variétés 'Longjiao 5' et 'Hangjiao 4' (*C. annuum*) cultivés en serre mais pas d'autres caroténoïdes impactés (Zhang et al., 2020).

Dans les fruits après récolte, la conservation à 30°C des piments matures verts a permis une accumulation plus élevée en caroténoïdes qu'une conservation à 20°C, ainsi qu'une surexpression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (*PSY*, *LCY-B*, *CrtZ* et *CCS*). Pola et al., (2020) recommandent donc une température de 30°C pour la conservation des piments matures verts afin



d'obtenir la couleur rouge intense et l'accumulation des composés phytochimiques demandées par l'industrie.

Les températures nécessaires à l'accumulation des caroténoïdes peuvent différer selon les fruits mais coïncident avec des températures plutôt élevées. Par exemple, les concentrations en caroténoïdes totaux dans les fruits en maturation post-récolte ont augmenté chez le melon amer lorsqu'ils sont stockés verts à 35°C (Tran and Raymundo, 1999) et chez la banane stockée à 30°C (Seymour et al., 1987; Fu et al., 2019). En revanche, les températures supérieures à 30°C chez la tomate inhibent l'accumulation de lycopène dans le fruit (Pecker et al., 1996).

### 2.7.2 Lumière

La lumière est un facteur important qui dirige les processus physiologiques tels que la photosynthèse, la photomorphogenèse, le développement du fruit ou encore la maturation (Casierra-Posada et al., 2014; Binotti et al., 2018). L'interaction des plantes avec la lumière se fait par différents pigments et photorécepteurs. Les principaux photorécepteurs sont les chlorophylles, les caroténoïdes associés à ces derniers dans les antennes collectrices de lumière, les phytochromes, les cryptochromes pour les rayonnements dans le domaine du visible, les phototropines, ainsi que la protéine UV-B-Resistance 8 (UVR8) qui perçoit les UV-B et les UV-C (Jiao et al., 2007; Aarouf et al., 2022a).

L'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes est directement influencée par la lumière (visible et UV). Elle stimule l'expression du gène *Psy*, pour moduler la biosynthèse des caroténoïdes pendant la photomorphogenèse ou la désétiolation, processus qui se traduit par la transition de l'étioplaste au chloroplaste (Quian-Ulloa and Stange, 2021). Elle peut également agir sur l'isomérisation du 9,15,9'-tri-cis- $\zeta$ -carotène en  $\zeta$ -carotène (Gómez-García and Ochoa-Alejo, 2013). La formation et la croissance de poivrons (*C. annuum* cv. Sirocco) à l'obscurité (fruit recouvert) entraînent une diminution de la concentration en caroténoïdes et une diminution de l'expression du gène *Psy* par rapport à des fruits cultivés en lumière directe (Yoo et al., 2020).

La quantité et la qualité de la lumière influencent la biosynthèse des caroténoïdes. Il a été montré qu'une forte exposition à la lumière favorisait l'accumulation des caroténoïdes chez la pomme (Li and Cheng, 2008) et chez l'orange (Schwanz et al., 1996). Les filets d'ombrage, utilisés pour la culture de piments notamment, ont pour objectif de protéger les plantes de niveaux de lumière excessifs. Lorsque les piments sont cultivés sous ces filets d'ombrage, la concentration en caroténoïdes augmente, notamment la capsanthine, la lutéine, la zéaxanthine et la violaxanthine, avec un effet dépendant de la variété (Ambrózy, 2016; Ombódi et al., 2016; Lekala et al., 2019).



La qualité de la lumière influence également ces concentrations. Avec des longueurs d'ondes spécifiques, les concentrations en  $\beta$ -carotène et en lycopène augmentent chez la tomate (700-1100 nm) (Gautier et al., 2005). Le rôle de pigments accessoires et de photoprotecteurs des caroténoïdes, en dissipant l'énergie au niveau des chlorophylles, entraîne des pertes en caroténoïdes qui sont compensées par une synthèse accrue. Cette régulation s'exerce au niveau transcriptionnel. Les niveaux d'ARNm du gène *Psy* sont plus élevés dans les feuilles de tomate et d'*Arabidopsis* lorsqu'elles sont exposées à la lumière (Giuliano et al., 1993; Lintig et al., 1997). Le promoteur du gène *Psy* semble impliqué dans cette régulation (Welsch et al., 2003).

De nombreuses études ont été réalisées sur l'évolution des caroténoïdes pendant la conservation après récolte. L'utilisation d'UV-C en conservation *post-récolte* augmente les concentrations en caroténoïdes lorsqu'ils sont appliqués à faibles doses (Promyou, 2012; Castillejo et al., 2022), une forte dose entraînant un impact négatif sur la photosynthèse et des dommages tissulaires (Bornman et al., 1983). D'autres études ont rapporté en revanche une diminution des caroténoïdes à la suite d'un traitement UV-C sur les plantes de piment (Mahdavian et al., 2008a; Sarghein et al., 2008) ou sur les fruits en conservation (Vicente et al., 2005). Ces effets sont grandement modifiés selon la dose d'application.

Le stockage des fruits de type 'Habanero' (*C. chinense*) dans des emballages fermés à basse température sous traitement à la lumière bleue et aux UV-C réduit les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes. Cette réponse pourrait être attribuée à la synthèse de pigments photosynthétiques dans les chloroplastes pour protéger les photosystèmes (Pérez-Ambrocio et al., 2018).

### 2.7.3 Statut hydrique

#### 2.7.3.1 Définition

Le stress hydrique est l'un des facteurs affectant limitant les productions végétales (Webber et al., 2018). Le déficit hydrique résulte d'un déséquilibre entre la quantité d'eau disponible dans le sol, et la demande en évaporation due aux conditions environnementales (Tardieu et al., 2011; Du et al., 2013). Les plantes ont une certaine capacité d'adaptation à l'état hydrique du sol fluctuant régulièrement et de manière peu prédictible. La déviation de l'état hydrique de l'optimum n'entraîne pas nécessairement un stress hydrique. Le stress est l'altération de la condition physiologique causée par les facteurs qui tendent à modifier son équilibre (Chaves et al., 2002; Gaspar et al., 2002; Chaves et al., 2003; Hu et al., 2006).

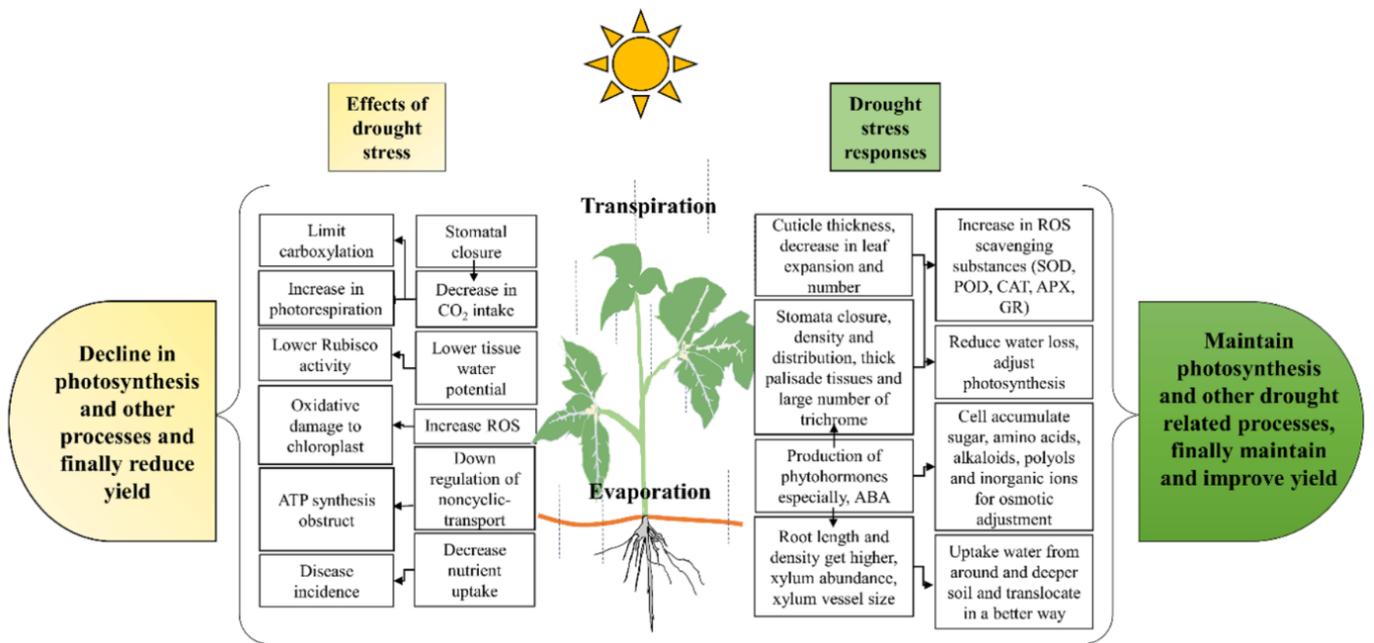


Figure 8. Effets du stress hydrique et réponses morpho-physiologiques des plantes (Ilyas et al., 2021)

Les plantes présentent généralement quatre types de mécanismes de réponse au stress hydrique, à savoir la tolérance, l'évitement, la fuite et la récupération (Fang and Xiong, 2015). La tolérance et l'évitement de la sécheresse sont les principales stratégies des plantes contre le stress du déficit hydrique.

La tolérance à la sécheresse est la capacité de la plante à résister à la déshydratation par le biais de diverses activités physiologiques, telles que l'ajustement osmotique via des osmoprotectants (Luo 2010). Ces ions inorganiques et solutés organiques réduisent le potentiel osmotique en augmentant leurs concentrations et augmentent ainsi la rétention d'eau cellulaire (Fang and Xiong, 2015). Dans les plantes, les osmoprotectants les plus courants sont la proline, le tréhalose, le fructane, le mannitol, la glycine-bétaïne et d'autres (Zhu, 2002). Cependant, toutes les plantes n'accumulent pas ces composés en quantités suffisantes pour éviter les effets néfastes du stress de la sécheresse (Penna, 2003), mais c'est le cas du piment (*C. chinense* et *C. annuum*), qui ont accumulé de la proline (augmentation d'un facteur 19) et de la glycine bêtaïne (augmentation d'un facteur 3) à la suite d'un stress hydrique (Escalante-Magaña et al., 2019a).

L'évitement de la sécheresse est la continuité des processus physiologiques, par exemple la régulation des stomates et le développement du système racinaire pendant le déficit hydrique. Le stress hydrique entraîne chez les plantes une réduction de la pression de turgescence et une fermeture des stomates, limitant la transpiration et diminuant l'activité photosynthétique. Cette fermeture des stomates peut être considérée comme une réponse positive de la plante, permettant une économie d'eau, mais la diminution de la photosynthèse qui l'accompagne et la réduction de la croissance foliaire ont un effet négatif sur l'assimilation du carbone (Khalid et al., 2022).

La fuite est la capacité à adapter leur cycle de vie (cycle de vie court pour éviter le stress hydrique) (Ilyas et al., 2021).

La récupération est la capacité de la plante à reprendre sa croissance après l'exposition à un stress de sécheresse extrême (Manavalan et al., 2009). Les réponses morpho-physiologiques des plantes pour tolérer, éviter, fuir ou récupérer ont été illustrées dans la figure 8.

Le déficit hydrique réduit souvent la taille de la plante et le nombre de fleurs par plante. Lorsque le stress hydrique est sévère au moment de la pollinisation, la fécondation et la nouaison sont susceptibles d'être inhibées en raison d'une réduction des flux d'eau et de carbone vers le fruit (Khalid et al., 2022). La diminution du nombre de fruits noués, donc de fruits en compétition pour les assimilats carbonés, peut à l'inverse favoriser la croissance des fruits restants (Ripoll et al., 2016b).



Globalement, en fonction du stade de la plante et du fruit, un déficit d'irrigation modéré constitue un levier potentiel à explorer pour améliorer la qualité du fruit sans réduction forte de sa taille (Ripoll et al., 2014a).

### 2.7.3.2 Conséquences sur les concentrations en caroténoïdes

Les conséquences du stress hydrique sur les concentrations en caroténoïdes sont différentes en fonction des espèces et en fonction de la sévérité du stress appliqué. De manière générale, tout stress biotique ou abiotique modéré (qui ne conduit pas à la sénescence) entraîne la formation de ROS (Fanciullino and Gautier, 2014). D'après Bouvier et al. (1998), les stress oxydatifs augmentent l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Les stress biotiques et abiotiques, par la génération de ROS, influencent l'accumulation des caroténoïdes. De plus, dans les fruits nourris par des feuilles soumises à des conditions propices au stress photo-oxydatif comme la sécheresse, la synthèse des caroténoïdes peut être stimulée par des concentrations élevées de carbohydrates dans les feuilles, par un processus impliquant la signalisation entre les feuilles et les fruits (Fanciullino et al., 2014).

Il est intéressant de noter que l'ABA, dont la formation par la dégradation de la violaxanthine ou néoxanthine est augmentée en réponse à un stress hydrique (Nambara and Marion-Poll, 2005), régule à la hausse l'expression de *PSY3* dans le riz soumis à un stress salin, exerçant ainsi un rétrocontrôle positif de la biosynthèse des caroténoïdes (Welsch et al., 2008).

Chez la tomate, la réponse au stress hydrique a induit l'augmentation de la concentration en caroténoïdes uniquement chez certains cultivars (Matsuzoe et al., 1998). Dans une autre étude, la concentration en lycopène, en  $\beta$ -carotène et en xanthophylles de la tomate n'a pas été influencée par le stress hydrique (Zushi and Matsuzoe, 1998), tandis que dans l'étude de Riggi et al. (2008), ces concentrations dans la tomate ont diminué.

Les effets de la salinité sont similaires à ceux du stress par une sécheresse, car la salinité module le déséquilibre du potentiel osmotique dans le système sol-plante en empêchant l'absorption efficace de l'eau. Chez la tomate, un stress salin (5,5 dS/m) peut entraîner une augmentation de la concentration en lycopène par rapport à la matière sèche d'un facteur 2 à 3 (Borghesi et al., 2011). Atkinson et al. (2011) ont observé qu'un stress hydrique appliqué sur des plants de tomate en croissance peut réduire de 30 à 35% la concentration en lycopène et en  $\beta$ -carotène dans la matière fraîche des fruits.

Dans le piment, la teneur en capsanthine dans le péricarpe diminue lors d'un stress hydrique, sans que l'expression du gène *CCS* soit diminuée. En revanche, des gènes situés plus en amont dans la voie

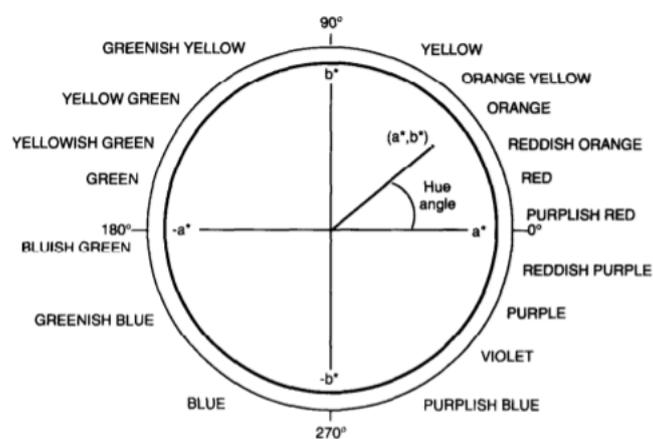


Figure 9. Diagramme CIELAB décrivant les couleurs selon leurs valeurs  $a$  et  $b$  mesurées au colorimètre. Le °Hue représente l'angle entre les axes  $a$  et  $b$ .

de biosynthèse des caroténoïdes ont montré une expression réduite en cas de stress hydrique (*Crtz* et *LCY-B*) (Tian et al., 2014).

Il convient de noter que l'expression du gène codant pour la fibrilline a été induite dans les chromoplastes et dans les chloroplastes des feuilles soumises à des stress tels que le manque d'eau, le froid ou l'excès de lumière (Chen et al., 1998; Manac'h and Kuntz, 1999)

#### 2.7.4 Nutrition minérale

Une nutrition azotée élevée pendant la croissance entraîne dans les piments, une augmentation de la concentration en lycopène et en  $\beta$ -carotène (Flores et al., 2004). Le niveau de potassium dans le milieu de culture n'a en revanche, pas montré d'effet sur les concentrations de ces deux caroténoïdes dans le piment, la tomate ou la patate douce (Aziz, 1968; Mozafar, 1993; Johnson and Decoteau, 1996). Dans le coton, le changement de ratio entre l'azote, le phosphore ou le potassium a entraîné des concentrations en caroténoïdes dans les feuilles différentes en fonction du dosage (Ahmad et al., 2021).

## 2.8 Analyses des caroténoïdes

### 2.8.1 Colorimétrie

Les caroténoïdes sont les principaux responsables de la couleur jaune à rouge du piment. Un critère non-destructif du stade de maturité et/ou un indicateur de la probable teneur en caroténoïdes est la mesure colorimétrique (Ruiz et al., 2008). Elle se fait à l'aide d'un colorimètre et ce sont les données  $L^*a^*b^*$  qui sont habituellement exploitées, 'L' représentant la clarté, 'a' la quantité relative du vert au rouge et 'b' du jaune au bleu. On peut choisir de donner les valeurs de  $L^*a^*b^*$  directement pour les comparer entre elles et avoir une idée de la couleur mesurée ou bien de les donner en °Hue, calculé à partir des deux valeurs a et b selon les règles de trigonométrie classiques appliquées au diagramme CIELAB représenté ci-dessous (Figure 8).

### 2.8.2 Extraction

Les caroténoïdes sont des molécules lipophiles aux structures diverses ; ils présentent donc différents degrés de polarités. Les carotènes, constitués uniquement d'une chaîne carbonée sans groupement fonctionnel, dont le  $\beta$ -carotène et le lycopène, sont plutôt apolaires, tout comme les caroténoïdes estérifiés. Les xanthophylles, qui contiennent au moins un atome d'oxygène tels que la



lutéine, la capsanthine ou la capsorubine, sont plutôt polaires. Ces derniers pourront être extraits par un solvant polaire tel que l'eau, l'éthanol, le méthanol et l'acétone, tandis que pour les premiers un solvant apolaire, tel que l'hexane, sera plus approprié (Amorim-Carrilho et al., 2014; Saini and Keum, 2018).

Des méthodes d'éco-extraction, plus respectueuses de l'environnement, ont été développées ces dernières années, avec notamment le développement de méthodes d'extraction sans solvant, utilisant les ultra-sons et les micro-ondes, ou une extraction supercritique au CO<sub>2</sub> (Kultys and Kurek, 2022; Vafaei et al., 2022).

Lors de l'extraction, les caroténoïdes en solution sont très sensibles à la lumière, la chaleur, l'acidité et la concentration en oxygène, étant données leurs propriétés antioxydantes. Afin de réduire au maximum leur dégradation, plusieurs mesures de précaution doivent être prises. Du carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) ou de magnésium (MgCO<sub>3</sub>) ou du bicarbonate de sodium (NaHCO<sub>3</sub>) peuvent être ajoutés afin de neutraliser les éventuels acides, qui pourraient être à l'origine de réarrangements ou d'isomérisations ; un antioxydant, tel que l'hydroxytoluène butylé (BHT), doit être ajouté, en général à 0,1% (m/v) ; le temps d'extraction doit être minimisé, et les échantillons protégés de la lumière directe ; enfin un séchage sous flux d'azote permet d'éliminer l'oxygène dans l'environnement des extraits (Saini and Keum, 2018).

### 2.8.3 Saponification

Les caroténoïdes en particulier les xanthophylles se lient partiellement puis totalement au fur et à mesure de la maturation à des acides gras, formant ainsi des esters, ce qui les rend davantage liposolubles (Breithaupt and Schwack, 2000). Afin de les identifier et de quantifier les caroténoïdes totaux réellement présents, il est possible d'hydrolyser ces esters en procédant à une saponification. Cette technique est aujourd'hui bien maîtrisée et couramment utilisée ; de nombreuses études ont visé l'optimisation de cette étape en jouant sur la durée de la saponification, la température ou encore le pH. Si les paramètres ne sont pas optimisés, il est possible de ne pas saponifier tous les caroténoïdes ou au contraire de les dégrader. La saponification se fait généralement par incubation des esters dans une solution méthanolique basique (KOH ou de NaOH), à chaud (60°C environ) et pendant plusieurs heures (Saini and Keum, 2018).

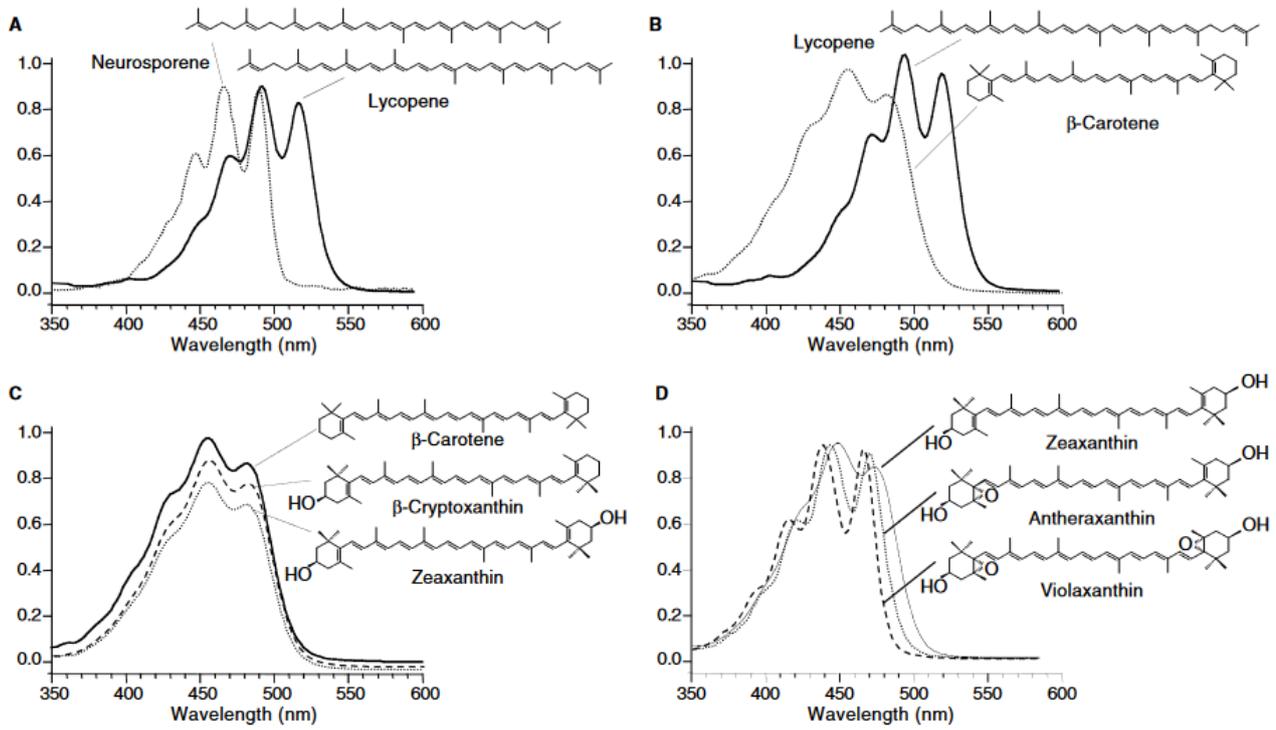


Figure 10. Les changements structuraux entraînent des changements sur le spectre d'absorption en UV-Visible. A. Augmentation de la longueur du chromophore. B. Cyclisation. C. Hydroxylation. D. Epoxydation. D'après Mínguez-Mosquera et al. (2008)

#### 2.8.4 Analyses

Les caroténoïdes sont des composés lipidiques solubles appartenant au groupe des terpènes composés de 40 carbones (tétraterpènes). Le système de doubles liaisons conjuguées des caroténoïdes au centre de la molécule constitue le chromophore absorbant la lumière qui donne aux caroténoïdes leur couleur et fournit le spectre d'absorption visible qui permet leur identification (Rodriguez-Amaya and Kimura, 2004; Pugliese et al., 2014). C'est ce chromophore qui rend les molécules particulièrement sensibles à l'oxydation (Britton, 1996).

Les caroténoïdes absorbent à des longueurs d'ondes comprises entre 450 et 570 nm. Leur spectre possède généralement trois bandes d'intensité inégale, qui varient d'un caroténoïde à l'autre (Figure 9). Plus le nombre de double liaisons conjuguées est grand, plus les longueurs d'ondes d'absorption sont grandes. Le lycopène, qui possède 11 doubles liaisons conjuguées est rouge et absorbe à 444, 470 et 502 nm. La cyclisation des caroténoïdes entraîne une diminution des longueurs d'ondes absorbées, une diminution de l'absorbance, et une diminution de la définition des pics, car les électrons des doubles liaisons des cycles ne sont plus dans le même plan que ceux de la chaîne carbonée. Ainsi, le  $\beta$ -carotène, qui possède le même nombre de doubles liaisons conjuguées que le lycopène mais qui est bicyclique, est orange et son spectre comporte un premier pic à 425 nm mal défini, puis deux autres à 450 et 477 nm (Rodriguez-Amaya, 2001).

Une méthode de quantification rapide et peu coûteuse consiste à doser les caroténoïdes totaux par spectrophotométrie dans le visible à 470 nm (Britton and Young, 1993). En solution s'applique la loi de Beer-Lambert : l'absorbance est proportionnelle à la concentration des espèces dissoutes dans cette solution et à la longueur du trajet optique. Ce dosage peut être réalisé grâce aux coefficients d'extinction molaire des caroténoïdes dans différents solvants ainsi qu'aux différentes longueurs d'ondes des spectres d'absorption (Britton, 1995). Une estimation de la quantité totale peut être réalisée en utilisant la longueur d'onde 470 nm, à laquelle les principaux caroténoïdes absorbent.

L'analyse des caroténoïdes libres ou estérifiés est possible également grâce à la chromatographie liquide en phase inverse. L'analyse des caroténoïdes estérifiés par HPLC avec détection par barrette de diodes (DAD) permet une collecte continue de données spectrophotométriques. En revanche, la complexité des mélanges et la similarité structurelle des composés compromettent l'identification sur la seule base des données spectrométriques UV/Vis. De nombreux efforts ont été déployés pour développer des méthodes d'analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse pour la détermination des caroténoïdes. Les caroténoïdes libres et estérifiés ont été étudiés par Schweiggert et al., (2005) par HPLC/APCI-MS. Les caroténoïdes majeurs et mineurs et les esters de caroténoïdes

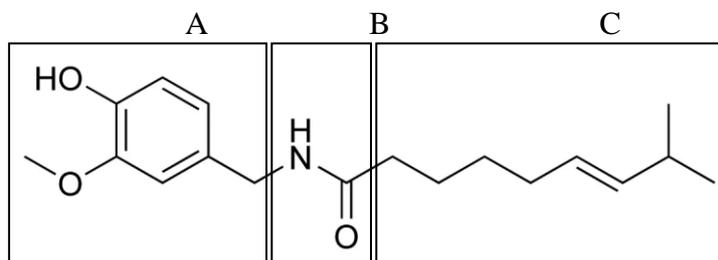


Figure 11. Les trois régions de la molécule de capsaïcine. A, noyau aromatique; B, liaison amide; C, chaîne carbonée hydrophobe.

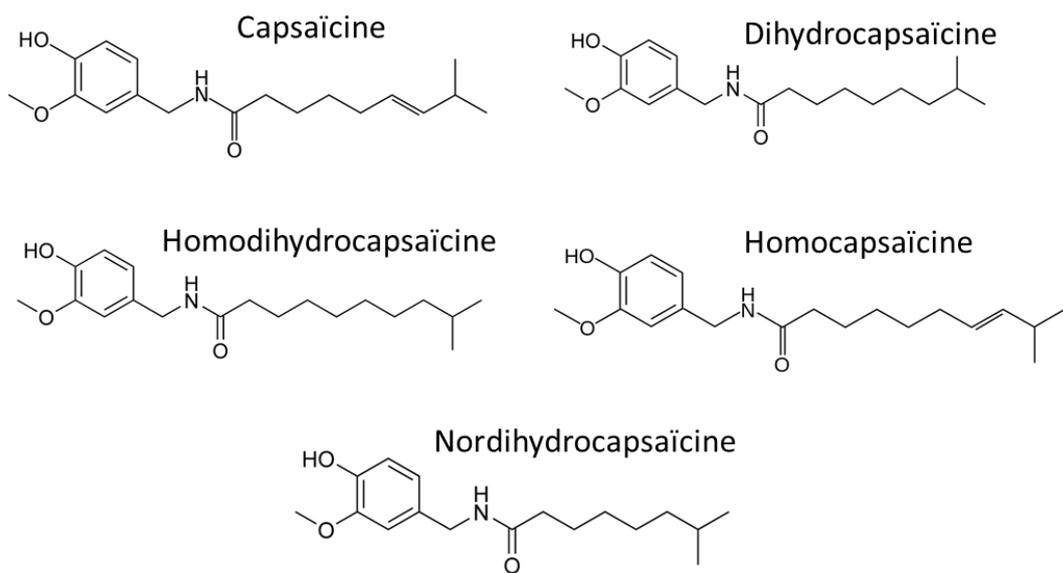


Figure 12. Structure des différents capsaïcinoïdes existants.

ont été caractérisés en mode positif et négatif avec leurs modèles de fragmentation spécifiques grâce à la spectrométrie de masse.

## 3 Les capsaïcinoïdes

### 3.1 Généralités

Les capsaïcinoïdes sont des alcaloïdes présents uniquement dans le genre *Capsicum*. Ces molécules résultent de la condensation d'un composé aromatique dérivé de la phenylalanine (vanillylamine) et d'une chaîne alkyle (acide gras à chaîne ramifiée, de 9 à 11 atomes de carbone) synthétisée à partir de la valine ou de la leucine (Curry et al., 1999). Ils sont composés d'une liaison amide (A) qui relie le noyau aromatique (B) et la chaîne carbonée hydrophobe (C) (Figure 10). Les molécules principales de la famille des capsaïcinoïdes sont la capsaïcine et la dihydrocapsaïcine (DHC), qui représentent ensemble de 77 à 90% et de 89 à 98% des capsaïcinoïdes totaux dans les fruits de *C. annuum* et *C. frutescens* respectivement (Díaz et al., 2004; Othman and Ahmed, 2011). La capsaïcine est issue d'un acide gras à chaîne ramifiée insaturée, alors que la DHC est issue d'un acide gras à chaîne ramifiée saturée (Iwai et al., 1979a). Plus de dix structures de capsaïcinoïdes existent (Mazourek et al., 2009) mais les trois autres formes retrouvées en quantité substantielle sont la nordihydrocapsaïcine (NDHC), l'homodihydrocapsaïcine (HDHC) et l'homocapsaïcine (HC) (Figure 11) (Luo et al., 2011).

Chez les végétaux, les capsaïcinoïdes jouent un rôle important dans la protection contre les herbivores, les insectes et les micro-organismes (Tewksbury and Nabhan, 2001). La capsaïcine a montré une activité antimicrobienne contre cinq espèces de champignons et deux espèces d'oomycètes, avec une action systémique dans la plante (Veloso et al., 2014).

De plus, la capsaïcine, possède un effet allélopathique, en inhibant la croissance des tiges et des racines de plusieurs espèces végétales comme la luzerne (*Medicago sativa*), le cresson (*Lepidium sativum*) ou la laitue (*Lactuca sativa*) et peut, selon la dose, supprimer la germination de ces espèces (Kato-Noguchi and Tanaka, 2003).

Les piments peuvent avoir différents degrés de piquant, directement liés à la concentration en capsaïcinoïdes. Il existe environ 200 variétés de piments présentant un degré de piquant différent, allant de 0- à 13 000 mg/kg de capsaïcine (Kozukue et al., 2005). L'échelle de Scoville, créée en 1912 par un pharmacologue du nom de Wilbur Scoville, mesure la force des piments à travers la sensation de brûlure qu'ils causent. Cette échelle a été mise au point à travers un test sensoriel. Wilbur Scoville



a dilué progressivement la capsaïcine dans l'eau pour ensuite la faire goûter à des testeurs, jusqu'à ne plus ressentir la sensation de piquant. L'unité a ainsi été établie en fonction de la quantité d'eau à mettre pour la dilution. Cette échelle est encore utilisée mais découle à présent directement d'un dosage des capsaïcinoïdes. Plusieurs méthodes de calcul existent en fonction des capsaïcinoïdes dosés. Une majorité d'études prend en compte uniquement la capsaïcine, l'argument étant que c'est une méthode simple et facilement réalisable, qui ne nécessite de doser que la capsaïcine. Dans ce cas-là, la concentration en ppm de capsaïcine est multipliée par 16,1 pour obtenir la valeur sur l'échelle de Scoville (Canto-Flick et al., 2008; Othman et al., 2011; Popelka et al., 2017; Olatunji and Afolayan, 2020). L'autre méthode consiste à prendre en compte plusieurs capsaïcinoïdes dans le calcul, en leur attribuant un coefficient différent en fonction de leur valeur de piquant : la concentration en ppm de chaque capsaïcinoïde est multipliée par 16,1 pour la capsaïcine, 15 pour la DHC, 9,3 pour la NDHC, 6,9 pour la HC et 8,1 pour la HDHC (Todd Jr. et al., 1977; Orellana-Escobedo et al., 2013). Le choix du calcul entraîne de fortes variations. Il convient alors de ne pas se fier uniquement à l'échelle de Scoville mais de connaître le taux de capsaïcinoïdes. Un nouveau calcul à partir du dosage est à privilégier. A titre d'exemple, le piment 'Habanero' (*C. chinense*) possède une valeur de 100 000 à 350 000 SHU (Scoville Heat Unit) environ, et le piment 'Bhut Jolokia', un hybride interspécifique *C. frutescens* x *C. chinense* atteint en moyenne 800 000 à 1 200 000 SHU. La capsaïcine pure correspond à 16 M SHU.

### 3.2 Récepteurs TRPV

Les sensations de chaleur et de douleur dans la bouche résultent de la stimulation par la capsaïcine des récepteurs locaux de la chaleur dans la peau et les muqueuses. La capsaïcine se lie aux récepteurs TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), qui sont présents dans les neurones nociceptifs et agissent comme transducteur de *stimuli* chimiques, thermiques ou mécaniques, générateurs de douleur (Luo et al., 2011). Ce récepteur est également activé par la chaleur (> 43°C) et par un pH < 5.9 (Tominaga et al., 1998).

Il est intéressant de noter que la capsaïcine peut également contribuer à la médiation de la douleur : l'application prolongée de capsaïcine provoquerait la désensibilisation des neurones sensoriels responsables de la douleur. Cela pourrait se produire par la diminution de la substance P, un neurotransmetteur peptidique dans les fibres sensorielles "douloureuses" (Goettl et al 1997), le résultat final étant la libération de  $\beta$ -endorphines qui sont des opioïdes endogènes.

Grâce à leurs propriétés, les capsaïcinoïdes sont employés dans divers domaines d'application comme la pharmacologie pour le traitement de douleurs nerveuses dans certains cas d'arthrose par exemple, ou encore pour la fabrication de dispositifs personnels de défense chimique, de répulsifs



contre les animaux nuisibles, ou encore pour la protection des cultures (Hayman and Kam, 2008; Dayan et al., 2009). La capsaïcine est également utilisée dans le domaine médical, sous forme de médicament topique par exemple. En se fixant sur ces récepteurs, la capsaïcine entraîne, entre autres, la dégénérescence des neurones sensoriels, ce qui lui confère des propriétés antalgiques et anti-inflammatoires (Chanda et al., 2008).

Le récepteur TRPV1 sur lequel se fixent les molécules de capsaïcine, est moins sensible chez les oiseaux que chez les mammifères. Les capsaïcinoïdes sont donc peu irritants pour les oiseaux, ce qui permettrait de repousser sélectivement les prédateurs sans empêcher la dispersion des graines par les oiseaux (Cipollini and Levey, 1997).

D'autres récepteurs de la famille des TRP sont impliqués dans la perception de la douleur : les TRP vanilloïdes (TRPV) 1 et 2 sont activés par des niveaux de chaleur douloureux, les TRPV3 et 4 répondent à une chaleur non douloureuse, TRP melastatine 8 est activé par des températures fraîches non douloureuses, tandis que TRP ankyrine (TRPA) 1 est activé par le froid douloureux. L'intérêt d'utiliser le *totum* de la plante est de posséder un ensemble de métabolites se fixant sur ces récepteurs, afin de moduler les canaux TRP et leurs signaux (Vay et al., 2012; Meotti et al., 2014).

### 3.3 Voie de biosynthèse

#### 3.3.1 Description

Les capsaïcinoïdes sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique, puis migrent à travers le cytoplasme *via* des petites vésicules qui fusionnent avec la membrane plasmique (Fujiwake et al., 1980; Suzuki et al., 1980). Des petites cavités subcuticulaires sont formées pendant cette fusion ; elles se présentent sous la forme de gouttelettes jaune pâle à orange sur le placenta, où sont accumulés les capsaïcinoïdes au cours de la maturation (Zamski et al., 1987; Stewart et al., 2007). Les capsaïcinoïdes sont synthétisés uniquement dans les fruits, mais peuvent se retrouver dans les organes végétatifs, une fois que les fruits ont été formés (Estrada et al., 2002). La capsaïcine est retrouvée en plus grande quantité que la DHC dans les fruits, tandis que l'inverse est observée dans les organes végétatifs (Estrada et al., 2002).

La phénylalanine ainsi que la valine, la leucine ou l'isoleucine sont les précurseurs des capsaïcinoïdes. La phénylalanine, de la voie des phénylpropanoïdes, forme au bout de la voie la vanillylamine, impliquant les enzymes Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), *trans*-cinnamic acid-4-hydroxylase (Ca4H), 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL), *trans*-p-coumaric acid-3-hydroxylase (Ca3H) et

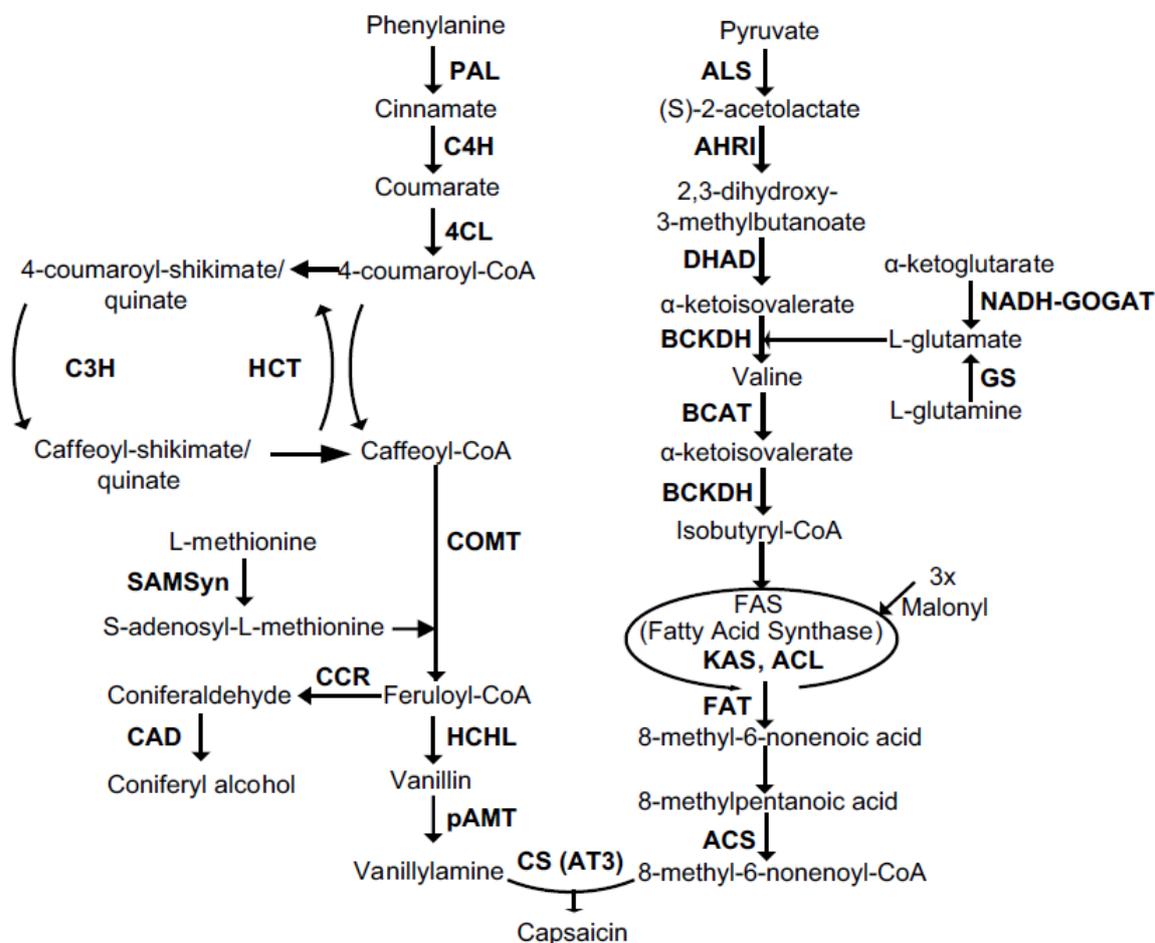


Figure 13. Voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes. PAL phenylalanine ammonia lyase, C4H cinnamate 4-hydroxylase, 4CL 4-coumaroyl-CoA ligase, CoA coenzyme A, HCT hydroxycinnamoyl transferase, C3H coumaroyl shikimate/quininate 3-hydroxylase, COMT caffeic acid O-methyltransferase, SAMSyn S-adenosylmethionine synthetase, HCHL hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase, CCR cinnamoyl-CoA reductase, CAD cinnamyl alcohol dehydrogenase, pAMT putative aminotransferase, ALS acetolactate  $\alpha$  synthase, AHRI acetohydroxyacid reductoisomerase, DHAD dihydroxy acid dehydratase, GS glutamine synthetase, NADH-GOGAT nicotinamide adenine dinucleotide-dependent glutamate synthase, BCAT branched-chain amino acid transferase, BCKDH branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase/decarboxylase, KAS ketoacyl-ACP synthase, ACP acyl carrier protein, ACL acyl carrier protein, FAT acyl-ACP thioesterase, ACS acyl-CoA synthetase, CS capsaicin synthase, AT3 acyltransferase. Issu de Arce-Rodríguez et Ochoa-Alejo 2019.

caffeic acid-o-methyltransferase (COMT), hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL) et putative aminotransferase (pAMT). Parallèlement, la valine, la leucine ou l'isoleucine forment successivement l' $\alpha$ - $\kappa$ -isovalerate, l'isobutyrate et l'isobutyryl coenzyme A (isobutyryl coA) sous l'action de la branched-chain amino acid transferase (BCAT), de la 3-methyl-2-oxobutanoate déshydrogénase (BKDH) et à nouveau de la BCAT. Ensuite, trois unités de malonyl CoA sont mobilisées par le complexe enzymatique Fatty Acid Synthase (FAS), constitué de trois unités protéiques (la  $\beta$ -ketoacyl transferase (KAS), l'Acyl Carrier Protein (ACP ou ACL) et la Fatty Acid Thioesterase (FAT)) pour former l'acide 8-methyl-6-nonenoyique (Díaz et al., 2004; Gómez-García and Ochoa-Alejo, 2013). La dernière étape de la voie de biosynthèse est une condensation entre la vanillylamine et un acide gras à chaîne ramifiée (le 8-methyl-6-nonenoyl-CoA) pour former la capsaïcine (Figure 12). Les différences structurales entre les capsaïcinoïdes proviennent de l'association de vanillylamine avec différents acides gras, issus de différents acides aminés : la vanillylamine associée à un acide gras issu de la voie de la valine conduit à la formation de capsaïcine et de DHC, tandis que les autres capsaïcinoïdes sont formés par association de la vanillylamine avec un acide gras issu de la voie de la leucine ou de l'isoleucine (Suzuki et al., 1981).

Cette étape finale est possible grâce à la capsaïcine synthase (CS) qui est une acyltransférase 3 (AT3) (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2019). Des observations d'extinction de gènes par VIGS (Virus Induced Gene Silencing) suggèrent que la CS est une enzyme clé de régulation de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes. L'inhibition par VIGS de l'AT3 entraîne une diminution de l'accumulation des capsaïcinoïdes (Stewart et al., 2005; Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2015), mais également une diminution de l'expression de gènes de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes : BCAT, KAS, ACL, pAmt. La participation d'autres gènes a été démontrée en inhibant leur expression par VIGS. L'inhibition des gènes *COMT*, *pAMT* et *KAS* entraîne une diminution de la quantité de capsaïcinoïdes (del Rosario Abraham-Juárez et al., 2008).

La PAL est active principalement dans le cytosol tandis que la C4H et la CS sont actives majoritairement dans les vacuoles, faisant des vacuoles le principal site d'accumulation des capsaïcinoïdes (Fujiwake et al., 1980).

Le gène *KAS* pourrait jouer un rôle important dans la production de capsaïcinoïdes en régulant les précurseurs majeurs de la fraction acyle des capsaïcinoïdes (Reddy et al., 2014). Néanmoins, le caractère piquant du piment est directement lié à l'expression du gène codant pour la capsaïcine synthase, *PUN1* (Reddy et al., 2014). Le degré de piquant dépend ensuite de la régulation des voies de biosynthèse des capsaïcinoïdes en amont (Wahyuni et al., 2011). Par exemple, parmi 32 accessions (éléments collectés en un endroit donné et à un moment donné, pour un taxon botanique identifié)



cultivées dans les mêmes conditions, celles se révélant les plus fortes appartenaient aussi bien aux espèces *C. frutescens*, que *C. annuum* ou *C. baccatum*.

La corrélation positive entre l'expression de gènes structurels de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes (*PAL*, *Ca4H*, *COMT*, *ACL*, *FAT* et *PUN1*) et le niveau de capsaïcinoïdes a été rapportée dans plusieurs études (Curry et al., 1999; Aluru et al., 2003; Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2015).

Deux glucosides de capsaïcinoïdes ont été identifiés dans certains piments (capsaïcine- $\beta$ -D-glucopyranoside et dihydrocapsaïcine- $\beta$ -D-glucopyranoside), dont leur concentration était corrélée positivement à la concentration des capsaïcinoïdes associés (*i.e.* capsaïcine et dihydrocapsaïcine respectivement) (Higashiguchi et al., 2006). Peu d'études ont été retrouvées dans la littérature à ce sujet pour le moment.

### 3.3.2 Régulation génétique

Arce-Rodríguez et Ochoa-Alejo (2017) ont montré qu'un facteur de transcription de la famille des R2R3-MYB, nommé *CaMYB31* était fortement impliqué dans la régulation de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes. L'expression de *CaMYB31* a montré un profil similaire à celui des gènes *KAS*, *pAMT* et *PUN1* dans le placenta des fruits piquants. Ce facteur de transcription est également exprimé dans les tissus des organes végétatifs tels que les racines, les tiges ou les feuilles, suggérant un possible rôle dans d'autres processus biologiques telle que la biosynthèse de la lignine et d'autres métabolites dérivant de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. L'expression de ce facteur de transcription est également affectée par les phytohormones. L'expression des gènes *CaMYB31*, *KAS* et *pAMT* a été augmentée après un traitement des fruits à l'acide salicylique (SA), à l'auxine, aux gibbérellines, tandis qu'elle a diminué après un traitement à l'acide jasmonique (JA), avec un effet dépendant du temps d'analyse après exposition (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017).

Deux autres facteurs de transcription ont été proposés comme régulateurs de la synthèse des capsaïcinoïdes. Ils appartiennent tous deux à la famille des facteurs de transcription ERF (ethylene response factor), et ont montré une corrélation entre leur expression et le taux de capsaïcinoïdes (Keyhaninejad et al., 2014).

## 3.4 Dynamique d'évolution pendant la maturation

Les capsaïcinoïdes commencent à s'accumuler environ 20 jours après l'anthèse, pour atteindre une concentration maximale entre 30 et 50 jours après la formation du fruit selon les espèces, lorsque le fruit passe du vert au rouge, puis diminuent (Contreras-Padilla and Yahia, 1998; Barbero et al., 2014;

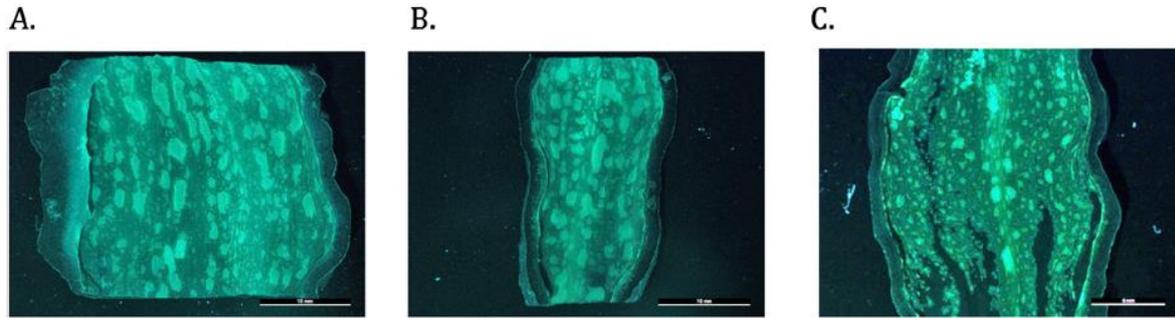


Figure 14. Vésicules (fluorescentes) contenant les capsaïcinoïdes dans le péricarpe de variétés de piments "superhot" : (A) Trinidad Moruga Scorpion, (B) Trinidad scorpion, (C) Bhut Jolokia, prises au microscope à fluorescence (Bosland et al., 2015).

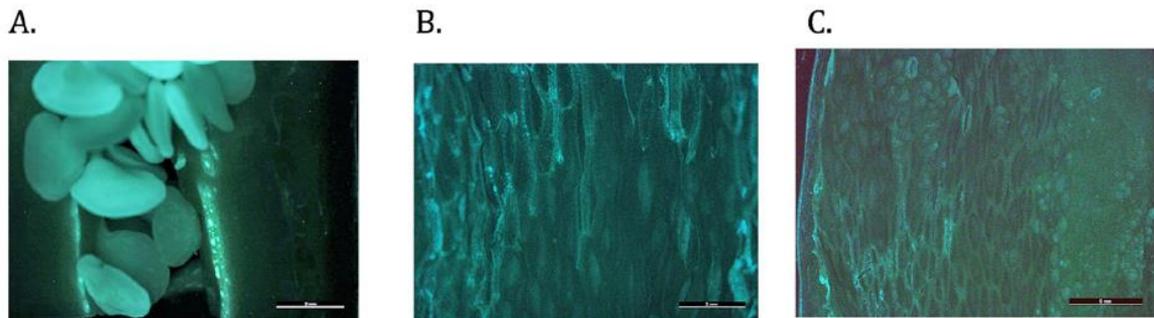


Figure 15. Images de microscopie à fluorescence : (A) Péricarpe de Jalapeno précoce sans vésicules de capsaïcinoïdes. (B) Placenta de Jalapeno précoce montrant des vésicules contenant les capsaïcinoïdes. (C) Péricarpe de poivron Keystone sans vésicules (Bosland et al., 2015).

Fayos et al., 2017). Cette diminution serait due à l'oxydation de la capsaïcine par les peroxydases dont l'activité augmente parallèlement à la baisse du taux de capsaïcinoïdes (Bernal et al., 1993; Díaz et al., 2004). Les peroxydases sont localisées principalement dans les cellules du placenta et dans les cellules épidermiques superficielles du fruit, ce qui est cohérent avec leur rôle supposé dans la régulation de la capsaïcine (Díaz et al., 2004).

L'accumulation des capsaïcinoïdes peut être différente selon les cultivars. Pour le cultivar 'Peter Pepper' (*C. annuum* var. *annuum*), par exemple, la concentration en capsaïcinoïdes totaux a augmenté linéairement jusqu'au 90<sup>ème</sup> jour après la formation du fruit pour atteindre environ 1,3 mg/g MF (Barbero et al., 2016). Chez le piment de Cayenne (*C. annuum*), Barbero et al. (2014) ont montré que le maximum de capsaïcinoïdes était atteint au 30<sup>ème</sup> jour après le début de la formation du fruit (0,55 mg/g MF), avant une diminution de la concentration. Après 90 jours (sur-maturation), la teneur en mg/g MF a de nouveau augmenté, mais cette concentration est principalement attribuable à la perte en eau du fruit. La capsaïcine était majoritaire pendant les 20 premiers jours de maturation, où elle représentait 50% des capsaïcinoïdes mesurés, puis la dihydrocapsaïcine est devenue majoritaire jusqu'au 70<sup>ème</sup> jour (Barbero et al., 2014).

La distribution des capsaïcinoïdes dans les différentes parties du fruit change au cours de la maturité. Dans *C. chinense* 'Naga King Chili', entre le stade vert et le stade rouge, la teneur en capsaïcinoïdes a diminué dans le placenta (de 60% à 55%) et a augmenté dans les graines (de 22% à 25%) (Ananthan et al., 2018).

De nombreuses différences existent entre les variétés, au niveau de la dynamique d'accumulation ou encore concernant le lieu d'accumulation des capsaïcinoïdes. Certains piments, dépassant un million de SHU sur l'échelle de Scoville, accumulent des capsaïcinoïdes ailleurs que dans le placenta. D'après Bosland et al., (2015), les piments « super-hot » ont développé des vésicules accessoires localisées dans le péricarpe, en plus des vésicules situées dans le placenta. Dans la figure 13, les trois variétés de piments « superhot » (plus de 1 M SHU sur l'échelle de Scoville) possèdent des vésicules contenant des capsaïcinoïdes dans le péricarpe, contrairement au poivron, qui n'en possède pas (Figure 14 C).

En dosant les capsaïcinoïdes dans les différents tissus de fruits avec des degrés de piquant différents (Habanero (HB) – 350 000 SHU et Trinidad Moruga Scorpion Yellow (MY) – 1 500 000 SHU), Tanaka et al. (2017) ont montré que les concentrations dans le placenta des deux génotypes n'étaient pas significativement différentes. Pour le génotype moins piquant (HB), les concentrations sont 38 fois plus élevées dans le placenta que dans le péricarpe. En revanche, les concentrations dans le péricarpe du génotype « super-hot » (MY) sont douze fois plus élevées que dans le péricarpe de HB, ce qui donne

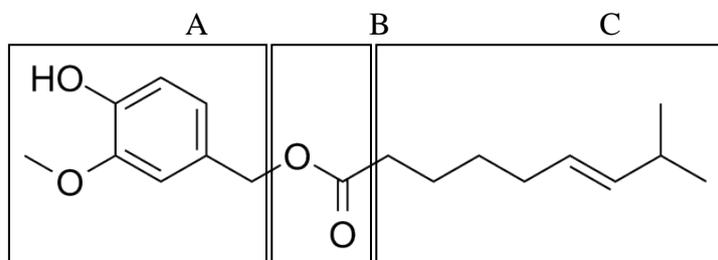


Figure 16. Les trois régions de la molécule de capsiate. A, noyau aromatique; B, liaison ester; C, chaîne carbonée hydrophobe.

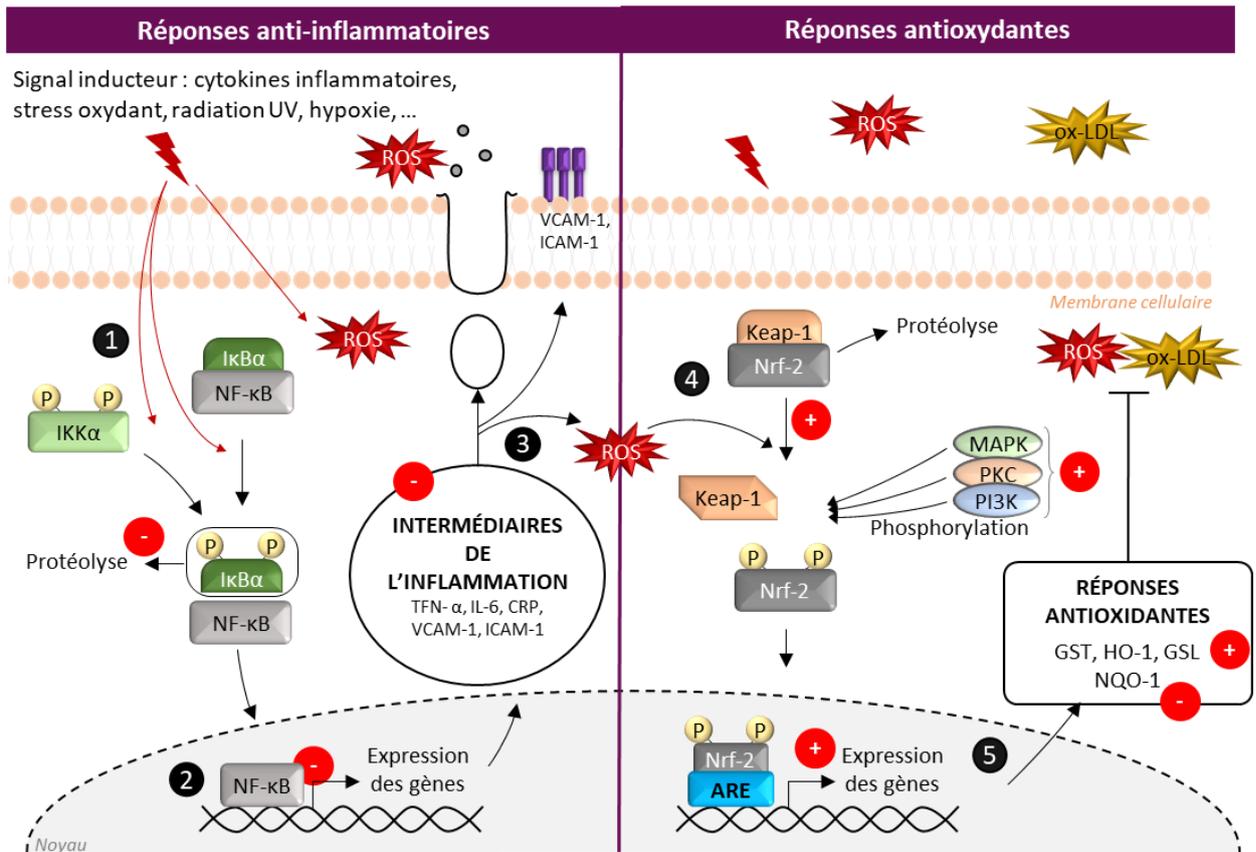
un fruit globalement plus piquant. La qRT-PCR révèle que plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes sont fortement sur-exprimés dans le placenta des cultivars piquants (*PUN1*, *pAMT*, *KAS*, *BCAT*). Dans le péricarpe, ils sont exprimés uniquement pour la variété MY. La surexpression de ces gènes dans le placenta mais surtout dans le péricarpe joue un rôle important dans l'accumulation des capsaïcinoïdes dans le fruit entier.

### 3.5 Les capsinoïdes

Les capsinoïdes sont des analogues non piquants des capsaïcinoïdes. Ils se distinguent structurellement par la perte de l'élément azote sur la liaison centrale (Figure 15), et sont naturellement présents dans quelques variétés de piment (Kobata et al., 1998; Kobata et al., 1999). Alternative non piquante aux capsaïcinoïdes, ils n'en possèdent pas moins des propriétés biologiques prometteuses, dont anti-cancéreuses, anti-inflammatoires, et anti-obésité (Saito and Yoneshiro, 2013). Ces molécules agiraient de façon similaire aux capsaïcinoïdes sur les récepteurs neuroniques, les récepteurs TRPV1, qui sont à l'origine de l'activation du système nerveux sympathique, et ont des effets sur la thermogénèse des tissus adipeux et musculaires. Ils sont considérés comme jusqu'à 1000 fois moins piquant en bouche que leurs analogues les capsaïcinoïdes, sont très lipophiles et plus facilement dégradés en milieu aqueux (ce qui explique peut-être leur plus faible agressivité en bouche) (Luo et al., 2011). Trois capsinoïdes sont couramment rencontrés : le capsiate, le dihydrocapsiate et le nordihydrocapsiate. Les capsinoïdes représentent donc une bonne alternative aux capsaïcinoïdes en santé humaine et animale, mais ne sont présents que dans certaines variétés, et en très faibles quantités.

La biosynthèse des capsinoïdes se fait suivant la même voie que celle des capsaïcinoïdes, à la différence du précurseur. Pour les capsinoïdes, le précurseur est en effet un alcool vanillique condensé à une chaîne d'acide gras et non une amine vanillique. Cette différence est due à une mutation du gène codant pour la putative AminoTransferase (*pAMT*), enzyme catalysant l'amination de la vanilline en vanillylamine, favorisant ainsi l'accumulation de vanillylalcool, utilisable par la CS pour former des capsinoïdes (Wahyuni et al., 2011).

Ces molécules sont elles aussi plus concentrées dans le placenta et le mucilage des graines, que dans le péricarpe. Des teneurs de moins de 0,01 à 0,12 mg/g MF dans les fruits de différentes accessions de piments à différents stades de maturité ont été rapportées (Wahyuni et al., 2011). La période d'accumulation des capsinoïdes est de 15 à 30 jours après l'anthèse selon les génotypes (Sutoh et al., 2006).



● Inhibition/activation par les capsaïcinoïdes

Figure 17. Réponses anti-inflammatoires et antioxydantes chez les animaux et étapes inhibées ou activées par les capsaïcinoïdes. L'étape 1 représente la libération de NF-κB, un facteur de transcription qui régule la réponse cellulaire à l'inflammation, par la dégradation de la fraction protéique IκBα suite à sa phosphorylation par IKKα. Le facteur de transcription NF-κB va ensuite induire la synthèse de gènes codants pour des molécules pro-inflammatoires et d'adhésion (étape 2) qui vont être libérés hors de la cellule ou se fixer sur la membrane cellulaire (étape 3). L'augmentation des ROS intracellulaires déclenche le changement de conformation de la protéine Keap-1, libérant le facteur de transcription Nrf-2, qui régule la réponse cellulaire au stress oxydatif (étape 4). Lorsqu'il n'y a pas de stimulation, le complexe est maintenu inactif et peut être dégradé par le protéasome. Après phosphorylation, Nrf-2 va entrer dans le noyau, se fixer sur des séquences ARE (antioxydant responsive elements) et induire l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines à pouvoir antioxydant (étape 5). Les capsaïcinoïdes ont une action anti-inflammatoire par inhibition de la phosphorylation et de la protéolyse de la fraction protéique IκBα (étape 1), par inhibition de la translocation nucléaire du NF-κB. Ils diminuent ainsi la synthèse des intermédiaires de l'inflammation (étape 3). Ils ont une action antioxydante par (1) l'activation du changement de conformation de la protéine Keap-1 et stimulation des MAPK, PKC et PI3K pour la phosphorylation (étape 4), (2) l'induction d'une forte production du facteur de transcription AP-1 (étape 5), (3) l'induction des enzymes antioxydantes et (4) l'inhibition de l'enzyme NQO-1 entraînant une production de ROS stimulant la signalisation PI3K (étape 5).

ox-LDL : lipoprotéine de faible densité oxygénée; ARE : éléments de réponse antioxydante (antioxidant responsive elements) ; CRP : C-reactive protein ; GSL : glutaminase; GST : glutathione S-transferase; HO-1 : hème oxygénase 1; ICAM-1 : molécules d'adhésion; IκBα : sous-unité inhibitrice de NF-κB; IKKα : IκB kinase ; IL-6 : Interleukine-6; Keap-1 : Kelch Like ECH Associated Protein 1; MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase; NF-κB : facteur de transcription régulant la réponse cellulaire à l'inflammation; NQO-1 : NAD(P)H quinone déshydrogénase 1; Nrf-2 : NF-E2-related factor 2, facteur de transcription régulant la réponse cellulaire au stress oxydatif; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKC : protéine kinase C ; TFN-α : Tumor Necrosis Factor ; VCAM-1 : molécules d'adhésion. D'après Singh et al., 1996; Goszcz et al., 2017; Singh et al., 2020.

### 3.6 Rôles des capsaïcinoïdes en nutrition/santé animale

Outre son application en médecine humaine pour ses actions analgésique et amincissante, ou encore pour son utilisation comme moyen de défense, la capsaïcine est utilisée en nutrition santé animale pour ses nombreuses propriétés. Il est intéressant de noter que les capsaïcinoïdes pourraient être soit des agonistes directs des récepteurs animaux (TRPV1), soit des briseurs de chaînes oxydatives ou des molécules neutralisant les ROS pour soutenir la régulation du cycle oxydo-inflammatoire chez les animaux (Badia et al., 2017).

La capsaïcine est utilisée en complément de l'aliment distribué pour son action anti-inflammatoire, en inhibant l'activation de l'IKK $\alpha$  (Figure 16, étape 1), la protéolyse de I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylée (Figure 16, étape 1) ou encore la capacité de liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN (Figure 16, étape 2), diminuant ainsi la synthèse et la libération des médiateurs de l'inflammation (Singh et al., 1996; Lee et al., 2007a).

La capsaïcine montre aussi des actions antioxydantes. Elle induit une production accrue du facteur de transcription AP-1, qui augmente l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la régulation du stress oxydant (Figure 16, étape 5) (Backes et al., 2018). Elle entraîne également l'inhibition de l'enzyme NQO-1 (Figure 16, étape 5), conduisant à la production de ROS, qui vont, à leur tour soit stimuler la signalisation PI3K, soit oxyder la cystéine thiol de Keap-1, qui peut également être oxydée par la capsaïcine (figure 16, étape 4) (Joung et al., 2007). La dissociation de Nrf-2 de Keap-1 et sa translocation nucléaire sont ainsi facilitées, permettant l'expression des gènes codant pour des enzymes détoxifiantes, comme la HO-1.

D'autres actions de la capsaïcine en se fixant aux récepteurs de la famille des TRP ont été rapportées : stimulation de la digestion (Long et al., 2021; Li et al., 2022), support de la fonction immunitaire (Xiang et al., 2021), inhibition de la douleur (Caterina et al., 1997; Sharma et al., 2013), ou encore modification du métabolisme du glucose (Oh et al., 2017).

La capsaïcine en tant que supplément nutritionnel entraîne par exemple, chez les cailles, une augmentation du nombre d'œufs pondus (Sahin et al., 2017) et améliore la digestibilité des aliments chez les poulets de chair (Hernández et al., 2004). En revanche, son utilisation possède quelques contraintes. Les produits à base de capsaïcine sont en général mélangés à d'autres ingrédients (phytogéniques, supports minéraux ou végétaux, vitamines...) dans un prémix avant incorporation dans l'aliment. Ils sont donc manipulés, mixés, conditionnés et la capsaïcine pure, l'extrait de piment, ou même la poudre de piment doivent être formulés préalablement à cette manipulation afin de ne pas mettre en danger le personnel qui les manipule. Côté animal, elle ne doit de même pas réduire



l'appétence du prémix/aliment supplémenté pour les animaux. Pour les mammifères, sensibles à l'effet piquant en raison de la présence des récepteurs TRPV1, la molécule, selon la dose d'apport, devra être encapsulée afin de limiter cette sensation.

### 3.7 Influence des facteurs environnementaux sur les capsaïcinoïdes

Le fond génétique des cultivars est le premier facteur qui génère le degré de piquant, mais le stade de développement du fruit ainsi que les conditions environnementales de culture jouent également un rôle sur la quantité de capsaïcinoïdes (Iwai et al., 1979b; Gurung et al., 2011).

#### 3.7.1 Température

Le niveau de piquant des fruits est très variable en fonction de la température de l'air mais il n'y a aucun consensus sur l'effet de la température sur les concentrations en capsaïcinoïdes. Pour certaines variétés, des températures fortes favorisent l'accumulation des capsaïcinoïdes tandis que pour d'autres, elles l'affectent négativement (Naves et al., 2019). Par exemple, une température de 36°C pendant 6, 12 ou 24h en culture a réduit la concentration en capsaïcinoïdes dans une lignée '007EA' (genre et espèce non précisés), probablement par une régulation des facteurs de transcription des familles HD-Zip, MYB et BES1 (Liu et al., 2022b).

L'activité de la capsaïcine synthase a été augmentée en condition de température de culture élevée (30°C) par rapport à une température plus faible (24°C) dans six géotypes de *C. annuum*, entraînant une augmentation de la teneur en capsaïcine (Rahman and Inden, 2012).

Le promoteur du gène de la capsaïcine synthase contient des éléments de stress thermique (heat stress elements (HSEs)) dont on peut faire l'hypothèse qu'ils sont impliqués dans la stimulation de la synthèse des capsaïcinoïdes en conditions de forte température (Kim et al., 2009).

Néanmoins, cet effet semble être variable, car il n'a pas été confirmé sur toutes les variétés (González-Zamora et al., 2013).

#### 3.7.2 Lumière

La lumière influence les concentrations en capsaïcinoïdes des fruits en cours de culture. Une lumière blanche constante avec une irradiance moyenne (150-350  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ ) induit plus de capsaïcinoïdes que lorsque les plants sont cultivés en serre dans des conditions estivales (Murakami et al., 2006).



La lumière blanche a une influence positive sur l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes. L'expression des gènes *PUN1* (ce dernier possède des motifs sensibles à la lumière dans la région du promoteur (Kim et al., 2009)), *KAS*, *pAMT* et *CaMYB31* a été augmentée à la lumière et réprimée en condition d'obscurité (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017). La lumière a entraîné une diminution de la concentration en capsaïcine, à travers l'induction des peroxydases, dégradant la capsaïcine (Díaz et al., 2004). Les effets de la lumière sur la balance entre anabolisme et catabolisme n'ont pas encore été décrits (Naves et al., 2019).

Lors de la conservation des fruits immatures récoltés, une irradiation constante permet de stimuler la formation de capsaïcinoïdes dans le placenta contrairement aux fruits conservés dans le noir (Iwai et al., 1977b). Sous lumière constante, la quantité est 2,5 fois plus élevée dans le placenta que dans le péricarpe, et aucun capsaïcinoïde n'est retrouvé dans les graines. Les capsaïcinoïdes formés dans ces conditions sont majoritairement de la dihydrocapsaïcine (Iwai et al., 1977a). Lorsque les fruits sont récoltés au stade vert mature et conservés à la lumière, la concentration en capsaïcinoïdes des fruits est doublée par rapport aux fruits conservés dans le noir (Naves et al., 2019).

### 3.7.3 Statut hydrique

Une diminution de l'apport en eau engendre un stress hydrique qui peut augmenter la proportion de capsaïcinoïdes par fruit. D'après Sung et al. (2005), la synthèse de capsaïcinoïdes n'est pas modifiée à proprement parler, mais le stress hydrique impacte la taille des fruits sans affecter la formation du placenta. La proportion de placenta par fruit est alors plus grande par rapport aux fruits d'une plante bien arrosée, ce qui résulte en une augmentation de la quantité de capsaïcinoïdes par fruit. Néanmoins, de nombreux effets du stress hydrique sur les teneurs en capsaïcinoïdes ont été rapportés (Caicedo-Lopez et al., 2022).

Le génotype a une part importante dans la réponse de la plante au stress hydrique (Phimchan et al., 2012; Jeeatid et al., 2017). La diminution de l'arrosage de 25, 50 et 75% de manière chronologique entre les stades de 11 à 20 jours après pollinisation (JAP), de 21 à 30 JAP et de 31 à 40 JAP, respectivement, a engendré une augmentation significative de la concentration en capsaïcinoïdes chez les variétés faiblement (< 50 000 SHU) et moyennement (50 000 to 100 000 SHU) piquantes (Phimchan et al., 2012). Pour les variétés fortement piquantes en revanche (> 100 000 SHU), la concentration n'a pas été modifiée. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que la teneur en capsaïcinoïdes est influencée par le génotype et par une interaction génotype-environnement (Zewdie and Bosland, 2000). En effet, d'après Gurung et al., (2012), la concentration en capsaïcinoïdes des génotypes hautement piquants, proche de la saturation, subit peu l'effet de l'environnement. Dans ce cas, la



teneur en capsaïcinoïdes atteint un maximum dans les différents compartiments cellulaires, rendant difficile une accumulation supplémentaire induite par les conditions environnementales : l'effet génotype sur la quantité de capsaïcinoïdes est grand et majoritaire par rapport à l'effet environnemental. Dans les génotypes peu et moyennement piquants, en revanche, la teneur en capsaïcinoïdes n'est pas saturée et peut être plus facilement influencée par les conditions environnementales (Zewdie and Bosland, 2000; Gurung et al., 2011).

Le stress hydrique conduit à une hausse de la teneur en capsaïcinoïdes via une augmentation de l'activité des enzymes nécessaires à la biosynthèse des capsaïcinoïdes (PAL, C4H et CS) et par une réduction de la dégradation des capsaïcinoïdes par les peroxydases (Sung et al., 2005; Phimchan et al., 2012).

L'humidité ambiante de l'air a également influencé les teneurs en capsaïcinoïdes. Il a été observé que la proportion de plants produisant des fruits piquants est plus importante en conditions d'humidité élevée dans une population sauvage native de Bolivie (Haak et al., 2012). L'hypothèse de ces auteurs est que l'augmentation de la concentration en capsaïcine permettrait de mieux protéger les fruits vis-à-vis des pathogènes et, plus spécifiquement dans ce cas, des champignons qui se développent dans des conditions d'humidité élevée.

Il est donc difficile de statuer clairement sur l'impact du statut hydrique (manque ou excès d'eau) sur les concentrations en capsaïcinoïdes, en raison des nombreux facteurs influençant la réponse des plantes (génotype, conditions environnementales, stade phénologique, ...) (Naves et al., 2019).

#### 3.7.4 Nutrition minérale

L'azote et le potassium sont les principaux facteurs de la nutrition minérale influençant l'accumulation des capsaïcinoïdes. La synthèse d'une molécule de capsaïcine implique trois acides aminés (la phénylalanine, la valine et la leucine) ainsi que le donneur d'un groupement amine (-NH<sub>2</sub>) toujours non identifié, requis pour la formation de vanillylamine (Naves et al., 2019). La concentration en capsaïcinoïdes est associée positivement avec l'azote disponible dans le sol : les concentrations en capsaïcine et DHC augmentent quand la quantité d'azote disponible dans le sol augmente dans les fruits de la variété Jalapa (*C. annuum* L.) (Johnson and Decoteau, 1996) et 'Habanero' (*C. chinense*) (Medina-Lara et al., 2008).

Le potassium n'engendre pas de modifications directes dans l'accumulation des capsaïcinoïdes (Johnson and Decoteau, 1996). En revanche, une forte augmentation de potassium dans le sol peut engendrer une diminution significative d'azote dans les feuilles de *C. chinense*, suivie par une



diminution de la concentration en capsaïcinoïdes (Medina-Lara et al., 2008). Le potassium a donc un effet indirect sur les capsaïcinoïdes à travers le développement du fruit.

Lorsque le placenta est isolé et cultivé *in vitro*, la concentration en capsaïcinoïdes augmente lorsque la concentration en  $\text{NO}_3^-$  dans le milieu augmente. Le potassium en revanche, ne modifie pas les concentrations (Monforte-González et al., 2010).

### 3.8 Extraction et analyses

#### 3.8.1 Extraction des capsaïcinoïdes

L'extraction se fait généralement dans un solvant plutôt apolaire, tel que l'acétonitrile, le méthanol ou l'éthanol ; elle peut être assistée ou non par ultrasons ou chauffage. Différents solvants, différentes températures et durées d'extraction ont été comparés à plusieurs reprises et l'extraction au méthanol à 70°C s'avère majoritairement la plus efficace. Si l'on souhaite privilégier des solvants moins nocifs et plus respectueux de l'environnement, l'extraction à l'éthanol à 70°C peut être préférée car les rendements d'extraction sont peu inférieurs à ceux obtenus avec du méthanol (Mokhtar et al., 2016a; Ananthan et al., 2018).

D'éventuels pré-traitements peuvent influencer les résultats de teneurs en capsaïcinoïdes. Par exemple, l'extraction d'une matrice séchée au four à 65°C a révélé davantage de capsaïcinoïdes que celle de la même matrice extraite fraîche, de 10 à 228 % de capsaïcinoïdes totaux supplémentaires (en MS, en fonction du compartiment étudié : péricarpe, placenta ou graine). Dans ce cas, cela peut s'expliquer par la présence d'eau, qui entraîne un changement de polarité, et éventuellement d'une couche protectrice présente dans les tissus frais qui diminuerait la diffusion du solvant et la dissolution des composés (Mokhtar et al., 2016b). De la même façon, l'extraction de piments entiers séchés a donné davantage de capsaïcinoïdes que les mêmes piments congelés puis séchés ; ces derniers étaient eux-mêmes plus riches que ceux bouillis puis séchés, pour la majorité des variétés testées (*C. annuum* 'Portafortuna', 'Idealino', 'Sole', 'Fantasia', 'O di Giotto', 'Loco', 'Ardecchino', 'Nobile', 'Taballo', 'Bonder', *C. baccatum* 'Aji Angelo' et 'Campana', et *C. chacoense* 'Chaco'). Pour d'autres variétés (*C. annuum* 'Yellow Cayenne', 'Duemila', 'Pelegrino', 'Effix', 'Acrata', 'Hiero' et *C. chinense* 'Capezolo do Scimmia') l'ébullition des piments a été moins destructive que la congélation (Loizzo et al., 2015).

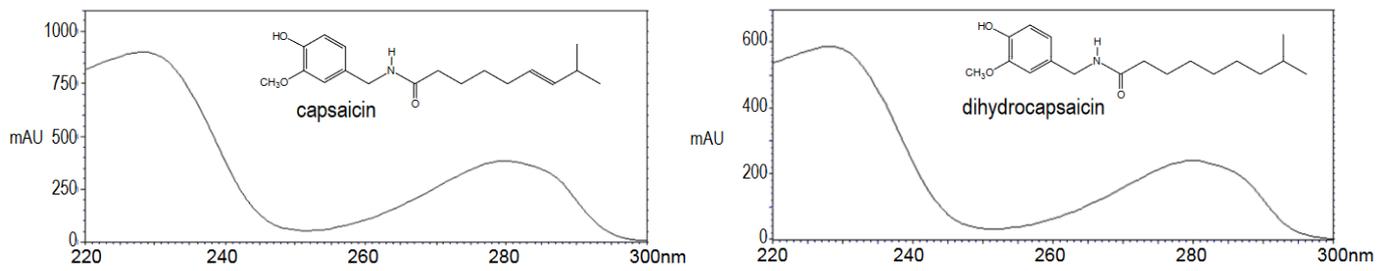


Figure 18. Spectres d'absorbance de le capsaicine et de la DHC,  $\lambda_{max} = 228 \text{ nm}$  (Al Othman et al., 2011).

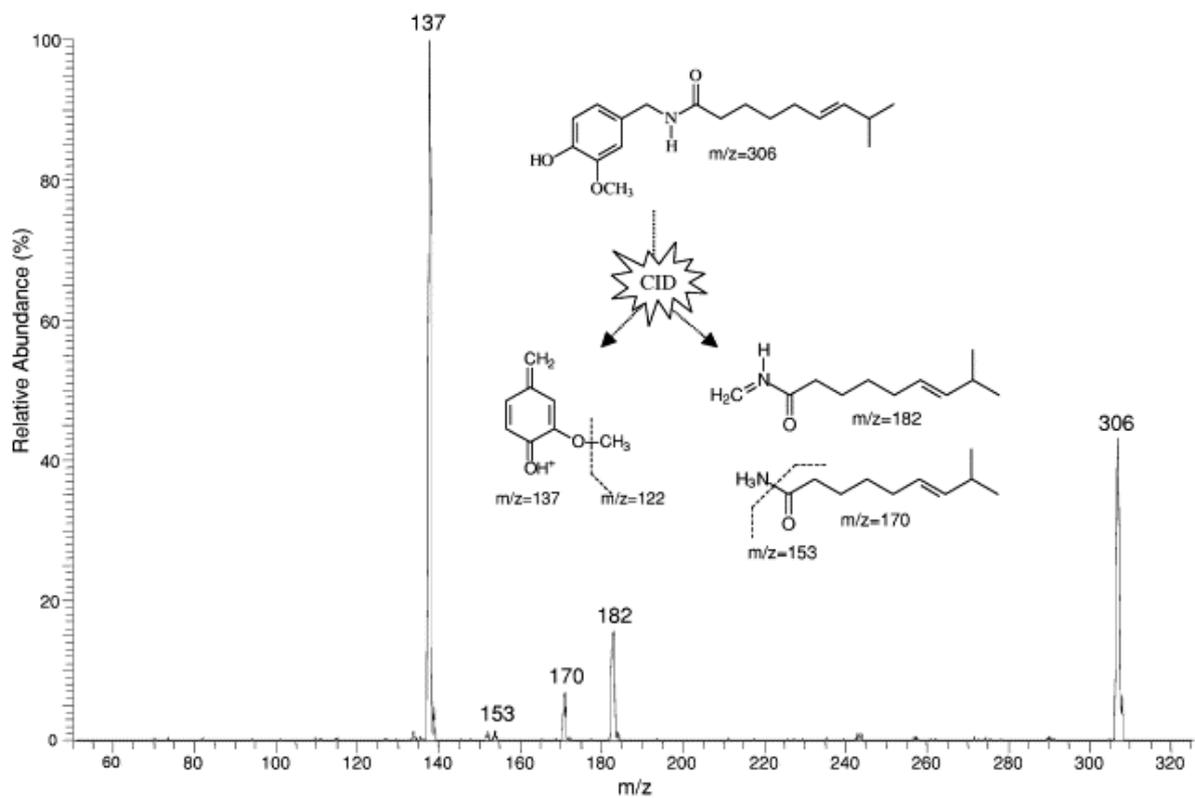


Figure 19. Spectre de masse des ions produits par la dissociation induite par collision (CID) de la capsaicine  $m/z \ 306 \rightarrow m/z \ 137, m/z \ 182, m/z \ 170$  (Reilly et al., 2001)

### 3.8.1 Analyse

Les capsaïcinoïdes, comme les capsinoïdes, sont des molécules plutôt apolaires du fait de leur extrémité phénolique et leur chaîne carbonée (Fabela-Morón et al., 2020). La méthode la plus couramment utilisée et la plus précise pour les quantifier individuellement est la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou à ultra-haute performance (UHPLC ou UPLC), couplée à un détecteur à diodes (DAD) et/ou à un (ou plusieurs) spectromètre(s) de masse (MS ou MS/MS). La spectrophotométrie représente la méthode la plus rapide et surtout la moins coûteuse pour quantifier les capsaïcinoïdes, mais totaux uniquement. Une méthode rapide de détermination de la teneur en capsaïcinoïdes par colorimétrie a été mise au point et comparée à l'HPLC par Ryu et al. (2017) montrant une forte corrélation linéaire des quantités dosées par les deux méthodes ( $R^2 = 0,9973$  and  $0,9816$  pour les piments frais et secs respectivement).

L'analyse en chromatographie liquide se fait généralement en phase inverse, c'est-à-dire avec une phase stationnaire apolaire, généralement une colonne de type C-18, et une phase mobile polaire de type eau/acétonitrile, ou eau/méthanol, en élution isocratique ou avec un gradient de polarité (Collins et al., 1995; Giuffrida et al., 2014; Islam et al., 2015; Ananthan et al., 2016; Mokhtar et al., 2016b; Duelund and Mouritsen, 2017). L'analyse des capsaïcinoïdes en chromatographie gazeuse (GC) est également possible, couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) (Loizzo et al., 2015).

L'injection de standard et la comparaison de leurs temps de rétention, mais aussi de leurs spectres d'absorbance UV et des spectres de masse permettent d'identifier les composés élués. Les capsaïcinoïdes ont un spectre d'absorbance UV très similaire (Figure 18) (Al Othman et al., 2011), qui ne permet pas réellement de différencier les composés.

L'analyse du spectre de masse permet une identification plus fiable en fonction de la masse  $m/z$  (masse sur charge) des ions caractéristiques détectés. En mode positif, outre les ions  $[M+H]^+$  détectés, l'ion 137 est un fragment commun à la famille des capsaïcinoïdes, puisqu'il correspond au groupe vanillyl avec un réarrangement des doubles liaisons du cycle aromatique obtenu suite au clivage de la molécule entre le carbone en 7<sup>ème</sup> position et l'azote (Figure 19) (Reilly et al., 2001).

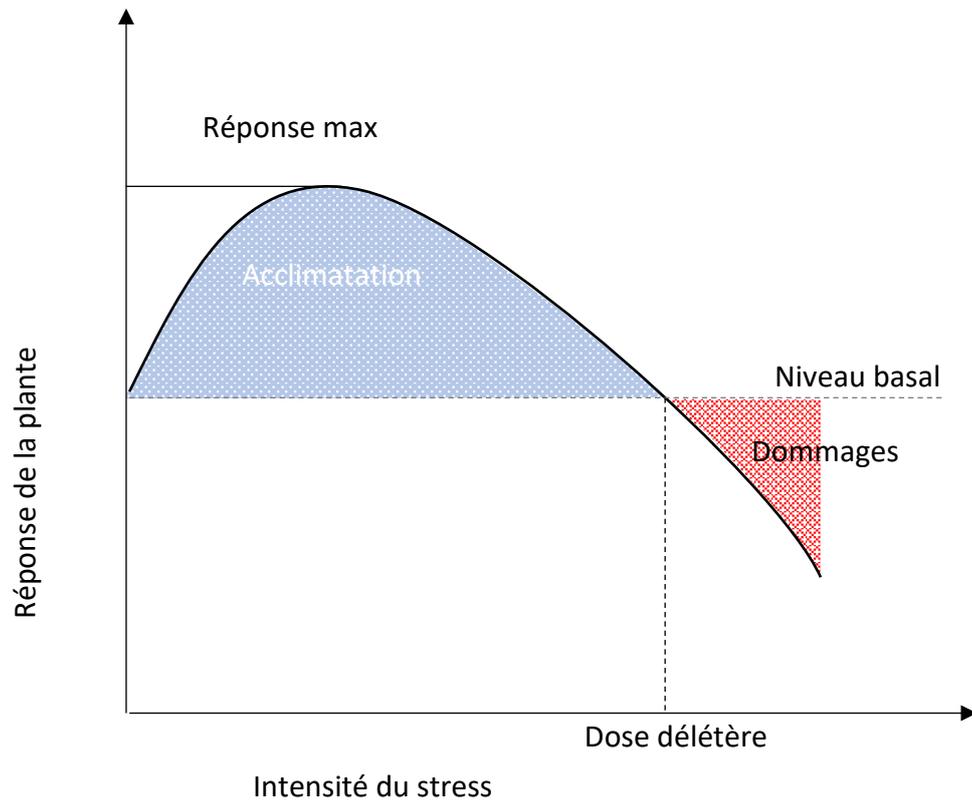


Figure 20. Définition de l'hormèse. La courbe de réponse montre un optimum à faibles doses, puis des effets délétères à fortes doses. Dixon et al. (1981); Kombrink and Hahlbrock (1986).

## 4 La stimulation des défenses des plantes, ou l'élicitation

### 4.1 Concept de xénohormésis

Les animaux n'ayant pas la capacité de synthétiser des métabolites secondaires, ils ont en revanche, depuis longtemps, développé l'aptitude de sélectionner et d'utiliser les plantes de leur environnement offrant des bénéfices pour la santé. Cette capacité d'automédication découle d'un principe connu sous le nom de zoopharmacognosie (Álvaro et al., 2019). Les animaux sélectionnent des espèces végétales spécifiques qu'ils trouvent dans leur environnement mais ne consomment pas quotidiennement afin de lutter spécifiquement contre les défis environnementaux ou physiologiques tels que le parasitisme, les carences la famine, le stress thermique, ou les périodes de gestation (Kumar et al., 2019). Les plantes, dans des conditions de stress, surproduisent des métabolites secondaires spécifiques liés au stress, tandis que l'animal a la capacité de les reconnaître et de les utiliser pour renforcer son immunité et sa propre résistance au stress. Cette hypothèse de xénohormésis repose sur l'acquisition par les animaux de récepteurs comme les TRP, de cascades de réponses et d'acceptation de molécules exogènes par des phénomènes de coévolution avec la plante (Lamming et al., 2004; Howitz and Sinclair, 2008). Le terme de xénohormésis fait référence à un phénomène inter-espèces (xéno-), en raison d'un stress produit dans un organisme, bénéficiant à d'autres organismes qui ont évolué pour percevoir ces signaux chimiques (Howitz and Sinclair, 2008). L'hormésis, ou l'hormèse, évoque une relation dose-réponse dans laquelle les faibles doses renforcent la réponse et les fortes doses l'inhibent, ce qui entraîne souvent une détérioration de l'état de santé (Figure 20). Plusieurs termes ont été utilisés dans la littérature pour désigner l'amélioration de la réponse induite par de faibles doses, tels que le stress bénéfique, la biostimulation, l'*eustress*, le stress positif, la promotion et la stimulation (Agathokleous et al., 2019).

Les fruits de *Capsicum spp* sont une source de métabolites primaires et secondaires d'intérêt pour la santé animale tels que des alcaloïdes spécifiques (capsaïcinoïdes) et dérivés (acide vanillique, capsiate), des caroténoïdes ou encore des composées phénoliques... (Saleh et al., 2018; Kopta et al., 2019). L'application contrôlée d'*eustress* à des plantes en croissance est la stratégie ciblée par ID4FEED d'après le concept de biofortification (Zhao and McGrath, 2009), pour utiliser la capacité de la plante à articuler intelligemment ses réponses de défense dans un *totum* qui pourra être utilisé ensuite en tant qu'aliment complémentaire.

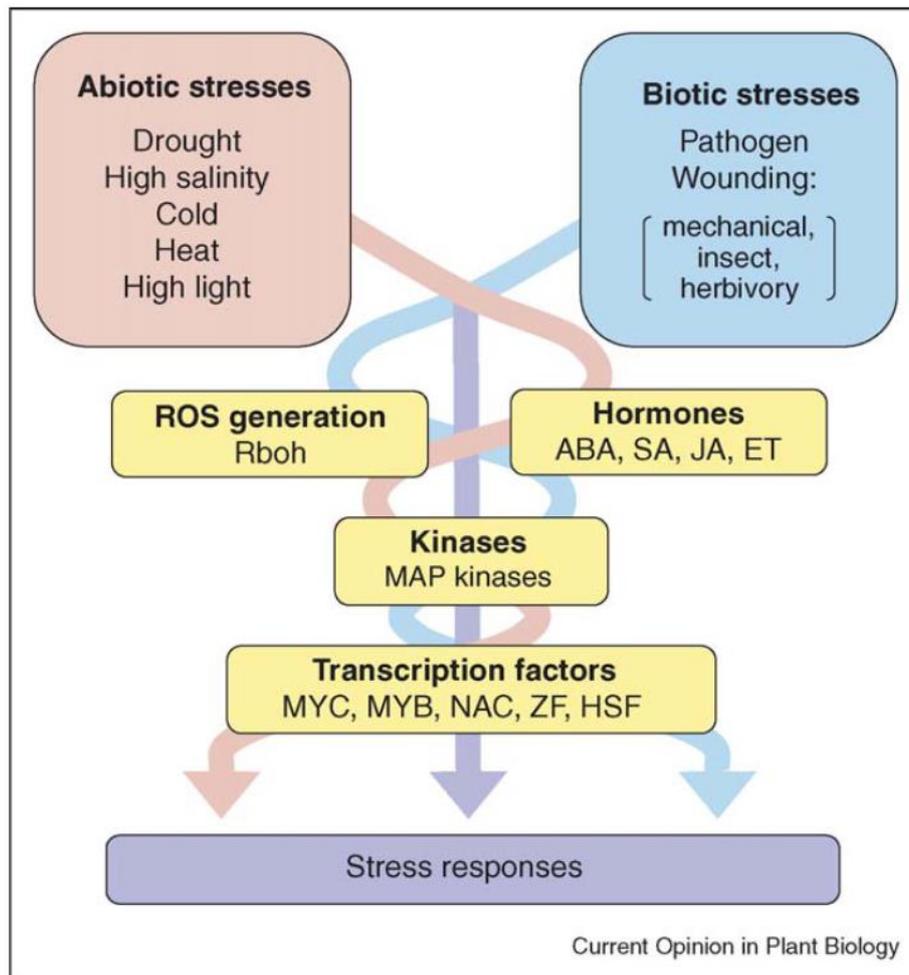


Figure 21. Points de convergence dans les réseaux de signalisation des stress abiotiques et biotiques (Fujita et al., 2006).

## 4.2 Définition

D'après Vasconsuelo et Boland (2007), l'élicitation est définie par une stimulation volontaire des intermédiaires biochimiques des métabolites secondaires par des facteurs externes, biotiques ou abiotiques, ce qui entraîne une amélioration de la qualité physiologique des plantes. Lorsque les plantes sont soumises à des stress modérés et bénéfiques (des *eustress*, c'est-à-dire contrôlés, à des doses hormétiques), la résistance des plantes est améliorée par des réactions de défense avec, éventuellement, la production de métabolites secondaires. La modification de la qualité du fruit s'explique par une réponse physiologique de la plante qui perçoit ces facteurs comme des stress (Murshed et al., 2014; Ripoll et al., 2014b). Les éliciteurs sont des leviers, pris seul ou en combinaison, et de manière efficace (dans les bonnes doses, formes, fréquence et période d'application) peuvent être utilisés pour modifier les concentrations en métabolites secondaires. La dose d'application des éliciteurs est primordiale et ne doit pas être délétère. Elle doit respecter le concept de « l'hormèse », ce qui implique la nécessité de fixer la dose optimale pour chaque couple organisme/éliciteur.

Les plantes perçoivent un *stimulus* par des récepteurs qui initie des processus de signalisation en induisant des réponses de défense. Les plantes répondent aux éliciteurs en activant différents mécanismes comme l'induction de la biosynthèse de métabolites secondaires tels que les phytoalexines, des réponses hypersensibles, ou encore la mise en place de barrières de défenses structurales comme une accumulation de lignine dans les parois cellulaires par exemple (Mert-Türk, 2002; Vasconsuelo and Boland, 2007). Les défenses mises en place contre les stress biotiques et abiotiques, c'est-à-dire principalement les ROS et les signalisations hormonales (SA et JA/ET) interagissent pour contrôler les défenses et les tolérances selon une théorie de *cross-talk* (Figure 21, Fujita et al., 2006). La convergence dans les réseaux de signalisation contre les stress biotiques et abiotiques vers la signalisation du SA implique la protéine NPR1 (*Non Expressor of Pathogenesis-Related genes 1*) (Ryals et al., 1996; Wu et al., 2012). Après accumulation de SA, ce dernier est perçu par la protéine NPR1, considérée comme un récepteur du SA et comme un coactivateur transcriptionnel pour activer les gènes PR-1 (Pathogenesis-Related-1) (Rochon et al., 2006). La protéine NPR1 est responsable de la voie de signalisation du SA et de l'activation des gènes de défenses (Wu et al., 2012; Ding et al., 2018).

Afin de raisonner l'élicitation, la balance entre défenses et croissance est importante. Un principe général de la GDBH (*Growth-Differentiation Balance Hypothesis*, Herms and Mattson, 1992) est la distinction entre la croissance de nouveaux tissus (métabolisme primaire) et la différenciation (production de tissus, d'organes et de composés spécialisés qui ne sont pas dédiés à la capture de ressources, c'est-à-dire le métabolisme secondaire). La croissance domine dans des conditions de



grande disponibilité des ressources, et la différenciation (production de métabolites secondaires) domine lorsque les limitations des ressources réduisent la croissance plus qu'elles ne réduisent la photosynthèse. La GDBH prédit l'allocation des ressources à la croissance ou à la différenciation sur la base de la disponibilité relative des ressources (Lerdau et al., 1994). D'autres théories plus récentes ont été développées comme la CoRAH (Coordinated Resource Allocation Hypothesis, Monson et al., 2022). Cette hypothèse rend compte de l'existence prévue (et observée) de réserves de ressources stockées (établies à un coût pour la croissance et la différenciation) qui fournissent une marge de sécurité pour répondre aux futurs stress biotiques et abiotiques, tout en équilibrant simultanément le compromis croissance-différenciation (Monson et al., 2022).

### 4.3 Mise en place des défenses de la plante : concept de la résistance induite

Les plantes possèdent un système immunitaire inné qui est capable de produire les composés et les structures de défense dont elles ont besoin en cas d'agression. Ce système est sous le contrôle d'un réseau complexe de voies de signalisation, qui peuvent être activées directement après reconnaissance de modèles moléculaires associés à des microorganismes ou à des dégâts. On parle respectivement de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou MAMPs (*Microbe-Associated Molecular Patterns*) et de DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (Zipfel, 2008).

Le modèle en « zig-zag » de Jones et Dangl (2006), distingue trois formes de résistance : l'ETI (*Effector Triggered Immunity*), la PTI (*Pattern-Triggered Immunity*), et la BR (basal resistance). L'ETI est une résistance qualitative, déclenchée par des effecteurs et associée à une réponse hypersensible et à la mort cellulaire (Morel and Dangl, 1997). La PTI correspond à une forme quantitative activant toute une gamme de voies et de mécanismes de défense qui varient de surcroît, en fonction du stade de l'interaction entre l'agresseur et la plante-hôte (Couto and Zipfel, 2016). Le niveau de résistance résiduel, après répression de l'ETI et de la PTI correspond à la BR (Jones et Dangl, 2006).

Malgré les différences qui existent entre l'ETI, la PTI et la BR, ces trois formes de résistance partagent les mêmes voies de signalisation et les mêmes mécanismes de défenses, avec la production locale de ROS, le renforcement des parois et la production d'hormones, notamment de SA, d'acide jasmonique (JA), d'éthylène (ET) et d'acide abscissique (ABA) qui interagissent finement pour ajuster la réponse immunitaire (Koornneef and Pieterse, 2008; Vos et al., 2015).

Pour réduire les dégâts effectués par les pathogènes les plus virulents, les plantes ont développé la capacité à augmenter leur niveau d'immunité spontanée en mémorisant les attaques passées afin de pouvoir déployer leurs défenses de manière plus rapide et plus forte à l'occasion de nouveaux contacts



avec les bioagresseurs (Conrath, 2011a). On parle de *priming* et de résistance induite, IR (induced resistance). Cette dernière ne correspond pas à un processus évolutif (il n'y a pas de mutation) mais entre dans le cadre de la plasticité phénotypique et peut ainsi être considérée comme une immunité acquise par les plantes (Wilkinson et al., 2019). L'IR s'exprime souvent de manière systémique, est durable dans le temps, possède un spectre large et, surtout, est plus efficace que la BR (Walters et al., 2005). L'objectif des éliciteurs est d'induire l'IR.

La résistance systémique acquise, SAR (systemic acquired resistance) est une forme d'IR qui dépend du SA et de la protéine régulatrice de défense NPR1 (Ryals et al., 1996). L'activation de la SAR entraîne le *priming* et l'activation directe d'un grand nombre de mécanismes de défense de base et notamment la production des protéines PR (*pathogenesis-related*). La SAR peut fournir une protection de longue durée contre une large gamme de pathogènes biotrophes et semi-biotrophes.

A côté de la SAR, il existe d'autres formes d'IR, comme la résistance systémique induite, ISR (*induced systemic resistance*) qui est déclenchée par des microorganismes bénéfiques associés aux racines : les PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), les PGPF (*Plant Growth Promoting Fungi*) et les mycorrhizes arbusculaires, AMF (*arbuscular mycorrhizal fungi*). L'ISR emprunte d'autres voies de signalisation que celles de la SAR. Elle ne repose pas sur la voie du SA mais sur l'amorçage des voies du JA et de l'ET (Pieterse et al., 2014). Tandis que la SAR est efficace contre les pathogènes biotrophes, l'ISR est efficace contre les pathogènes nécrotrophes et les arthropodes ravageurs (insectes, acariens), (Van Wees et al., 2008). Cette signalisation semble aujourd'hui plus complexe : les flashes d'UV-C ont stimulé la résistance contre *Botrytis*, un nécrotrophe, alors qu'ils stimulent la voie du SA chez *Arabidopsis* (Urban, communication personnelle).

#### 4.4 *Priming* des défenses

Les plantes peuvent subir des dommages conséquents lors de la mise en place des défenses lors d'une attaque de pathogène ou d'un stress abiotique soudain (Frost et al., 2008). L'application d'éliciteurs vise à enclencher la SAR afin d'amener le système de défense de la plante dans un état induit ou amorcé et pouvoir induire une réponse de défense rapide/plus forte lors d'un stress ultérieur (Conrath, 2011a). L'action du *priming* est systémique : elle s'établit dans le tissu exposé à l'éliciteur puis dans le reste de la plante. Le *priming* offre un avantage de réduction du coût métabolique lors de la mise en place des réponses de défense. Le mécanisme contrôlant le *priming* n'a pas encore été complètement élucidé. Néanmoins, certains composés ont été identifiés comme jouant un rôle central dans la mise en œuvre du *priming* médié par le SA, chez *Arabidopsis thaliana* : les MAP kinases 3 et 6 (Beckers et al., 2009), les facteurs de transcription MYC2 (Poza et al., 2008) et les niveaux élevés de



PRR (Tateda et al., 2014). Des modifications épigénétiques ont également été observées, suggérant une transmission de la capacité de *priming* pour la descendance montrant des réponses de défenses améliorées (Jaskiewicz et al., 2011; Avramova, 2015). Urban et al. (2022) émettent l'hypothèse qu'une résistance efficace et durable est conditionnée par le niveau de ressources en carbohydrates qui peuvent être mobilisées pour synthétiser les composés nécessaires à la défense. L'application d'éliciteurs entraîne une réponse de défense plus rapide afin de préserver les ressources pour la croissance.

En général, les réponses de résistance contre les agressions biotiques et tolérance contre les stress abiotiques activées par ces éliciteurs conduisent à l'induction du métabolisme secondaire et à l'accumulation de métabolites dont la nature et proportion varient selon les espèces végétales (Sharma et al., 2019).

#### 4.5 Les différents types d'éliciteurs

Les éliciteurs peuvent être de natures différentes et sont classés selon leur origine et leur structure moléculaire. Les éliciteurs peuvent être biotiques, c'est-à-dire d'origine biologique, dérivé d'un pathogène ou d'une plante. Leur composition peut être inspirée d'une structure moléculaire connue comme par exemple le chitosan (Vasconsuelo et al., 2004) ou la pectine (Flores-Sánchez et al., 2002) ou complexe, regroupant plusieurs classes moléculaires, comme dans un extrait de levures (Broeckling et al., 2005; Sánchez-Sampedro et al., 2005) ou des spores de champignons (Zook, 1998). Les éliciteurs peuvent également être de nature abiotique. Ils sont classés dans deux groupes : les facteurs chimiques (hormones, métaux lourds, azote) ou les facteurs physiques (stress thermique, osmotique, rayonnement UV, ...). Les réponses induites par les éliciteurs chimiques sont universelles ; ils visent généralement soit à stimuler directement les défenses (DAMPs), soit à stimuler la voie du JA/ET et l'ISR (Yassin et al., 2021).

Il est également possible de classer les éliciteurs en fonction de leur mode d'action. Sont retrouvés alors les éliciteurs « généraux » qui peuvent conduire à la mise en place de réponses de défenses chez des plantes hôtes et non hôtes, et les éliciteurs spécifiques des espèces qui induisent une résistance seulement dans certaines espèces hôtes spécifiques. Il faut que les gènes d'aviorulence chez le pathogène et de résistance chez la plante soient présents pour entraîner la résistance de l'hôte (Cohn et al., 2001).



Plusieurs facteurs affectent l'intensité de la réponse de la plante à l'élicitation. La nature de l'éliciteur, la dose, l'application, la fréquence de traitement ou encore un potentiel effet synergique avec un autre éliciteur modifient l'efficacité de l'élicitation.

L'efficacité de l'élicitation dépend également de plusieurs caractéristiques de la plante et son environnement : les facteurs génétiques, agronomiques et l'état physiologique de la plante. Par exemple, l'application de méthyl jasmonate sur des pousses de brocoli de différents stades (3, 5 ou 7 jours) n'entraînent pas les mêmes effets : les composés phénoliques ont augmenté de 23 % par rapport au témoin lorsque les pousses ont 5 ou 7 jours, mais n'étaient pas différentes des concentrations témoins chez les pousses de 3 jours (Pérez-Balibrea et al., 2011). Ces interactions restent à ce jour mal comprises.

#### 4.5.1 Eliciteurs biotiques

Parmi les nombreux éliciteurs utilisés sur les plantes pour induire la production de métabolites secondaires ou en protection des cultures, on retrouve des éliciteurs biotiques ou d'origine biotique comme des oligosaccharides, le JA, le SA ou encore des microorganismes (Yassin et al., 2021).

Les oligosaccharides (OGA) sont largement utilisés comme éliciteurs. Chez la vigne, l'utilisation d'un OGA (diméthyl- $\beta$ -cyclodextrine) en culture cellulaire a permis d'augmenter la concentration en resvératrol (Zamboni and Vrhovsek, 2006). Chez *Papaver somniferum L.* (pavot à opium), l'élicitation avec des OGA a entraîné une accumulation d'alcaloïdes et en particulier une augmentation de la production de morphine de 54% par rapport au témoin (Khan et al., 2011). Un traitement d'élicitation avec de la laminarine, un polysaccharide issu de la paroi cellulaire d'algue, a induit une augmentation de la teneur en capsaïcine dans les fruits de *Capsicum frutescens* (Gururaj et al., 2012). Les COS-OGA (ChitoOlygoSaccharides et OligoGalacturonides, oligosaccharides issus de carapaces de crustacés et de pectines de fruits) sont utilisés pour stimuler les défenses des plantes notamment *via* la synthèse d'acide salicylique (van Aabel et al., 2016).

L'application de méthyl jasmonate (MeJA) a stimulé, après 48h, l'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, dont ceux codant pour la PAL chez le basilic (Milan et al., 2017). L'application de SA ou de MeJA sur des cultures cellulaires de piment (cals 'Habanero') pendant 0, 12, 24, 36, 48 et 72h a entraîné une accumulation des capsaïcinoïdes et de l'intermédiaire précédent, la vanilline. Les deux éliciteurs ont eu un effet positif sur l'activité de la PAL, et de la COMT (Altúzar-Molina et al., 2011; Gururaj et al., 2012; Rodas-Junco et al., 2013). Ils ont également eu un effet positif sur l'expression du facteur de transcription *CaMYB31* (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017).



L'application de SA pendant la croissance du plant de piment (*Capsicum annuum* cv. Twingo) a également entraîné une augmentation de la biomasse, de la concentration en acide ascorbique et en caroténoïdes totaux, et une réduction de l'activité des peroxydases dans les feuilles et dans les fruits (Elwan and El-Hamahmy, 2009). Les capsaïcinoïdes étant dégradés par les peroxydases, la diminution de l'activité de ces dernières pourrait être un autre levier pour améliorer la concentration en capsaïcinoïdes, en évitant leur dégradation, la concentration en métabolites résultant d'un bilan entre synthèse et dégradation à un instant donné.

#### 4.5.2 Eliciteurs abiotiques

Les éliciteurs abiotiques sont également largement utilisés, parmi lesquels sont retrouvés tous les facteurs environnementaux utilisés à une dose bénéfique, des traitements chimiques comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou encore les rayonnements UV.

##### 4.5.2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, qui pourrait également être classé en tant qu'éliciteur biotique, plusieurs études ont montré que son utilisation comme éliciteur permettait d'augmenter les concentrations en métabolites secondaires chez plusieurs espèces. L'application répétée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur des feuilles de *C. chinense*, induit une augmentation de l'accumulation de métabolites secondaires (composés phénoliques, flavonoïdes et capsaïcinoïdes) dans les fruits et une augmentation de l'activité antimicrobienne *in vitro* (Vargas-Hernández et al., 2017). Une autre étude montre que l'utilisation de peroxyde d'hydrogène sur des tiges d'*Aqualaria sinensis* augmente la concentration en sesquiterpènes dans les tissus (Zhang et al., 2014). Le brevet déposé par ID4FEED encadre d'ailleurs l'utilisation de peroxyde d'hydrogène par pulvérisation sur les feuilles de *C. chinense* 'Helios' dans le but d'augmenter les concentrations en métabolites secondaires, dont les capsaïcinoïdes (Brevet FR3100955, 2021).

Bouvier et al. (1998), ont étudié l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes en situation de stress induits pharmacologiquement, en travaillant sur des disques de péricarpe de poivron. L'augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogène par blocage de la catalase a entraîné une forte augmentation des différents transcrits des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, parallèlement à une synthèse *de novo* d'un caroténoïde spécifique des chromoplastes de *Capsicum*, la capsanthine, non détectée dans les disques témoins. Les stress oxydatifs ont augmenté l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.



#### 4.5.2.2 CO<sub>2</sub>

D'autres facteurs abiotiques peuvent influencer positivement la concentration en capsaïcinoïdes comme par exemple la concentration en CO<sub>2</sub>, qui a entraîné une augmentation de 27% de la teneur en capsaïcinoïdes par rapport au témoin avec 760 ppm de CO<sub>2</sub> pendant 5 mois au lieu de 380 ppm (Garruña-Hernández et al., 2013). Cette observation suggère un effet sur la photosynthèse et la production d'effecteurs, et il reste à établir le rôle joué par le métabolisme primaire dans la synthèse des capsaïcinoïdes.

#### 4.5.2.3 Rayonnements UV

Les radiations UV ont été largement étudiées notamment en *post-récolte*, où les UV-B à faibles doses entraînent l'accumulation de glucosinolates et de composés phénoliques tels que les flavonoïdes (Schreiner et al., 2016). Dans la peau de la pomme, les UV-B combinés à la lumière visible, ont permis une augmentation des composés phénoliques de 127% par rapport à une exposition à de la lumière visible uniquement (Hagen et al., 2007).

Les UV-C sont également exploités en application directe sur les plantes pendant la culture, ou sur fruits récoltés, car, une fois perçus par les plantes, ils peuvent stimuler des voies de signalisation et métaboliques impliquées dans le métabolisme secondaire (Urban et al., 2016b).

### 4.5.3 Les rayonnements UV-C

La partie UV du spectre électromagnétique comprend le rayonnement UV-A à ondes longues (320-400 nm), les rayonnements UV-B à ondes moyennes (280-320 nm) et les rayonnements UV-C à ondes courtes (200-280 nm) (Bintsis et al., 2000). Les UV-C sont absents naturellement de l'atmosphère terrestre car absorbés par la couche d'ozone. Selon la relation de Planck, plus la longueur d'onde est courte, plus l'énergie du photon est élevée, ce qui fait des rayonnements UV-C les plus énergétiques de tous les rayonnements UV.

En conservation *post-récolte*, les UV-C sont utilisés pour contrôler les maladies des fruits et légumes et augmenter la durée de vie en retardant la sénescence (Stevens et al., 1990a; Wilson et al., 1997; Mercier et al., 2001a; Liu et al., 2011). Sur fruits récoltés, ils peuvent retarder la sénescence et stimuler le métabolisme secondaire en étant utilisés à des doses hormétiques, c'est-à-dire efficaces sans engendrer d'effets négatifs. L'effet positif des UV-C sur la meilleure conservation des fruits et légumes serait dû à leur stimulation de l'activité antioxydante, permettant une meilleure gestion des ROS associés à la sénescence et un retard des dommages oxydatifs (Urban et al., 2016b), ainsi qu'à la conservation de l'intégrité pariétale (Charles et al., 2008).

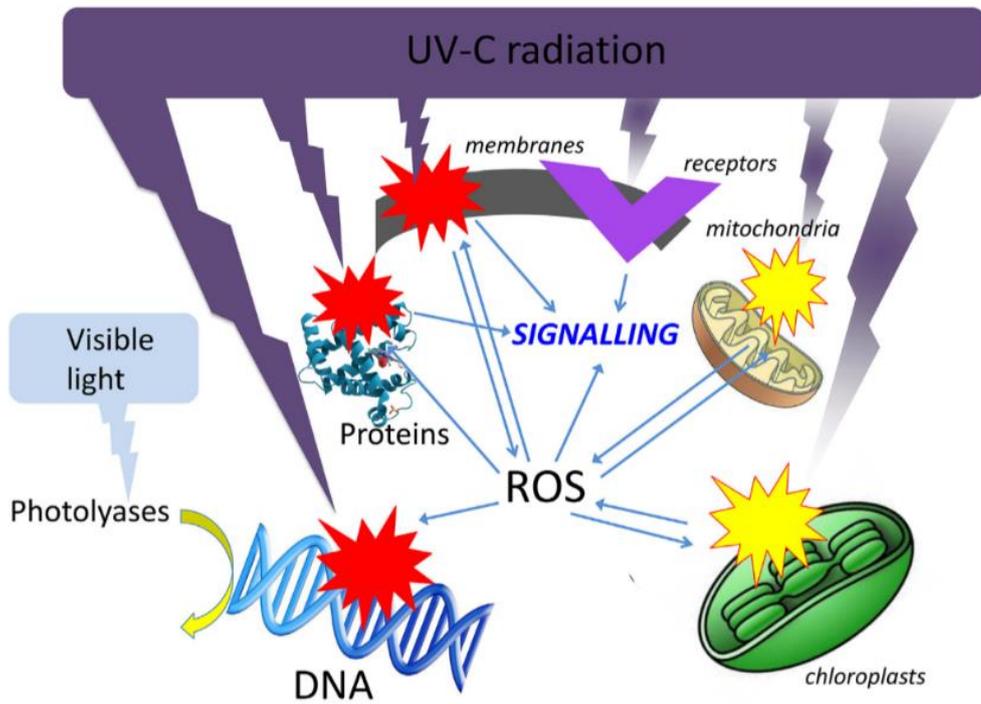


Figure 22. Représentation des effets des UV-C sur les cellules végétales. (Urban et al., 2016).

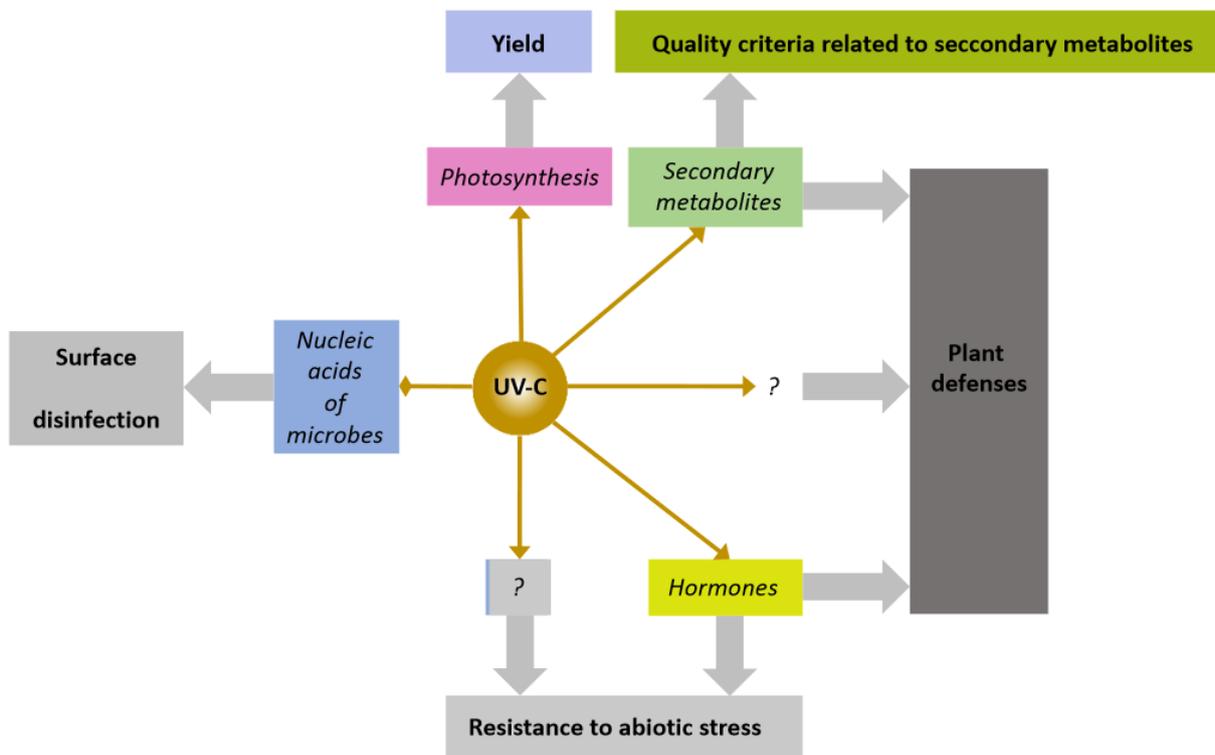


Figure 23. Effets biologiques et agronomiques des rayonnements UV-C. De Urban et al. (2022)

Ils sont également utilisés dans un but de désinfection grâce à leurs effets délétères à forte dose sur les micro-organismes : les rayons de longueurs d'ondes entre 250 et 260 nm ont la capacité de dénaturer l'ADN cellulaire par la formation de dimères de pyrimidine (Bintsis et al., 2000). A une certaine dose, les rayonnements UV-C peuvent également avoir un effet délétère sur les membranes et en particulier sur les chloroplastes et les mitochondries, avec une dégradation directe des plastoquinones (Bishop, 1961; Shavit and Avron, 1963), des protéines membranaires des chloroplastes, ce qui empêche le bon fonctionnement du photosystème II. Les UV-C pourraient avoir un effet délétère direct sur la structure des membranes, *via* des effets sur les protéines et les phospholipides membranaires. Ils sont également à l'origine de la formation de ROS, qui à leur tour, peuvent impacter négativement l'intégrité de l'ADN, des protéines et des membranes, et le fonctionnement des mitochondries et chloroplastes (Figure 22) (Urban et al., 2016).

Par des mécanismes encore inconnus, les UV-C ont différents effets biologiques et agronomiques (Figure 23). Les rayonnements UV-C sont étudiés en application directe sur les plantes en culture car ils peuvent être utilisés pour induire une réponse aux stress biotiques et abiotiques en stimulant les défenses des plantes, ou augmenter les productions de métabolites secondaires d'intérêt (Urban et al., 2016b; Urban et al., 2022). La synthèse de nombreux métabolites de différentes familles (polyphénols, caroténoïdes, ...) a été augmentée à la suite d'une exposition aux UV-C (Tableau 2, Mishra et al., 2020). En réponse à une exposition d'UV-C, les plantes répondent notamment par une production de ROS, qui joue aussi un rôle dans la défense des plantes contre les ravageurs et les maladies. L'accumulation rapide de ROS au site d'attaque des pathogènes est toxique pour les pathogènes directement (Lamb and Dixon, 1997) et peut cibler des voies de signalisation qui sont responsables de l'activation d'autres mécanismes de défense (Dat et al., 2000; Grant and Loake, 2000). La stimulation de la voie de biosynthèse du SA par les UV-C a été rapportée par Yao et al. (2012). Le SA étant considéré comme un éliciteur efficace pour l'augmentation des métabolites secondaires (Ali, 2021), les UV-C via la synthèse de SA, semblent être une bonne solution physique de traitement d'élicitation.

Pour le piment, les UV-C ont été principalement utilisés pour l'amélioration de la conservation post-récolte grâce à leur effet bactéricide : augmentation du temps de conservation avec un meilleur aspect visuel, fermeté supérieure, perte de poids plus faible (Vicente et al., 2005; Andrade Cuvi et al., 2011; Rodoni et al., 2012). Quelques études néanmoins utilisent les UV-C pour stimuler le métabolisme secondaire chez le piment en application sur la plante en cours de culture. Lorsque les UV-C sont appliqués pendant la croissance de la plante sur les feuilles à des doses de 9 et 17,2 kJ/m<sup>2</sup>, la

Tableau 2. Synthèse des métabolites secondaires induits par une irradiation UV-C. Issu de (Mishra et al., 2020). (PSMs : plant secondary metabolites).

PSMs	Source	Treatment Condition	UV-C elicitation dose	Induced by	References
Ergosterol	<i>Agaricus bisporus</i>	UV-C	14.71 kJ/m <sup>2</sup>	3.31 fold	(Mau et al., 1998; Taofiq et al., 2017)
Resveratrol	<i>Vitis vinifera</i> cv. Beihong	UV-C	6 J/m <sup>2</sup>	90 fold	(Wang et al., 2015)
Trans-resveratrol	<i>V. vinifera</i> berry skin	UV-C	0.0025 J/m <sup>2</sup>	355 fold	(Suzuki et al., 2015)
Trans-resveratrol	<i>V. vinifera</i> cv. Okuzgozu calli	UV-C	25.2-57.6 kJ/cm <sup>2</sup>	8 fold	(Cetin, 2014)
Resveratrol	<i>V. vinifera</i> cv. Napoleon	UV-C, stored at 0°C	510 J/m <sup>2</sup>	10 fold	(Cantos et al., 2001)
Total phenolic	<i>V. vinifera</i> cv. Okuzgozu calli	UV-C	25.2-57.6 kJ/cm <sup>2</sup>	2.15 fold	(Cetin, 2014)
Total flavonol	<i>V. vinifera</i> cv. Okuzgozu calli	UV-C	25.2-57.6 kJ/cm <sup>2</sup>	24.55 fold	(Cetin, 2014)
Flavonoid	Maradol papaya	UV-C, stored at 5°C and 14°C	1.48 kJ/m <sup>2</sup>	2.5% and 26%	(Rivera-Pastrana et al., 2014)
Flavonoids	<i>Capsicum annuum</i> L.	UV-C+SA	5.7 J/m <sup>2</sup>	1.5-2 fold	(Mahdavian et al., 2008)
Catechin	<i>V. vinifera</i> cv. Redglobe	UV-C, stored at 4°C	4.1 kJ/m <sup>2</sup>	1.5 to 2 fold	(Crupi et al., 2013)
Catechin	<i>V. vinifera</i> cv. Okuzgozu calli	UV-C	50.4-115.2 kJ/cm <sup>2</sup>	7.28 fold	(Cetin, 2014)
Cis and trans piceid	<i>V. vinifera</i> cv. Redglobe	UV-C, 4°C	2.4 kJ/m <sup>2</sup>	3 fold	(Crupi et al., 2013)
Piceid	<i>V. vinifera</i> cv. Napoleon	UV-C, 0°C	17.8-23.0 J/m <sup>2</sup>	3 fold	(Cantos et al., 2000)
Cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3 O-glucoside	<i>V. vinifera</i> cv. Redglobe	UV-C, 4°C	4.1 kJ/m <sup>2</sup>	1.5 to 2 fold	(Crupi et al., 2013)
Carthamin	<i>Carthamus tinctorius</i> L. cv. Benibana	UV-C, 23°C	50 J/m <sup>2</sup>	13.9 fold	(Fukushirna and Saito, 2000)
Anthocyanins	<i>C. annuum</i> L.	UV-C+SA	5.7 J/m <sup>2</sup>	2 fold	(Mahdavian et al., 2008)
Rutin	<i>C. annuum</i> L.	UV-C+SA	5.7 J/m <sup>2</sup>	3 fold	(Mahdavian et al., 2008)
UV absorbing compounds	<i>C. annuum</i> L.	UV-C+SA	5.7 J/m <sup>2</sup>	2 fold	(Mahdavian et al., 2008)
Artemisinin	<i>Artemisia annua</i> L.	UV-C	5.7 kJ/m <sup>2</sup>	15.7%	(Rai et al., 2011)
Lycopene	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	UV-C, stored at 25°C	3.0 kJ/m <sup>2</sup>	2 fold	(Bravo et al., 2012)
Lycopene	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	UV-C and ultrasound	2.15 kJ/m <sup>2</sup>	90%	(Esua et al., 2019)
Glucosinolate	<i>Brassica oleracea</i> L. cv. italica	UV-C, stored at 4°C	1.2 kJ/m <sup>2</sup>	N/A	(Nadeau et al., 2012)
Lignans (Di-glucoside)	<i>Linum usitatissimum</i> L.	UV-C	3.6 kJ/m <sup>2</sup>	1.86 to 2.25 fold	(Anjum et al., 2017)
Total phenolic	<i>Linum usitatissimum</i> L.	UV-C	3.6 kJ/m <sup>2</sup>	2.82 fold	(Anjum et al., 2017)
Polyphenols	<i>Lepidium sativum</i> L.	UV-C	3 J/m <sup>2</sup>	2.5 fold	(Ullah et al., 2019)

concentration en caroténoïdes dans les feuilles semble diminuer (Mahdavian et al., 2008a; Sarghein et al., 2008). Lorsque les fruits sont traités avec des UV-C après la récolte, à des doses entre 0,68 et 6 kJ/m<sup>2</sup>, les concentrations en caroténoïdes sont augmentées de 20 à 50% selon les doses (Promyou, 2012; Pérez-Ambrocio et al., 2018).

Le traitement aux UV-C possède des avantages par rapport aux traitements chimiques. En effet, leur application n'entraîne pas d'effets secondaires sur l'environnement. Ces traitements physiques sont sans résidus et n'exercent aucun effet indésirable sur le sol, la faune et la flore. L'application ne requiert pas de conditions climatiques particulières et peut être réalisée par tous temps. De plus, à des doses hormétiques, les UV-C appliqués sous forme de flashes (moins de 2 secondes) n'exercent aucun effet négatif sur la photosynthèse et la croissance des plantes, même chez les plantes non stressées, ce qui n'est pas le cas de tous les autres traitements éliciteurs chimiques visant la voie de l'acide salicylique (Aarrouf et al., 2020 ; Ledermann et al., 2021).

La lampe à lumière pulsée, autre dispositif lumineux (longueurs d'ondes allant de 200 à 1100 nm, contenant 15% d'UV-C), générant un flash polychromatique de très forte intensité sur un temps très court (300µs) semble avoir aussi un effet sur la stimulation du métabolisme secondaire. La quantité d'énergie absorbée par la plante pour un temps donné est supérieure à une application de plusieurs secondes ou minutes. La lumière pulsée utilisée sur des fruits récoltés a montré une augmentation de la concentration en caroténoïdes de 150% chez la tomate au bout de 21 jours (Pataro et al., 2015) et de 350% dans la pulpe de mangues après 7 jours de conservation (Lopes et al., 2016).

#### 4.5.4 Association d'éliciteurs

L'association d'éliciteurs est possible et peut modifier les réponses de la plante. En effet, un phénomène de résistance croisée peut intervenir, signifiant qu'une acclimatation suite à un stress entraîne un certain niveau de protection contre un autre (Jansen et al., 2022a). La combinaison d'éliciteurs peut entraîner des effets synergiques, antagonistes ou additifs, qui peuvent être calculés selon une méthode développée par Piggott et al. (2015).

Une méta-analyse, regroupant 89 expériences, sur les effets des UV (A et B) en condition de stress hydrique a révélé que la combinaison de stress provoque à la fois un effet antagoniste en entraînant une augmentation (moins qu'additive) des marqueurs d'acclimatation (proline, flavonoïdes, antioxydants), considérés comme protecteurs, et une réduction antagoniste (moins qu'additive) des dommages (réduction de la hauteur des plantes ou de la surface foliaire) (Jansen et al., 2022a). Un tronc commun de réponses de défense, gouverné par des voies de signalisation se recouvrant, telles les voies hormonales et la production contrôlée de ROS cellulaires, a été sur-stimulé par la combinaison



de ces deux stress et a provoqué simultanément une meilleure protection contre le stress et une moindre nécessité de déployer les mécanismes de défense. Il est important de souligner que les doses des études réunies dans cette méta-analyse n'ont pas été précisées, mais étant considérées comme des stress, elles ne peuvent pas être des doses hormétiques. Par la suite, les doses appliquées dans les expériences de la thèse sont hormétiques, et donc ne sont pas considérées comme des stress.

Mahdavian et al. (2008) ont observé une augmentation de 34 % de la concentration en anthocyanes dans les feuilles après un traitement à l'acide salicylique sur les plants de piment (*C. annuum*) par pulvérisation. Lorsque les plantes ont été exposées aux UV-C (27 min/jour pendant 14 jours, soit 131 kJ/m<sup>2</sup> au total), la même augmentation de la concentration en anthocyanes a été observée (+ 33%). Lorsque les deux traitements ont été associés (pré-traitement avec SA puis exposition aux UV-C), la concentration a été augmenté de 70%. La combinaison du traitement à l'acide salicylique et du traitement UV-C entraîne un effet additif sur la synthèse des anthocyanes. La diaphonie (*cross-talk*) entre les voies de signalisation du SA et du JA/éthylène, c'est-à-dire les interactions des voies de transduction du signal hormonal, sont au cœur du réseau de signalisation conduisant à l'immunité des plantes (Pieterse et al., 2012; Urban et al., 2022).

## 4.6 Mécanismes physiologiques de réponse à un stress

### 4.6.1 Généralités

Afin de comprendre et éventuellement maîtriser les conséquences finales de l'application d'un éliciteur, sur le métabolisme secondaire ou sur la morphologie d'une plante, il est nécessaire de comprendre les étapes de perception de ce stress, et celles qui en découlent jusqu'aux effets observés *in fine* sur la plante. Des modifications au niveau de la chaîne photosynthétique, du cycle de Calvin et de la synthèse des métabolites primaires, sont des indicateurs de stress physiologiques. Afin d'observer l'innocuité des traitements d'élicitation, il est nécessaire d'utiliser des outils non destructifs, tels que la mesure de la cinétique de fluorescence de la chlorophylle et des échanges gazeux.

La photosynthèse permet de transformer de l'énergie lumineuse (photons) en énergie chimique (glucose). La lumière absorbée par les plantes n'est pas utilisée en totalité pour la production d'énergie chimique. Une partie de cette énergie est dissipée sous forme de chaleur et de fluorescence chlorophyllienne (ChlF). La ChlF est dépendante directement ou indirectement de tous les processus de la réaction photochimique : de l'acceptation des premiers photons par les pigments chlorophylliens, jusqu'au transfert des électrons et le cycle de Calvin (Goltsev et al., 2016). Une diminution du transfert

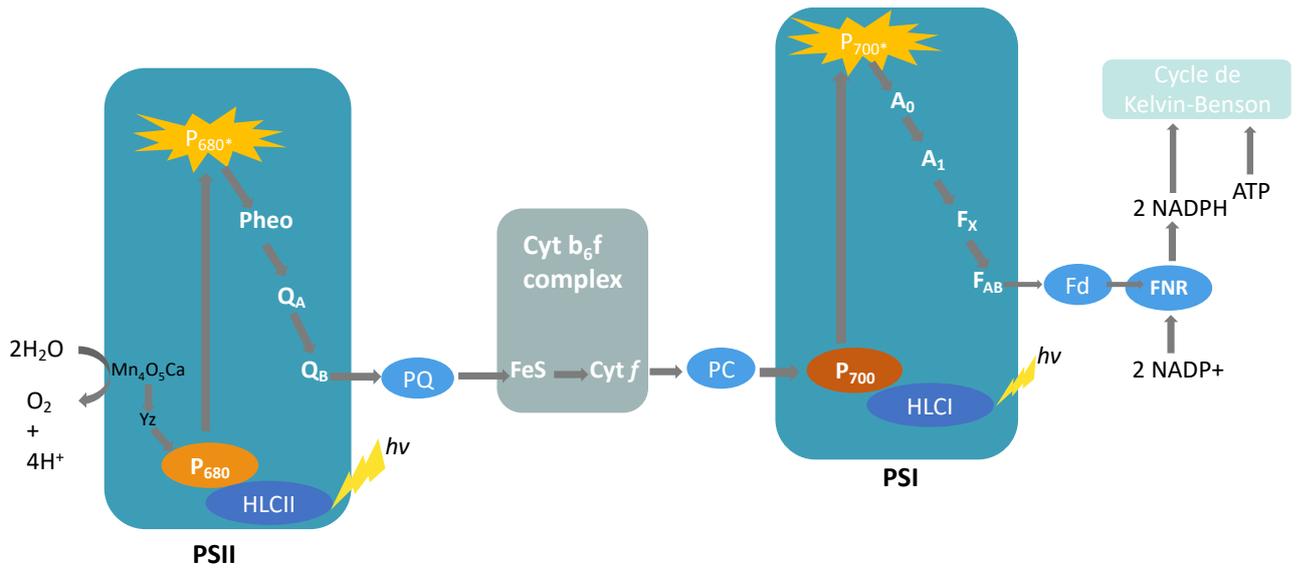


Figure 24. Schéma en Z du transfert d'électrons entre les deux photosystèmes (Stirbet and Govindjee, 2011).

de l'énergie par les voies photochimiques se traduit par une augmentation de la dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence ou de chaleur (McAlister and Myers, 1940; Strasser et al., 2000).

L'émission de fluorescence, même avec une proportion faible (3 à 5 %) représente une source très importante d'information pour l'étude et l'interprétation de l'adaptation physiologique des plantes aux conditions environnementales (Maxwell and Johnson, 2000; Goltsev et al., 2016).

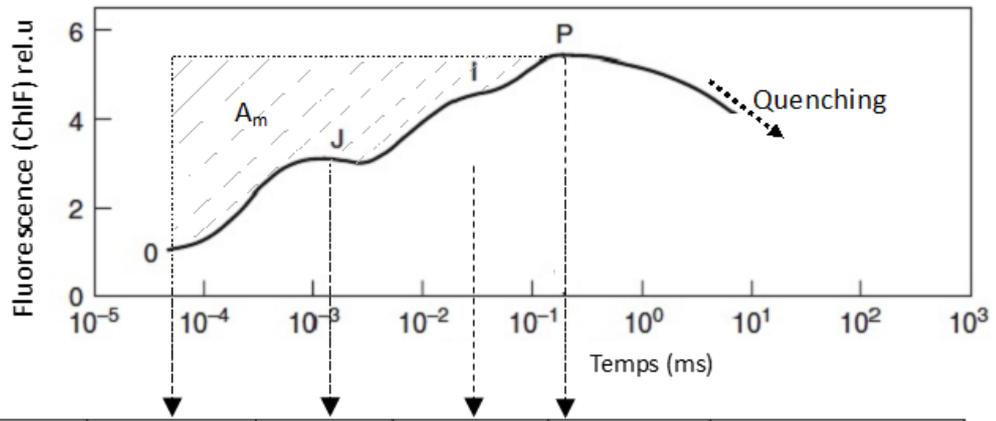
#### 4.6.2 Le transfert d'électrons

La lumière absorbée par les antennes collectrices des deux photosystèmes est la source d'énergie qui permet le transfert d'électrons depuis l'oxydation des molécules d'eau jusqu'à NADP<sup>+</sup>. Ce processus de transfert d'électrons et d'énergie aboutit à la formation des molécules NADPH et ATP. Ces deux molécules sont nécessaires dans le cycle de Calvin-Benson pour la conversion de CO<sub>2</sub> en carbohydrates.

Le transfert d'électrons se déroule selon un schéma en Z (Figure 24). Une fois le centre réactionnel du photosystème II (PSII) (P680) excité par la lumière (hv), P680\* transmet l'électron provenant de l'eau *via* l'Oxygen Evolving Complex (OEC), à la phéophytine (Pheo). Lorsque P680 est oxydé (P680<sup>+</sup>), il peut être à nouveau réduit (P680<sup>-</sup>) en acceptant un nouvel électron du OEC *via* la tyrosine (Yz). La Phéo permet ensuite le transfert d'électrons à une quinone (QA) qui le transmet à une autre quinone (QB), puis à une plastoquinone mobile (PQ). Par la suite, PQ transfère l'électron au complexe cytochrome Cyt b6f. Ce complexe, *via* les protéines Fe-S et Cytf, cède l'électron à la plastocyanine (PC). Le centre réactionnel excité du PSI (P700\*) transmet les électrons reçus de PC à NADP<sup>+</sup> *via* plusieurs intermédiaires : des protéines (A0, A1), des protéines soufrées (FX, FAB) et la ferredoxine (Fd). La ferredoxine-NADP réductase (FNR), grâce au transfert d'électrons, catalyse la formation de NADPH. L'ATP est générée par l'enzyme ATP-synthétase à partir du gradient électrochimique transmembranaire établi par l'accumulation des protons issus du complexe OEC.

#### 4.6.3 Les paramètres de fluorescence

La photochimie maximale des plantes, qui est liée au transport d'électrons au niveau de PSII, peut être déterminée en fonction de la variation de la ChlF. En effet, en exposant une feuille adaptée à l'obscurité à une lumière saturante, les accepteurs d'électrons des photosystèmes sont réduits successivement induisant ainsi une variation de la fluorescence. Autrement dit, la variabilité de la fluorescence est liée à l'état d'oxydo-réduction des accepteurs d'électrons de la chaîne de transfert d'électrons (Stirbet and Govindjee, 2011).



Am	F <sub>0</sub>	F <sub>J</sub>	F <sub>I</sub>	F <sub>P</sub>	Quenching
Proportionnelle à la taille du pool des accepteurs d'électrons du PSII	50 μs	2 ms	30 ms	300 ms	Atténuation de la fluorescence par les réactions photochimiques ou non photochimiques
	Fluorescence des pigments des antennes	Equilibre entre Q <sub>A</sub> <sup>-</sup> et Q <sub>A</sub> réoxydé par Q <sub>B</sub>	Equilibre entre le pool PQ réduit et PQ réoxydé par PSI	Réduction totale des accepteurs des PSII et PSI	

Figure 25. La courbe d'induction de fluorescence chlorophyllienne (Strasser et al., 2000; Tsimilli-Michael and Strasser, 2008)

La cinétique de la ChlF est connue sous le nom de « courbe OJIP » ou encore « effet de Kautsky » (Govindjee, 1995). Après un temps d'adaptation des feuilles à l'obscurité (15 à 20 min), une exposition à la lumière saturante d'une très courte durée (1s), permet d'établir une courbe OJIP définissant l'évolution de la fluorescence.

L'émission de la fluorescence commence dès l'excitation des pigments chlorophylliens des antennes collectrices par les photons. Le transfert de l'énergie entre les molécules de chlorophylles permet soit l'excitation du centre réactionnel du PSII (P680) soit la dissipation de cette énergie sous forme de chaleur ou de fluorescence. C'est la fluorescence de base  $F_0$ .

Ensuite, si le centre réactionnel du PSII (P680) excité par un photon, transmet un électron *via* la Pheo à la QA, transféré ensuite à QB, QA est réduit (QA<sup>-</sup>). P680 étant oxydé (P680<sup>+</sup>), il peut récupérer un électron d'une tyrosine, mais ne peut pas le transmettre car QA est réduit. Par conséquent, l'émission de la ChlF augmente. La fluorescence atteint un niveau maximal  $F_m$  ou  $F_p$  lorsque l'appareil photosynthétique est exposé à une lumière saturante et que tous les QA sont réduits. On appelle  $F_v$  la différence entre  $F_m$  et  $F_0$ .

Les transitions de la courbe OJIP ( $F_0$ ,  $F_j$ ,  $F_i$ ,  $F_p$ ) représentent différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons des photosystèmes (Figure 25).  $F_0$  correspond au rendement initial de fluorescence à 50  $\mu$ s. L'intensité de fluorescence continue d'augmenter tant que les QA continuent d'être réduites (QA<sup>-</sup>). En même temps, les QA<sup>-</sup> poursuivent le transfert d'électrons à QB et QA se réoxyde. L'équilibre entre les deux états d'oxydoréduction de QA est atteint à 2 ms ce qui correspond à un petit plateau au niveau de  $F_j$ . La poursuite de la réduction des accepteurs de la chaîne de transport d'électrons permet à la fluorescence d'augmenter jusqu'au niveau  $F_i$  à 30 ms. La phase J-I correspond à la réduction du pool mobile de PQ et de sa réoxydation par les accepteurs du PSI (Fe-S, FNd, NADP<sup>+</sup>). L'intensité de fluorescence atteint son niveau maximal  $F_p$  à 300 ms. Ce niveau correspond à la réduction totale des accepteurs des PSII et PSI (Stirbet and Govindjee, 2011; Stirbet and Govindjee, 2011; Kalaji et al., 2014; Goltsev et al., 2016). Après  $F_p$ , le rendement de fluorescence commence à baisser progressivement : c'est le « quenching ». Cette atténuation de l'émission de fluorescence est due au fonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons et au début de la fixation du CO<sub>2</sub> (Quenching photochimique QP). Le quenching est également dû à la dissipation de l'énergie absorbée sous forme de chaleur (Quenching non photochimique : qN ou NPQ). La voie la plus importante de la photo-protection des plantes à l'excès d'énergie est le cycle des xanthophylles (Maxwell and Johnson, 2000; Kalaji et al., 2014).

A partir de la cinétique de la fluorescence, des paramètres représentant des indicateurs du fonctionnement de la machinerie photosynthétique liés au transfert d'électrons sont déductibles

Tableau 3. Paramètres de fluorescence déduits des courbes d'induction de la fluorescence OJIP (Strasser et al, 2000 ; Tsimilli et Strasser, 2008).

Paramètres bruts	Définition
$F_o$	Fluorescence à 50 $\mu$ s
$F_k$	Fluorescence à 300 $\mu$ s
$F_j$	Fluorescence à 2ms
$F_i$	Fluorescence à 30 ms
$F_p = F_m$	Fluorescence maximale (à 300 ms)
$M_o$	Pente initiale de la courbe OJIP
$A_m$	Aire au-dessus de la courbe OJIP
$T_{Fm}$	Temps nécessaire pour atteindre le niveau maximal de ChlF ( $F_m$ )
Paramètres déduits	Définition
$F_v = F_m - F_o$	Fluorescence variable entre $F_o$ et $F_m$
$F_v/F_m$	Rendement photochimique maximal des PSII
$V_k = (F_k - F_o) / F_v$	Fluorescence variable relative à 300 $\mu$ s
$V_j = (F_j - F_o) / F_v$	Fluorescence variable relative à 2ms
$S_m = A_m/F_v$	Capacité d'acceptation d'électrons par le pool des accepteurs d'électrons jusqu'à la réduction totale de $Q_A$
$N = S_m / (M_o/V_j)$	Nombre d'électrons nécessaires pour la réduction de $Q_A$
$F_v / F_o$	Performance de l'utilisation photochimique et non photochimique de l'énergie absorbée par les centres réactionnels
$(1-V_j) / V_j$	Performance de la conversion de l'énergie captée en flux de transport d'électrons
$DI_o/ABS$	Rendement du flux d'énergie dissipé sous forme de chaleur au niveau des antennes collectrices du PSII
$PI_{ABS} = RC/ABS * (\varphi_{PO} / 1 - \varphi_{PO}) * (\Psi_{E0} / 1 - \Psi_{E0})$	Indicateur de l'état de fonctionnement de PSII
$PI_{TOT} = PI_{ABS} * (\delta_{R0} / 1 - \delta_{R0})$	Indicateur de l'état de fonctionnement total des deux photosystèmes PSII et PSI

(Tsimilli-Michael and Strasser, 2008). Les paramètres déduits des différentes phases de transition de la courbe d'induction de ChlF peuvent être classés en trois catégories : les paramètres bruts de la courbe OJIP, les paramètres de flux d'énergie et les paramètres de performance des photosystèmes (Tableau 3).

## 5 Hypothèses et objectifs

L'objectif du projet est de développer un procédé d'élicitation applicable en plein champ qui permettrait d'augmenter la concentration en composés d'intérêts dans les fruits, à des coûts entrant dans le coût final acceptable d'un aliment complémentaire en nutrition animale. Le produit commercialisé étant un mélange de poudres de *Capsicum* avec une concentration en capsaïcinoïdes standardisée (0,5% minimum), le piment élicité, avec une forte concentration en caroténoïdes et capsaïcinoïdes, permettrait d'utiliser cette poudre pour ajuster la concentration finale. Un produit plus concentré pourrait permettre de diminuer les coûts d'approvisionnement, de laisser plus de place dans la formule pour d'autres actifs, ou encore permettre de développer des produits à très hautes teneurs finales en capsaïcinoïdes et caroténoïdes.

La grande diversité de variétés et donc de concentrations en capsaïcinoïdes entraîne des réponses aux conditions environnementales et à l'élicitation très différentes. Deux variétés ont été sélectionnées par l'entreprise ID4FEED afin d'envisager le traitement d'élicitation ; elles appartiennent à deux niveaux de piquant différents, dont les propriétés seront décrites en détail dans la suite du manuscrit (Chapitre 2, 1.1). La première variété, 'Bhut Jolokia', possède une teneur en capsaïcinoïdes très haute (environ 1 000 000 SHU selon les génétiques et conditions agronomiques), mais son rendement est réduit (60g de fruits/plant) (Indrabi et al., 2022). La corrélation négative entre teneur et rendement pourrait être attribuable à la compétition entre fonctions de croissance et production de composés secondaires (équilibre croissance-différenciation) (Herms and Mattson, 1992). L'autre variété sélectionnée, 'Habanero', présente une teneur en capsaïcinoïdes plus faible mais encore considérée comme forte sur l'échelle de Scoville (entre 100 000 et 350 000 SHU), ainsi qu'un rendement largement supérieur (1,2 kg de fruits/plant) (Vasquez-Velazquez et al., 2021). Les deux variétés ont une concentration en caroténoïdes moyenne, entre 3 et 4 mg/g MF, mais peu d'études sont disponibles sur la quantification dans nos variétés étudiées (Menichini et al., 2009; Mena et al., 2018).

Dans ce cadre, la technique d'élicitation pourrait satisfaire deux objectifs : (1) augmenter la teneur en métabolites des fruits provenant de variétés à bon rendement (masse/surface) (Poulev et al., 2003; Angelova et al., 2006), ou alors (2) améliorer la résistance aux stress biotiques et abiotiques des



plantes pour augmenter le rendement (masse/surface), de variétés déjà très concentrées et pouvoir faciliter leur exploitation dans différents lieux géographiques soumis à des contraintes environnementales diverses, sécurisant les cultures. Il reste à établir si les concentrations déjà très importantes pourraient encore être augmentées. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les variétés considérées comme « super-hot » accumulent des capsaïcinoïdes dans le péricarpe en plus du placenta, ce qui est le cas pour 'Bhut Jolokia', mais pas 'Habanero'. Le potentiel d'augmentation des concentrations en capsaïcinoïdes de 'Habanero' semble plus élevé, avec la possibilité d'accumuler des capsaïcinoïdes dans d'autres tissus et en fonction des conditions environnementales (Gurung et al., 2012).

Tout d'abord, afin de satisfaire les différents objectifs, une mise au point méthodologique a été indispensable et sera présentée dans le chapitre 3. Dans le but de caractériser les métabolites d'intérêt du piment, la préparation des échantillons et leur analyse ont dû être optimisées. Ensuite, les caroténoïdes et capsaïcinoïdes étant nombreux et variés dans les fruits de piments, un travail d'identification a été nécessaire à l'aide de standards et des fragments caractéristiques de chaque molécule. Par la suite, des profilages métaboliques non ciblés dans des plantes en situation de stress physiologique ont été réalisés.

Ensuite, les deux objectifs de l'élicitation ont été étudiés.

Le premier objectif (Chapitre 4) visait à satisfaire une performance industrielle afin de développer un procédé technique permettant d'augmenter la concentration en métabolites secondaires d'intérêt dans les fruits, applicable sur le terrain. Pour ce faire, différents traitements ont été appliqués sur les plantes et fruits pendant la croissance. Les rayonnements UV-C ont été envisagés pour cette élicitation car leur application stimule la synthèse d'acide salicylique dans les plantes (Yao et al., 2012), ce qui peut déclencher ensuite de nombreux mécanismes de résistance et induire la production de métabolites secondaires. Ils ont été utilisés pour leur capacité à produire des ROS et donc agir sur la concentration en antioxydants tels que les caroténoïdes (Bouvier et al., 1998). Concernant les capsaïcinoïdes, aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur l'effet des UV-C sur ces concentrations mais l'expression du facteur de transcription *CaMYB31* ayant été induite par la synthèse de SA (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017), il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de ce traitement sur l'accumulation de capsaïcinoïdes. Le SA, à travers l'application de traitements UV-C, est à l'origine d'un effet de *priming* et nécessite un deuxième traitement pour déclencher la synthèse de composés ciblés (Urban et al., communication personnelle). Un stress hydrique sera associé à ces traitements d'élicitation.



Un autre traitement a également été utilisé en tant que témoin positif. En se basant sur de précédentes études menées par ID4FEED, le peroxyde d'hydrogène pulvérisé sur plantes de *C. chinense* 'Helios' pendant la croissance, a augmenté les concentrations en capsaïcinoïdes dans les fruits, d'un facteur 2,5, voire d'un facteur 4 lorsque le traitement était associé au stress hydrique (Brevet FR3100955, 2021). La pulvérisation sur les feuilles de piment *C. annuum*, pendant la maturation du fruit a également augmenté l'expression des gènes associés aux capsaïcinoïdes d'un facteur 25 à 50 (*pAMT*, *KAS*, *PAL*, *PUN1*) (Zunun-Pérez et al., 2017). Un brevet a d'ailleurs été déposé par ID4FEED à l'issue de ces observations, protégeant l'utilisation de peroxyde d'hydrogène combiné à un stress hydrique dans le but d'augmenter les concentrations en capsaïcinoïdes des fruits de la variété *C. chinense* 'Helios' (Brevet FR3100955, 2021).

Le deuxième objectif, qui sera détaillé dans le chapitre 5, vise à améliorer les performances agronomiques des plantes. Les traitements d'élicitation dans ce cas sont intervenus à un stade précoce, dans le but d'améliorer leur tolérance aux stress abiotiques, en améliorant le comportement agronomique des plantes. Une meilleure tolérance permettrait de conserver le stock de ressources carbonées afin de maintenir la croissance et *in fine* le rendement, sans affecter le pool de métabolites secondaires. L'amélioration des performances agronomiques des plantes à fort taux de capsaïcinoïdes pourrait également permettre de combiner les bonnes performances agronomiques et les forts taux de capsaïcinoïdes.

Ce manuscrit sera donc articulé autour de ces objectifs. Tout d'abord, une partie décrivant le matériel et les méthodes utilisées dans la thèse sera présentée dans le chapitre 2. Les parties suivantes décriront le développement analytique mis en place en vue de la caractérisation des métabolites d'intérêt (chapitre 3), puis l'effet des éliciteurs sur les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes dans les fruits associés ou non à un stress hydrique (chapitre 4) et enfin la réponse de la plante au stade végétatif après un traitement aux UV-C en condition de stress hydrique (chapitre 5).

Une partie de ce travail de thèse a été réalisé sur le traitement des fruits après la récolte. Différents essais ont été menés afin d'observer les variations de métabolites d'intérêt dans les fruits après traitement des fruits et conservation. Cet axe de travail ne sera pas présenté dans ce manuscrit.



# Chapitre 2

---

Matériel et méthodes



Ce chapitre décrit le matériel végétal employé ainsi que les méthodes expérimentales communes à l'ensemble des travaux présentés. Les détails plus spécifiques de l'application des éliciteurs à chaque expérimentation sont mentionnés dans les chapitres correspondants. Les méthodes d'extraction et d'analyses font l'objet d'un chapitre à part entière (chapitre 3) car elles ont nécessité des étapes de développement et d'optimisation.

## 1 Matériel végétal

### 1.1 Choix des espèces et variétés étudiées

Les expériences ont été réalisées sur deux génotypes possédant des niveaux de piquants différents.

Le premier génotype, 'Habanero', est une variété de *Capsicum chinense*. Bien que le terme « Habanero » soit parfois utilisé pour désigner un type variétal de piment, c'est-à-dire un groupe informel de plantes qui partagent des caractéristiques distinctives mais qui n'ont pas de statut officiel en termes de classification taxonomique, il s'agit en réalité d'une variété spécifique de piments. En raison de cette confusion, il est difficile d'obtenir des informations spécifiques sur la variété 'Habanero'. Il est néanmoins établi que cette variété est originaire des Caraïbes et est très cultivée dans la péninsule du Yucatan au Mexique et dans les régions tropicales du monde entier (Vasquez-Velazquez et al., 2021). Cette variété est considérée comme piquante et possède entre 100 000 et 350 000 unités sur l'échelle de Scoville (Sweat et al., 2016), ce qui équivaut à des valeurs entre 6,2 et 21,7 mg de capsaïcine.g MS<sup>-1</sup>, ou encore entre 0,6%-2,17%.

Le deuxième génotype, 'Bhut Jolokia' (BJ), appartient à l'espèce *Capsicum chinense* mais possède des introgressions (flux de gènes) de *Capsicum frutescens*. Il peut donc être considéré comme un hybride interspécifique naturel entre *C. chinense* et *C. frutescens* (Bosland and Baral, 2007). Originaire du nord est de l'Inde, de nombreux noms sont proposés en fonction de la région considérée. Il est donc également connu sous le nom de 'Bhoot Jolokia', 'Naga king', 'Naga Jolokia', 'Bih Jolokia', 'Dorset Naga', 'Raja Mirchi', 'Borbih Jolokia', 'Nagahari', 'Ghost chilli', 'Naga Viper chilli' ou encore 'Poison chilli' (Verma et al., 2013). Il a été classé comme variété la plus piquante au monde en 2007 dans le *Guinness Book of World Records* en atteignant 1 000 000 SHU (Roy, 2016), ce qui équivaut à 62,1 mg capsaïcine.g MS<sup>-1</sup> ou encore 6,2%.



## 1.1 Mise en culture

Les graines provenant d'un semencier (Ducretet, Gaillard, France) ont été désinfectées par trempage dans de l'hypochlorite de sodium 2%, puis semées dans des plaques de 40 cellules contenant du terreau composé de tourbe brune, blonde, de perlite et d'engrais (NPK 14-16-18, 1.2 kg/m<sup>3</sup>) (Light Mix, Biobizz, Espagne). La germination a eu lieu en 8 à 10 jours dans des conditions de températures de 28°C jour/24°C nuit. Le repotage a été effectué environ 4 semaines plus tard, dans des pots de 4L contenant le même terreau. Les plants ont été cultivés en serre dont les consignes de températures ont été fixées à environ 28°C jour/24°C nuit, avec une photopériode de 16h jour/8h nuit. Les conditions d'éclairage ont différé selon les saisons de culture mais étaient comprises entre 200 et 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  selon la saison (mesuré par radiomètre, Solar Light, USA). Un apport d'engrais a été effectué toutes les quatre semaines environ (NPK 5-6-7 + 2.5 mg MgO en début de culture, puis 10-5-20 à partir de la floraison). L'apparition de ravageurs a été surveillée et des actions de traitement chimique ont été mises en œuvre lorsque nécessaires.

## 2 Dispositif expérimental

Les calendriers de traitements seront précisés pour chaque expérience dans la suite du manuscrit, seule l'application des éliciteurs est détaillée ici.

### 2.1 Eliciteurs utilisés

#### 2.1.1 UV-C

La détermination d'une dose efficace de traitement implique de connaître au préalable la dose délétère, qui provoque des dégâts manifestes sur l'intégrité des plantes, mesurés par les performances photosynthétiques et la croissance des plantes (Urban et al., 2022). Ces doses doivent être déterminées dans chaque expérience car elles sont spécifiques aux conditions de culture, géotypes et stade phénologique d'application. La recherche de dose délétère a été effectuée sur les plantes de deux stades différents : un stade précoce (1) où la plante d'environ 8 semaines possède 8 feuilles (BBCH 18 108), et un stade avancé (2) où les premières fleurs sont visibles (échelle BBCH 61 601, environ 2 mois). Afin de déterminer la dose délétère, des observations visuelles pendant les 7 jours suivants les traitements ont été effectués ainsi qu'une mesure de photosynthèse nette 30 minutes après les traitements.



Figure 26. Enceinte d'application des traitements UV-C. A. Traitement vertical pour les plantes au stade précoce, où l'apex est éloigné de 10 cm des lampes. B. Traitement horizontal visant à cibler la zone présentant les fleurs et les fruits chez les plantes au stade avancé.

Tableau 4. Mesures de la photosynthèse nette mesurée 30 minutes après les traitements, et dégâts observés pendant les 7 jours suivant le traitement. La dose retenue pour le stade précoce est 1 kJ/m<sup>2</sup> et 5 kJ/m<sup>2</sup> pour le stade avancé.

Stade précoce (1)					
Dose testée (kJ/m <sup>2</sup> )	0	1	5	10	20
Temps de traitement (s)	0	2	10	20	40
Photosynthèse nette	8,576 ± 1,264 <sup>a</sup>	<b>7,986 ± 1,675<sup>a</sup></b>	6,160 ± 1,454 <sup>a</sup>	4,586 ± 0,680 <sup>b</sup>	4,253 ± 1,657 <sup>b</sup>
Dégâts observés	/	/	Brunissements	Brunissements	Brunissements

Stade avancé (2)					
Dose testée (kJ/m <sup>2</sup> )	0	5	20	50	100
Temps de traitement (s)	0	10	40	100	200
Photosynthèse nette	7,784 ± 1,495 <sup>a</sup>	<b>6,944 ± 1,893<sup>a</sup></b>	7,160 ± 2,734 <sup>a</sup>	0,955 ± 0,570 <sup>b</sup>	0,388 ± 0,244 <sup>b</sup>
Dégâts observés pendant 7 jours	/	/	Brunissements	Chloroses, nécroses	Chloroses, nécroses, brunissements

L'application des flashes UV-C a été faite grâce à des lampes fluorescentes (modèle TUV PL-L 95W HO/4P, Philips) dans une enceinte de traitement fermée (Figure 26). La distance conservée entre les ampoules et les plantes a été fixée de 10 cm afin d'éviter une augmentation de température des plantes trop importante. Le traitement a été effectué par application verticale pour les jeunes plantes, et application horizontale pour les plantes à un stade avancé (Figure 26). Durant le temps de traitement, un ventilateur brassant l'air sous le dispositif de traitement a été utilisé afin de réduire la teneur en ozone dans l'enceinte de traitement et d'éviter une augmentation de la température. A cette distance des lampes, une irradiance de  $50 \text{ mW.cm}^{-2}$  a été mesurée et il a été établi qu'un temps de traitement de 2 secondes permettait de délivrer une dose de  $1 \text{ kJ.m}^{-2}$ .

Les doses testées pour les deux stades phénologiques ainsi que les mesures de photosynthèse nette sont résumées dans le tableau 4.

Les flashes d'UV-C à des doses de 10 et 20  $\text{kJ/m}^2$  sur le stade précoce et 50 et 100  $\text{kJ/m}^2$  sur le stade avancé ont entraîné une diminution importante de la photosynthèse nette. A des doses de 20 et de 5  $\text{kJ/m}^2$  sur les plantes du stade avancé et 1  $\text{kJ/m}^2$  sur les plantes de stade précoce, la photosynthèse nette ne semble pas avoir été impactée.

Trois jours après les traitements, des chloroses, nécroses et brunissements ont été observés sur les feuilles des plantes traitées aux doses de 5, 10 et 20  $\text{kJ/m}^2$  au stade précoce et aux doses de 100, 50 mais aussi 20  $\text{kJ/m}^2$  au stade avancé. La dose retenue pour le stade précoce a donc été de 1  $\text{kJ/m}^2$ , et de 5  $\text{kJ/m}^2$  au stade avancé. Chaque série de traitement UV-C a comporté trois traitements successifs, espacés d'environ trois jours.

### 2.1.2 $\text{H}_2\text{O}_2$

La solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  400mM a été préparée à partir d'une solution concentrée à 30% (Merck, Darmstadt, Allemagne) diluée dans de l'eau. Elle a été pulvérisée sur chaque plant jusqu'au « ruissellement » (Zunun-Pérez et al., 2017), soit environ 25 mL par plant au stade précoce et 50 mL par plant au stade avancé. Les plants témoins ont été pulvérisés avec la même quantité de  $\text{H}_2\text{O}$  au même moment.

## 2.2 Prélèvements des échantillons

La maturité des fruits a été suivie tout au long de la culture, afin de récolter des fruits du même stade de développement. Les fruits ont été récoltés entre 35 et 40 jours après nouaison pour 'Habanero', et entre 40 et 50 jours pour 'BJ', correspondant au stade de maturation optimal, avant que



les capsaïcinoïdes ne diminuent (Contreras-Padilla and Yahia, 1998; Siddiqui et al., 2013; Olguín-Rojas et al., 2019; Sarpras et al., 2019).

Deux stratégies de prélèvements des fruits ont été réalisées. Lorsque le traitement était répété sur l'ensemble de la culture, les fruits ont été classés par nombre de traitement reçus et individualisés (un fruit correspondant à un échantillon). Lorsque le calendrier de traitement a été réalisé une seule fois, les fruits ont été regroupés et analysés par plante (ensemble des fruits de même maturité d'une plante correspondant à un échantillon). Une fois récoltés, les fruits ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide.

Lors de l'étude de la réponse de la plante aux éliciteurs, l'apex de chaque plante, contenant les sept premières feuilles a été collecté et immédiatement congelé dans l'azote liquide.

Les échantillons ont été broyés frais avec de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur A11 (IKA, Allemagne) puis conservés à -80°C jusqu'à analyse.

### 3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (v4.1.2, R Core Team, 2021). Le détail de chaque analyse est présenté dans le matériel et méthodes spécifique à chaque chapitre.



# Chapitre 3

---

Développement  
méthodologique en vue de la  
caractérisation des métabolites  
d'intérêt du piment et de la  
recherche de marqueurs



La métabolomique repose sur deux approches principales : les approches ciblées et non-ciblées. Les approches ciblées utilisent des procédures d'extraction et d'analyses chimiques adaptées à une ou plusieurs classes de composés prédéfinies (Naz et al., 2014) qui permettent une identification et une quantification plus rapide et plus fiable, tout en se limitant aux composés recherchés *a priori* (Christians et al., 2012).

Les approches non ciblées en revanche reposent sur des techniques analytiques capables d'appréhender des familles moléculaires plus variées, sans hypothèse *a priori* sur les molécules d'intérêt. Les méthodes extractives et instrumentales choisies permettent des analyses exploratoires à haut débit, semi-quantitatives, sur des centaines de métabolites ayant des propriétés physicochimiques variées. En revanche, cette approche se traduit par une spécificité et une sensibilité moindres par rapport aux approches ciblées (Klepacki et al., 2016), avec une limitation importante résidant dans l'annotation des métabolites, rendue laborieuse en raison de bases de données incomplètes et d'importantes variations des signaux spectraux selon les conditions d'analyses, toujours peu standardisées.

Ces deux approches demandent systématiquement une optimisation des méthodes à différentes étapes, en commençant par la préparation des échantillons, puis lors la séparation chromatographique, du paramétrage des spectromètres de masse et enfin pour l'analyse des données. Les paramètres sont à optimiser en fonction du matériel végétal, des métabolites recherchés ou encore des caractéristiques de l'appareillage analytique.

## 1 Optimisation de la préparation des échantillons

L'extraction a nécessité une optimisation de la prise d'essai des échantillons afin de vérifier que les concentrations en métabolites d'intérêt étaient comprises dans les gammes de mesures des appareils utilisés.

### 1.1 Caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée selon le protocole de Dumont et al. (2020), dont les paramètres ont été optimisés pour extraire les caroténoïdes contenus dans la baie de goji. Le mélange de solvant permettant la meilleure extraction est un mélange éthanol:hexane (2 :1) puis addition d'eau et d'hexane. Pendant l'extraction, l'ajout de  $\text{CaCO}_3$  (30 mg) permet d'éliminer un risque potentiel de réarrangement des caroténoïdes (Britton and Young, 1993), et l'ajout de BHT 0,1%, un antioxydant lipophile, augmente la stabilité des composés les plus sensibles à l'oxydation dans le temps (Meléndez-

Tableau 5. Pourcentages des cinq caroténoïdes extraits, dont le signal est le plus abondant au DAD, dans les trois fractions et dans les trois conditions de prise d'essai.

Prise d'essai	Fraction	RT_5,88	RT_9,08	RT_10,28	RT_10,49	RT_10,67
10 mg	F1	83,1	83,7	74,2	78,9	81,9
	F2	16,8	16,2	25,7	21,0	18,0
	F3	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
30 mg	F1	87,1	87,5	81,8	85,3	91,1
	F2	12,9	12,4	18,0	14,6	8,9
	F3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
60 mg	F1	75,9	73,4	74,8	75,7	79,2
	F2	22,4	24,7	21,0	20,8	17,3
	F3	1,7	1,9	4,2	3,5	3,5

Martínez et al., 2007). Le solvant d'extraction n'étant pas compatible avec l'injection chromatographique, les extraits ont été séchés puis repris dans un mélange éthanol:MTBE (Méthyl tert-butyl éther) 2:1, qui permet une bonne dissolution des caroténoïdes (Dumont et al., 2020).

La contrainte principale étant de réaliser l'extraction en micro-tubes de 2 mL, il a fallu ajuster la quantité de prise d'essai pour éviter la saturation du solvant d'extraction et des détecteurs analytiques. De plus, afin de s'assurer de l'épuisement de l'échantillon, plusieurs extractions successives du culot ont été réalisées. Ainsi trois prises d'essai ont été réalisées (10, 30, 60 mg), extraites chacune trois fois. Les cinq pics les plus abondants ont été repérés au DAD (Diode Array Detector), et le signal de masse a été intégré pour définir la proportion de chaque caroténoïde extrait dans les différentes fractions. Lors d'une prise d'essai de 10, 30 ou 60 mg, environ 80%, 86% et 76% des cinq pics majoritaires absorbant à 280 nm ont été extraits dans la première fraction (respectivement), 20%, 13% et 21% dans la deuxième et moins de 1% lors d'une prise d'essai de 10 et 30 et de 3% avec 60 mg dans la troisième fraction (Tableau 5).

Les caroténoïdes dans la troisième fraction représentaient 0,3, 0,5 et 13% des caroténoïdes de la fraction 2 (%F3/F2) pour les prises d'essai de 10, 30 et 60 mg. De plus, lors la prise d'essai de 60 mg, des pigments sur le culot après le 3<sup>ème</sup> épuisement étaient encore visibles, indiquant que la totalité des caroténoïdes n'avait pas été extraite même après trois épuisements de l'échantillon.

Finalement, nous avons choisi une prise d'essai de 30 mg, préférable à 10 mg afin d'augmenter la précision de la pesée, extraite 2 fois afin de récupérer au moins 99% des caroténoïdes.

## 1.2 Capsaïcinoïdes

La concentration en capsaïcinoïdes étant très variable en fonction des variétés, le ratio matière fraîche/volume de solvant a dû être adapté à chaque variété, en partant du protocole de Barbero et al. (2008) et Stipcovich et al. (2018), utilisant le ratio matière fraîche/volume solvant de départ de 40 mg/mL. Afin de réaliser l'extraction en micro-tubes de 2 mL, 60 mg de matière fraîche ont été extraits dans 1,5 mL de solvant constitué de méthanol (MeOH) 80%, ainsi que de la phénacétine à 5 mg/L en tant que standard interne (la phénacétine possède des propriétés physico-chimiques similaires à celles des capsaïcinoïdes, et n'est pas présent de manière naturelle dans les piments; Zhang et al., 2010). L'extraction a consisté ensuite à placer les échantillons 5 minutes au bain à ultrasons à 40°C (37 kHz) (Elmasonic P., Elma, Singen, Allemagne) puis à les centrifuger 5 minutes à 10 000 rpm (Jouan C3i Multifunction, Thermo Fisher Scientific Inc). Le surnageant a été récupéré (fraction 1), puis les étapes précédentes ont été répétées afin d'épuiser le culot pour récupérer les fractions 2 et 3.

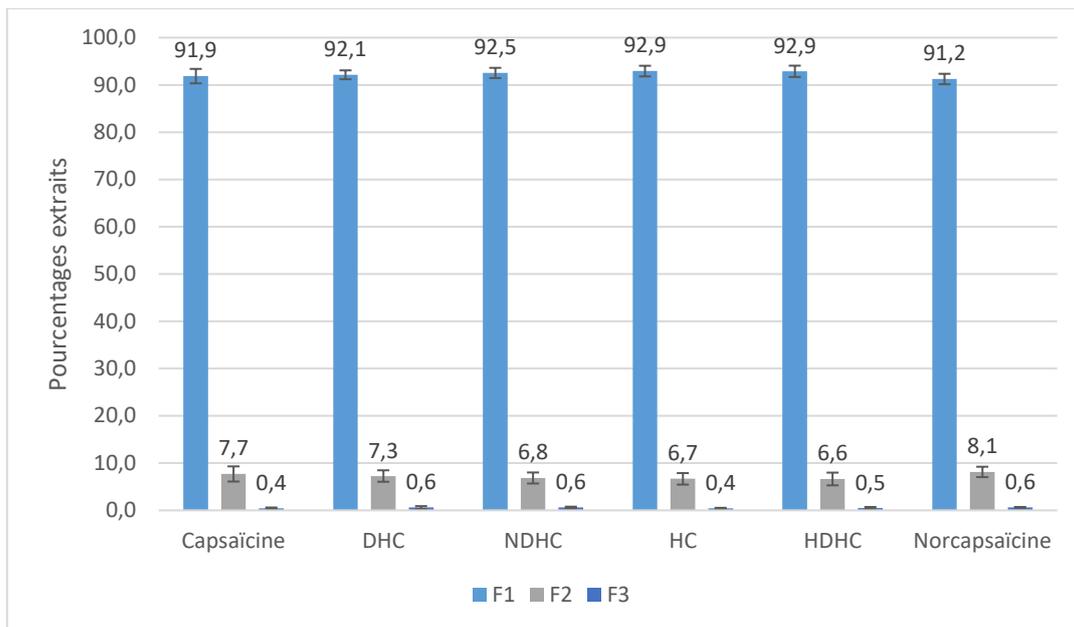


Figure 27. Pourcentages des six capsaïcinoïdes majoritaires identifiés dans les fractions 1, 2 et 3 avec une prise d'essai de 60 mg dans la variété 'Habanero'.

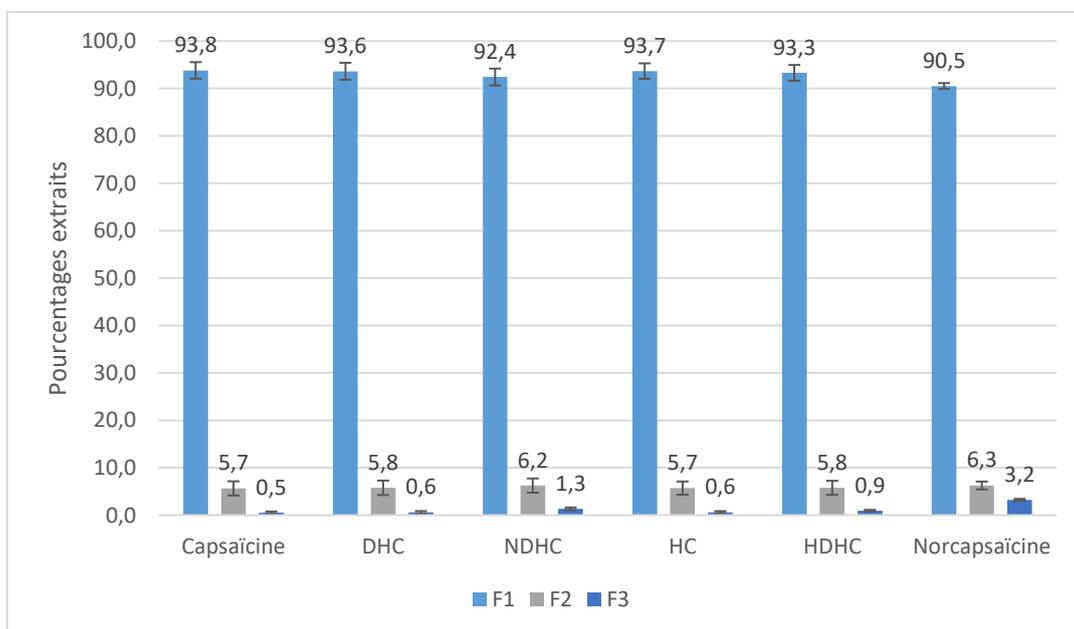


Figure 28. Pourcentages des six capsaïcinoïdes identifiés dans les fractions 1, 2 et 3 avec une prise d'essai de 60 mg dans la variété 'BJ'

L'analyse des extraits des deux variétés à cette concentration a entraîné une saturation du signal (en MS). Les fractions extraites de la variété 'Habanero' ont été diluées 100 fois après extraction, tandis que celles extraites de la variété 'BJ' ont été diluées 400 fois.

Dans les extraits des deux variétés, environ 92% des capsäicinoïdes identifiés ont été extraits dans la première fraction, entre 6 et 7% dans la deuxième et moins de 1% dans la troisième fraction (Figures 26 et 27). Les deux premières fractions ont donc permis d'extraire environ 99% des capsäicinoïdes de l'échantillon.

Par la suite, la prise d'essai a été divisée par deux pour éviter de prélever de trop faibles volumes lors de la dilution subséquente. L'extraction a donc été réalisée à partir de 30 mg de matière fraîche, en réalisant un épuisement afin d'additionner les deux premières fractions (30 mg/3 mL). La dilution a été effectuée ensuite, en adaptant selon la concentration en capsäicinoïdes des variétés (dilution par 50 pour 'Habanero' et par 200 pour 'BJ').

Par la suite, un standard interne de phénacétine a été ajouté à une concentration de 50 ng/mL dans le solvant d'extraction afin de corriger les pertes éventuelles et les effets matrices pouvant subvenir durant l'analyse.

## 2 Optimisation des méthodes d'analyses ciblées

Les analyses ciblées ont été réalisées avec un système UPLC Acquity I-Class (Waters, Milford, Etats-Unis) équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et couplé à un spectromètre de masse triple quadripolaire Xevo TQ-XS (Waters, Milford, Etats-Unis) équipé d'une source ESI (ionisation par électronébulisation) utilisée en mode positif. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées à l'aide du logiciel MassLynx (Waters, Milford, Etats-Unis).

### 2.1 Méthode chromatographique

#### 2.1.1 Caroténoïdes

En partant d'une méthode chromatographique existante créée sur une matrice différente (baie de goji, Dumont et al., 2020) plusieurs paramètres ont été optimisés. La colonne utilisée, une colonne BEH C18 (Waters 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1\*50 mm, chauffée à 55°C (avec pré-colonne)), permet une bonne séparation des isomères, notamment la lutéine et la zéaxanthine (Epler et al., 1992; Jumaah et al., 2016).

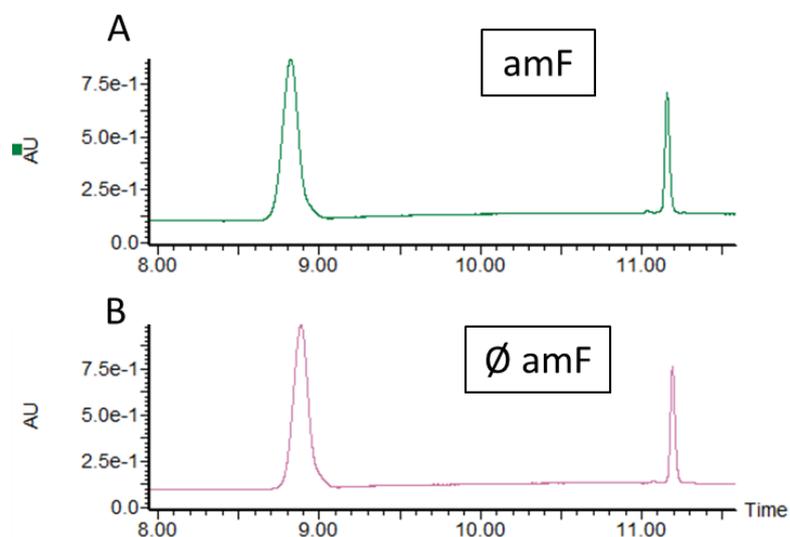


Figure 29. Chromatogrammes d'un mix de standards de caroténoïdes avec ammonium formate (A) et sans ammonium formate (B). La symétrie des pics n'est pas améliorée avec l'ammonium formate.

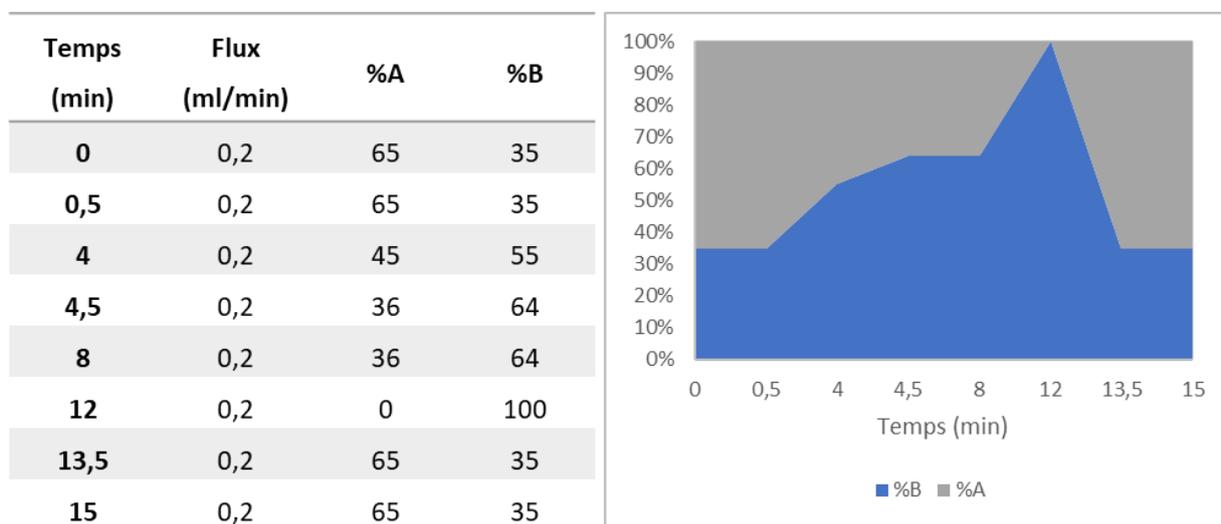


Figure 30. Méthode chromatographique utilisée pour les caroténoïdes, détaillée sous forme de tableau sur la gauche et de courbe du gradient d'éluion à droite.

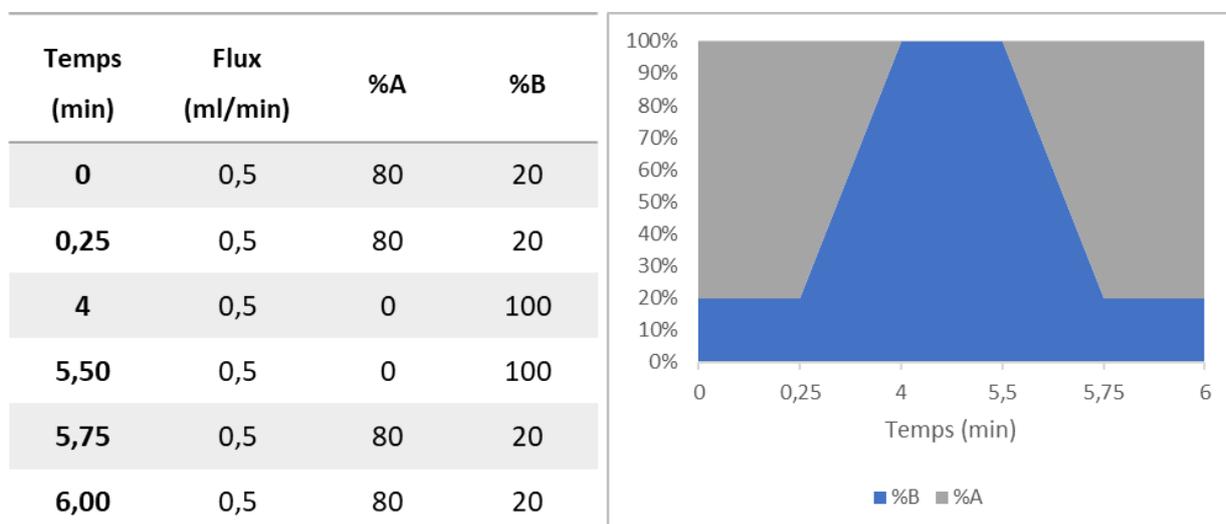


Figure 31. Méthode chromatographique utilisée pour les capsaïcinoïdes, détaillée sous forme de tableau sur la gauche et de courbe du gradient d'éluion sur la droite.

L'ajout d'ammonium formate dans les voies mobiles a été testée. L'ammonium formate permet de tamponner la phase mobile et éviter la dégradation de certaines molécules au cours de l'élution. En revanche, il n'a pas amélioré pas la symétrie des pics pour nos échantillons (Figure 28) et nous ne l'avons donc pas employé ultérieurement dans les phases mobiles.

Les phases mobiles étaient constituées d'un mélange acétonitrile ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 avec ajout d'acide formique à 0,1% (voie A), et d'isopropanol avec ajout d'acide formique 0,1% (voie B). L'acide formique favorise l'ionisation des molécules et améliore la forme des pics chromatographiques ainsi que la conductivité, ce qui permet améliorer la nébulisation au niveau de la source ESI (ElectroSpray Ionization) en formant des gouttelettes plus fines.

Le gradient d'élution utilisait un solvant A aqueux, permettant d'éluer rapidement les xanthophylles libres, plutôt polaires en raison de leur groupe hydroxyle (Gupta et al., 2015) et un solvant B organique composé d'isopropanol, un solvant apolaire (le plus apolaire que l'on puisse utiliser sans avoir besoin de modifier l'instrument analytique) afin d'éluer les molécules plus apolaires tels que les carotènes et les esters de xanthophylles (voir méthode chromatographique figure 29).

### 2.1.2 Capsaïcinoïdes

La méthode chromatographique a été adaptée d'une méthode existante (Stipcovich et al., 2018), en raccourcissant les étapes afin d'assurer une bonne séparation des capsaïcinoïdes en un temps optimal (Figure 30). Les phases mobiles étaient constituées d'eau pour la voie A et d'acétonitrile pour la voie B, toutes deux supplémentées avec 0.1% d'acide formique. La colonne utilisée était une Acquity HSS T3 1.8  $\mu$ m (2.1 x 100 mm, Waters, USA) équipée d'une pré-colonne HSS T3 (2.1 x 50 mm, Waters, USA). Des essais ont été réalisés avec du méthanol dans la phase mobile B, mais l'élution des composés était meilleure avec l'acétonitrile, en raison de sa plus grande force éluante.

A partir de ces méthodes chromatographiques, des standards de caroténoïdes et capsaïcinoïdes ont été injectés afin d'identifier des métabolites dans un pool de poudre de piment 'BJ'.

## 2.2 Développement de méthodes MRM pour l'identification et la quantification des composés

### 2.2.1 Démarche générale

La spectrométrie de masse a permis l'identification et la quantification des molécules par mesure de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). En métabolomique, les molécules sont, par définition, petites et

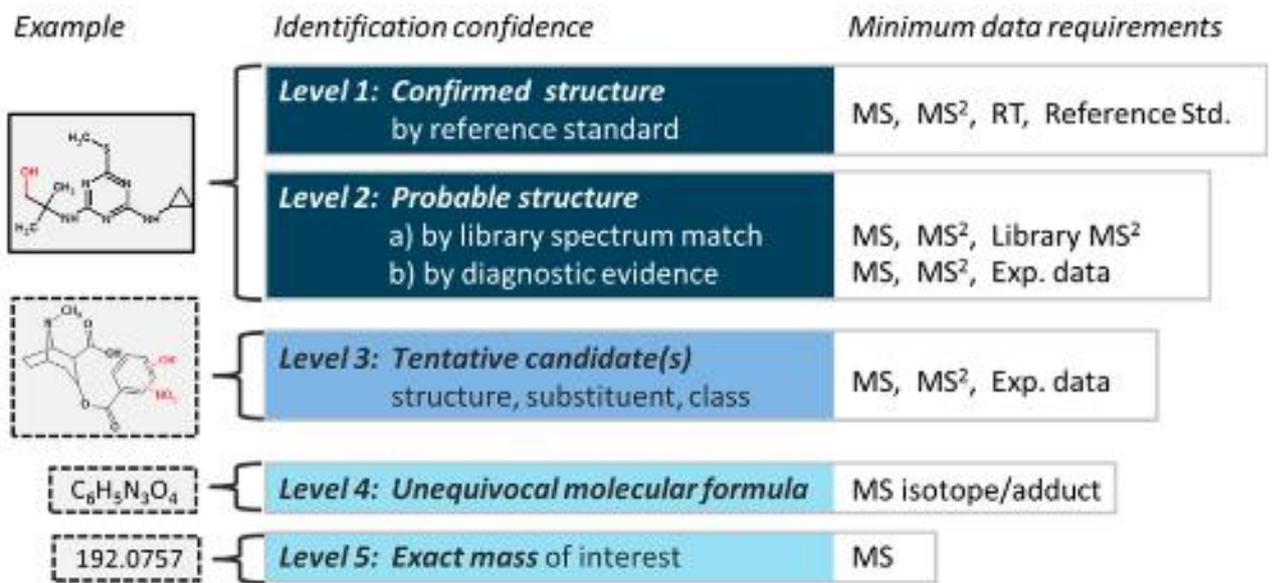


Figure 32. Les cinq niveaux d'identification possibles lors des analyses spectrométriques de masse à haute résolution (Schymanski et al., 2014)

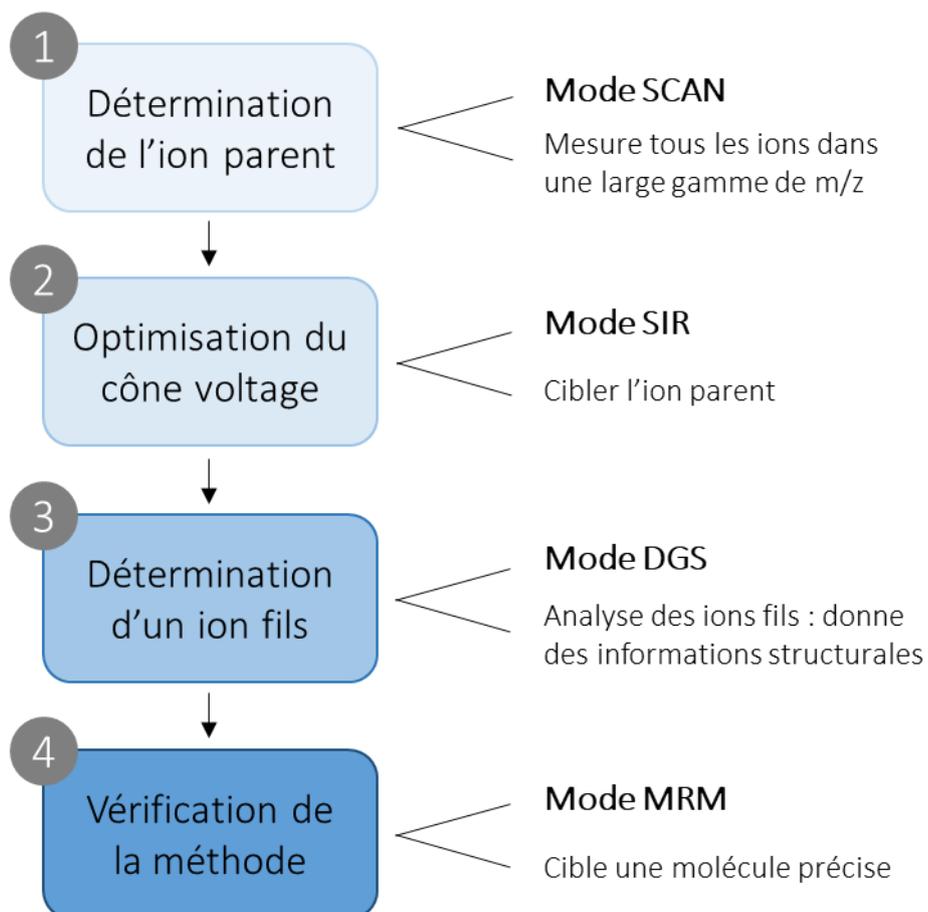


Figure 33. Les quatre étapes du développement de la méthode MRM

la probabilité qu'elles soient chargées plusieurs fois est faible. La charge  $z$  étant alors égale à 1, le rapport  $m/z$  correspond à la masse  $m$ .

L'identification des métabolites peut être faite à cinq niveaux différents selon Schymanski et al. (2014) (Figure 31). Dans le niveau d'identification le plus élevé (1), la structure est confirmée par une molécule standard injectée dans les mêmes conditions que les échantillons. Le niveau 2 permet d'identifier une molécule par comparaison des spectres expérimentaux avec ceux d'une base de données ou par un diagnostic en MS/MS, sans confirmation dans la littérature. Le niveau 3 décrit des molécules candidates potentielles dont les structures pourraient produire les spectres observés (identification putative). Le niveau 4 permet simplement de confirmer la formule moléculaire en utilisant les informations spectrales mais les preuves pour proposer une structure sont insuffisantes. Enfin le niveau 5 indique qu'il n'existe aucune information non équivoque sur la structure de la molécule ou même la formule, seule la masse exacte de l'ion étant connue.

Dans le cas présent, notre approche ciblée a permis d'identifier les composés avec un niveau de confiance de 1, grâce à l'utilisation de standards purs et au développement de méthodes MRM (Multiple Reactions Monitoring) selon la procédure décrite ci-après. Les méthodes MRM permettent d'obtenir un signal très peu bruité, permettant une limite de détection très basse, et de quantifier spécifiquement les molécules cibles. Il s'agit en pratique de produire une transition ion parent > ion fils propre à la molécule cible, à l'aide d'un spectromètre de masse à triple quadrupôle : un ion parents d'un rapport  $m/z$  défini est sélectionné dans le premier quadrupôle, puis il est fragmenté dans une cellule de collision de façon structure-dépendante, avant qu'un ion fils choisi ne soit sélectionné dans le troisième quadrupôle. Le signal émis pour cette transition correspond aux métabolites possédant à la fois l'ion parent et l'ion fils fragmenté, ce qui augmente fortement la fiabilité de l'analyse.

Le développement des transitions demande, pour chaque métabolite, l'optimisation des paramètres de cône voltage, d'énergie de collision et le choix des  $m/z$  des ions parents et fils. Le développement d'une méthode MRM implique donc plusieurs étapes (Figure 32). La première consiste à déterminer l'ion parent en mode SCAN. L'ion parent peut être l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ , ou encore un fragment *in source* caractéristique de la molécule. Une injection en SIR (Single Ion Recording) de cet ion parent, où seul l'ion sélectionné est filtré, permet ensuite de choisir le voltage du cône, à optimiser pour chaque transition MRM. L'injection suivante doit être réalisée en DGS (Daughter Scan), où l'ion parent filtré est fragmenté dans la cellule de collision afin de définir l'ion fils le plus abondant. La meilleure transition ion parent > ion fils en relation avec le signal le plus intense permet de sélectionner la meilleure énergie de collision pour chaque molécule. Après définition de la

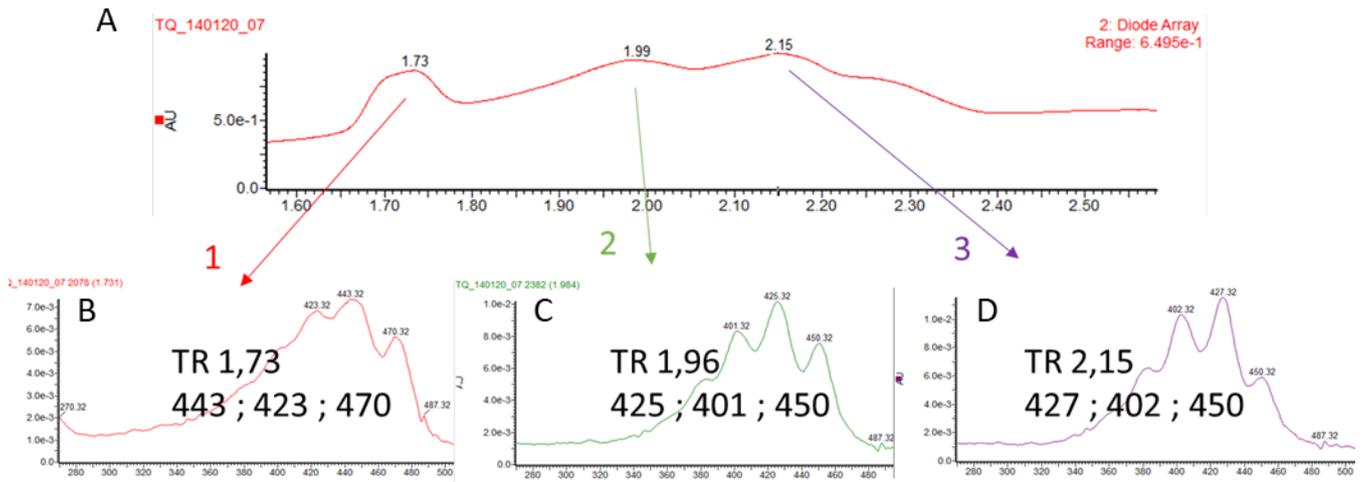


Figure 34. A. Chromatogramme du standard de violaxanthine injecté issu du DAD. B, C, D. Spectres d'absorbances des pics 1, 2 et 3, aux temps de rétention (TR) de 1.73, 1.96 et 2.15 minutes respectivement.

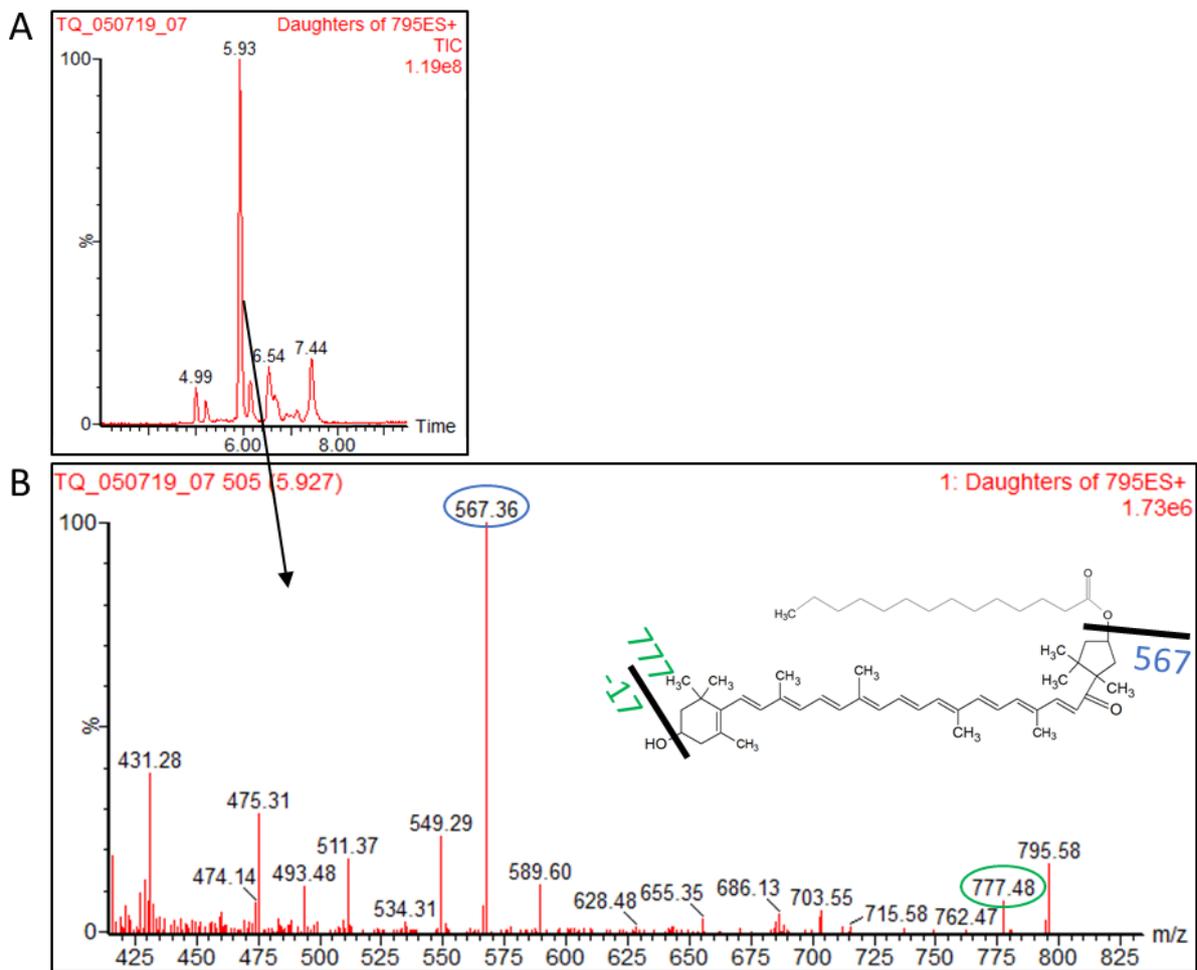


Figure 35. A. Chromatogramme des fragments de l'ion 795 en LC/MS (mode DGS) ; B. Spectre de masse de l'ion 795 fragmenté au temps de rétention de 5,93 minutes permettant d'identifier la capsanthine myristate.

transition, fixation du cône voltage et de l'énergie de collision, la dernière injection doit permettre de vérifier la méthode MRM (Zhou and Yin, 2016).

## 2.2.2 Caroténoïdes

### 2.2.2.1 Identification par injection de standards

Des solutions de standards d'une concentration de 100  $\mu\text{M}$  ont été préparées dans du méthanol 80%. Les standards de caroténoïdes ont été réunis en une seule solution, après vérification de la non co-élution chromatographique des composés :  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, zéaxanthine, capsanthine, capsorubine et violaxanthine.

Un problème de dégradation/isomérisation de la violaxanthine nous a empêché de la quantifier dans les échantillons. En effet, lorsque le standard de violaxanthine a été injecté seul, trois pics sont apparus dont les spectres de masse contenaient l'ion moléculaire  $m/z$  601,5, tandis que leurs spectres d'absorbance UV-visible comportaient des pics d'absorbance ( $\lambda$  max) différents (Figure 33). D'après Pott et al., (2003), les pics 2 et 3 présents lors de l'injection du standard de violaxanthine pourraient être attribués au néochrome et à la lutéoxanthine. La masse monoisotopique de l'ion moléculaire pourrait aussi correspondre à de la néoxanthine (Rivera et al., 2014), à l'antheraxanthine (Mercadante et al., 2017) ou à l'auroxanthine (Hempel et al., 2017), mais ces hypothèses ont été écartées car leurs  $\lambda$  max UV-visible ne correspondaient pas à celles observées.

### 2.2.2.2 Développement de méthode MRM pour 16 caroténoïdes avérés ou supposés

Lors de l'injection d'un pool (mélange d'extraits de poudre de piments) en mode scan positif (entre 100 et 1100  $\text{u.m.a}$ ), 16 pics de molécules ayant une absorbance à 480 nm ont été détectés, dont 5 molécules correspondant aux standards suivants (identification niveau 1) : la capsanthine, la zéaxanthine, la  $\beta$ -cryptoxanthine, le  $\beta$ -carotène et la capsorubine. Parmi les autres pics, 5 esters ont été identifiés de manière putative grâce à leur fragmentation (niveau 2) : la capsanthine myristate, la capsanthine palmitate, la capsanthine myristate palmitate, la capsorubine laurate myristate et la violaxanthine dimyristate. La capsanthine myristate par exemple, a été identifiée à partir de l'ion moléculaire attendu  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z = 795,7$ ) au temps de rétention de 5,93 minutes. Lorsque cet ion a été fragmenté (Figure 34 A), il a donné un spectre de masse  $\text{MS}^2$  présenté sur la figure 34 B avec les ions fragments suivants :  $m/z = 777,6$ , qui correspond à  $[\text{M}+\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  et  $m/z = 567,4$  qui correspond à la perte de l'acide myristique ( $[\text{M}+\text{H} - \text{C14:0}]^+$ ), ce qui a permis de confirmer l'identité de la capsanthine myristate. Les 6 autres pics demeurent non identifiés (niveau 5). Une méthode MRM a ensuite été développée pour ces 16 caroténoïdes avérés ou supposés, selon les étapes décrites dans la figure 32.

Tableau 6. Méthode MRM pour l'analyse des différents caroténoïdes supposés ou avérés. U : unknown, composé inconnu; TR : temps de rétention

Composé	Transition MRM	Cône voltage (V)	Energie de collision (eV)	TR (min)
Capsorubine	601,32 > 108,92	20	40	1,57
Capsanthine	585,33 > 108,93	10	30	2,38
U_3,17	600,33 > 159,91	20	30	3,17
Zéaxanthine	568,53 > 476,13	30	20	3,33
U_3,44	584,35 > 159,92	20	40	3,44
U_5,75	784,58 > 183,92	30	40	5,75
Putatif capsanthine myristate	795,46 > 108,87	40	40	5,93
$\beta$ -cryptoxanthine	552,66 > 460,14	30	20	6,42
Putatif capsanthine palmitate	823,46 > 567,14	40	20	7,46
Putatif capsorubine laurate myristate	993,45 > 793,32	10	20	10,2
$\beta$ -carotène	536,56 > 444,16	30	20	10,25
U_10,51	793,35 > 108,89	10	40	10,51
Putatif violaxanthine dimyristate	1021,45 > 793,11	10	30	10,52
U_11,19	1028,6 > 108,9	20	40	11,19
U_11,27	880,55 > 624,04	20	40	11,27
Putatif capsanthine myristate palmitate	1033,43 > 777,12	40	20	11,32

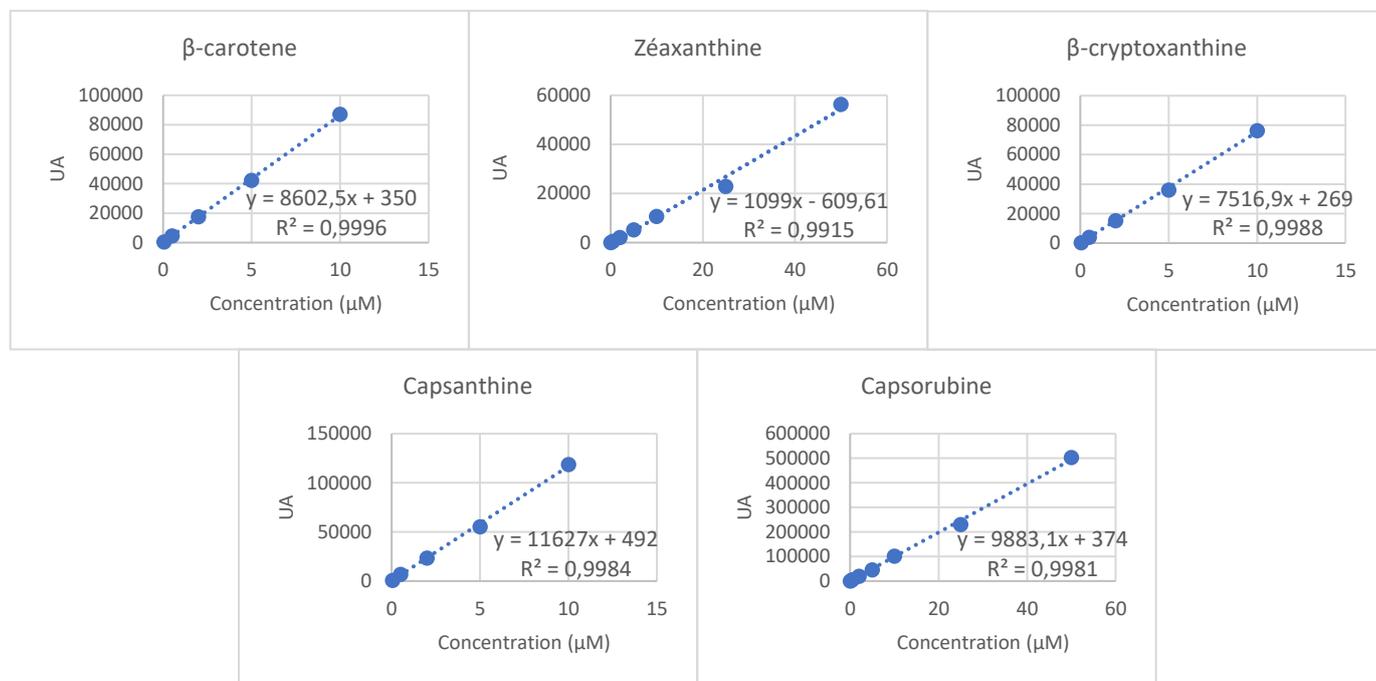


Figure 36. Courbes étalons des standards de caroténoïdes injectés. UA : unités arbitraires représentant l'aire sous la courbe des pics intégrés d'après le signal de masse. A.  $\beta$ -carotène, B. Zéaxanthine, C.  $\beta$ -cryptoxanthine, D. Capsanthine, E. Capsorubine.

La méthode MRM développée pour l'analyse des caroténoïdes avérés ou supposés est présentée dans le tableau 6.

#### 2.2.2.3 *Gammes étalon*

La solution a été diluée dans le but de préparer des gammes étalons afin d'étudier la réponse du signal en fonction de la concentration, et déterminer les courbes étalons servant à quantifier ces métabolites.

La réponse du signal en fonction de la concentration s'est avérée linéaire ( $R^2 > 0,99$ ) pour les cinq standards injectés (Figure 35) jusqu'à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pour le  $\beta$ -carotène, la  $\beta$ -cryptoxanthine et la capsanthine et jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  pour la zéaxanthine et la capsorubine.

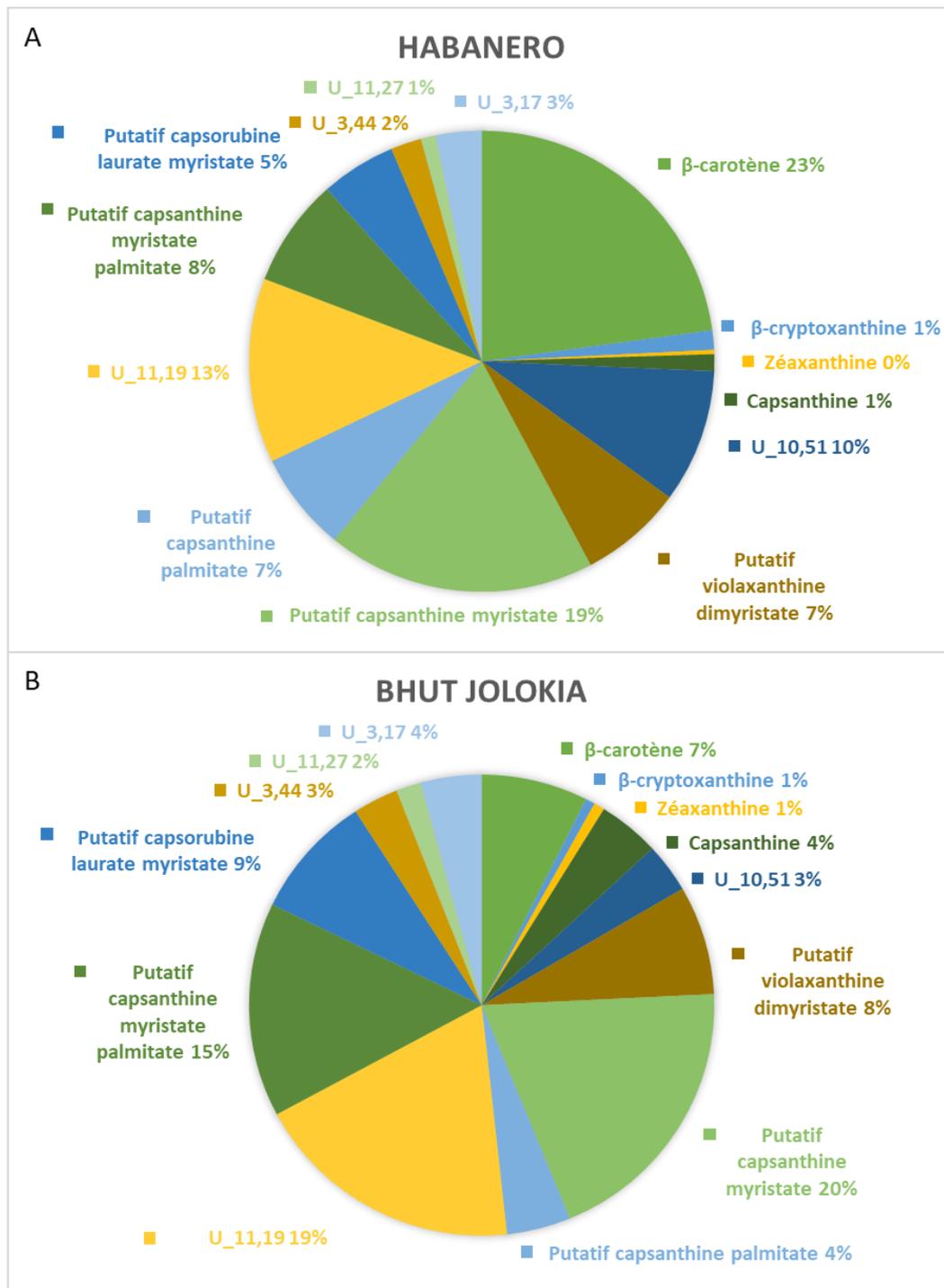


Figure 37. Proportion des différents caroténoïdes dosés par la méthode MRM, avérés ou supposés, dans les deux variétés étudiées, en aires de pics en DAD par rapport aux aires totales des pics détectés en DAD. A. 'Habanero'; B. 'Bhut Jolokia'.

U\_ : unknown

#### 2.2.2.4 Proportions des différents caroténoïdes dans les variétés étudiées

Les proportions des caroténoïdes (en relatif, par rapport à la somme des pics annotés en DAD) dans les deux variétés étudiées se sont avérées largement différentes (Figure 36) : la variété 'Habanero' a présenté 23% de  $\beta$ -carotène, peu de capsanthine libre (1%) et environ 34% de capsanthine estérifiée, alors que la variété Bhut Jolokia a présenté seulement 7% de  $\beta$ -carotène, peu de capsanthine libre (4%), et environ 39% de capsanthine estérifiée avec différents acides gras. La  $\beta$ -cryptoxanthine et la zéaxanthine étaient faiblement représentées dans les deux variétés. Les inconnus représentaient 34 et 40% des caroténoïdes détectés pour 'Habanero' et 'BJ' respectivement, avec un caroténoïde inconnu au temps de rétention de 11,19 minutes représentant 38 et 47% des caroténoïdes inconnus, soit 13 et 19 % des caroténoïdes totaux. Une tentative inaboutie d'identification de ce composé a été réalisée et sera présentée par la suite.

La capsorubine non estérifiée n'a été détectée dans aucune des deux variétés, tandis que la capsorubine estérifiée par des acides laurique et myristique représentait entre 5 et 9 % des caroténoïdes dans les variétés 'Habanero' et 'BJ' respectivement. La capsorubine, ainsi que la capsanthine s'accumulent uniquement lors de la maturation du fruit, lorsque ce dernier devient rouge (Minguez-Mosquera and Hornero-Mendez, 1994). Les fruits ont été analysés au stade rouge mature, et la capsanthine a bien été retrouvée, ce qui indique que le stade de maturité n'était pas trop précoce pour trouver de la capsorubine. La concentration de ce composé rapportée par la littérature est variable selon les variétés. Dans sept variétés étudiées par Almela et al. (1991), la proportion calculée en masse de capsorubine par rapport à la masse de caroténoïdes détectés totaux était comprise entre 0,82 et 13,39%, tandis que dans un cultivar de *C. annuum*, la proportion était de 3,2% (Deli et al., 2001). Néanmoins, Giuffrida et al. (2013), n'ont pas détecté de capsorubine non estérifiée dans les 12 cultivars étudiés, dont 'Habanero' faisait partie, ce qui est cohérent avec l'étude de Goda et al. (1995), qui montre que l'estérification des cycles hydroxycyclopentanes (présents aux deux extrémités de la capsorubine) se produit plus facilement et plus rapidement que l'estérification des cycles hydroxycyclohexane. Deruère et al. (1994) ont par ailleurs identifié 14 caroténoïdes dans des disques de péricarpe de poivron, parmi lesquels la capsorubine représentait 6% des caroténoïdes identifiés, dont 90% de cette capsorubine a été retrouvée sous forme estérifiée, confortant l'absence de capsorubine non estérifiée dans notre étude.

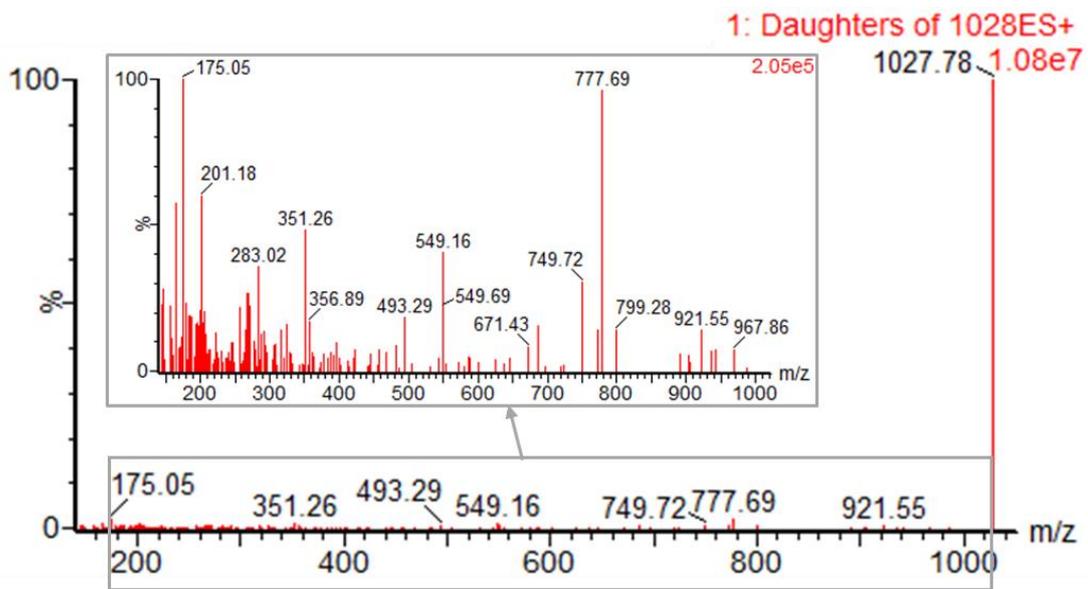


Figure 38. Spectre de masse MS<sup>2</sup> de l'ion 1027,6. L'ion 777,7 pourrait correspondre à la capsanthine myristate, mais la perte de neutre entre les masses 1027 et 777 ne correspond à aucune formule évidente.

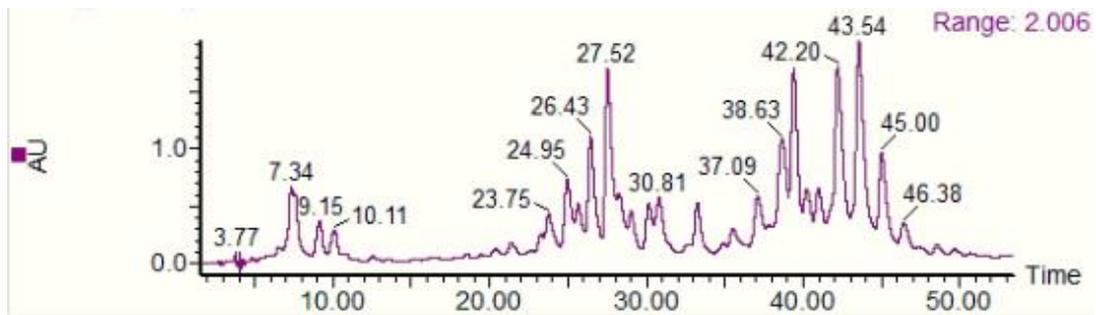


Figure 39. Chromatogramme des molécules absorbant entre 400 et 600 nm (HPLC-DAD)

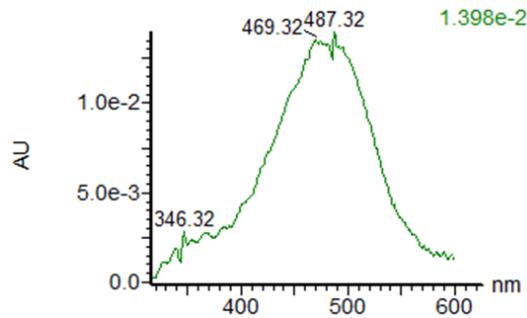


Figure 40. Spectre d'absorbance UV-visible de la molécule inconnue. Le maximum d'absorbance est de 469 nm. L'absorbance à 487 nm est commune à de nombreuses molécules lors de l'analyse.

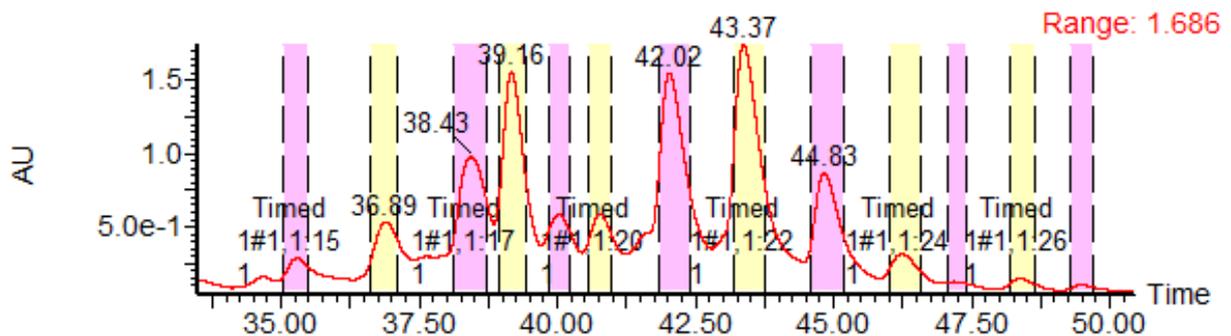


Figure 41. Ensemble des fractions collectées séparément à la suite de l'injection en HPLC-DAD-QDa

### 2.2.2.5 Tentative de purification et d'identification d'une molécule inconnue (TR 11,19)

La molécule au temps de rétention de 11,19 minutes représente 13% et 19% des caroténoïdes totaux dans les variétés 'Habanero' et 'BJ', et demeure toujours inconnue malgré les tentatives d'interprétation de son spectre de masse. La fragmentation de l'ion 1027,8 (Figure 37) ne nous a pas permis d'identifier des fragments caractéristiques. La littérature n'a pas non plus permis de trouver des informations sur un caroténoïde de masse 1027 uma, Schweiggert et al., (2005) ayant détecté 42 composés lors de l'analyse des caroténoïdes d'une poudre de piment rouge, mais aucun ne correspondant à cette molécule inconnue.

Afin de poursuivre l'identification, une purification de ce composé a été tentée grâce au système HPLC Alliance e2695 (Waters, USA) équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) couplé à un spectromètre de masse simple quadropôle (Acquity QDa, Waters, USA) et doté d'un collecteur de fractions (FractionLynx, Waters, USA). La méthode chromatographique a été adaptée en HPLC-DAD-QDa, avec une séparation en 65 minutes sur colonne C18 (XSelect HSS T3 OBD, 10\*250 mm, Waters). La figure 38 représente les molécules éluées entre 0 et 55 minutes qui absorbent à une longueur d'onde entre 400 et 600 nm. La molécule inconnue possédait un temps de rétention de 11,19 minutes lors de l'analyse en UPLC-DAD-ESI-TQ, ce qui suggère qu'elle est de nature plutôt apolaire (carotène ou esters de xanthophylles). Son pic est donc également attendu vers la fin du chromatogramme en HPLC-DAD.

Cette molécule inconnue possédait un maximum d'absorption à 469 nm (Figure 39) lors de l'analyse en UPLC-DAD-ESI-TQ et lors de l'injection en HPLC-DAD-QDa, plusieurs molécules ont montré un signal d'absorbance autour de 469 nm (entre 460 et 470 nm). Le signal de masse n'était pas exploitable en raison d'un bruit de fond très important même sur les molécules de standard, ce qui ne nous a pas permis de localiser le pic correspondant à la molécule inconnue. Plusieurs fractions d'un extrait de piment concentré ont été collectées (Figure 40) afin de purifier les molécules éluant entre 35 et 50 minutes. Chaque fraction a été collectée entre 7 et 10 fois et ces collectes ont été rassemblées puis réduites par concentration sous vide avant d'être reprises dans un mélange EtOH:MTBE (2:1) pour analyse en UPLC-DAD-ESI-TQ.

Les fractions collectées ne semblaient pas pures. En effet, après injection en UPLC-DAD-ESI-TQ, les chromatogrammes de nombreuses fractions présentaient des signaux correspondants aux fractions adjacentes, signifiant que l'intervalle de temps durant lequel la fraction a été prélevée était trop grand et entraînant la présence de plusieurs molécules au sein de chaque fraction. Les durées de collectes auraient dû être raccourcies pour mieux cibler la molécule.

Tableau 7. Capsaïcinoïdes retrouvés dans le piment lors d'une analyse en HPLC-APCI-MS d'après Schweiggert et al. (2006). MIM : masse mono-isotopique.

Nom	Formule brute	MIM	Lambda max	[M+H] <sup>+</sup>	Ions fils attendus
Capsaïcine	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	305,20	230, 280	306	MS2 [306]: 137 (100), 182 (13), 170 (11), 135 (3)
DHC	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	307,22	230, 280	308	MS2 [308]: 137 (100), 184 (32), 172 (7), 122 (5), 152 (3)
NDHC	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	293,20	229, 280	294	MS2 [294]: 137 (100), 170 (16), 122 (4)
HC (I et II)	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	319,22	229, 280, 310sh	320	MS2 [320]: 137 (100), 184 (39), 196 (31), 303 (6), 167 (5)
HDHC (I et II)	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	321,23	230, 280, 345sh	322	MS2 [322]: 137 (100), 198 (9), 152 (5), 186 (4), 122 (2)
Norcapsaïcine	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	291,18	-	292	MS2 [292]: 137 (100), 156 (55), 168 (7), 109 (7), 154 (5), 166 (5), 122 (4)
Nornorcapsaïcine	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	277,17	-	278	MS2 [278]: 137 (100), 142 (70), 154 (26), 125 (12)
NorNDHC	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	279,18	229, 280	280	MS2 [280]: 137 (100), 177 (33), 156 (11), 144 (9), 152 (4), 122 (3)
N-vanillyl octanamide	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	279,18	278	280	MS2 [280]: 137 (100), 152 (10), 122 (6)
N-vanillyl nonanamide	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	293,20	-	294	MS2 [294]: 137 (100), 170 (10), 122 (2)
N-vanillyl décanamide	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	307,21	-	308	MS2 [308]: 137 (100), 184 (15)

Par ailleurs, certaines fractions n'ont pas montré de signal lors de l'analyse en UPLC-DAD-ESI-TQ : la concentration était sans doute trop faible. Cette expérimentation n'a pas été poursuivie par faute de temps et de moyens financiers, mais il serait intéressant d'identifier cette molécule abondante.

Si l'identification est poursuivie, et afin d'augmenter la concentration des fractions récoltées, le nombre de collectes devra être plus important. L'injection d'un volume plus important est également possible en modifiant légèrement l'appareillage (boucle d'injection de 200  $\mu$ L). L'extrait en amont de l'injection pourra également être plus concentré afin de garantir une concentration plus importante. Si la molécule n'est toujours pas identifiée en LC-MS, une identification par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) en collaboration avec un autre laboratoire pourra être envisagée selon les coûts.

### 2.2.3 Capsaïcinoïdes

#### 2.2.3.1 Identification par injection de standards

Les caractéristiques des différents capsaïcinoïdes attendus dans le piment sont résumées dans le tableau 7. Seuls les standards des trois principaux capsaïcinoïdes étaient disponibles (Merck, Darmstadt, Allemagne) et après injections, la capsaïcine, la DHC et la NDHC ont été trouvés aux temps de rétention 2,98, 3,20 et 2,94 minutes respectivement.

L'ensemble des capsaïcinoïdes possède un noyau aromatique caractéristique qui produit un fragment  $MS^2$  de 137 uma (Figure 19). Nous avons donc utilisé le mode *parent scan* du UPLC TQ pour repérer tous les ions parents du chromatogramme produisant cet ion fils après fragmentation, afin de chercher d'autres capsaïcinoïdes. La norcapsaïcine, l'homocapsaïcine et l'homodihydrocapsaïcine ont ainsi été putativement identifiées aux temps de rétention de 1,84, 2,30 et 2,47 minutes respectivement. Néanmoins, ces composés étant à l'état de trace, ils n'ont pas été quantifiés dans les échantillons par la suite.

#### 2.2.3.2 Développement de méthode MRM pour les trois capsaïcinoïdes majoritaires

A partir de la méthode chromatographique présentée précédemment et de l'injection des standards disponibles, des méthodes MRM ont été développées, en suivant les étapes précédemment énoncées (Figure 32).

Afin de renforcer la sélectivité de la méthode, plusieurs transitions par molécule ont été établies, représentant des fragments caractéristiques de chaque composé. Seuls les trois capsaïcinoïdes principaux (capsaïcine, DHC, NDHC), confirmés par standards (niveau 1), ont été intégrés à la méthode

Tableau 8. Méthode MRM pour l'analyse des différents capsaïcinoïdes vérifiés par injection de standards. TR : temps de rétention.

Composés	Transitions MRM	Cône voltage (V)	Energie de collision (eV)	TR (min)
Capsaïcine	306,3 > 121,9	33	40	2,98
	306,3 > 136,9	33	20	
	306,3 > 170,0	33	10	
DHC	308,3 > 121,8	33	40	3,20
	308,3 > 136,9	33	20	
	308,3 > 172,0	33	20	
NDHC	294,2 > 93,9	33	40	2,94
	294,2 > 121,7	33	30	
	294,2 > 136,9	33	20	
	294,2 > 170,0	33	15	

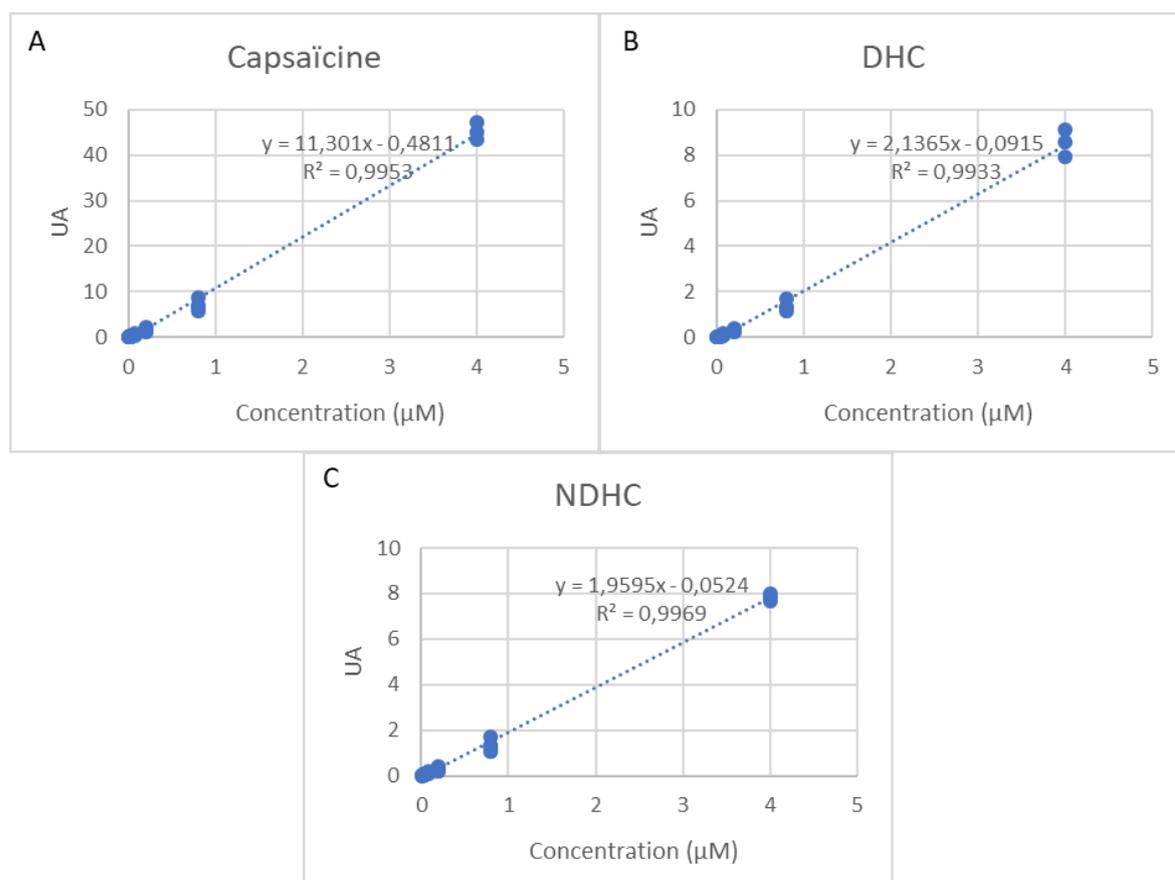


Figure 42. Courbes étalons des standards de capsaïcinoïdes injectés. UA : unités arbitraires représentant l'aire sous la courbe des pics intégrés d'après le signal de masse. A. Capsaïcine, B. DHC, C. NDHC.

de quantification (Tableau 8). D'après Olguín-Rojas et al. (2019), ces trois capsaïcinoïdes représentaient environ 99% des capsaïcinoïdes totaux dans la variété 'Habanero' 41 jours après anthèse. Le standard interne (phénacétine) a également été quantifié durant les analyses, à l'aide de 3 transitions déterminées à partir d'une solution à 50 ng/mL :  $m/z$  180,30  $\rightarrow$  110,05;  $m/z$  180,30  $\rightarrow$  93,10 et  $m/z$  180,30  $\rightarrow$  65,05.

Les ions fils de  $m/z$  136,9 (ou arrondis 137) utilisés pour les trois composés correspondent à un clivage de la liaison C7-N8 avec un réarrangement des doubles liaisons du cycle aromatique. Ce clivage entraîne également des fragments de  $m/z$  170,0 ou 172,0 pour la capsaïcine et la DHC respectivement, le fragment de  $m/z$  170 pour la NDHC résultant du clivage de la liaison C1-C7 (Schweiggert et al., 2006).

### 2.2.3.3 Gammes étalon

La solution contenant les trois standards a été diluée dans une gamme de concentration de 0,008 à 4  $\mu$ M. Une fois les aires corrigées par la phénacétine, la réponse du signal pour les trois capsaïcinoïdes s'est avérée linéaire ( $R^2 = 0,9953, 0,9933, 0,9969$  pour la capsaïcine, DHC et NDHC respectivement) jusqu'à une concentration de 4  $\mu$ M (Figure 42).

### 2.2.3.4 Proportion des capsaïcinoïdes dans les deux variétés étudiées

La concentration totale en capsaïcinoïdes dans la variété 'Habanero' est 5,75 fois plus faible que dans la variété 'BJ', avec environ 20 mg/g MS chez 'Habanero' contre 60 mg/g MS chez 'BJ'. Ces valeurs correspondent à 309 000 SHU et 908 000 SHU pour 'Habanero' et 'BJ' respectivement, ce qui est cohérent avec les valeurs rapportées par la littérature, qui souligne néanmoins, une grande variabilité entre les fournisseurs et les lieux de culture (M et al., 2016; Sweat et al., 2016; Popelka et al., 2017).

La proportion des capsaïcinoïdes (en mg.g MS<sup>-1</sup> des trois capsaïcinoïdes principaux) est différente selon la variété (Figure 43). La proportion de DHC est plus importante dans 'BJ' par rapport à 'Habanero', dont les proportions en capsaïcine et en NDHC sont plus importantes. La localisation de la synthèse des capsaïcinoïdes (péricarpe ou placenta) pourrait engendrer des ratios différents entre les variétés (Tanaka et al., 2017)

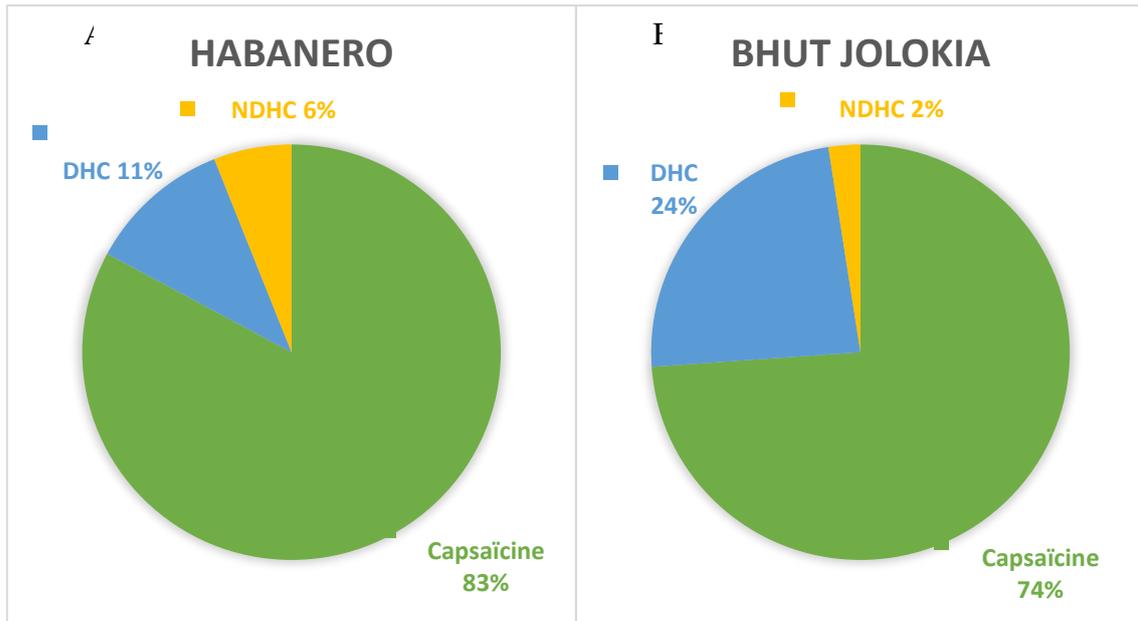


Figure 43. Proportion des trois principaux capsaïcinoïdes dosés par la méthode MRM dans les deux variétés étudiées (en  $\text{mg.gMS}^{-1}$  par rapport à la somme des trois capsaïcinoïdes dosés) . A. 'Habanero' ; B. Bhut Jolokia.

### 3 Profilage métabolique non ciblé dans des plantes en situation de stress physiologique

Nous avons cherché des marqueurs métaboliques de façon non ciblée, sans *a priori*, pour comparer les réponses des plants de piment en situation de sécheresse avec ou sans élicitation préalable par des flashes UV-C. Les méthodes de chromatographie liquide et gazeuse couplées à la spectrométrie de masse ainsi que les filières de traitement des données ont été optimisées à cette fin.

#### 3.1 Analyses LC-MS/MS

Les analyses ont été effectuées avec un système UPLC Acquity I-Class (Waters, Milford, USA) couplé à un spectromètre de masse Synapt G2-Si quadripolaire à temps de vol (QTOF) (Waters, Manchester, UK) équipé d'une source d'ionisation par électrobulbion (ESI). Les solvants étaient de qualité LC-MS (Carlo Erba, Milan, Italie). L'injection de 1,5 µL d'échantillon a été effectuée en tête d'une colonne Acquity HSS T3 de 1,8 µm (2,1 x 100 mm) avec une pré-colonne Acquity Vanguard HSS T3 (2,1 x 50 mm, Waters, Milford, USA). La phase mobile était composée d'eau (A) et d'acétonitrile (B), tous deux contenant 0,1 % d'acide formique, avec un débit de 0,4 mL/min selon le gradient d'élution suivant : 1% B pendant 1,5 min, puis jusqu'à 99% B en 15 min, maintenu pendant 2,25 min. Ensuite, un gradient linéaire a été appliqué pendant 0,25 min pour revenir à 99 % A, qui a été maintenu pendant 1 min (durée totale de 20 min). La température de la colonne a été maintenue à 45°C et la température du passeur d'échantillons à 10°C. Les conditions optimales pour l'interface électrospray étaient les suivantes : tension capillaire réglée à 1 kV et 2,8 kV en modes positif et négatif respectivement, tension du cône à 40 V, température de la source à 120°C. L'azote a été utilisé comme gaz de séchage et de nébulisation avec un débit de 50 L/h, et un débit de gaz de désolvatation de 850 L/h avec une température de désolvatation réglée à 450°C.

Les analyses ont été effectuées sur trois répétitions biologiques des échantillons contenant 7 feuilles d'une plante de piment (détails de l'expérience dans le chapitre 5), en modes d'ionisation négative et positive, avec une résolution de 20 000. Dix injections de pool (mélange d'extraits de poudre de piment) ont d'abord été réalisées avant l'analyse, puis une injection tous les cinq échantillons, afin de corriger les éventuelles dérives de la des intensités de pics chromatographiques et des temps de rétention. Une solution de leucine enképhaline (2ng/µL) a été co-injectée dans la source pour corriger les masses mesurées et garantir une précision inférieure à 5ppm.

Tableau 9. Paramètres optimisés pour le traitement des données non ciblées LC-MS/MS sur Progenesis

Paramètre	Description	Mode positif	Mode négatif
Limites de détection des pics	Les groupes de pics dont le niveau d'intensité absolue est inférieur aux valeurs données sont considérés comme du bruit et sont ignorés.	Intensité absolue des ions → intensité minimale 1000	Intensité absolue des ions → intensité minimale 1000
Limites de temps de rétention	Les ions qui éluent avant ou après ces valeurs sont ignorés.	0,6 min – 16,5 min	0,6 min – 16,5 min
Limites d'intensité	Filtration des fragments MS <sup>2</sup> de faible intensité. Le seuil utilisé est le pourcentage multiplié par l'intensité maximale du fragment en question.	0,2 % pic de base	0,2 % pic de base
Adduits	Adduits pris en compte pour identifier la masse exacte des composés.	M+3H	M-3H
		M+2H+Na	M-2H
		M+2Na+H	M-H-H <sub>2</sub> O
		M+2H	M-H
		M+H+Na	M+Na-2H
		M+2Na	M+Cl
		M+H-2H <sub>2</sub> O	M+K-2H
		M+H-H <sub>2</sub> O	M+FA-H
		M+H	2M-H
		2M+3H <sub>2</sub> O+2H	2M+FA-H
		M+Na	3M-H
		M+K	
		M+ACN+H	
		M+2Na-H	
		M+ACN+Na	
		2M+H	
		2M+Na	
		2M+K	
		2M+ACN+H	
		2M+ACN+Na	

Afin d'observer les ions minoritaires, des acquisitions en mode DIA (*Data-Independent Acquisitions*) ont été réalisées. Ce mode réalise simultanément les acquisitions en modes MS et MS/MS ( $MS^e$ , *continuum*), avec une rampe d'énergie de collision de 20 à 35 eV, sur la gamme de  $m/z$  50 à 1200, avec un temps de balayage de 0,1s. L'acquisition des données a été réalisée à l'aide de MassLynx version 4.2 (Waters, USA).

Ces données acquises en MSe ont été traitées à l'aide du logiciel Progenesis Q1 (Waters, USA) selon différentes étapes qui comprennent la détection des ions d'intérêt (c'est-à-dire un ion de rapport  $m/z$  associé à un temps de rétention,  $m/z \times TR$ , ou *feature*), l'alignement des chromatogrammes, la déconvolution des spectres de masse et enfin l'alignement des pics, c'est-à-dire le regroupement des pics pour former des pseudos-spectres. Différents paramètres pour la détection des pics ont été testés, ceux retenus ont été résumés dans le tableau 9.

Une fois la liste des *features* obtenue, des filtres ont permis de sélectionner uniquement celles étant discriminantes (ANOVA < 0,05), avec une faible variabilité au sein de chaque condition (coefficient de variation < 30%). L'annotation des métabolites, basée sur la similarité spectrale MSMS, a été réalisée à l'aide de ReSpect DB, une base de données MS/MS spécifique aux plantes (Sawada et al., 2012) compilée par des chercheurs de l'institut RIKEN, téléchargée en ligne à partir de la plateforme MS-Dial (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>).

Une étape d'identification a été effectuée pour les *features* les plus discriminantes. Chaque ion discriminant entre deux conditions a été vérifié manuellement (Mann-Whitney,  $p$ value < 0.05 %) ainsi que ses fragments en source (MS) ou par collision ( $MS^e$ ). La vérification manuelle des spectres a été effectuée en modes négatif et positif. La première étape a consisté à identifier l'ion moléculaire de chaque ion discriminant. En comparant les spectres acquis en modes positif et négatif, une formule brute a pu être proposée plus facilement. Des fragments en source ou par collision ont ensuite pu aider à l'annotation des composés, en vérifiant au préalable leur alignement chromatographique par rapport à l'ion moléculaire afin de s'assurer qu'ils provenaient bien de la même molécule. La connaissance de la matrice a également permis d'orienter le choix des identifications possibles. Par confrontation à la littérature et aux bases de données spectrales, les *features* les plus discriminantes ont été identifiées au niveau 3 ou 4 selon les cas (Schymanski et al. 2014). L'acquisition en MSe entraîne une fragmentation en continu des ions détectés à chaque scan effectué. Le spectre en pseudo MS/MS, contient alors les fragments de tous les ions ayant été fragmentés à chaque temps de rétention. De ce fait, il n'est pas possible d'associer de manière certaine les fragments et les ions parents et donc d'obtenir avec certitude le spectre de fragmentation d'un seul ion, rendant l'identification des molécules à l'aide de la seule acquisition MSe délicate. Par conséquent, des injections en mode DDA



(*Data-Dependant Acquisitions*) ont été réalisées sur les mêmes échantillons. Ce mode d'acquisition déclenche uniquement la fragmentation ciblée des cinq ions les plus abondants à chaque temps de rétention, avec un temps de scan de 0,1s en mode MS et de 0,2s en mode MS/MS. Une rampe dynamique d'énergie de collision a été utilisée de 10 à 40 V pour les faibles masses, et de 40 à 70 V pour les masses élevées, sur la plage de  $m/z$  50 à 1200, afin d'obtenir en abondance relativement identique dans le spectre  $MS^2$  des fragments issus de faibles et fortes fragmentations des ions parents. Cette analyse permet d'obtenir le spectre de fragmentation des ions les plus abondants.

### 3.2 Analyses en GC-EI-TOFMS

Les analyses non ciblées ont également été réalisées en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse d'après la méthode de Roessner et al. (2000) adaptée par Le Boulch et al. (2022). Cette méthode d'analyse est une technique robuste et stable pour l'établissement de profils métaboliques. En outre, l'identification des composés par GC-MS est relativement simple grâce aux bases de données contenant à la fois les indices de rétention chromatographiques et des spectres de masse en EI (Impact Electronique) qui sont très reproductibles.

Les échantillons ont été dérivés chimiquement en ligne avant injection par un robot de préparation (Gerstel MPS, CTC Analytics AG, Suisse) : les extraits secs ont été incubés dans 50  $\mu$ L d'une solution de pyridine contenant 20 mg/mL de méthoxyamine hydrochloride sous agitation constante à 200 rpm et à 80°C pendant 90 minutes. Ensuite, 80  $\mu$ L de BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) contenant un mélange de 9 *n*-alcanes ont été ajoutés avant d'être chauffés pendant 30 minutes à 80°C sous agitation constante à 200 rpm. L'acquisition des données a été réalisée avec un système de chromatographie en phase gazeuse (7890B GC, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) équipé d'une colonne capillaire (ZB-SemiVolatiles, 34,59 m, diamètre interne 250  $\mu$ m, épaisseur du film 250  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, USA) couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF) (Pegasus BT, Leco, Saint Joseph, USA) équipé par une source à impact électronique de 70 eV. Un microlitre d'échantillon a été injecté à 230°C en mode split (1:30) afin d'éviter des phénomènes de saturation. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à 0,6 mL/min. La température initiale du four a été maintenue à 70°C pendant 1 minute, puis augmentée à 320°C (9°C/min) et maintenue pendant 10 minutes. La plage de balayage  $m/z$  était de 70-600 avec une durée de cycle de 20 balayages/s. La température de la source et la ligne de transfert ont été réglées à 250°C. Le robot de préparation était contrôlé par la version 1.4.40.1 de Maestro. Le système de chromatographie en phase gazeuse avec spectromètre de masse a été contrôlé par ChromaTOF® Version 5.20.38.0.54864 (LECO, Saint Joseph, USA).

Tableau 10. Paramètres optimisés pour le traitement des données non ciblées GC-EI/MS sur MS-Dial.

<b>Etape</b>	<b>Paramètre</b>	<b>GC-EI/MS</b>
Acquisition des données	Gamme de masse	70 – 600 Da
	Limites de temps de rétention	5 min – 27 min
Détection des pics	Hauteur minimale de pic	500 000
	Méthode de lissage	Moyenne mobile pondérée linéaire
	Niveau de lissage	1 scan
	Largeur moyenne du pic	30 scans
Identification	Utilisation de l'index de rétention	Oui
	Type d'indice	Alcanes
	Base de données	Riken, fichier MSP
	Tolérance d'indice de rétention	20
	Tolérance de temps de rétention	0,5 min
	Tolérance m/z	0,5 Da
	Seuil de similarité de l'EI	70 %
	Seuil d'admission du score d'identification	70 %
Alignement	Tolérance d'indice de rétention	20
	Tolérance de temps de rétention	0,075 min
	Tolérance de similarité EI	70 %

Les données GC-EI-TOFMS ont été d'abord déconvoluées automatiquement à l'aide du logiciel ChromaTOF® (LECO, St. Joseph, MI, USA). La liste des pics a été vérifiée manuellement pour éliminer les pics incorrectement déconvolués et les contaminants. L'annotation des pics a été réalisée en utilisant des bibliothèques de spectres de masse (base de données Golm, NIST 2014, Leco-fiehn rtx5), par similarité spectrale de l'indice de rétention (RI), le niveau d'identification de chaque métabolite étant déterminé selon les critères inspirés par Schymanski et al. (2014). L'aire des pics a ensuite été intégrée par le logiciel TargetLynx (MassLynx, Waters) avec une supervision manuelle.

Dans l'objectif d'augmenter le potentiel de découverte de marqueurs métaboliques, une approche moins supervisée a été entreprise avec un autre outil de déconvolution et annotation automatique des pics : le logiciel MS-Dial (Tsugawa et al., 2015). Après conversion des données, les différentes étapes comprennent la détection des pics, la déconvolution des chromatogrammes, l'identification puis l'alignement des pics. Le logiciel permet également d'exporter les données sous différents formats afin de continuer l'analyse statistique. Le paramétrage de ce logiciel a nécessité de nombreuses optimisations dont le résultat est présenté dans le tableau 10.

### 3.3 Utilisation des réseaux pour l'identification des métabolites discriminants

Les démarches de traitement des données non ciblées par MS-Dial en GC-MS et par Progenesis en LC-MS DIA ont permis d'obtenir des annotations pour de nouveaux métabolites par confrontation aux bases de données, avec toutefois peu d'efficacité, notamment à cause de la confrontation des spectres expérimentaux avec des spectres théoriques de fragmentation *in silico*, qui sont beaucoup moins fiables. Nous avons donc tenté d'améliorer l'identification des molécules en utilisant des réseaux moléculaires, qui regroupent les molécules par famille en fonction de leur similarité spectrale, ouvrant la possibilité d'identifier des composés structurellement proches de molécules annotées par ailleurs.

#### 3.3.1 Description d'un outil de création de réseaux moléculaires : GNPS

Les données issues d'analyses non ciblées peuvent être représentées sous forme de réseaux moléculaires. La plateforme d'analyse de mise en réseau moléculaire GNPS (*Global Natural Product Social*), a été développée par un laboratoire américain de l'Université de Californie de San Diego. Cette approche permet, après un pré-traitement des données à l'aide d'outils de déconvolution des chromatogrammes, comme par exemple MS-Dial, MZ-Mine ou encore Progenesis, d'organiser et visualiser les données MS<sup>2</sup> sous la forme de carte de similarité spectrale, regroupant en *clusters* les molécules par degré de similarité (Nothias-Scaglia et al., 2015). Les spectres sont représentés par des « nœuds » qui sont reliés par des liens dont la longueur est fonction de la similarité des spectres. Les

Tableau 11. Comparaison des caractéristiques des réseaux LC-MS obtenus par deux approches différentes, en polarité positive et négative.

	<b>MS-Dial</b>	<b>MZ-Mine</b>	<b>MS-Dial</b>	<b>MZ-Mine</b>
	ESI (+)	ESI (+)	ESI (-)	ESI (-)
Nombre de nœuds	3897	640	2952	490
Nombre de clusters (>4)	15	14	11	10
Nombre de nœuds dans ces clusters (>4)	211	163	202	142
Nombre de nœuds dans les clusters <4	3686	477	2750	348
Identifications proposées	12	57	67	41
Proportion d'identifications (%)	0,3	8,9	2,3	8,4

Tableau 12. Comparaison des caractéristiques des réseaux GC-MS obtenus par les trois différentes approches.

	<b>MSHub</b>	<b>MS-Dial</b>	<b>MZ-Mine</b>
<b>Nombre de nœuds</b>	372	324	266
<b>Nombre de clusters (&gt;4 nœuds)</b>	14	13	12
<b>Nombre de nœuds dans ces clusters (&gt;4 nœuds)</b>	217	235	188
<b>Nombre de nœuds dans les clusters &lt;4 nœuds</b>	155	89	78
<b>Identifications proposées</b>	319	172	146

groupes de nœuds connectés rassemblent des spectres appartenant à des molécules structurellement semblables. Des paramètres sont à optimiser pour la création de réseaux, et notamment le choix du seuil de *cosine score*, un indice de corrélation dont la valeur est comprise entre 0 et 1, attribué entre chaque paire de spectres MS<sup>2</sup> pour quantifier leur similarité. Les réseaux peuvent au final être visualisés graphiquement grâce au logiciel Cytoscape. L'utilisation de GNPS permet également de consulter automatiquement les nombreuses bases de données spectrales connectées à la plateforme en ligne afin d'annoter les molécules ainsi que d'annoter manuellement des nœuds (Nothias-Scaglia et al., 2015; Ramos et al., 2019). Dans l'ensemble, cet outil facilite l'élucidation structurale des marqueurs métaboliques (Demarque et al., 2020).

### 3.3.2 Réseaux issus des données acquises en LC-MS/MS

Les données acquises en LC-MS/MS en mode DDA ont permis de réaliser des réseaux moléculaires, après avoir testé différentes méthodes de pré-traitements des données en utilisant les logiciels MS-Dial et MZ-Mine (tableau 11). Les nœuds ont été liés lorsque le *cosine score* était supérieur à 0,6 en mode positif et 0,7 en mode négatif. Nous avons constaté un nombre de nœuds largement supérieur lorsque le pré-traitement avait été effectué par MS-Dial, en polarité positive et négative. En revanche, le nombre de clusters contenant au minimum quatre nœuds était le même avec les deux approches : la différence de nombre total de nœuds était principalement due à des nœuds appartenant à des petits clusters, ou des *singletons*, c'est-à-dire des nœuds n'étant associés à aucun autre. La proportion d'ions identifiés était, faible dans l'ensemble mais plus importante lorsque le pré-traitement avait été effectué par MZ-Mine. C'est donc ce pré-traitement qui a été retenu pour la suite des analyses de données.

### 3.3.3 Réseaux issus des données acquises en GC-MS

Les données acquises en GC-MS ne sont pas des données MS<sup>2</sup> car elles n'ont pas été acquises par spectrométrie de masse en tandem. Néanmoins, elles contiennent des spectres complexes très fragmentés caractéristiques de l'utilisation d'une source à impact électronique (EI) (Kind and Fiehn, 2010) et les données peuvent donc également être utilisées pour la construction de réseaux moléculaires (Aksenov et al., 2021). Le pré-traitement des données (déconvolution automatique) peut être effectué avec un algorithme d'apprentissage automatique nommé « MSHub », implémenté dans l'environnement GNPS. Trois méthodes de pré-traitement ont été testées sur un jeu de données de feuilles de piment appartenant à des modalités différentes, et les réseaux obtenus ont été comparés (Tableau 12). Les nœuds ont été liés lorsque le *cosine score* était supérieur à 0,6. Le nombre de nœuds



s'est trouvé compris entre 266 et 372. La méthode de déconvolution automatique MSHub a permis d'obtenir le plus grand nombre de nœuds (372), tandis que les deux autres outils (MS-Dial et MZ-Mine), où les nombreux paramètres sont à optimiser par l'utilisateur, ont donné 324 et 266 nœuds respectivement. Le nombre de *clusters* supérieurs à 4 nœuds a été similaire avec les trois méthodes (entre 12 et 14). Les nœuds supplémentaires issus de l'approche MSHub n'appartenaient pas à des *clusters* regroupant quatre nœuds ou plus et rassemblaient donc des spectres présentant peu de similitudes avec d'autres. Les identifications proposées ont été largement supérieures lorsque la déconvolution a été effectuée de manière automatique : 319 pour MSHub contre 172 et 146 pour MS-Dial et MZ-Mine, ce qui suggère qu'une déconvolution non optimale effectuée de manière manuelle peut empêcher l'annotation par confrontation aux banques spectrales. La déconvolution automatique a donc été privilégiée par la suite.

Les méthodes développées et optimisées sur le matériel végétal étudié ont ensuite été utilisées afin d'élucider l'effet des traitements d'élicitation par les UV-C et par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes (Chapitre 4) puis par des approches non ciblée et multiciblée, l'effet des traitements UV-C sur le métabolisme du piment en condition de stress hydrique (Chapitre 5).



# Chapitre 4

---

Elicitation des concentrations en caroténoïdes et capsaïcinoïdes dans les fruits lors de différentes situations physiologiques



## 1 Introduction

Le piment (*Capsicum spp.*) est une culture d'importance mondiale avec 41 millions de tonnes produites en 2021 (FAOSTAT, 2021), dont le fruit est apprécié pour ses propriétés nutritionnelles intéressantes, sa saveur, son piquant, sa couleur ou encore sa texture, mais il possède également des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumorales (Kaiser et al., 2017). Ce fruit est considéré de fait comme un « super-aliment » avec des effets nutraceutiques et des fonctionnalités favorisant la prévention des maladies métaboliques telles que le syndrome métabolique (Driessche et al., 2018; Naves et al., 2019). L'utilisation du piment concerne de nombreux domaines comme la cosmétique, la pharmaceutique et le secteur alimentaire ; aussi bien d'ailleurs l'alimentation humaine qu'animale. Des utilisations de poudre de piment pour l'alimentation animale, en tant qu'additifs dans la production porcine, avicole et piscicole ont été rapportées (Erdost et al., 2006). Par conséquent, ces avantages pour l'utilisation de la poudre de piment et l'intérêt croissant des secteurs agricoles et biotechnologiques incitent à rechercher l'augmentation des concentrations en métabolites secondaires d'intérêt dans les fruits, qui plus est, à travers des solutions durables.

Ainsi, des recherches approfondies ont été menées afin d'augmenter le rendement des piments en composés d'intérêt, en adoptant différentes techniques. L'augmentation du rendement en composés actifs peut se faire à travers la recherche de variétés hybrides à haut rendement en capsaïcinoïdes ou par l'optimisation de la fertilisation; mais la stratégie la plus pratique consiste encore à utiliser des leviers d'élicitation (Poulev et al., 2003; Angelova et al., 2006).

Parmi ces leviers, les facteurs physiques, chimiques et microbiens sont largement utilisés. Les facteurs biotiques comprennent notamment les champignons ou les bactéries tandis que les facteurs abiotiques comprennent la salinité, la sécheresse, les métaux lourds, le rayonnement ultraviolet (UV), le stress thermique ou encore le froid (Haggag, 2015; Isah, 2019). Des molécules synthétisées naturellement peuvent également être utilisées en tant qu'éliciteur, agissant comme signaux stimulant de l'immunité. Parmi ces éliciteurs, on peut citer le SA, le JA, le MeJA ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après élicitation, les plantes peuvent activer des réponses de défenses, incluant la synthèse et l'accumulation de métabolites secondaires jouant un rôle dans la survie et la performance agronomique (Thakur et al., 2019). L'accumulation de métabolites secondaires peut ainsi contribuer à l'amélioration de la composition nutritionnelle des fruits (Teklić et al., 2021). Les modalités et contraintes de l'élicitation doivent, en revanche, avoir été bien établies au préalable : définition des couples, du stade d'application, réaliser d'essais *in situ* pour appréhender les contraintes environnementales, de même que le choix du moment de récolte. En effet, la récolte doit être coordonnée avec la réponse de plante si l'impact de l'éliciteur n'est pas conservé dans le temps.



Parmi les métabolites secondaires qu'on trouve dans les fruits du genre *Capsicum*, deux familles sont présentes en quantités importantes et ont un intérêt particulier en nutrition animale : les capsaïcinoïdes et les caroténoïdes. Sur fruits matures récoltés (*C. annum*), des applications de chitosan, JA ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent entraîner une augmentation de la concentration en caroténoïdes, en particulier de lycopène et de lutéine (Garcia-Mier et al., 2015). Des cultures cellulaires de 'Habanero' élicitées par des traitements au SA, ont montré une accumulation de capsaïcinoïdes 10 fois plus importante qu'en condition témoin (Gutiérrez-Carbajal et al., 2010). Une exposition aux UV-C sur les fruits récoltés matures ont montré une augmentation des concentrations en caroténoïdes ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes par rapport à la condition témoin (Promyou, 2012). Certains éliciteurs peuvent entraîner une réponse de ces deux familles de molécules. En effet, après application de *Botryococcus braunii* sur des cultures cellulaires de *C. frutescens*, la concentration en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes ont été augmentées d'un facteur deux par rapport au témoin (Sharma et al., 2011).

Le choix des éliciteurs doit se faire en fonction de l'objectif recherché. Nous avons choisi d'augmenter les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes en appliquant des UV-C et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les UV-C, en stimulant la voie du SA (Yao et al., 2012), pourraient augmenter la concentration en capsaïcinoïdes, comme rapporté par Gutiérrez-Carbajal et al. (2010) en culture cellulaire. De plus, le facteur de transcription *CaMYB31* est fortement impliqué dans la régulation de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes et son expression est induite par un traitement au SA (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017). Concernant la concentration en caroténoïdes, l'hypothèse est différente. Les UV-C sont perçus par le récepteur UVR8, décrit comme le principal récepteur des UV-B, dont le spectre d'action comprend également la région des UV-C (Jiang et al., 2012; Arrouf et al., 2022a). La forme active de ce récepteur spécifique aux UV-B et C, interagit directement avec COP1, une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la régulation de la signalisation lumineuse, notamment en régulant l'expression du gène HY5, qui déclenche la production de caroténoïdes, directement liés à la photoprotection (Jenkins, 2009a; Jenkins, 2014). Les UV-C semblent être à la base d'un *priming* (Urban, communication personnelle), un stress hydrique sera également appliqué afin de constituer le stress déclenchant. Dans cette étude, le stress hydrique n'est pas considéré comme un éliciteur, mais comme un stress survenant après l'application de ce dernier.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été utilisé dans de nombreuses études et notamment pour augmenter les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes. D'après Bouvier et al. (1998), l'application de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur des disques de péricarpe de poivron entraîne la synthèse de *novo* de capsanthine. L'application sur plantes entières est également possible dans le but d'augmenter les concentrations en capsaïcinoïdes. D'après

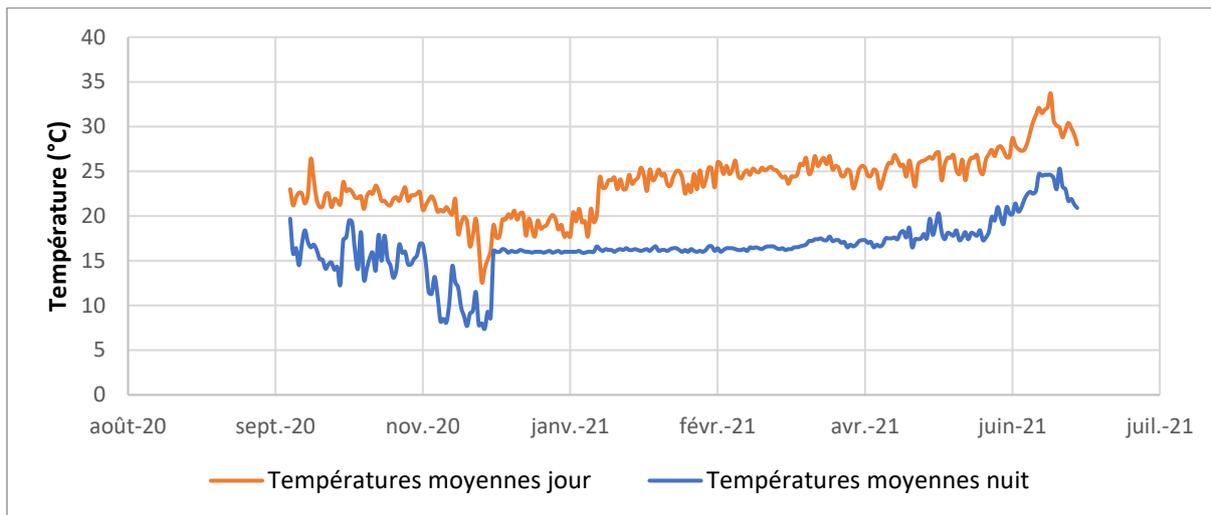


Figure 44. Températures moyennes de jour et de nuit dans la serre de l'Université d'Avignon lors de cet essai réalisé entre les mois d'octobre 2020 et juin 2021.

Zunun-Pérez et al. (2017) ainsi que les déposants du brevet (FR3100955, 2021), la pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur plantes de *C. chinense* 'Helios' cultivées au Mexique, à la dose de 400 mM trois jours avant la récolte des fruits, a permis de multiplier par 2,4 la concentration en capsaïcinoïdes dans les fruits, et par 5,7 lorsqu'un stress hydrique a suivi le traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport au témoin bien arrosé (et x2 par rapport au stress hydrique seul). Ces deux éliciteurs semblent donc efficaces pour augmenter les concentrations en composés d'intérêt dans les fruits de piment.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet des traitements d'élicitation par les UV-C ou par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes dans les fruits lorsque le traitement est effectué sur les plantes pendant leur croissance. En effet, les traitements par les UV-C et par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été réalisés précédemment sur plantes entières (Urban et al., 2018; Brevet FR3100955, 2021). Pour cela, différents essais ont été réalisés au cours desquels les traitements d'élicitation ont été appliqués dans deux conditions physiologiques (arrosage non limitant/arrosage limitant). L'état physiologique des plantes a été évalué après les traitements afin de vérifier l'innocuité des traitements d'élicitation, à travers la mesure des échanges gazeux et de la cinétique de fluorescence de la chlorophylle, ainsi que d'un dosage de métabolites primaires dans les feuilles. L'effet des traitements sur les teneurs en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes dans les fruits a été évalué par des dosages de ces composés en LC-MS ou par spectrophotométrie.

## 2 Matériel et méthodes

Les différents essais réalisés dans la serre de l'université d'Avignon sont présentés par la suite. Certaines conditions n'ont été réalisées qu'une seule fois, et d'autres ont été répétées sur plusieurs saisons de culture. Les calendriers de traitement de chaque essai sont présentés dans les parties ci-dessous, puis les résultats sont commentés ensemble dans la partie 3.

### 2.1 Elicitation par le peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations

#### 2.1.1 Calendrier de traitement et de récolte

Cet essai a eu lieu entre les mois d'octobre 2020 et juin 2021 sur des plantes de *C. chinense* 'Habanero' et *C. frutescens* 'BJ' dans la serre de l'Université d'Avignon (Figure 44). Le nombre de plantes par modalité est compris entre 10 et 11. Les traitements d'élicitation ont été réalisés par pulvérisation foliaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les plantes en croissance, à des doses de 20 mM et de 400 mM, jusqu'au ruissellement.

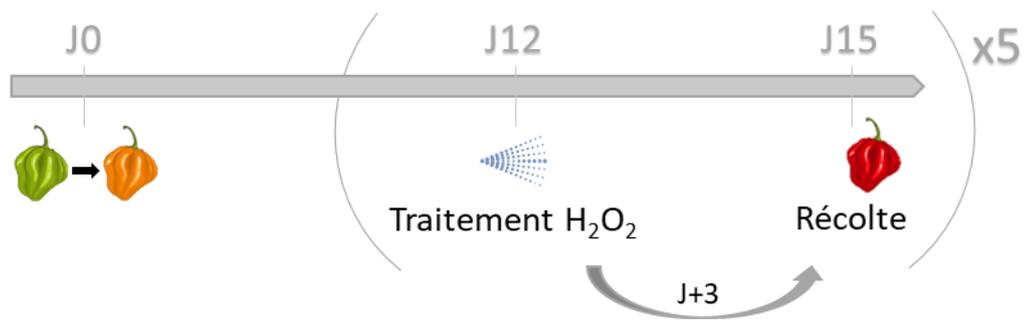


Figure 45. Schéma du calendrier de traitement des fruits. A partir du changement de couleur des fruits, la maturation est suivie et le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été réalisé 12 jours après sur plantes entières ; la récolte des fruits a été effectuée 3 jours après. Cinq traitements ont eu lieu sur 5 semaines successives.

Cinq traitements ont été effectués, associés à chaque fois à une récolte des fruits trois jours après traitement. Les fruits ont été traités 12 jours après le changement de couleur de vert à orange, puis récoltés trois jours plus tard. Les fruits récoltés ont donc été traités, deux, trois, quatre ou cinq fois pendant toute la croissance (Figure 45). Conformément aux deux études citées précédemment, les traitements ont été effectués à une dose de 20 mM et de 400 mM, par pulvérisation de l'ensemble de la plante jusqu'à ruissellement. Les plants témoins ont été traités de la même manière avec de l'eau.

La maturité des fruits a été suivie et ces derniers ont été récoltés 15 jours après le changement de couleur des fruits, soit environ 35 jours après anthèse pour 'Habanero', et environ 40 jours pour 'BJ'. Les fruits ont été analysés en fonction du nombre de traitements reçus (un fruit = un échantillon).

### 2.1.2 Mesures des échanges gazeux

Des mesures sur les plantes après le 4<sup>ème</sup> traitement ont été effectuées afin d'obtenir une indication de l'état des plantes à travers les mesures d'échanges gazeux. Les mesures ont été faites à l'aide d'un analyseur de gaz CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à infrarouge et d'un système de chambre foliaire avec une source de lumière externe dans la gamme 400-700 nm (LI 6800, Licor, Lincoln, USA). Le taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub> (soit la photosynthèse nette,  $A_{net}$ ) et la conductance stomatique ( $g_{sw}$ ) ont été mesurés aux environs du midi solaire, sur des feuilles jeunes mais entièrement déployées, avec un niveau de rayonnement photosynthétique actif (PAR) fixé à 600  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , et une pression partielle de CO<sub>2</sub> ambiant de 42 Pa.

### 2.1.3 Mesures de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne (ChlF)

La cinétique de ChlF a été mesurée après le 4<sup>ème</sup> traitement, avant 10h du matin à l'aide d'un fluorimètre portable (Pocket PEA, Hansatech Instruments, Royaume-Uni). Les feuilles ont été adaptées à l'obscurité pendant 20 minutes avant la mesure à l'aide d'une pince foliaire, puis exposées pendant 1 seconde à 3 500  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (637 nm). L'intensité de la ChlF à  $t = 50 \mu\text{s}$  a été considérée comme la fluorescence minimale ( $F_0$ ) (Strasser, 1995). La cinétique rapide de ChlF de  $F_0$  à  $F_m$ , où  $F_0$  et  $F_m$  sont, respectivement, la ChlF minimale et maximale mesurées du photosystème II (PSII) dans l'état adapté à l'obscurité, a été enregistrée de 10  $\mu\text{s}$  à 1 s. Le rendement quantique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ), c'est-à-dire le ratio entre la fluorescence variable ( $F_v$ ) et la fluorescence maximale ( $F_m$ ), un indice de performance ( $PI_{abs}$ ), un indicateur de vitalité de la plante, et une de ses composantes ( $(1 - V_j)/V_j$ ), où  $V_j$  est la fluorescence variable relative à  $t = 2 \text{ ms}$ ) ont été calculés automatiquement (Strasser et al., 2000; Campa et al., 2017). D'autres paramètres ont été calculés ensuite, comprenant le flux d'énergie dissipée sous forme de chaleur exprimé en rendement quantique ( $DI_0/ABS$ , un indicateur de



l'importance des processus autres que le piégeage), ou encore des paramètres indicateurs de dommages potentiels comme  $V_k$ ,  $V_k/V_j$  et  $S_m$  (Ripoll et al., 2016a; Urban et al., 2017).  $V_k$  représente la fluorescence variable relative à 300  $\mu$ s, tandis que le rapport  $V_k/V_j$  correspond au rapport entre la fluorescence variable à 300  $\mu$ s (étape K) sur celle à 2 ms (étape J).  $S_m$  représente l'énergie nécessaire pour fermer tous les centre réactionnels (aire normalisée par  $F_v$ ).

#### 2.1.4 Dosages des caroténoïdes totaux par spectrophotométrie

Dans cet essai, les caroténoïdes ont uniquement été dosés en quantité totale, par spectrophotométrie. Les caroténoïdes présents dans une masse de 100 mg de matière fraîche d'échantillon ont été extraits à l'aide de 1 mL d'acétone à 4°C (Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera, 2001). Suivant la loi de Beer-Lambert, la concentration en caroténoïdes totaux a été calculée par les équations suivantes, déterminées par Lichtenthaler (1987) :

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/mL}) = (11,24 \times DO_{662}) - (2,04 \times DO_{645})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/mL}) = (20,13 \times DO_{645}) - (4,19 \times DO_{662})$$

$$\text{Caroténoïdes } (\mu\text{g/mL}) = \frac{1000 \times DO_{470} - 1,9 \times \text{Chl a} - 63,14 \times \text{Chl b}}{214}$$

La concentration a ensuite été exprimée en  $\text{mg.g MS}^{-1}$ .

#### 2.1.5 Dosage des capsaïcinoïdes par UPLC-ESI-TQ-MS

En raison du nombre important d'échantillons, seulement un lot de fruits par variété (c'est-à-dire ayant reçu le même nombre de traitements) a été analysé par LC-MS/MS. Pour rappel dans cet essai, un fruit constituait un échantillon. Afin d'évaluer l'effet de la répétition du traitement, les capsaïcinoïdes ont été quantifiés dans les fruits ayant reçus cinq traitements pour la variété 'Habanero', et trois traitements pour les fruits de la variété 'BJ'. En effet, cette dernière variété étant moins productive, seulement trois récoltes ont pu être effectuées.

D'après les optimisations présentées dans le chapitre 3, 3 mL de méthanol 80% ont été ajoutés aux 30 mg de matière fraîche des échantillons afin d'extraire les capsaïcinoïdes. Ces derniers ont été quantifiés par UPLC-ESI-TQ-MS, par la méthode MRM développée pour ces composés (voir chapitre 3, tableau 6).

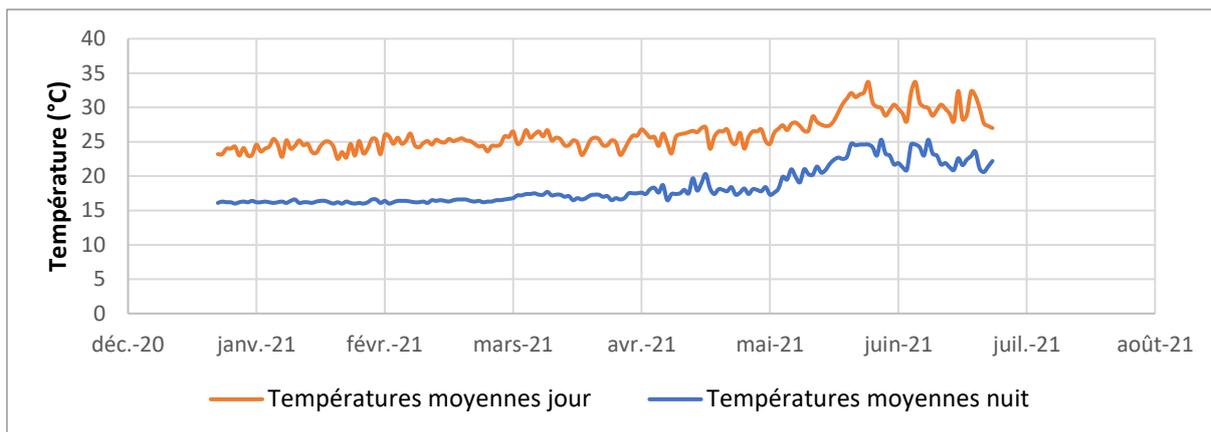


Figure 46. Températures moyennes de jour et de nuit dans la serre de l'Université d'Avignon lors de cet essai réalisé entre les mois de janvier et juillet 2021.

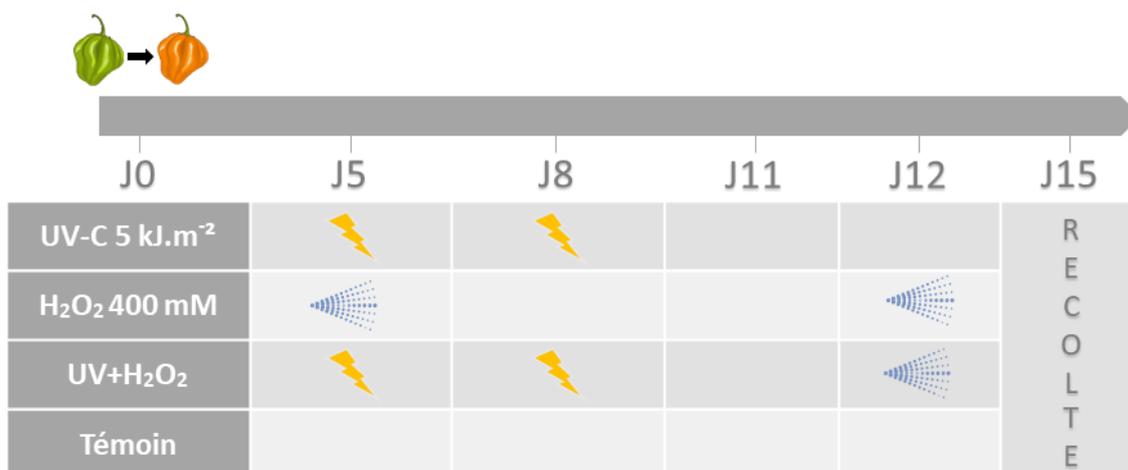


Figure 47. Schéma du calendrier de traitement des fruits. A partir du changement de couleur des fruits, la maturation a été suivie et les traitements ont été réalisés sur plantes entières, aux jours 5 et 8 pour les UV-C et aux jours 5 et 12 pour les traitements H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La récolte a été effectuée 3 jours après le dernier traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

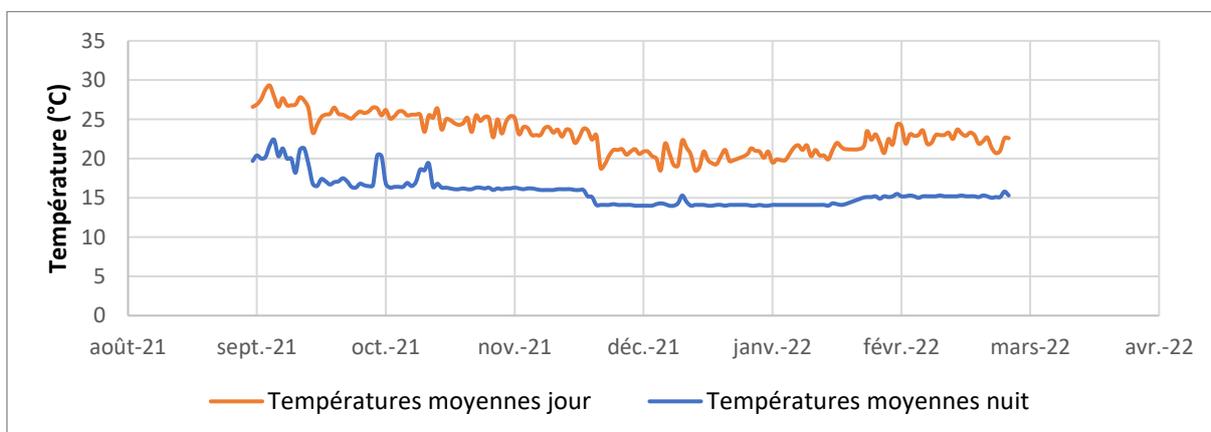


Figure 48. Températures moyennes de jour et de nuit dans la serre de l'Université d'Avignon lors de cet essai réalisé entre les mois de septembre 2021 et mars 2022.

## 2.2 Elicitation par les UV-C et combinaison de traitements

Un autre essai a été réalisé entre les mois de janvier et juillet 2021 dans la serre de l'Université d'Avignon (Figure 46). L'essai a été réalisé sur des plantes de la variété 'Habanero' uniquement, car la productivité de la variété 'BJ' ne permettait pas d'obtenir suffisamment de fruits pour exploiter les résultats. Neuf plantes par modalité ont été utilisées.

Les UV-C ont été utilisés à la dose de  $5 \text{ kJ.m}^{-2}$  après détermination de la dose hormétique (cf. chapitre 2), et ont été combinés avec une pulvérisation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 400 mM.

Les UV-C ont été appliqués 5 jours après le changement de couleur des fruits puis répétés 3 jours plus tard. Le traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été appliqué 4 jours après, puis les fruits ont été récoltés, selon le calendrier présenté dans la figure 47.

Après les traitements, des mesures d'échanges gazeux, ainsi que des cinétiques de ChIF ont été effectuées.

Dans cet essai, et pour tenter de diminuer la variabilité due au stade des fruits, les stades d'avancement des fruits à partir de la nouaison ont été suivis, puis les fruits récoltés ont été rassemblés par plante pour représenter un seul échantillon, soit 9 répétitions par modalité.

Sur ces échantillons, des dosages de caroténoïdes totaux au spectrophotomètre ainsi qu'un dosage individuel des caroténoïdes et des capsaïcinoïdes en LC-MS/MS ont été réalisés.

## 2.3 Réponses aux éliciteurs en situation de stress hydrique

### 2.3.1 Calendrier de traitement

Un essai utilisant les éliciteurs en condition de stress hydrique a été réalisé entre les mois de septembre 2021 et mars 2022, sur 10 plantes de chaque variété par modalité dans la serre de l'Université d'Avignon (Figure 48). Les rayonnements UV-C ainsi que le peroxyde d'hydrogène ont été utilisés en tant qu'éliciteurs, en suivant les applications décrites dans le chapitre 2.

Les traitements ont été effectués selon la chronologie présentée dans la figure 49. Trois traitements UV-C et un traitement  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été effectués avant le commencement du stress hydrique, qui a été poursuivi pendant 23 jours jusqu'à la récolte des fruits. Les fruits de la variété 'BJ' ont été récoltés au jour 42 après nouaison afin d'atteindre la maturité complète des fruits. Un 4<sup>ème</sup> traitement

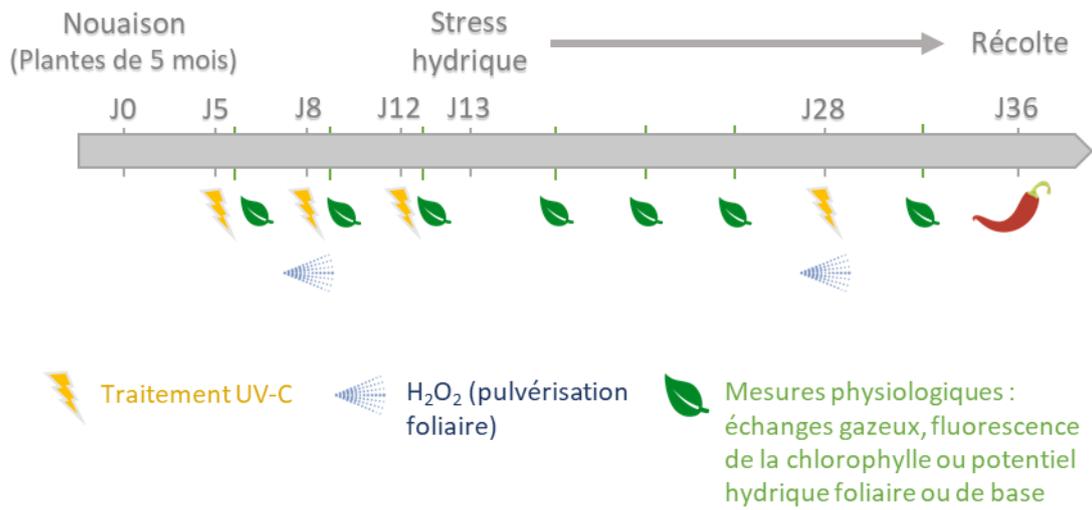


Figure 49. Schéma du calendrier de traitement des fruits. A partir du changement de couleur du fruit, la maturation a été suivie et les traitements ont été réalisés sur plantes entières, aux jours 5, 8, 12 et 28 pour les UV-C et aux jours 8 et 28 pour les traitements H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le stress hydrique par diminution de la quantité d'eau a démarré au jour 13. Des mesures physiologiques ont eu lieu jusqu'à la récolte.

UV-C et 2<sup>ème</sup> traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été effectués au cours du stress hydrique. Le stress hydrique a consisté en une réduction progressive de l'arrosage, avec une quantité d'eau totale pendant la durée du stress diminuée de 70%. Des mesures physiologiques ont été réalisées après les traitements et tout au long du stress hydrique afin de suivre l'état physiologique des plantes après les traitements et durant le stress appliqué.

#### *2.3.1.1 Potentiel hydrique de base et du potentiel hydrique foliaire*

Des mesures de potentiel hydrique de base ont été réalisées afin d'avoir une indication de l'état hydrique du sol et de la disponibilité en eau. Les mesures ont été réalisées en fin de nuit, lorsque la transpiration est négligeable et que la plante a reconstitué ses réserves en eau. On considère alors que le potentiel hydrique de la plante est en équilibre avec celui du sol. Des feuilles à la base de la plante, saines et sans blessures ont été placées dans des sachets opaques en fin de journée afin d'effectuer les mesures le lendemain matin (entre 8 et 10 feuilles par modalité).

Le potentiel hydrique foliaire est un indicateur de l'état hydrique de la plante. Les feuilles prélevées, étaient des feuilles jeunes mais ayant terminé leur croissance ; elles ont été placées dans des sachets opaques immédiatement après avoir été coupées puis les mesures ont été faites.

Le pétiole de la feuille prélevée a été coupé transversalement puis inséré dans le couvercle de la chambre de pression avec la surface coupée du pétiole dépassant à travers un joint (bombe de Scholander, Agroressources, DP100 ; Cochard et al., 2001). Le couvercle est remis en place, maintenant le limbe de la feuille dans la chambre scellée, et la chambre est pressurisée jusqu'à ce que la surface coupée du pétiole soit mouillée par le ménisque ascendant de la sève du xylème, indiquant que la "pression d'équilibrage" appliquée a compensé la pression négative sur l'eau à l'intérieur de la feuille équilibrée. La mesure repose sur la théorie de la tension de cohésion pour l'ascension de la sève (Steudle, 2001; Angeles et al., 2004), c'est-à-dire que la tension dans le xylème de la feuille au moment où elle est attachée à la tige peut être mesurée en pressurant la feuille équilibrée et en observant la pression d'équilibrage (Rodriguez-Dominguez et al., 2022).

#### *2.3.1.2 Echanges gazeux et fluorescence de la chlorophylle*

Les mesures des échanges gazeux et de cinétique de ChlF ont été réalisées après les traitements, comme décrits précédemment (chapitre 4, parties 2.1.2 et 2.1.3).

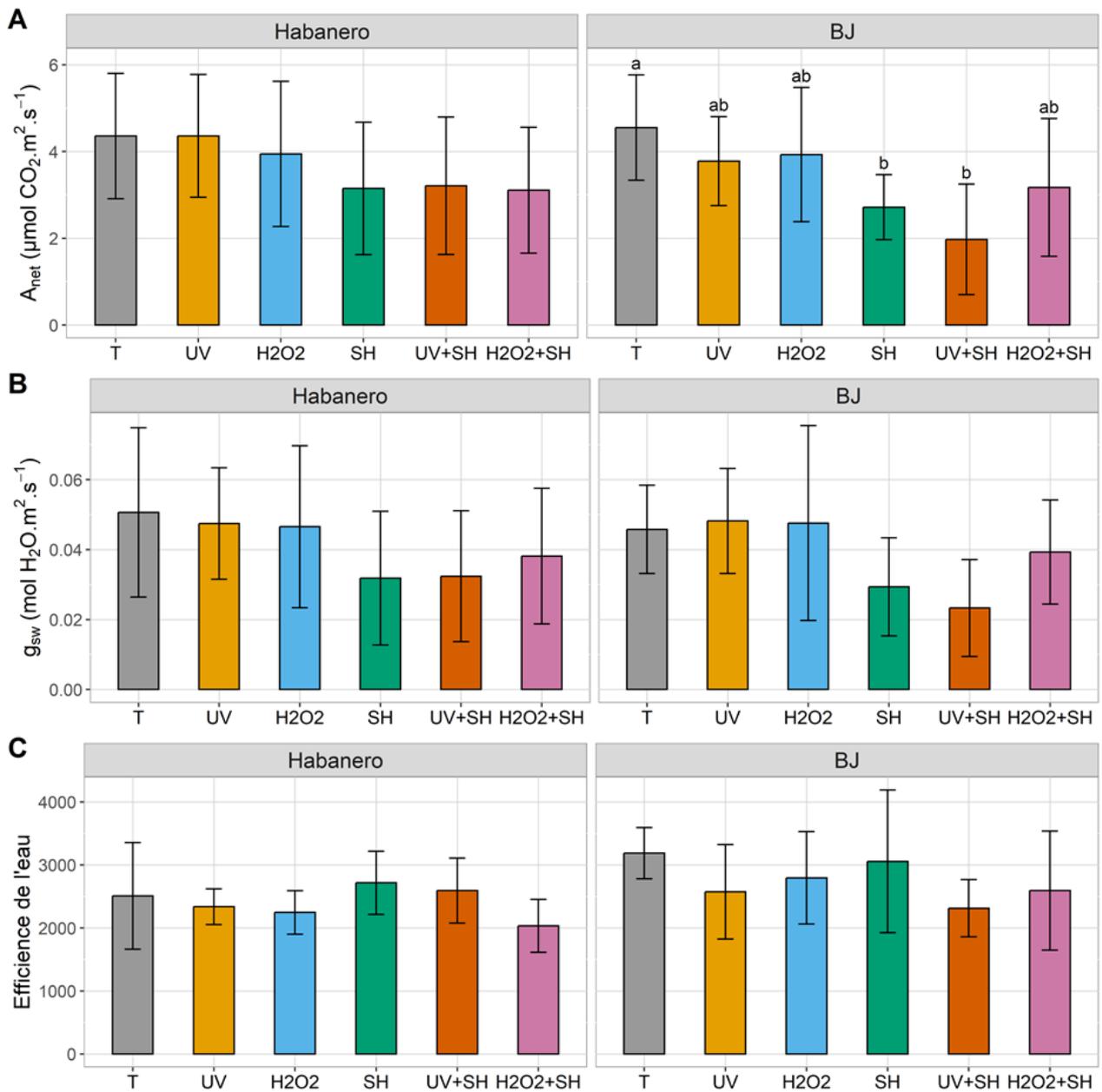


Figure 50. Effets des traitements d'élicitation associés ou non à un stress hydrique sur la photosynthèse nette des plantes des deux variétés. A. Taux net d'assimilation du carbone ( $A_{net}$ ). B. Conductance stomatique ( $g_{sw}$ ). C. Efficacité de l'eau ( $A_{net}/E$  (transpiration)). Les barres d'erreur représentent les écarts-types ( $n=10$ ). Les lettres indiquent une différence statistique significative entre les moyennes selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%.

### 2.3.2 Analyses non ciblées et dosages de métabolites secondaires

Les fruits ont été récoltés au même stade de maturité grâce aux notations du stade d'avancement des fruits. A la récolte, les fruits de même stade de maturité d'une plante ont constitué un échantillon. Trois feuilles jeunes mais totalement développées ont également été récoltées par plante au dernier jour, puis immédiatement congelées et broyées dans de l'azote liquide avant analyse.

Des analyses non ciblées du métabolome primaire dans les feuilles ont été effectuées, par GC-EI-TOF. Les méthodes de traitement d'échantillon et d'analyses employées ont été décrites dans le chapitre 2. Les 55 métabolites primaires identifiés et quantifiés de manière relative ont été résumés dans l'annexe 1. Des analyses ciblées ont également été menées afin de doser les caroténoïdes et les capsaïcinoïdes dans les fruits par UPLC-ESI-TQ-MS.

## 2.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel R. Les données ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis et du test *post-hoc* de Conover avec ajustement de Bonferroni pour différencier les groupes statistiques. Les graphiques ont été réalisés avec R à l'aide des packages ggplot2 (Wickham, 2009) et FactoMineR (Lê et al., 2008).

## 3 Résultats

### 3.1 Evaluation de l'état physiologique de la plante : les traitements d'élicitation n'engendrent pas de perturbation physiologique

#### 3.1.1 Les traitements d'élicitation ne modifient pas les échanges gazeux et la fluorescence chlorophyllienne

##### 3.1.1.1 Echanges gazeux

En condition hydrique optimale, les traitements d'élicitation (UV-C et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 mM) n'ont pas entraîné de perturbation significative des paramètres d'échanges gazeux. Dans les deux variétés, aucune diminution de photosynthèse nette, de conductance stomatique ( $g_{sw}$ ) ou d'efficacité de l'eau (calculée comme le rapport entre la photosynthèse nette ( $A_{net}$ ) et la transpiration des feuilles ( $E$ ), figure 50), n'a été observée le 21<sup>ème</sup> jour après le début du stress hydrique et la fin des traitements

Tableau 13. Effets des traitements d'élicitation associés ou non au stress hydrique sur les paramètres dérivés des courbes d'induction de la fluorescence chlorophyllienne maximale pour la variété 'Habanero' (A) et la variété 'BJ' (B). Les paramètres sont colorés selon leur signification : en gris, paramètres de dégâts ; en vert, paramètres contribuant à l'index de performance ; en orange, paramètres liés au flux d'électrons. Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  écarts-types ( $n=18$ ). Les lettres représentent les différences statistiques significatives entre les moyennes à chaque date de mesure, selon le test de Kruskal-Wallis, au seuil de 5%. Une absence de lettres indique une absence de différence.

A		Jour	Modalité	Fv/Fm	Sm	Vk	Vk/Vj	(1-Vj)/Vj	PI <sub>abs</sub>	DI <sub>0</sub> /ABS
8	T		T	0,77 $\pm$ 0,06	17,05 $\pm$ 4,46 <sup>a</sup>	0,189 $\pm$ 0,054 <sup>ab</sup>	0,412 $\pm$ 0,072 <sup>a</sup>	1,244 $\pm$ 0,255	2,983 $\pm$ 1,859	0,230 $\pm$ 0,064
			UV	0,77 $\pm$ 0,04	19,58 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	0,199 $\pm$ 0,052 <sup>a</sup>	0,405 $\pm$ 0,062 <sup>a</sup>	1,095 $\pm$ 0,266	2,506 $\pm$ 1,513	0,228 $\pm$ 0,043
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,78 $\pm$ 0,05	15,41 $\pm$ 3,96 <sup>b</sup>	0,166 $\pm$ 0,082 <sup>b</sup>	0,350 $\pm$ 0,092 <sup>b</sup>	1,245 $\pm$ 0,324	3,739 $\pm$ 2,219	0,222 $\pm$ 0,054
18			T	0,79 $\pm$ 0,04	23,62 $\pm$ 6,50	0,115 $\pm$ 0,036 <sup>ab</sup>	0,266 $\pm$ 0,043	1,412 $\pm$ 0,350 <sup>a</sup>	4,282 $\pm$ 2,064 <sup>a</sup>	0,210 $\pm$ 0,036
			UV	0,79 $\pm$ 0,02	26,57 $\pm$ 6,19	0,111 $\pm$ 0,016 <sup>ab</sup>	0,264 $\pm$ 0,021	1,491 $\pm$ 0,263 <sup>ab</sup>	4,537 $\pm$ 2,284 <sup>ab</sup>	0,210 $\pm$ 0,020
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,80 $\pm$ 0,04	26,38 $\pm$ 4,36	0,088 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>	0,243 $\pm$ 0,045	1,800 $\pm$ 0,358 <sup>b</sup>	6,003 $\pm$ 2,235 <sup>b</sup>	0,203 $\pm$ 0,035
			SH	0,79 $\pm$ 0,03	21,31 $\pm$ 4,21	0,109 $\pm$ 0,029 <sup>ab</sup>	0,270 $\pm$ 0,030	1,524 $\pm$ 0,367 <sup>ab</sup>	4,499 $\pm$ 2,234 <sup>a</sup>	0,208 $\pm$ 0,029
			UV+SH	0,80 $\pm$ 0,04	22,94 $\pm$ 3,25	0,118 $\pm$ 0,016 <sup>ab</sup>	0,276 $\pm$ 0,021	1,378 $\pm$ 0,326 <sup>a</sup>	4,125 $\pm$ 2,230 <sup>a</sup>	0,201 $\pm$ 0,036
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +SH	0,79 $\pm$ 0,03	21,42 $\pm$ 3,64	0,120 $\pm$ 0,029 <sup>ab</sup>	0,274 $\pm$ 0,037	1,403 $\pm$ 0,359 <sup>a</sup>	4,180 $\pm$ 2,438 <sup>a</sup>	0,211 $\pm$ 0,032
21			T	0,82 $\pm$ 0,04	21,46 $\pm$ 3,28	0,088 $\pm$ 0,025	0,237 $\pm$ 0,032 <sup>ab</sup>	1,751 $\pm$ 0,292	6,938 $\pm$ 1,779	0,183 $\pm$ 0,038
			UV	0,81 $\pm$ 0,03	19,20 $\pm$ 3,24	0,106 $\pm$ 0,023	0,258 $\pm$ 0,030 <sup>ab</sup>	1,521 $\pm$ 0,337	5,214 $\pm$ 2,473	0,195 $\pm$ 0,032
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,80 $\pm$ 0,04	20,18 $\pm$ 4,94	0,108 $\pm$ 0,024	0,266 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup>	1,542 $\pm$ 0,258	5,148 $\pm$ 1,333	0,196 $\pm$ 0,038
			SH	0,80 $\pm$ 0,02	19,96 $\pm$ 5,48	0,106 $\pm$ 0,029	0,270 $\pm$ 0,037 <sup>b</sup>	1,614 $\pm$ 0,408	5,011 $\pm$ 2,720	0,202 $\pm$ 0,023
			UV+SH	0,81 $\pm$ 0,03	21,56 $\pm$ 4,35	0,098 $\pm$ 0,046	0,259 $\pm$ 0,049 <sup>ab</sup>	1,747 $\pm$ 0,361	6,254 $\pm$ 2,065	0,188 $\pm$ 0,034
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +SH	0,81 $\pm$ 0,02	22,83 $\pm$ 3,04	0,103 $\pm$ 0,020	0,254 $\pm$ 0,023 <sup>ab</sup>	1,508 $\pm$ 0,307	5,309 $\pm$ 2,206	0,190 $\pm$ 0,019
B		Jour	Modalité	Fv/Fm	Sm	Vk	Vk/Vj	(1-Vj)/Vj	PI <sub>abs</sub>	DI <sub>0</sub> /ABS
8			T	0,81 $\pm$ 0,03	18,82 $\pm$ 2,20	0,163 $\pm$ 0,040	0,389 $\pm$ 0,061 <sup>a</sup>	1,447 $\pm$ 0,258 <sup>a</sup>	4,203 $\pm$ 1,797	0,190 $\pm$ 0,025
			UV	0,80 $\pm$ 0,02	20,68 $\pm$ 3,40	0,160 $\pm$ 0,040	0,362 $\pm$ 0,051 <sup>ab</sup>	1,321 $\pm$ 0,328 <sup>ab</sup>	3,888 $\pm$ 1,677	0,196 $\pm$ 0,023
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,81 $\pm$ 0,02	18,88 $\pm$ 2,48	0,170 $\pm$ 0,087	0,348 $\pm$ 0,099 <sup>b</sup>	1,189 $\pm$ 0,340 <sup>b</sup>	4,137 $\pm$ 2,010	0,190 $\pm$ 0,024
18			T	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	20,39 $\pm$ 4,19	0,136 $\pm$ 0,042	0,330 $\pm$ 0,050 <sup>ab</sup>	1,533 $\pm$ 0,386	5,452 $\pm$ 2,722	0,192 $\pm$ 0,032
			UV	0,82 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	18,97 $\pm$ 2,58	0,125 $\pm$ 0,024	0,324 $\pm$ 0,038 <sup>a</sup>	1,618 $\pm$ 0,224	5,943 $\pm$ 1,821	0,181 $\pm$ 0,030
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	18,58 $\pm$ 4,04	0,155 $\pm$ 0,062	0,357 $\pm$ 0,073 <sup>ab</sup>	1,438 $\pm$ 0,377	4,715 $\pm$ 2,154	0,190 $\pm$ 0,028
			SH	0,79 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	19,82 $\pm$ 3,95	0,149 $\pm$ 0,036	0,362 $\pm$ 0,051 <sup>ab</sup>	1,494 $\pm$ 0,268	4,112 $\pm$ 1,923	0,213 $\pm$ 0,044
			UV+SH	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	19,53 $\pm$ 2,82	0,155 $\pm$ 0,026	0,368 $\pm$ 0,038 <sup>b</sup>	1,397 $\pm$ 0,204	3,990 $\pm$ 1,121	0,194 $\pm$ 0,025
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +SH	0,81 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	18,07 $\pm$ 3,72	0,155 $\pm$ 0,064	0,357 $\pm$ 0,069 <sup>ab</sup>	1,445 $\pm$ 0,413	4,664 $\pm$ 2,352	0,192 $\pm$ 0,024
21			T	0,81 $\pm$ 0,03	15,69 $\pm$ 3,99	0,177 $\pm$ 0,081	0,385 $\pm$ 0,094	1,337 $\pm$ 0,422	4,410 $\pm$ 2,680	0,189 $\pm$ 0,122
			UV	0,80 $\pm$ 0,04	15,95 $\pm$ 3,26	0,168 $\pm$ 0,084	0,373 $\pm$ 0,088	1,440 $\pm$ 0,498	4,858 $\pm$ 2,901	0,197 $\pm$ 0,182
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,78 $\pm$ 0,05	14,75 $\pm$ 2,57	0,200 $\pm$ 0,077	0,413 $\pm$ 0,091	1,193 $\pm$ 0,417	3,165 $\pm$ 2,149	0,217 $\pm$ 0,174
			SH	0,78 $\pm$ 0,05	16,29 $\pm$ 2,21	0,171 $\pm$ 0,053	0,401 $\pm$ 0,070	1,429 $\pm$ 0,312	3,564 $\pm$ 1,938	0,220 $\pm$ 0,192
			UV+SH	0,80 $\pm$ 0,03	15,71 $\pm$ 3,08	0,170 $\pm$ 0,051	0,378 $\pm$ 0,065	1,315 $\pm$ 0,367	3,974 $\pm$ 2,285	0,197 $\pm$ 0,114
			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +SH	0,79 $\pm$ 0,05	15,26 $\pm$ 2,75	0,184 $\pm$ 0,099	0,398 $\pm$ 0,118	1,341 $\pm$ 0,377	3,881 $\pm$ 2,222	0,211 $\pm$ 0,235

**Fv/Fm** est le rendement quantique maximal du PSII; **Sm** représente l'énergie nécessaire pour fermer tous les centres réactionnels; **Vk** représente la fluorescence variable relative à 300  $\mu$ s; **Vk/Vj** est un indicateur de l'inactivation du complexe d'oxydation de l'eau (OEC, oxygen evolving complex); **(1-Vj)/Vj** indique la performance de la conversion de l'énergie captée en flux de transport d'électrons; **PI<sub>abs</sub>** est un indice de performance pour la conservation de l'énergie des photons absorbés par le PSII à la réduction des accepteurs d'électrons entre les deux photosystèmes; **DI<sub>0</sub>/ABS** représente le rendement quantique du flux d'énergie dissipée sous forme de chaleur au niveau des antennes collectrices du PSII.

d'élicitation. Des mesures effectuées 24h après les traitements d'élicitation, n'ont pas non plus permis de mettre en évidence une perturbation des paramètres d'échanges gazeux (données non montrées).

En condition de stress hydrique, les valeurs de photosynthèse étaient 23% et 28% plus faibles qu'en condition d'irrigation optimale pour les plantes des variétés 'Habanero' et 'BJ' respectivement.

La conductance stomatique  $g_{sw}$  a montré des valeurs faibles y compris en condition témoin (Campos et al., 2014; Goto et al., 2021). Malgré ces conditions, une diminution de 40% de  $g_{sw}$  en conditions de stress hydrique a été mise en évidence. Les traitements d'élicitation n'ont pas eu d'effet sur  $g_{sw}$ , quelle que soit la date.

### 3.1.1.2 Cinétique de fluorescence de la chlorophylle

Lorsqu'ils ont été mesurés aux jours 18 et 21, après l'application des traitements d'élicitation, les paramètres liés à la fluorescence de la chlorophylle n'ont pas été impactés par ces traitements (Tableau 13). Les valeurs moyennes du rapport  $F_v/F_m$ , correspondant au rendement photochimique maximal du PSII n'étaient pas substantiellement différentes de celle du témoin. Ces valeurs sont comprises entre 0,80 et 0,82 pour les plantes de la variété 'BJ' et ,77 et 0,82 ; elles témoignent d'un bon fonctionnement du PSII (Björkman and Demmig, 1987).

Pour 'Habanero' au jour 8, 1h après les traitements d'élicitation effectués,  $S_m$ , le paramètre de dégâts représentant l'énergie nécessaire pour fermer tous les centres réactionnels, a été diminué à la suite du traitement  $H_2O_2$  par rapport aux plantes témoins. Cette diminution par rapport au témoin n'a plus été observée par la suite.

## 3.1.2 Les traitements d'élicitation influencent peu le métabolisme primaire dans les feuilles

### 3.1.2.1 En condition d'arrosage non limitant

En bonne condition hydrique, les traitements d'élicitation n'ont pas eu d'effet sur les 55 métabolites primaires étudiés. Des ACP réalisées sur les fruits des variétés 'Habanero' (Figure 51) et 'BJ' expliquent 70,9 et 60,8 %, respectivement, de la variabilité totale, et ne permettent néanmoins pas de distinguer les modalités de traitement. Les variables utilisées dans l'explication de la variabilité sont toutes constitutives de l'axe 1 (valeur positive), voire de l'axe 2 pour 'BJ', ce qui indique qu'elles sont toutes liées et varient de la même manière. Aucune des cinq composantes suivantes n'a permis de distinguer les modalités.

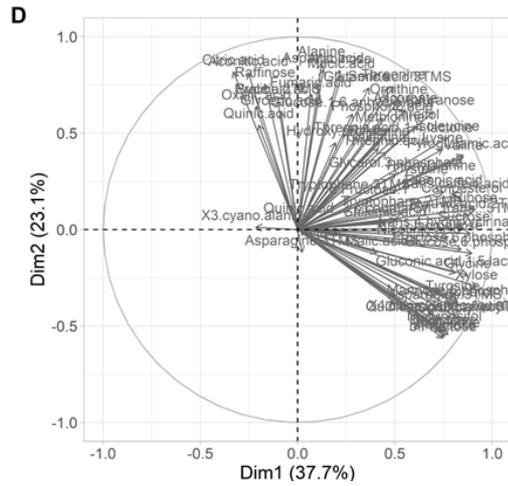
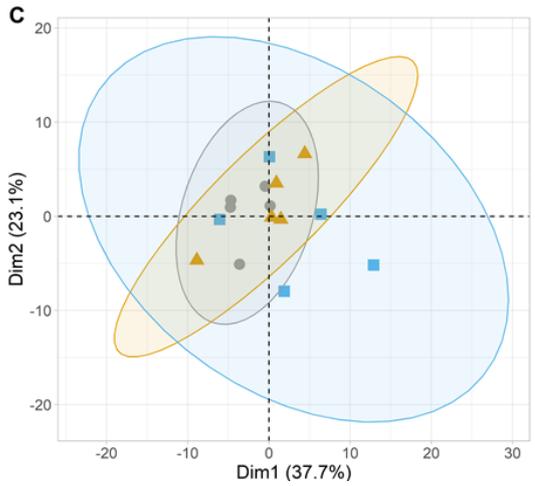
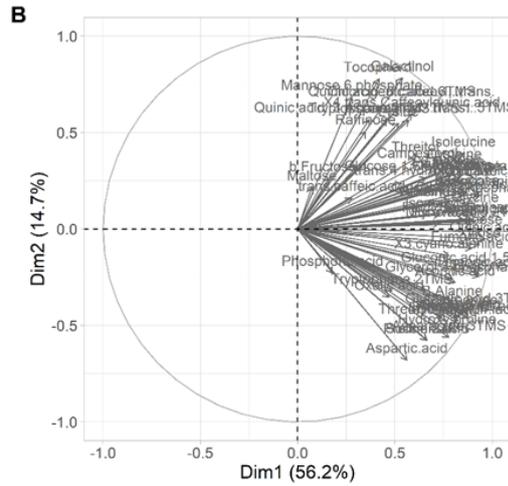
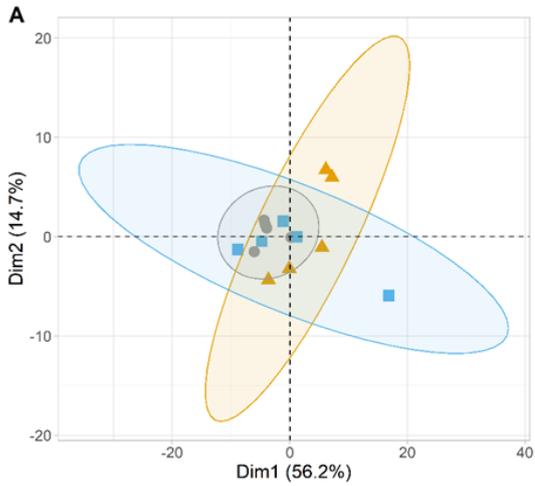


Figure 51. Effets des traitements UV-C et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sur le métabolisme primaire dans les feuilles. Graphes des individus pour la variété 'Habanero' (A) et la variété BJ (C). Graphes des variables d'une analyse en composantes principales des 59 métabolites primaires identifiés et analysés par GC-MS dans les feuilles de la variété 'Habanero' (B) et celles de la variété BJ (D). Les surfaces brutes des pics ont été normalisées par la masse sèche de l'échantillon, puis centrées sur la moyenne et divisées par l'écart-type de chaque variable (n=5). T : témoin ; UV : plantes traitées aux UV- C ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : plantes traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Modalités  
 ● T ▲ UV ■ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

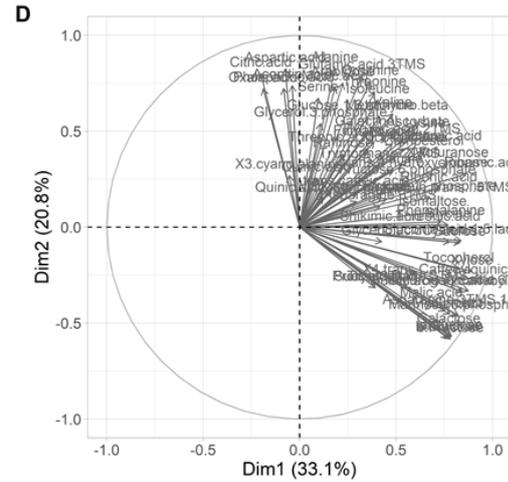
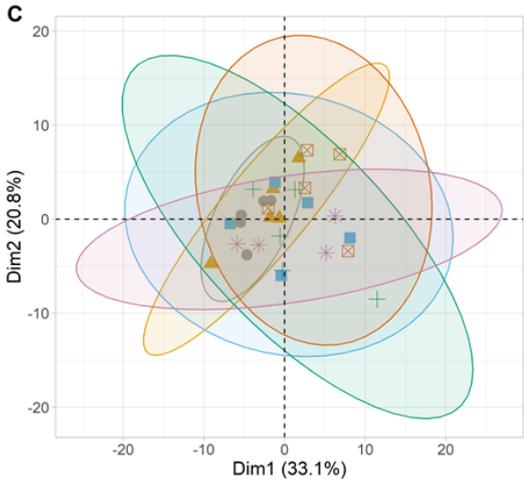
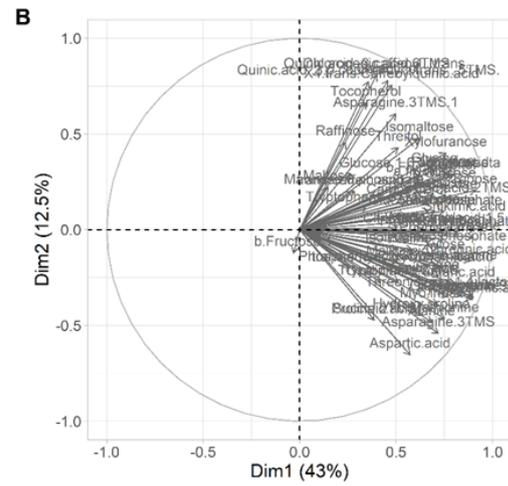
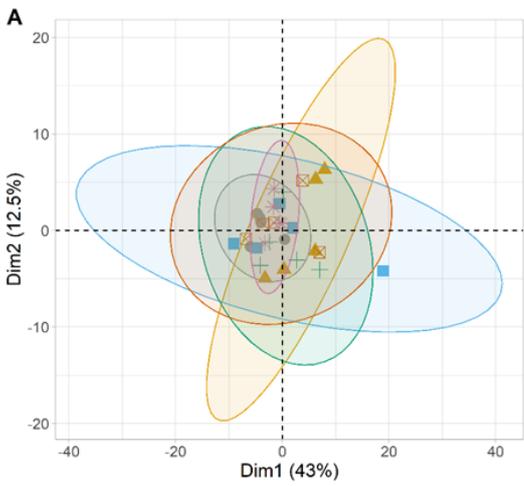


Figure 52. Effets des traitements UV-C et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en condition d'arrosage non limitant et en condition de stress hydrique, sur les 55 métabolites primaires annotés, dans les feuilles. Graphes des individus de la variété 'Habanero' (A) et de la variété BJ (C). Graphes des variables d'une analyse en composantes principales des 59 métabolites primaires identifiés et analysés par GC-MS dans les feuilles de la variété 'Habanero' (B) et dans la variété BJ (D). Les surfaces brutes des pics ont été normalisées par la masse sèche de l'échantillon, puis centrées sur la moyenne et divisées par l'écart-type de chaque variable (n=5). T, témoin ; UV, plantes traitées aux UV-C ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plantes traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; SH, plantes ayant subi le stress hydrique ; UV+SH, plantes ayant été traitées aux UV-C avant le stress hydrique ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plantes ayant été traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant le stress hydrique

Modalités  
 ● T ▲ UV ■ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 ■ SH ■ UV+SH ■ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+SH

### 3.1.2.1 En condition d'arrosage limitant

Pour les plantes soumises à un déficit hydrique, aucune séparation des modalités par les 55 métabolites primaires annotés n'a été observée (Figure 52). En revanche, certains métabolites, ont été suraccumulés en condition de stress hydrique, comme la proline par exemple, un osmolyte compatible connu pour s'accumuler en conditions de stress hydrique (Szabados and Savouré, 2010a) ; sa concentration est 8 fois supérieure en condition de stress hydrique dans les plantes de la variété 'Habanero', et 2 fois supérieure chez 'BJ'. Les concentrations d'autres acides aminés jouant un rôle dans la tolérance aux stress abiotiques, comme la thréonine, la valine et l'isoleucine ont également été augmentées d'un facteur 2 par le stress hydrique dans les feuilles des plantes de la variété 'Habanero' par rapport aux plantes du témoin (Joshi et al., 2010). En revanche, aucun des traitements d'élicitation effectués en prévention du stress hydrique n'a permis de modifier la réponse des plantes à ce stress.

L'effet du stress hydrique n'est que très peu visible sur les métabolites analysés. Il convient de se demander si l'impact du stress hydrique a été suffisant. Cependant, le potentiel hydrique de base mesuré pour les deux variétés était significativement plus faible lors du stress hydrique (Figure 53). Pour la variété 'Habanero', le potentiel hydrique de base était significativement plus faible en condition de stress hydrique, mais n'a pas décliné au cours du temps (- 6 bar), tandis que pour 'BJ', le potentiel hydrique de base a atteint - 9 bars au 21<sup>ème</sup> jour du stress hydrique.

Le potentiel hydrique foliaire pour les plantes de la variété 'Habanero' a montré peu de différences au 15<sup>ème</sup> jour après le début du stress hydrique (Figure 54). Les plantes ayant été traitées aux UV-C semblent avoir un potentiel hydrique foliaire plus élevé que les plantes témoins, indiquant un meilleur état hydrique des plantes traitées. Les trois modalités ayant subi le stress hydrique semblent avoir des valeurs plus faibles, sans différences significatives. L'arrosage ayant été réduit de manière progressive, les plantes semblent s'être acclimatées au stress hydrique, empêchant une brusque déshydratation.

Pour la variété 'BJ', la différence de potentiel hydrique foliaire entre le groupe des plantes n'ayant pas subi le stress hydrique et les plantes ayant subi un dessèchement était plus prononcée. Les valeurs de potentiel hydrique foliaire des plantes avec arrosage réduit étaient comprises entre -7,3 et -6,5 bars, tandis que les plantes non soumises à un stress hydrique ont montré des valeurs comprises entre -3,9 et -2,8 bars. Les valeurs de potentiel hydrique étaient plutôt élevées (Campos et al., 2014), indiquant un stress léger. Ces valeurs peuvent être expliquées par la fermeture stomatique, qui garantit l'état hydrique.

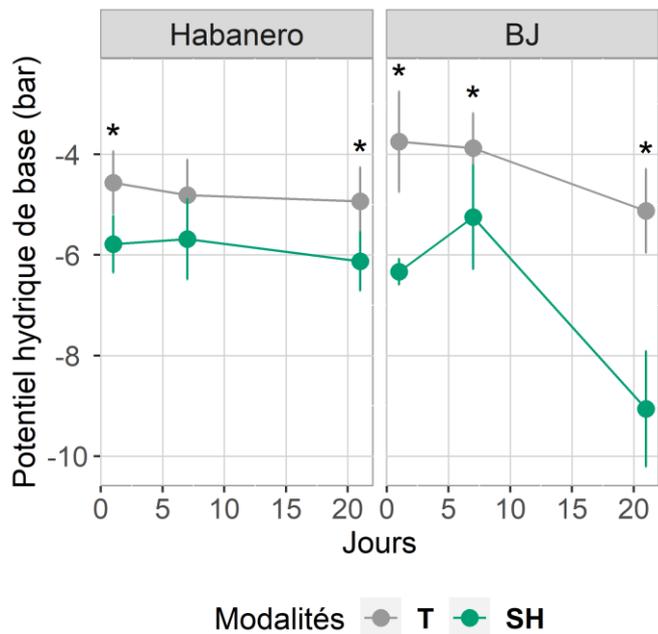


Figure 53. Potentiel hydrique de base en bars, en fonction des jours après le début du stress hydrique sur les plantes issues des conditions témoin bien arrosé (T) et stress hydrique (SH) pour les deux variétés. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=8). Les étoiles indiquent une différence statistique significative entre les moyennes par date de mesure selon le test de Kruskal-Wallis, à un seuil de 5%.

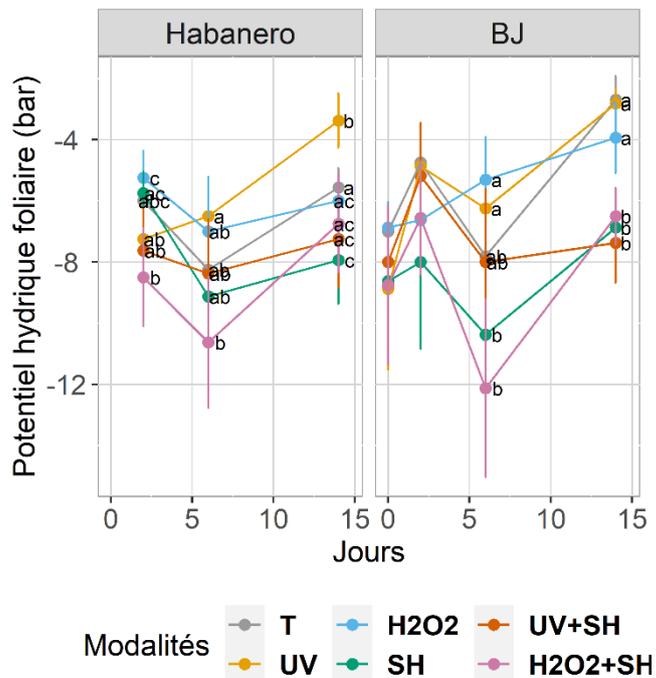


Figure 54. Potentiel hydrique foliaire en bars, en fonction des jours après le début du stress hydrique, pour les deux variétés. Les barres d'erreur représentent les écarts-types (n=8). Les lettres indiquent une différence statistique significative entre les moyennes par date de mesure selon le test de Kruskal-Wallis, au seuil de 5%. T, témoin ; UV, plantes traitées aux UV-C ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plantes traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; SH, plantes ayant subi le stress hydrique ; UV+SH, plantes ayant été traitées aux UV-C avant le stress hydrique ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, plantes ayant été traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avant le stress hydrique.

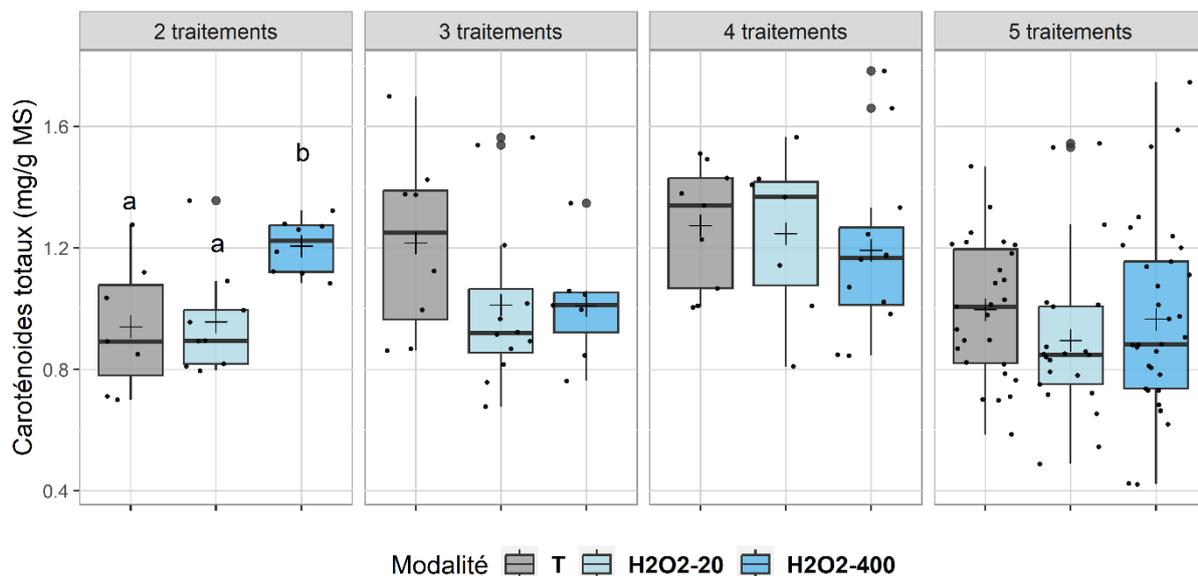


Figure 55. Effet du traitement par pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la concentration en caroténoïdes totaux analysés au spectrophotomètre, en fonction du nombre de traitements reçus par les fruits de la variété 'Habanero'. Les points représentent les individus (n≥7), et les lettres indiquent une différence statistique significative entre les moyennes selon le test de Kruskal-Wallis, au seuil de 5%.

## 3.2 Les teneurs en caroténoïdes présentent peu de variations significatives en fonction des traitements appliqués

### 3.2.1 En conditions d'arrosage non limitant

Les concentrations en caroténoïdes dans les fruits de la variété 'Habanero' ont été peu influencées par les traitements répétés au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 55). Seule la modalité de traitement à 400 mM répétée deux fois a entraîné une augmentation significative des caroténoïdes totaux de 33% dans les fruits par rapport aux fruits témoins, atteignant une concentration de 1,2 mg.g MS<sup>-1</sup>. On observe également une diminution de la variabilité lorsque les plants ont été traités au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM deux fois. Lorsque les traitements ont été répétés dans le temps, cette augmentation n'a plus été retrouvée, traduisant peut-être une accoutumance des plantes aux traitements. La variabilité reste plus faible pour les plantes ayant été traitées trois fois au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM, mais elle augmente ensuite avec la répétition des traitements. Cette diminution de la variabilité pourrait être liée à une synchronisation de la maturation des fruits sur la plante par les traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et donc l'obtention de stades de fruits plus homogènes.

Concernant les concentrations en caroténoïdes totaux des fruits issus des plantes de la variété 'BJ', aucune différence significative par rapport aux fruits témoins n'a été observée, quel que soit le nombre de traitements (Figure 56). La variabilité est de 35% en moyenne pour les fruits témoins, et de 12 à 23% pour la modalité contenant les fruits traités au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM. La variabilité semble également réduite avec ce traitement.

L'effet positif d'un double traitement par pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les concentrations en caroténoïdes dans les fruits de la variété 'Habanero', n'a pas été retrouvé lors de l'utilisation de ce traitement une seconde fois. En effet, la modalité H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 mM) n'a pas entraîné d'augmentation de la concentration en caroténoïdes par rapport aux fruits témoins (figure 57). Il convient de noter que les concentrations sont deux fois moins importantes dans les fruits, toutes modalités confondues, lors du 2<sup>ème</sup> essai, effectué entre janvier et juin 21 par rapport aux fruits de l'essai effectué entre octobre et mars 2021.

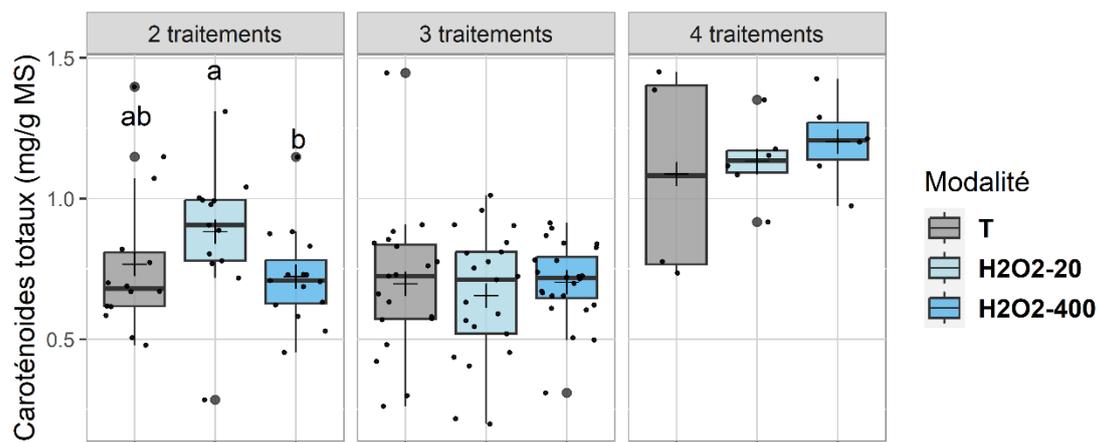


Figure 56. Effet du traitement par pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la concentration en caroténoïdes totaux analysés au spectrophotomètre, en fonction du nombre de traitements reçus par les fruits de la variété 'BJ'. Les points représentent les individus (n≥5), et les lettres indiquent une différence statistique significative entre les moyennes selon le test de Kruskal-Wallis, au seuil de 5%.

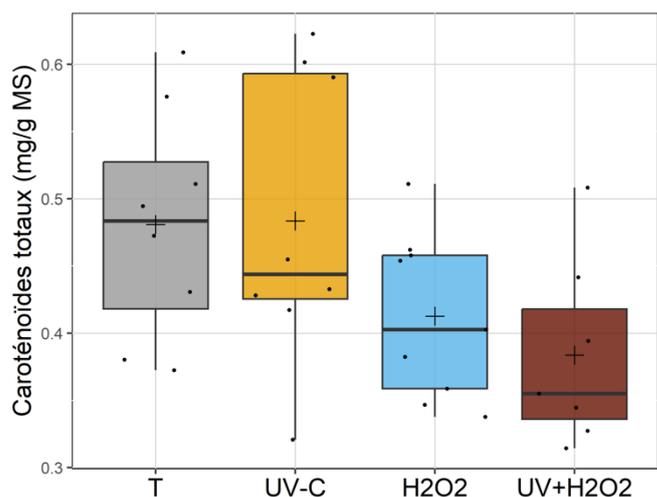


Figure 57. Effet des traitements d'élicitation aux UV-C, au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et à une combinaison des deux, sur la concentration en caroténoïdes totaux analysés au spectrophotomètre, dans les fruits de la variété 'Habanero'. Les points représentent les individus (n=8), et les moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis, à un seuil de 5% (p = 0,09).

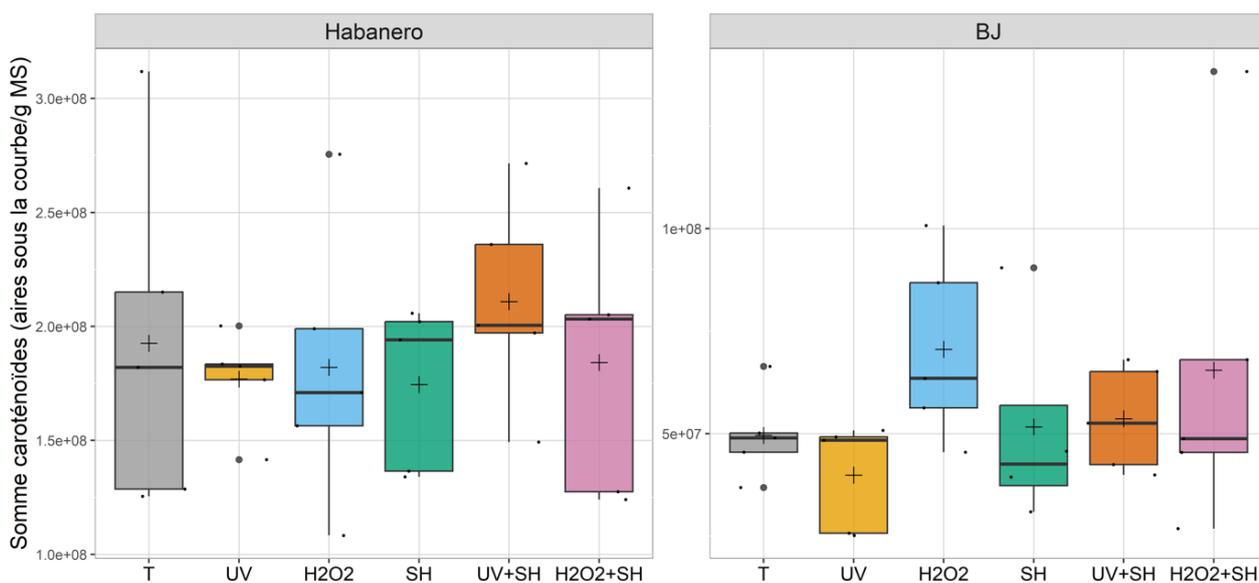


Figure 58. Effet des traitements d'élicitation associés ou non à un stress hydrique, sur la concentration en caroténoïdes totaux analysés en LC-MS, dans les fruits des deux variétés. Les caroténoïdes analysés individuellement suivent les mêmes tendances que la concentration globale. Les points représentent les individus (n=4), et les moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% (p = 0,41 et 0,88 pour 'Habanero' et 'BJ' respectivement).

Ni le traitement des plantes aux UV-C ni la combinaison des traitements UV-C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'ont permis d'augmenter les concentrations en caroténoïdes dans les fruits de la variété 'Habanero' (figure 57). Il n'y a pas non plus de modifications significatives de la concentration en caroténoïdes par les traitements aux UV-C ou par pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM pour les deux variétés (figure 58, modalités T, UV et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Malgré l'absence de significativité, une tendance à l'augmentation des caroténoïdes à la suite d'une pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 mM, deux traitements) a été observée pour la variété 'BJ'. Cette augmentation était globale et a été retrouvée pour tous les caroténoïdes identifiés et dosés par UPLC, sans qu'elle ne soit significative.

### 3.2.2 En condition de stress hydrique

En condition de stress hydrique, les concentrations en caroténoïdes (/g de MS) totaux ou individuels quantifiés relativement en UPLC n'ont pas été augmentées, dans les fruits des deux variétés (Figure 58). Le stress hydrique seul a provoqué une perte d'eau dans les fruits, entraînant une concentration des métabolites, mais une fois le résultat rapporté à la matière sèche, les concentrations n'apparaissent plus modifiées. Lorsqu'un pré-traitement aux UV-C a été effectué avant le stress hydrique, la concentration en caroténoïdes semble augmenter (de manière non significative), pour la variété 'Habanero' seulement.

## 3.3 Les teneurs en capsaïcinoïdes dans les fruits des deux variétés étudiées ne sont pas influencées par les traitements d'élicitation dans ces conditions

### 3.3.1 En condition d'arrosage non limitant

Les fruits issus des plantes traitées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cinq et trois fois (pour 'Habanero' et 'BJ' respectivement) n'ont pas montré des concentrations en capsaïcinoïdes totaux différentes des fruits issus des plantes témoins (Figure 59). Les concentrations en capsaïcine, DHC et NDHC n'ont pas été modifiées non plus. La variabilité reste importante au sein de chaque modalité.

Lors d'une autre expérimentation avec traitement aux UV-C, par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM (deux fois) ou par une combinaison de ces deux éliciteurs, aucune modalité n'est apparue efficace pour augmenter les concentrations en capsaïcine, DHC ou NDHC (Figure 60).

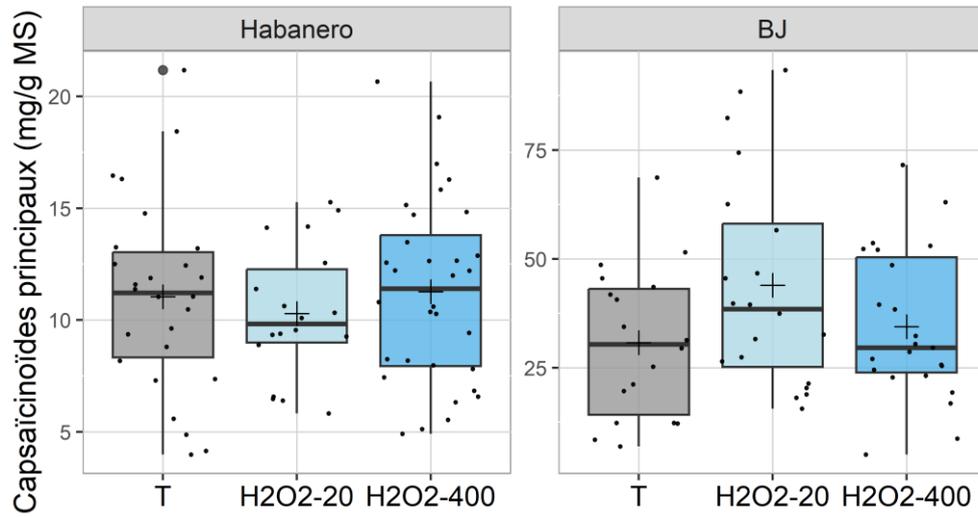


Figure 59. Effet du traitement par pulvérisation de  $H_2O_2$  sur la concentration en capsaïcinoïdes totaux analysés en LC-MS, pour les fruits ayant reçus 5 traitements ('Habanero') ou 3 traitements ('BJ'). Les points représentent les individus ( $n>15$ ), et les moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis, à un seuil de 5% ( $p = 0,69$  et  $0,27$  pour 'Habanero' et 'BJ' respectivement)

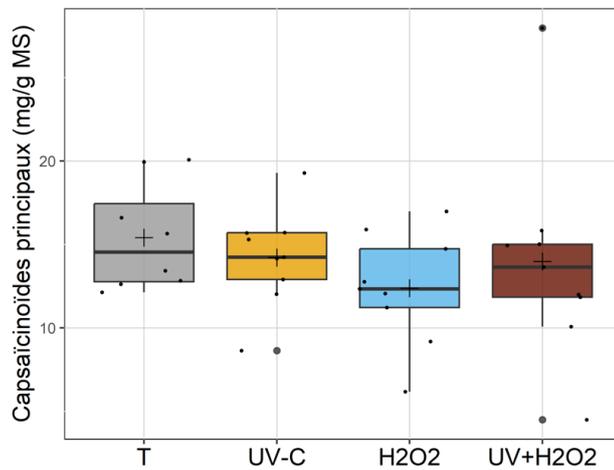


Figure 60. Effet des traitements d'élicitation aux UV-C, au  $H_2O_2$  et à une combinaison des deux, sur la concentration en capsaïcinoïdes principaux (capsaïcine, DHC et NDHC) identifiés et quantifiés en LC-MS, dans les fruits de la variété 'Habanero'. Les points représentent les individus ( $n=8$ ), et les moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5%, ni pour la concentration totale ( $p = 0,39$ ) ni pour les capsaïcinoïdes analysés individuellement.

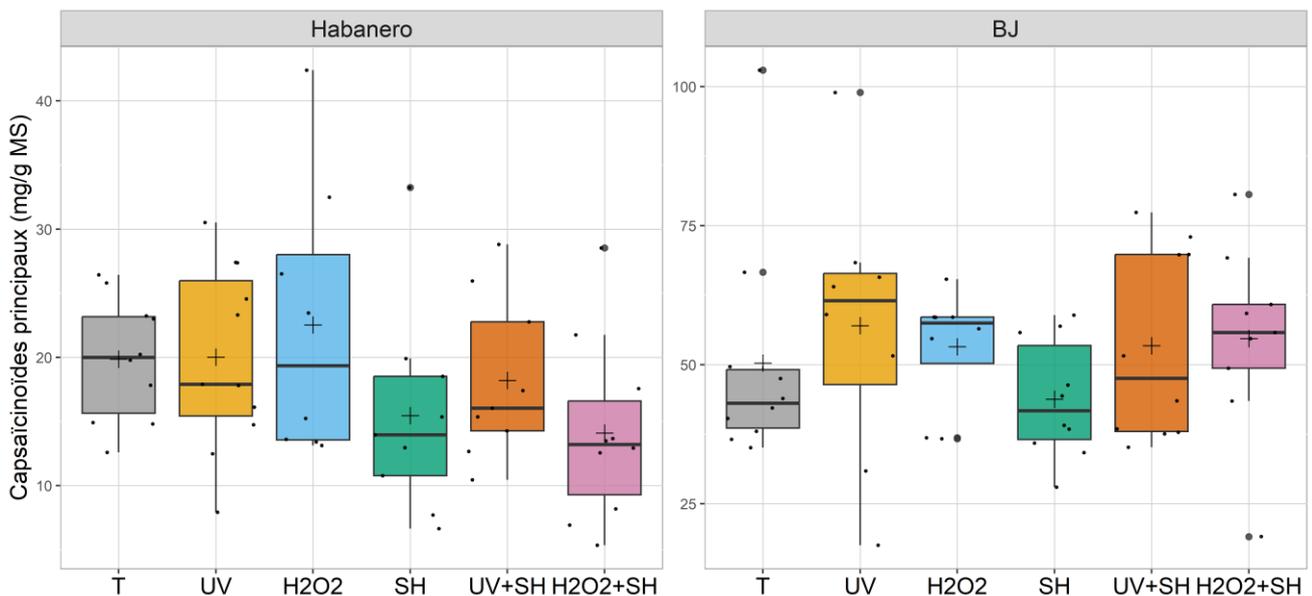


Figure 61. Effet des traitements d'élicitation, associés ou non à un stress hydrique, sur la concentration en capsaïcinoïdes principaux (capsaïcine, DHC et NDHC) identifiés et quantifiés en LC-MS, dans les fruits des deux variétés 'Habanero' et 'BJ'. Les capsaïcinoïdes analysés individuellement suivent les mêmes tendances que la concentration globale. Les points représentent les individus ( $n=9$ ), et les moyennes ne sont pas significativement différentes selon le test de Kruskal-Wallis au seuil de 5% ( $p = 0,16$  et  $0,43$  pour 'Habanero' et 'BJ', respectivement).

### 3.3.2 En conditions de stress hydrique

Dans les fruits des variétés 'Habanero' et 'BJ', aucun effet significatif des traitements en conditions de stress hydrique n'a été remarqué malgré une tendance à la diminution pour la variété 'Habanero' et à l'augmentation pour 'BJ' en condition de stress hydrique (Figure 61). Le traitement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associé à un stress hydrique n'a pas entraîné de modifications des concentrations en capsaïcinoïdes, à la différence de ce qui a été observé précédemment sur les fruits de *C. chinense* 'Helios' en culture au Mexique (Brevet FR3100955, 2021).

## 4 Discussion

### 4.1 Les traitements par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'engendrent pas d'augmentation des métabolites secondaires

Le traitement des plantes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 20 mM n'a eu aucun effet sur les concentrations en métabolites secondaires dans les fruits. Des doses faibles (inférieures à 20 mM) de traitements par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été rapportées pour être efficaces en tant que biostimulants avec un effet positif sur la croissance (Hasan et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2017). Le traitement des plantes par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM en deux applications a entraîné une augmentation des caroténoïdes totaux dans les fruits de la variété 'Habanero' lors du premier essai, tandis qu'une tendance pour les fruits issus de la variété 'BJ' lors d'un autre essai a été révélée. Néanmoins, après plusieurs répétitions de ce traitement, aucun effet répétable sur la concentration en caroténoïdes n'a été observé.

La pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les feuilles semblait être un levier d'augmentation des caroténoïdes en raison du pouvoir antioxydant des caroténoïdes à la suite d'un stress oxydatif (Bouvier et al., 1998), mais, avec peu d'explications, les résultats n'ont pas été reproduits dans nos conditions. Les niveaux de lumière utilisés dans cette étude n'étaient pas précisés mais ils pourraient être impliqués dans la différence de réponse. En effet, la lumière étant un élément déterminant pour la physiologie de la plante, le stress oxydant ne s'exprime pas de la même façon en fonction des conditions de lumière (Campa et al., 2017).



## 4.2 La variabilité génétique ainsi que l'environnement entraînent des réponses différentes

Le traitement d'élicitation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, couplé ou non à un stress hydrique, a permis d'augmenter les concentrations en capsaïcinoïdes dans le piment *C. chinense* cv. 'Helios' (Brevet FR3100955, 2021), qui fait partie du type variétal Habanero. Or, les expérimentations ici ont été réalisées sur une autre variété, appartenant également au type variétal Habanero, ainsi que sur 'BJ', provenant d'une autre espèce. Les différences observées entre les résultats attendus et les résultats obtenus peuvent être dus à la variabilité génétique des variétés choisies. En effet, d'après Fanciullino et al. (2006), le potentiel d'accumulation des caroténoïdes dans les agrumes est fortement lié au fond génétique. La variété 'Helios' pourrait posséder une teneur en capsaïcinoïdes plus faibles, entraînant un potentiel d'accumulation plus important.

Les différences peuvent également provenir de l'environnement. Les résultats cités ont été obtenus dans des conditions différentes de celles de notre essai. En effet, les plantes utilisées dans le brevet (FR3100955, 2021) avaient été cultivées au Mexique, à une altitude d'environ 1800 m, où la concentration en CO<sub>2</sub> était d'environ 300 ppm, tandis que l'altitude à Avignon est de 20 m pour une concentration en CO<sub>2</sub> de 420 ppm. Aucune information sur la quantité de lumière n'était disponible, mais il est fort probable que le rayonnement était plus important que dans nos serres, étant donné l'altitude. Le rayonnement était compris entre 200 et 400  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  lors de la saison hivernale et entre 300 et 700  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  lors de la saison estivale. Ces valeurs peuvent être considérées comme faibles, entraînant peu la machinerie photosynthétique (Campos et al., 2014). La concentration en CO<sub>2</sub> plus faible, notamment, a pu entraîner une ouverture stomatique plus importante, permettant une meilleure pénétration du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à travers les stomates. Le fond génétique mais également l'environnement ont entraîné un potentiel d'accumulation des caroténoïdes différent chez les agrumes de différentes variétés dans différents lieux de culture (Fanciullino and Gautier, 2014).

## 4.3 Les traitements UV-C n'ont pas été efficaces pour augmenter les composés d'intérêt

Les UV-C n'ont pas entraîné d'effets significatifs et répétables sur les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes des fruits issus des plantes traitées. D'après Urban et al. (2016), les UV-C pourraient être à l'origine d'un stress photo-oxydatif, notamment par un effet inhibiteur, voire



de dommages sur les enzymes du cycle de Calvin. Dans nos essais, la dose appliquée était une dose hormétique, non délétère, qui ne doit donc pas être considérée comme stressante. A des doses hormétiques, les UV-C peuvent être utilisés pour la désinfection des fruits et légumes, influencer la physiologie des organes récoltés en retardant la sénescence ou encore stimuler le métabolisme secondaire, connu pour jouer un rôle dans la défense des plantes (Poiroux-Gonord et al., 2010; Urban et al., 2016b). Un des premiers précurseurs des capsaïcinoïdes étant la phénylalanine, l'induction de l'activité de la PAL pourrait être liée à la concentration finale en capsaïcinoïdes. Une application d'UV-C sur des fraises à une dose hormétique a augmenté l'activité de la PAL dans les fruits, conduisant à une augmentation de la teneur en composés phénoliques (Nigro et al., 2000). En revanche, les UV-C n'ont pas augmenté les niveaux de transcrits de la PAL chez la tomate, alors qu'ils ont stimulé les gènes d'autres enzymes importantes de la voie de biosynthèse des composés phénoliques (Tiecher et al., 2013). Urban et al. (2016) ont émis l'hypothèse que les UV-C induisaient très probablement l'activité de la PAL au niveau *post*-transcriptionnel. La PAL est impliquée dans les premières étapes de la voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes, mais les UV-C employés dans cette étude n'ont pas permis d'augmenter ces concentrations. En revanche, l'augmentation des flavonoïdes est attendue à la suite d'un traitement aux UV-C (Rivera-Pastrana et al., 2014). L'augmentation de l'activité de la PAL rapportée par les études précédentes, pourrait avoir un effet sur les autres nombreux intermédiaires possibles, comme par exemple les flavonoïdes.

La littérature concernant l'effet des UV-C sur les plantes en croissance afin d'augmenter les caroténoïdes dans les fruits est peu abondante. Néanmoins, de nombreuses études ont été réalisées sur les fruits en *post*-récolte (piment, tomate, fraise) (Vicente et al., 2005; Andrade Cuvi et al., 2011; Rodoni et al., 2012; Pataro et al., 2015; Pinheiro et al., 2015; Pérez-Ambrocio et al., 2018; Forges et al., 2020). Les teneurs en caroténoïdes dans les fruits ont été influencées positivement ou négativement par les traitements UV-C. Ainsi, dans la tomate, les concentrations en lycopène et particulièrement de l'isomère Z du lycopène ont été augmentées lorsque les tomates ont été exposées à des doses de 1, 3 et 12,2 kJ.m<sup>-2</sup> correspondant à des durées d'exposition de 1, 3 et 12h respectivement (Bravo et al., 2013). En revanche, Jagadeesh et al. (2011), rapportent une diminution des concentrations en lycopène, avec une dose de 3.7 kJ.m<sup>-2</sup>, tandis que Tiecher et al. (2013), montrent, après traitement UV-C à une dose de 3,7 kJ.m<sup>-2</sup>, une accumulation des transcrits PSY, ZDS, LCY-B et CRTRB sans accumulation de lycopène,  $\beta$ -carotène and phytoène dans les tomates. La comparaison des effets est délicate en raison de la dose, qui est un paramètre important à prendre en compte.



#### 4.4 La saisonnalité a entraîné des différences de concentrations en caroténoïdes

Les concentrations en caroténoïdes retrouvés dans les fruits cultivés au cours de deux saisons différentes, ont été augmentées d'environ deux fois lorsque les plantes ont été cultivées entre les mois d'octobre et mars (période hivernale), par rapport aux plantes cultivées de janvier à juin (période printanière). Les concentrations totales en caroténoïdes ont été quantifiées dans la gamme de concentrations rapportée par d'autres auteurs pour les piments (Deepa et al., 2007; Zhuang et al., 2012). Cela signifierait que la synthèse des caroténoïdes a été stimulée en condition de température et lumière relativement faibles, correspondant aux caractéristiques d'une période hivernale.

Poiroux-Gonord et al. (2013) ont observé une accumulation de caroténoïdes lorsqu'un déficit de ressources a été provoqué au moment de l'ontogénèse : un stress au moment de la division cellulaire a été favorable à une surproduction de chromoplastes, entraînant ensuite une augmentation de la concentration en caroténoïdes. L'accumulation de caroténoïdes dans les fruits dépend de la taille et du nombre de chromoplastes, se déterminant au moment de l'ontogénèse (Fanciullino et al., 2014). Les conditions de faibles lumière et température ont pu constituer un stress qui n'a pas permis de produire suffisamment de ressources, entraînant une augmentation de la production de chromoplastes et donc l'accumulation de caroténoïdes.

Le moment de l'ontogénèse semble à privilégier pour effectuer les traitements d'élicitation dans le but d'augmenter la production de caroténoïdes. Néanmoins, une atteinte drastique sur le rendement est inévitable à ce stade (Poiroux-Gonord et al., 2013), et en raison du caractère industriel de la demande, il n'était pas envisageable de réduire autant le rendement. Il reste aussi à établir si le moment propice à l'élicitation des caroténoïdes serait le même pour éliciter les concentrations en capsaïcinoïdes.

#### 4.5 La variabilité au sein des modalités reste importante

Les moyennes des différents paramètres ne sont pas toujours statistiquement différentes, en raison de la grande variabilité des données. L'échantillonnage est une cause possible de cette variabilité. En effet, les fruits analysés à l'échelle individuelle entraînent des différences entre les fruits, notamment à cause du stade de maturité, difficile à contrôler. L'échantillonnage a été amélioré au cours de la thèse, en considérant un ensemble de fruits comme un échantillon plutôt qu'un fruit unique. Les fruits ont été regroupés par plante, selon leur stade de maturité identique pour ne former qu'un échantillon. Kirschbaum-Titze et al. (2002) en analysant les différents piments provenant d'une même plante, ont mis en évidence une large gamme de valeurs de teneurs en capsaïcinoïdes dans les



différents fruits. Le rapport entre les différents capsaïcinoïdes était conservé, mais la compétition avec la synthèse d'autres métabolites ou les conditions environnementales ont pu jouer un rôle dans la synthèse et l'accumulation des capsaïcinoïdes. La variabilité entre les fruits d'un individu est réduite, mais la variabilité entre individus est toujours présente.

Des différences de concentrations en capsaïcinoïdes existent également entre les fruits provenant de différentes localisations sur la plante. D'après Estrada et al. (2002), au même stade de maturation, les fruits provenant du haut de la plante de *C. annuum* 'Padron' peuvent contenir 1,4 fois plus de capsaïcinoïdes que les fruits provenant du bas de la plante. Ce paramètre n'ayant pas été pris en compte au moment de l'échantillonnage, l'hétérogénéité des fruits de la même plante a été augmentée, pouvant masquer des effets entre les fruits de même étage de différentes plantes.

Malgré l'optimisation de la prise de masse au préalable des dosages expérimentaux, la masse faible prélevée (30 mg MF) pourrait ne pas être représentative de l'échantillon total, et engendrer de la variabilité supplémentaire.

Le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 400 mM semble diminuer la variabilité. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> semble exercer un effet de synchronisation sur la maturité. Un effet similaire a été rapporté sur raisins après pulvérisation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 300 mM sur la grappe, où la concentration en sucres solubles était plus importante après traitement (Guo et al., 2019). En conditions de production, les traitements au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourraient être utilisés, en répétant l'application deux fois mais en espaçant par la suite la répétition des traitements pour éviter un effet d'accoutumance des plantes. Cette utilisation en champ pourrait permettre de synchroniser les récoltes en augmentant la vitesse de maturation, qui permettrait, en réduisant le temps des cycles, d'également gagner du temps.

## 4.6 Peu de changements ont été observés en condition de stress hydrique

### 4.6.1 Sur la machinerie photosynthétique

Les différences de potentiel hydrique foliaire et de base entre les variétés 'BJ' et 'Habanero' ont montré une tolérance au stress hydrique différente entre ces deux variétés. Cette différence est également visible sur le paramètre Fv/Fm, indicateur du rendement quantique maximal de la photochimie du PSII (Govindjee, 1995) et utilisé comme indicateur de stress au niveau de la chaîne de transport des électrons (Stirbet et al., 2018). Chez les plantes supérieures, en conditions optimales, il se situe généralement entre 0,78 et 0,84 (Björkman and Demmig, 1987). Pour la variété 'BJ' au jour 18 (soit 6 jours après les derniers traitements, et 5 jours après la diminution de l'arrosage), une légère



différence, bien que non significative, a été observée entre les plantes bien arrosées et celles ayant subi le stress hydrique. Elle traduit un ajustement normal par l'augmentation de l'évacuation de l'énergie absorbée en excès sous forme de flux de chaleur (cycle des xanthophylles *alias non photochemical quenching*) (Demmig-Adams and Adams, 1996). L'assimilation nette de CO<sub>2</sub> confirme également cette observation (diminution en condition de stress hydrique), ainsi que la conductance stomatique, qui suit la même tendance malgré une différence non significative.

Les valeurs de photosynthèse légèrement plus faibles observées dans les plantes soumises à un stress hydrique par rapport aux plantes bien arrosées pourraient être principalement dues à la fermeture des stomates, plutôt qu'à des dommages au PSII (Liang et al. 2011). Néanmoins, la diminution de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> pourrait aussi être expliquée par des limitations non stomatiques, comme par exemple une diminution de l'activité de la Rubisco (Sarabi et al., 2019; Pan et al., 2021). L'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et la conductance stomatique des plantes, demeurent faibles même en conditions témoin. Ces faibles valeurs pourraient être dues au stade phénologique des plantes, entraînant une diminution de ces paramètres lorsque l'âge des plantes augmente (Bond, 2000).

La théorie de la coordination indique que tous les paramètres liés aux principales limitations de la photosynthèse varient parallèlement (Damour et al., 2010). Ces faibles valeurs pourraient également être dues aux conditions de lumière faible, qui ont déterminé une capacité photosynthétique faible, et, au regard de cette théorie, une conductance stomatique maximale faible également.

Les traitements d'élicitation, ainsi que le stress hydrique dans ces conditions ont eu peu d'effets sur la chaîne de transfert des électrons, et par conséquent n'ont pas eu d'effets sur les paramètres de fluorescence chlorophyllienne. Néanmoins, ces paramètres sont fortement modifiés lors d'une combinaison de stress (Robinson et al., 1983; Lu, 2003), ce qui suggère que les traitements d'élicitation n'ont pas été perçus comme des stress. D'après les mesures de potentiel hydrique, le stress hydrique a été effectif, en particulier pour la variété 'BJ'. Une acclimatation a alors pu se produire, la diminution de l'arrosage ayant comporté des phases de réhydratations partielles.

Les dommages du stress hydrique sur la machinerie photosynthétique ne sont pas forcément irréversibles. En effet, d'après Campos et al. (2014), il est possible de retrouver des paramètres équivalents aux plantes témoins après une réhydratation survenant après une phase de 10 jours de stress hydrique sur des plantes de *C. annuum* cv. Cannon. La récupération dépend de la sévérité du stress hydrique. Elle peut être rapide et complète si le stress a été modéré, et lente, progressive et incomplète lorsque le stress a été sévère (Flexas et al., 2006).



#### 4.6.2 Sur la concentration en métabolites d'intérêt

L'effet du stress hydrique sur la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes reste controversé. En effet, en fonction de l'intensité du stress, de sa durée, ou encore du stade des fruits au moment de l'application, l'impact peut être positif ou négatif (Poiroux-Gonord et al., 2010). Dans les organes photosynthétiques, le stress hydrique entraîne une diminution de la conductance stomatique, ainsi qu'une inhibition du cycle de Calvin. Un excès d'énergie peut induire la formation d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) au niveau des antennes collectrices de lumière et la synthèse d'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) au niveau du PSI (Apel and Hirt, 2004). Les caroténoïdes agissent alors en éliminant l'énergie en excès *via* le cycle des xanthophylles (Robert et al., 2004). Ces mécanismes pourraient être activés chez les jeunes fruits, encore photosynthétiques, néanmoins, chez les fruits en cours de maturation, où les chromoplastes deviennent prédominants, la réponse au stress hydrique pourrait impliquer d'autres mécanismes. Le stress hydrique, en entraînant la fermeture des stomates et une diminution de la photosynthèse des feuilles, pourrait influencer négativement la disponibilité en précurseurs dans les fruits. Cependant, la disponibilité en carbone dans les organes puits est généralement améliorée en condition de stress hydrique (Muller et al., 2011). L'expansion des organes, en tant que principal puits de carbone est privilégiée, au détriment de la croissance liée à la photosynthèse.

## 5 Conclusion

L'objectif était de tester des traitements d'élicitation et d'identifier les modalités d'application efficaces pour augmenter les concentrations en caroténoïdes d'une part, en capsäïcinoïdes d'autre part, ou des deux concentrations, dans les fruits. Aucun traitement utilisé dans cette étude n'a permis d'atteindre ce but, contredisant des études antérieures. La différence des conditions environnementales entre les essais utilisés comme référence et les essais réalisés semble être une des explications. Le facteur génétique est également à prendre en considération étant donné les réponses différentes des différentes variétés aux conditions environnementales et aux traitements d'élicitation.

De plus, le modèle expérimental consistant à appliquer les traitements d'élicitation sur des plantes de plusieurs mois afin d'étudier les fruits entraîne une variabilité importante et difficile à maîtriser. Aucun traitement efficace n'ayant été identifié, la réponse des plantes aux traitements d'élicitation n'a pas pu être caractérisée. Cependant, afin de répondre à la question de l'effet des traitements d'élicitation sur le métabolome des plantes, un autre dispositif expérimental plus simple dans des conditions encore plus contrôlées a été envisagé afin de mieux appréhender l'effet des traitements sur la plante.



# Chapitre 5

---

Priming for drought resistance?  
UV-C flashes induced no growth  
or metabolic cost but triggered  
pipecolate accumulation and  
dehydration avoidance in  
*Capsicum chinense*



## 1 Avant-propos

Suite à la faible réponse du métabolisme des fruits aux traitements d'élicitation, des traitements UV-C ont été utilisés pour augmenter la tolérance aux stress abiotiques pouvant survenir pendant la culture. En effet, d'après Urban et al. (2022), les flashes d'UV-C, par des mécanismes encore inconnus, peuvent également induire une résistance aux stress abiotiques, probablement via le déclenchement de la voie du SA. Jusqu'à présent, peu d'études ont été réalisées sur l'effet des traitements UV-C contre un stress hydrique. La recherche de solutions de traitements d'élicitation pour une meilleure tolérance au stress hydrique représente un enjeu majeur dans un contexte actuel de ressources en eau limitées.

Il est fortement envisageable que les résultats obtenus sur une espèce du genre *Capsicum* soient extrapolables à d'autres cultures d'importance économique, notamment d'autres genres ou espèces de la famille des Solanaceae, comme la tomate par exemple (*Solanum lycopersicum*).

D'après Okunlola et al. (2017), les trois espèces du genre *Capsicum* confrontées au stress hydrique sont plus sensibles au déficit hydrique au stade végétatif qu'au stade reproducteur, ce qui nous a conduit à établir un dispositif expérimental visant à pré-traiter aux UV-C de jeunes plants de *C. chinense* au stade végétatif avant d'appliquer une stress hydrique progressif par cessation de l'arrosage. L'objectif était d'évaluer l'éventuel effet protecteur des UV-C et de déterminer, par des approches analytiques non ciblées et multiciblées, les changements du métabolisme primaire et secondaire du piment après traitement UV-C, suivi ou non par un stress hydrique. Ce chapitre a fait l'objet d'une soumission d'article dans la revue *The Plant Journal*, en avril 2023.



# Priming for drought resistance? UV-C flashes induced no growth or metabolic cost but triggered pipecolate accumulation and dehydration avoidance in *Capsicum chinense*

Coline Pons, Lindsay Mas, Olivier Chevallier, Jawad Aarouf, Laurent Urban, Raphaël Lugan

## Affiliations

<sup>1</sup>UPRI/ERIT PSII, Avignon University, Avignon, FR

<sup>2</sup>IMBE, Aix Marseille Univ, Avignon Univ, CNRS, IRD, Avignon, FR

<sup>3</sup>DARI, Plateforme 3A, Avignon University, Avignon, FR

<sup>4</sup>INRAE PACA, Plantes et Systèmes de cultures Horticoles, Avignon, FR

<sup>5</sup>ID4FEED, Annecy, FR

<sup>6</sup>Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA

## Keywords

Abiotic stress, water stress, UV-C light, elicitation, fingerprinting, metabolomics, acclimation.

## Summary

Ultraviolet radiations are increasingly studied as elicitor of plant defense in order to cope with biotic and abiotic stresses. The biological responses to these stimuli can be either beneficial or detrimental and are not yet fully understood. We treated pepper plants with UV-C flashes (1 kJ m<sup>-2</sup>, 2 seconds, 254 nm) three times during one week, before imposing a progressive drought stress for two weeks. In the absence of drought, plants treated with UV-C showed identical height, leaf number, water content and stomatal conductance than control plants. Analysis of leaf metabolic fingerprints covering large portions of central and secondary metabolism also revealed a very limited impact of the UV-C treatment on the metabolome, including however the accumulation of pipecolate. In contrast, when subjected to drought, plants previously treated with UV-C showed enhanced water retention in leaves and significant changes in the metabolome. Further investigation of the metabolic responses revealed that the variations of the major water stress markers were significantly mitigated by the UV-C pretreatment. Overall, the results suggest that the UV-C treatments induced a priming, based on the activation of systemic defense effectors and the absence of harmful symptoms, resulting in partial but significant avoidance of dehydration and reduced drought metabolic consequences. This paves the way for agricultural applications to manage multiple stresses concurrently and to study the specific mechanisms at work in UVC-primed plants.



## 2 Introduction

Plants evolve in an ever-changing environment where physical, chemical and biological variables exert selection forces on their protective mechanisms. The co-occurrence of multiple stresses, such as heat and pest attacks, or drought and high radiation for example, as well as the contingent challenges of distinct stresses, *e.g.* the osmotic imbalance caused by freezing, hypersalinity and drought, have led to adaptive responses with both specific and overlapping dimensions. Multiple stressors thus affect organisms synergistically or antagonistically (Piggott et al., 2015b), depending on the process of acclimation, defined as the ability of an organism to adjust to short-term environmental changes, by constant modulation of its transcriptome, proteome and metabolome (Kleine et al., 2021). Acclimation to multiple stresses induces cross-resistance if an environmental stimulation initiates resistance to another (Jansen et al., 2019), which allows to consider stimulating the resistance to a particular environmental constraint by manipulating others. The physiological consequences of ultraviolet (UV) radiations combined with other biotic or abiotic stresses have been particularly investigated, with the prospect of developing UV treatments enhancing plant resistance.

UV-A (400-315 nm) and UV-B (315-280 nm) are naturally occurring in plant environments while UV-C (280-100 nm) are filtered by the ozone layer. The effect of UV-B radiations, more energetic than UV-A, have been studied extensively. Exposure to UV-B provokes hormonal changes in plants, most notably the accumulation of the defense hormone salicylic acid (SA) (Vanhaelewyn et al., 2016; Meyer et al., 2021). This observation has prompted numerous studies using UV-B stimulation that successfully increased plant resistance to biotrophic and necrotrophic fungi, sap sucking and chewing arthropods (Demkura and Ballaré, 2012; Mewis et al., 2012; Vandenbussche et al., 2018; McLay et al., 2020). The protection conferred by UV treatments was early established to be related to ROS-controlled plant responses, such as the repression of genes involved in photosynthesis and the transcriptional activation of pathogenesis related defense genes (PR-1), the latter depending on the SA pathway (Brederode et al., 1991; Surplus et al., 1998). In addition to the accumulation of SA following UV-B irradiation (Mannucci et al., 2020; Escobar-Bravo et al., 2019; Mewis et al., 2012), the increase of jasmonates following UV-B treatment was also documented and proved to participate in UV-B-induced herbivore resistance (Demkura et al., 2010; Qi et al., 2018; Escobar-Bravo et al., 2019). An important limitation to the use of UV-B is the dose-dependent occurrence of undesirable side effects. The higher the fluence rate and the shorter the wavelengths, the more cellular harm, including direct genotoxic effects with DNA damage and oxidative stress in leaf tissue (Jenkins, 2009b). Acclimation to UV-B thus involves DNA repair mechanisms such as photolyases (Takeuchi et al., 2007), and the foliar accumulation of antioxidant and photoprotective compounds, particularly flavonoids, following



transcriptional activation of their biosynthetic pathways (Mewis et al., 2012; Vandebussche et al., 2018; Höll et al., 2019; Kaducová et al., 2019). At high doses of UV-B irradiation, cellular damages are also associated with jasmonic acid (JA) and ethylene production (A.-H.-Mackerness et al., 1999; Mewis et al., 2012). In addition to visible necrosis on leaves, high UV doses affect growth (Vandebussche et al., 2018; Höll et al., 2019) as well as morphology, by reducing leaf area, stomatal density or increasing trichome density while fitness impairments can be measured in terms of reduced inflorescence size and seeds number and weight (Lake et al., 2009). Lower doses of UV-B retain significant photomorphogenic actions which may be partially under the control of the UVR8 photoreceptor (Favory et al., 2009; O'Hara et al., 2019). These responses are considered to be strictly signalling in nature because they are not necessarily associated with signs of cellular stress, as measured by photosynthetic capacity and expression of stress marker genes (Jenkins, 2009b). However, they alter the balance of growth-related hormone profiles: auxins, brassinosteroids and gibberellins (Vanhaelewyn et al., 2016) and they also exhibit disruptions in terms of resource distributions between vegetative and reproductive organs, flowering and metabolic shifts (Hectors et al., 2007; Zioutopoulou et al., 2022; Brown and Jenkins, 2008).

UV-C treatments were for a long time used exclusively for their biocidal properties and confined to post-harvest surface disinfection (Stevens et al., 1990b). It was soon observed however that the biocidal effect was coupled with stimulation of defense mechanisms, even at low irradiation doses (Baka et al., 1999; Mercier et al., 2001). More energetic and less penetrating than UV-B (Urban et al., 2016a), UV-C light is thought to act partially on different targets (Meyer et al., 2021), but it nonetheless elicits similar responses, like local and systemic SA accumulation (Yalpani et al., 1994; Nawrath et al., 2002; Xu et al., 2019), SA-dependent acceleration of flowering (Martínez et al., 2004), changes in organs number and size (Darras et al., 2015), as well as metabolic stimulation of different classes of secondary compounds (Baka et al., 1999; Petit et al., 2009; Xu et al., 2017; Xu et al., 2019). Studies testing their pre-harvest plant defense stimulation properties are far less frequent than those on UV-B but have been increasing in recent years (Urban et al., 2018), with demonstrated efficacy in both lab and field conditions (Kunz et al., 2008; Xu et al., 2019; Ledermann et al., 2021). As with UV-B treatments, negative effects can occur using UV-C: oxidative stress, DNA fragmentation and morphological changes of cell apoptosis (Danon and Gallois, 1998; Zacchini and de Agazio, 2004; Kunz et al., 2008; Wituszyńska et al., 2015) and, at the macroscopic level, leaf yellowing with localized cell death, reduced leaf area and leaf curling (Stefanato et al., 2009; Mintoff et al., 2015). These points are critical since deleterious side effects dampen the desired elicitation of defense. Recent studies, however, indicate that protective effects against biotic stresses can be achieved without collateral damage, by using hormetic doses, ranging between 0.125 and 9 kJ m<sup>-2</sup> (Mintoff et al., 2015; Ouhibi et



al., 2015; Vàsquez et al., 2017; Forges et al., 2018; Sidibé et al., 2021). The duration of radiation exposures also seems to matter, with short exposures potentially improving pest resistance while longer exposures may instead reduce it (Escobar-Bravo et al., 2021). Hormetic doses in the way of flashes of a few seconds, even seem to have peculiar effects: they stimulate defenses without negative symptoms more efficiently than an identical dose delivered in 60 seconds, and they activate the UVR8 protein migration in the nucleus, which had never been related to UV-C treatments before (Aarrouf and Urban, 2020; Aarrouf et al., 2022).

UV treatments have also been tested in combination with abiotic stresses, especially drought, as both constraints are naturally associated. In a recent meta-analysis, Jansen et al. (2022) showed that UV radiations and drought stresses cause common damages and physiological responses, like reduced growth in plant biomass and height, altered stomatal conductance, oxidative stress and accumulation of proline and secondary metabolites. The data further indicate a cross-resistance, as a reduction of these symptoms are often observed when UV radiations and drought are combined. For instance, the absence of natural UV radiation worsened the drought-induced growth impairment of silver birch during a drought stress (Robson et al., 2015), while UV-B pretreatment protected barley plants undergoing subsequent drought by preserving the water content and reducing lipid peroxidation (Bandurska and Cieślak, 2013). Most of these studies focused primarily on UV-B and very little data are available regarding the impact of UV-C on drought tolerance.

In this work we tested the feasibility of increasing drought tolerance of chili plants (*Capsicum chinense*) using hormetic doses of UV-C flashes as a pretreatment. *Capsicum* species are considered rather sensitive to drought due to the large transpiration surface of their leaves (Alvino et al., 1994) and a reproductive cycle completed in periods affected by recurrent water stress episodes, especially in the Mediterranean basins and in India (Thomas et al., 2015). Various studies on *C. annum* and *C. chinense* stated that drought reduces photosynthesis mainly through the decrease of stomatal conductance, resulting in growth and developmental disturbance eventually affecting yields (Delfine et al., 2002; Zamljen et al., 2020; Ricardez-Miranda et al., 2021; Nieto-Garibay et al., 2022). In a recent investigation, (Rodríguez-Calzada et al. (2019) applied a moderate UV-B treatment to *C. annum* seedlings (1.14 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> for 14 days), prior to a drought stress. The UV-B treatment had no positive impact on the performance of the plants under drought condition, but instead exacerbated the declines in growth and flower production. On the contrary, the UV-C flashes pre-treatment we performed significantly mitigated the symptoms of drought stress, without causing any apparent stress in itself. We used untargeted mass spectrometry-based metabolomics, a powerful tool to map system-level physiological status (Patti et al., 2012), to evaluate the impact of UV-C flashes on leaves. Molecular networks established from combined GC-MS and LC-MS/MS data revealed that large



segments of the metabolome were covered by the analysis, providing an extended view of the endophenotype resulting from the treatments. The innocuity of the UV-C treatment alone was strongly supported by metabolic fingerprinting of the aerial parts. When drought stress was applied, however, the UV-C pre-treatment resulted in a distinct metabolic fingerprint, with a moderating effect on the main metabolic reconfigurations induced by drought stress. In addition, the identification of many metabolic markers highlighted the role of pipecolic acid in this UV-C priming.

### 3 Experimental procedures

#### 3.1 Plant material

'Habanero' (*C. annuum chinense*) seeds were purchased from a seed company (Ducrettet, Gaillard, France). Disinfected seeds (in sodium hypochlorite 2%) were sown in 40-cell plates containing potting soil composed of brown peat, blond peat, perlite and fertilizer (NPK 14-16-18 1.2 kg.m<sup>-3</sup> Light Mix, Biobizz, Spain) disinfected with boiling water. Four weeks old seedlings were repotted in 4L pots and randomly placed in two growth chambers. The temperature was set to 28°C day / 24°C night controlled by a thermoregulated air extractor, with a photoperiod of 16h day / 8h night. The HPS 600W lamp delivered an average of 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of photosynthetically active radiation (PAR) and the plants were moved within the chamber every two days to homogenize the amount of radiation received.

#### 3.2 UV-C treatments, water deprivation and plant sampling

Ten 8 weeks-old plants (day 0, phenological stage BBCH 18 108, Zadoks et al., 1974) were treated during the hemeroperiod with strong flashes of UV-C (1 kJ.m<sup>-2</sup> in 2 seconds, checked with a radiometer RM-12, Opsytec Dr. Gröbel, Germany) produced by UV-C fluorescent tubes (Philips, model TUV PL-L 95W HO/4P) and then placed in the dark for 1 hour; this treatment was applied three times in one week with a spacing of three days (on day 1, day 4 and day 7). Half of these plants were maintained under optimal growth conditions (samples named UV) and the other half were additionally deprived of water by stopping watering for a period of fourteen days, between day 7 and day 21 (samples named UV+DS). The drought stress was progressively manifested from day 14 onwards, with a reduction in watering of 80% over the two weeks, which corresponds to a severe stress (Okunlola et al., 2017). Six other plants were only deprived of water between day 7 and day 21 (samples named DS) and finally



six plants were not treated at all as a control. On day 21, (BBCH 22 202), plant apices including the last seven leaves were collected and immediately flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Substrate moisture was measured by weighing the pots on day 21 to estimate the intensity of drought stress applied to the plants: control, 46%; UV-C 52%; DS, 14% and UV-C+DS, 16%.

### 3.3 Measurement of physiological variables

Physiological measurements were carried out on whole plants before sampling (day 21) : collar to apex length (cm), stem diameter at the collar (mm), number of flower buds, number of leaves, fresh weight (FW) (g) and dry weight (DW) (g). The water content (WC) was determined according to the following formula:  $(FW - DW)/DW$ , which represents the water content in gram of water per gram of dry biomass. Stomatal conductance was measured at day 21 using a portable gas exchange system (LI-6800, LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

### 3.4 Metabolite extraction

Each sample was ground in liquid nitrogen (A-11 grinder, IKA, Germany) and then lyophilized (for 72h at 50 mTorr, Cosmos, Cryotec, France). Solvents were acquired from Honeywell (Charlotte, USA) and Thermo Fisher Scientific (Wilmington, USA), and ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Merck, Darmstadt, Germany). 20 mg of dry matter was extracted in 1.5 mL of methanol/water (80/20, v/v), for 5 minutes in an ultrasonic bath (40°C, 37 kHz, Elmasonic P., Elma, Germany). The samples were centrifuged for 5 minutes at 10,000 g then the supernatants containing the polar metabolites were recovered and filtered before analysis (0.22 µm PTFE filter, AIT, France).

### 3.5 Analytical procedures

All details can be found in Methods S1.

#### 3.5.1 Untargeted GC-EI-TOFMS analysis

GC-MS analysis was conducted according to the method of Roessner et al. (2001) adapted by Lacrampe et al. (2023). The raw data were first automatically deconvoluted by MSHub (Aksenov et al., 2021) and processed to create a molecular network with the Library Search/Molecular Networking GC workflow at GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Wang et al., 2016). The RT-m/z features were used for the



fingerprinting analysis. Then the annotation and quantification were improved by manual checking, leading to a list of the 94 metabolites (Table S1) used for physiological interpretation.

### 3.5.2 Untargeted UPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis

LC-MS/MS analysis was adapted from Le Boulch et al. (2022). First, a data-dependent acquisitions (DDA) was processed using MZMine v.2.53 (Katajamaa et al., 2006; Pluskal et al., 2010) and a molecular network was created for positive and negative ionization modes with the Feature-Based Molecular Networking (FBMN) workflow (Nothias et al., 2020) on GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Wang et al., 2016). This dataset provided features for fingerprinting analysis. Then, data were acquired in DIA (MS<sup>e</sup>) mode and were processed using Progenesis Q1 software (Waters, USA) to expand the pool of discriminating features by including low-intensity peaks that could have gone undetected in the DDA acquisitions. The most discriminating features in each pairwise comparison were identified at level 3 or 4 according to Schymanski et al. (2014) by manual verification of MS and MS<sup>e</sup> spectra in negative and positive modes and spectral comparison with in-house and spectral database (list in the Table S2).

### 3.5.3 Amino acids and phytohormones determination by UPLC-ESI-TQMS

The LC-MS/MS methods were adapted from Le Boulch et al., (2022 using Multiple Reactions Monitoring (MRM) methods described in Table S3.

## 3.6 Data analysis

Statistical analyses were performed on RStudio version RStudio 2022.12.0+353. Statistically significant differences were found with a Kruskal-Wallis test followed by a Conover *post-hoc* test with a Bonferroni adjustment, or a Mann and Whitney test when the modalities were compared pairwise. All means and standard deviations of the annotated features and p-values of statistical tests can be found in the Tables S7, S8 and S9. More details in Methods S2.

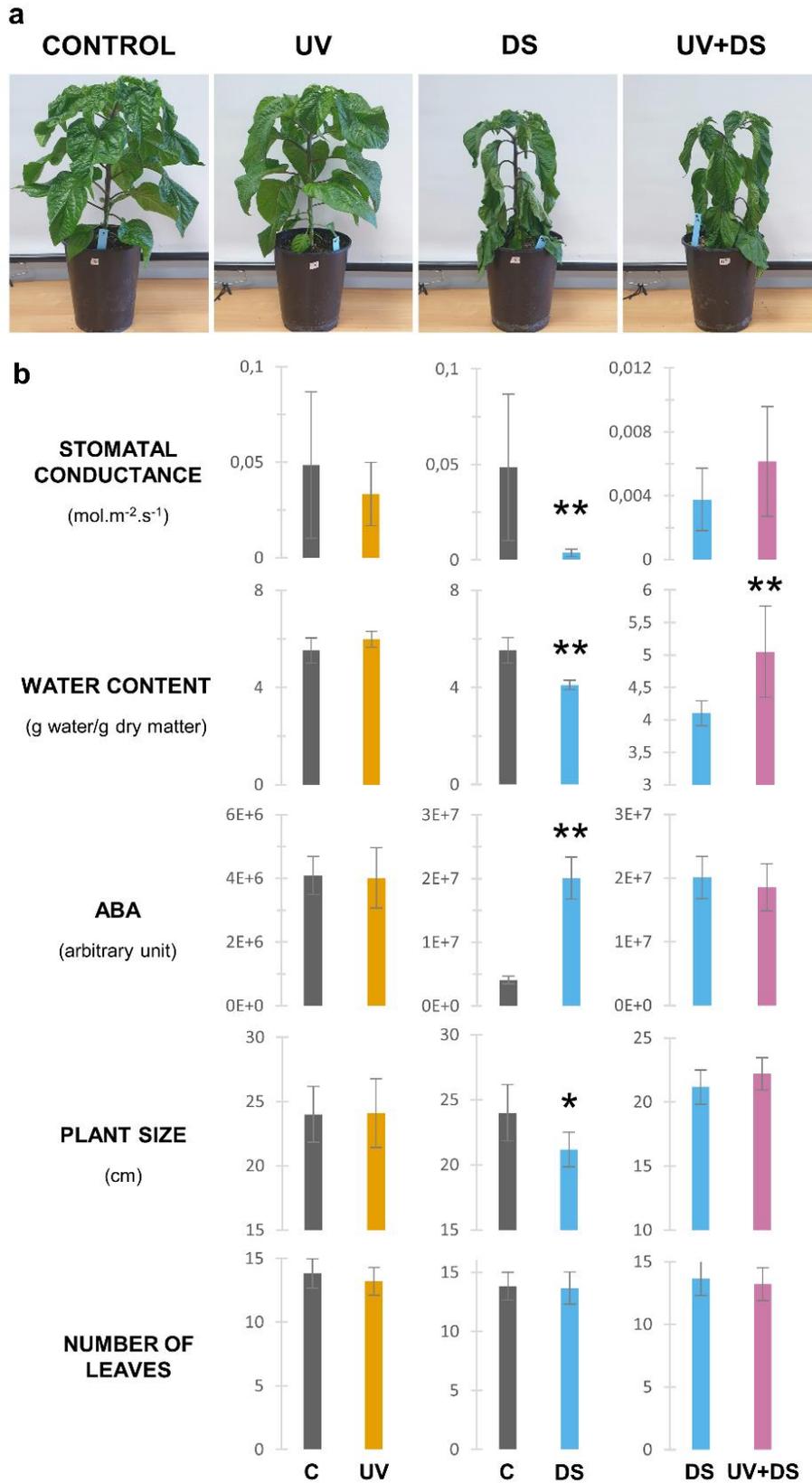


Figure 62. Effects of UV-C flashes, drought stress or a combination of both on the physiology of chili plants (*C. chinense*). UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants A. Plants appearance at the end of the treatments (12 weeks-old plants). B. Physiological parameters related to stress. Vertical bars represent the standard deviation. Mann Whitney test \*:  $p$ -value < 0.05; \*\*:  $p$ -value < 0.01.

## 4 Results

### 4.1 Effects of UV-C, drought or a combination of both on water status and growth parameters

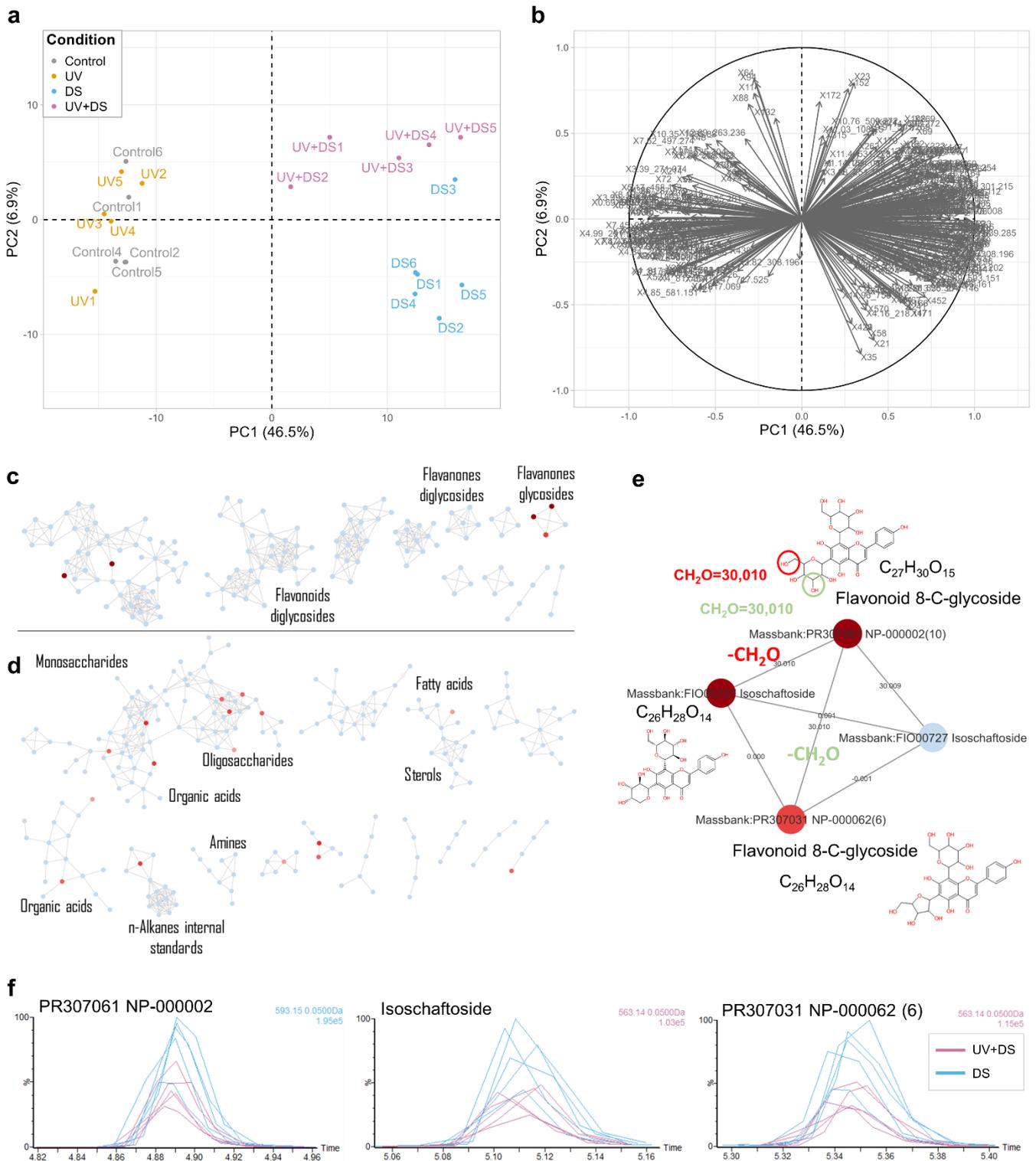
In the absence of drought, the UV-C treatment had no significant effect on either the appearance of the plants (Fig. 62 a.) or on any of the physiological parameters measured (Fig. 62 b.). The drought stress caused visible leaf wilting and significantly reduced plants size (-12%) but not the number of leaves. It also led to an increase in ABA and substantially reduced the stomatal conductance from 0.049 to 0.004 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and the water content from 5.5 to 4.1 grams of water per gram of dry weight.

Plants pretreated with UV-C prior to the application of drought stress did not show significant differences from drought-stressed plants in growth variables, ABA content and stomatal conductance, but presented obviously less wilting and significantly less leaf dehydration, with a water content decreased by only 9% compared to the controls, instead of 26% in the absence of UV-C pretreatment.

### 4.2 Effects of UV-C, drought or a combination of both on leaf metabolome

In a first approach, the leaf metabolic fingerprints were recovered by automatically processing the untargeted metabolomics data obtained by GC-MS, LC-ESI(+)-MS/MS and LC-ESI(-)-MS/MS to extract all the features discriminating at least two experimental conditions. The integration of complementary techniques enabled a broad coverage of the metabolome since GC-MS allows mostly the detection of primary, low mass and high polarity metabolites such as sugars, amino acids and organic acids, while reverse phase LC-MS/MS rather provides information on secondary metabolites of greater size and lower polarity. A total of 1502 features (372 in GC-MS, 640 and 490 respectively in positive and negative DDA LC-MS modes) were used in a PCA (Fig. 63 a and b). The scores plot showed a clear and significant effect of drought stress on the metabolome according to PC1, accounting for 46% of the dataset total variance. No effect of the UV-C treatment alone was observed on the first two components of the PCA, while in contrast the UV-C treatment had a significant impact on the metabolome of the plants subsequently subjected to drought stress, reflected by PC2 accounting for 6.4% of the dataset total variance.

Molecular network analysis provided insight into the molecular classes underlying the differences between conditions (Fig.63 c, Figures S1, S2 and S3). The molecular network constructed from GC-MS data was found to be the most developed, with 58% of the spectra involved in clusters of at least four



**Figure 63. Metabolic fingerprints of chili shoots (*C. chinense*) treated by UV-C flashes, drought stress or a combination of both:** **A.** Score plot and **B.** Loadings plot of a Principal Component Analysis of discriminant features (RT-*m/z*). Obtained by non-targeted GC-MS (372 features) and LC-MS/MS in positive and negative DDA modes (640 and 490 features respectively). **C. and D.** Feature-based molecular networking (GNPS) of LC-ESI(-)-MS and GC-MS data respectively. Nodes were connected if they had a cosine score > 0.7 and more than 6 matched peaks. 10 clusters contained at least 4 nodes. Discriminant nodes between UV+DS and DS are shown in red (Mann-Whitney *p*-values < 0.05). **E.** Node cluster containing flavanones glycosides: edge labels represent mass deltas between two linked nodes. A flavanoid 8-C-glycoside was identified from a node of the network annotated isoschaftoside which has a mass difference of 30.010 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). **F.** Extracted ion chromatograms of three isoschaftoside isomers with peak areas significantly larger in the DS condition compared with the UV+DS condition (Mann-Whitney test, *p*-value < 0.05), in accordance with MZmine. UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants.

nodes (Table S4). The main cluster included 82 nodes and consisted of spectra of mono- and disaccharides as well as organic acids. Five other groups were formed with more than 10 nodes, associated with spectra of fatty acids, sterols or amines. Molecular networks constructed from LC-MS/MS data showed proportionally less connectivity, with 33% of the spectra involved in clusters of at least 4 nodes in positive mode and 21% in negative mode (Tables S5 and S6). In addition, ten clusters of more than ten nodes were constructed (six in positive and four in negative mode), with only six clusters being associated with annotated molecular families, namely phenolamides and various flavonoid species. Thus, although the annotations were not comprehensive, it seems that the non-targeted analyses encompassed important segments of both primary and secondary metabolism.

### 4.3 Improvement of metabolites annotation and quantification by supervised data processing

To explain in functional terms the metabolites fluctuations associated with the different treatments, the molecules had to be properly labelled and quantified.

The accuracy of peak integration by the MZmine algorithm was tested in the LC-MS/MS data. The discriminating nature of the peaks annotated coumaroyl putrescine in positive mode and isochaftoside in negative mode, as reported by MZmine, was indeed confirmed by the direct inspection of the chromatograms (Fig. S2F and Fig. 63 e respectively). On the other hand, the discriminating nature of the peaks annotated scoparol in positive mode and apiin in negative mode was challenged by the direct inspection of the chromatograms (Figures S3D and S2C respectively), indicating that the deconvolution process by MZmine was not optimal.

Moreover, the features annotation was generally very poor. In GC-MS data, 89% of the features were annotated but with generally low relevance: while the MSHub and GNPS algorithms had correctly annotated phenylalanine and trans-4-hydroxyproline, many annotations were erroneous due to poor spectral similarity (citrulline, pipecolate or glycine), while important and expected compounds such as proline were not detected (Table S5). The annotations were thus completely revised by performing a new fully supervised data analysis, with manual validation of spectral similarities and retention indices. It is likely that the lack of use of retention indices as an identification criterion considerably reduced the relevance of the annotations made by GNPS. In untargeted LC-MS/MS data, only 9% of the features were annotated, so DIA were conducted on the samples in order to expand the pool of discriminating LC-MS/MS features by including low-intensity peaks that could have gone undetected by DDA. In this way, additional compounds were detected and annotated, including several flavonoids (Table S6). The identity of the discriminating features detected by MZmine was then improved by



supervised study of the MS and MS/MS mass spectra. Some compounds annotated by GNPS, such as isochaftoside isomers or scoparin were confirmed by manual annotation, others such as coumaroylputrescine and kaempferol 3-O-rutinoside were only manually annotated while apiin and scoparol were not confirmed at all (Table S6). The final dataset was a list of 94 compounds in GC-MS, of which 38 were annotated with a level 1 confidence, 45 with a level 2 and 11 with a level 3 (Table S1), as well as 21 compounds in LC-MS/MS, of which 13 annotated with a level 3 confidence and 8 with level 1 (Tables S2 and S3).

Quantification was finally improved for discriminating compounds, in both GC-MS and LC-MS/MS datasets, by selecting the most relevant Extracted Ions Chromatograms (EIC) to integrate and by manually supervising the integration of each peak. A PCA performed on these data (Figure S4) provided a quite similar result to the PCA performed on the features in Fig. 63, with a clear separation of the drought-stressed plants along axis 1 (64.3% of the total variance) and a visible effect of the UV-C treatment only in the drought-stressed plants, thereby confirming the robustness of this result. The UV+DS samples were even closer to the control samples on PC1 than DS samples, indicating that drought-induced metabolic shifts were partially alleviated by the UV-C pretreatment (Figure S4A).

#### 4.4 Metabolic markers of UV-C treatment

The OPLS-DA performed on annotated and discriminating metabolites (Fig. 64 a.) indicated very moderate changes in metabolite levels 14 days after the last UV-C flash treatment was applied. Indeed, while the model explained 89% of the difference between control and UV-C-treated samples (goodness of fit,  $R^2Y$ ), the share of total variance associated with the predictive component separating control and UV-C-treated samples ( $R^2X$ ) was only 13% and the quality of the model, as measured by its ability to correctly classify individuals, was only 38% (goodness of prediction,  $Q^2$ ).

Furthermore, only ten metabolites showed significantly altered levels by UV-C treatment in a Mann-Whitney test for pairwise comparisons of C vs UV; at threshold  $\alpha = 0.10$  (Table S7). The most notable were the lysine derivative pipecolic acid and the putative salicylic acid glucoside ester (SGE, Pastor et al., 2014, a compound presenting the spectral signature of a glycosylated hydroxybenzoate with a retention time different from the salicylic acid glucoside, SAG, Table S2), both involved in the systemic acquired resistance (SAR) (Návarová et al., 2012) (Lawton et al., 1995). Also of note were several osides: sucrose, myo-inositol-1-phosphate and U\_galactose as well as secondary metabolites such as a putative derivative of phytatetraen, a diterpene. The compounds that decreased after UV treatment included malonic acid and the putative scoparin, a flavonoid.

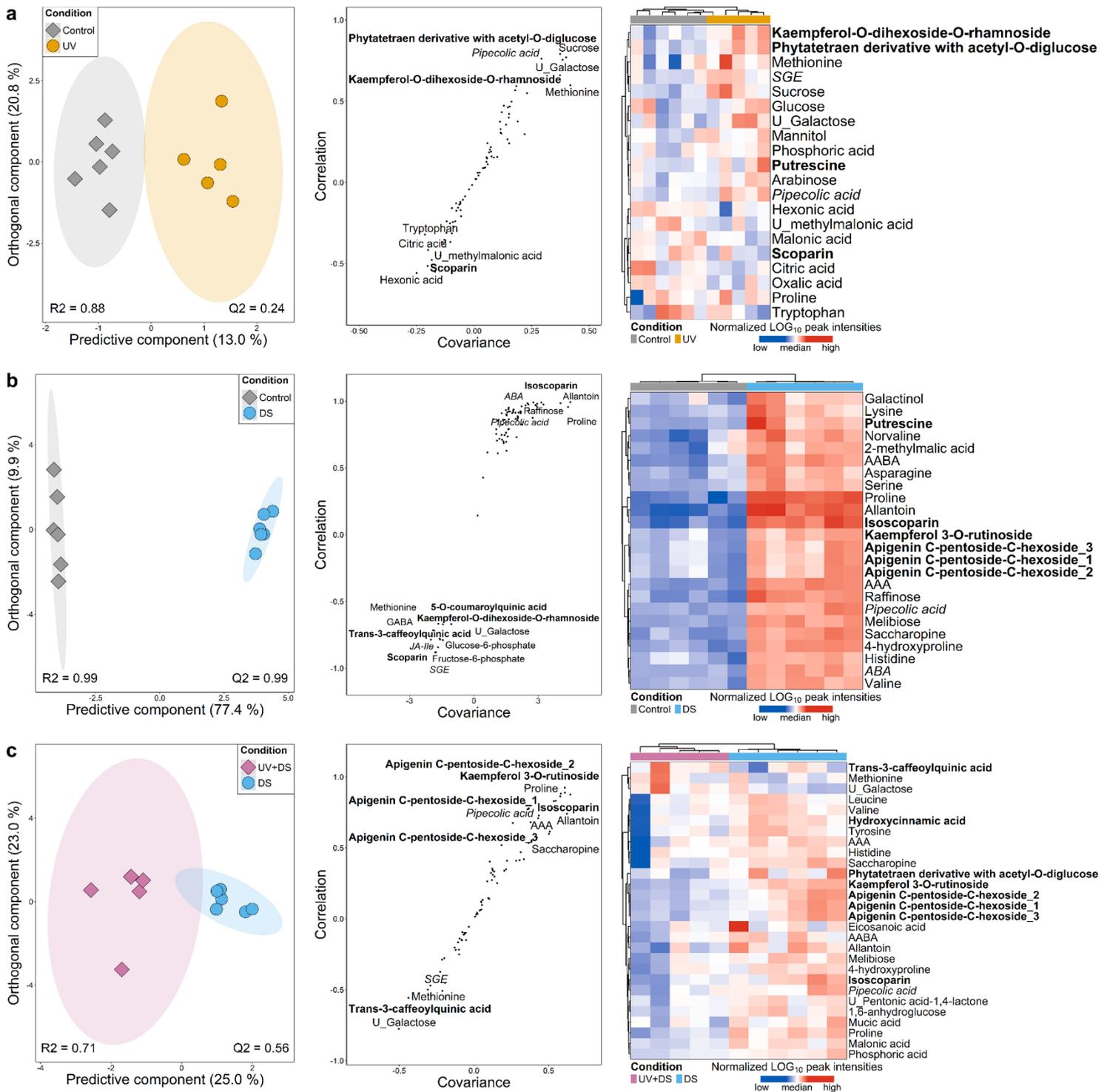


Figure 64. Metabolic changes induced by UV-C flashes, drought stress or a combination of both in chili shoots (*C. chinense*): OPLS-DA of annotated and discriminant metabolites, obtained by non-targeted GC-MS (67 compounds) and LC-MS/MS (20 compounds). On scores plots (left side), ellipses represent the distribution of each group with a 95% level of confidence; the names of the most contributing variables are displayed on S-plots (middle) and a HCA (right side) was performed on the variables with a VIP score > 1. UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants. A. Control vs UV. B. Control vs DS. C. UV+DS vs DS. Secondary metabolites are written in bold, phytohormones are written in *italics* and physiological variables are written in bold and *italics*.

#### 4.5 Metabolic markers of drought stress

The 14-day drought stress caused significant changes in the metabolome, reflected by the OPLS-DA model, which explained 99% of the difference between control and stressed samples ( $R^2Y$ ), with 79.5% of total variance associated with the predictive component separating control and stressed samples ( $R^2X$ ), and a model quality  $Q^2$  of 99% (Fig. 64 b.). A Mann-Whitney test for pairwise comparisons of C vs DS at threshold  $\alpha = 0.10$ , revealed 68 metabolites significantly accumulated and 16 whose content decreased following drought stress (Table S8).

Among the metabolites significantly accumulated were several markers expected during osmotic stress: proline, a well-known compatible solute (Szabados and Saviouré, 2010b) and 4-hydroxyproline, already reported as a strong marker of water stress in *Capsicum* (Florencio-Ortiz et al., 2018); galactinol and raffinose, alleviating abiotic stress (dos Santos and Vieira, 2020); allantoin, a purine catabolite involved in drought stress tolerance (Watanabe et al., 2010) and the branched-chain amino acids, valine, leucine, and isoleucine, documented osmotic stress markers (Huang and Jander, 2017), as well as norvaline and 2-methylmalate, which are structurally related and in the same metabolic pathways. More surprisingly, two metabolites involved in SAR were accumulated: SA and pipecolic acid, as well as the other lysine catabolites saccharopine and aminoadipic acid (AAA) (Arruda and Barreto, 2020). Several secondary metabolites also accumulated like hydroxycinnamic acid derivatives: trans-5-caffeoylquinic acid, coumaroylputrescine, caffeoylputrescin and flavonoids: isoscoparin, apigenin, 3 isomers of apigenin C-pentoside-C-hexoside and kaempferol 3-O-rutinoside. Further upstream in metabolic pathways, precursors of secondary metabolites have accumulated as well, such as quinic acid, tryptophan and tyrosine. On the other hand, central carbonaceous metabolites like glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate and U\_Galactose decreased after drought stress, as well as secondary metabolites such as 5-O-Coumaroylquinic acid, trans-ferulic acid and trans-3-caffeoylquinic acid, and the phytohormones JA-ile, the main active form of jasmonates (Fonseca et al., 2009) and the putative SGE.

#### 4.6 Metabolic markers of UV-C treatment in plants subsequently subjected to drought stress

Fairly large differences in metabolic profiles were found in drought-stressed plants pretreated or not with UV-C. The OPLS-DA model was found to be of moderate quality, explaining 71% of the difference between the DS and UV+DS samples ( $R^2Y$ ), with 26% of the total variance associated with



the predictive component separating the two modalities ( $R^2X$ ) and a model quality  $Q^2$  of 60% (Fig. 64 c.).

Of the 68 metabolites that were significantly increased under drought stress alone, 48 (70%) increased more moderately when pretreated with UV-C, including 21 (31%) significantly according to a Mann-Whitney test (Table S9). Strikingly, this was the case for most of the obvious drought stress markers: proline, 4-hydroxyproline, allantoin, melibiose, leucine, and valine, as well as the lysine catabolites pipecolic acid and AAA. Tyrosine and several secondary metabolites followed the same trend, like hydroxycinnamic acid, the isomers of apigenin C-pentoside-C-hexoside and the putative isoscoparin. Other compounds included phosphoric, malonic, pantothenic and mucic acids. Finally, of the 15 compounds whose content had significantly decreased under drought stress alone, 14 (93%) decreased more moderately when pretreated with UV-C, including 1 (7%) significantly according to a Mann-Whitney test (Table S9).

## 5 Discussion

### 5.1 UV-C flashes pretreatment mitigated the dehydration of aerial parts and its costly metabolic consequences.

Drought caused wilting and dehydration of the aerial parts of *C. chinense* (Fig. 62), reflecting a shift from water homeostasis, resulting in reduced growth and the establishment of metabolic profiles typical of drought stress (Fig. 63 b). The increase in ABA, the major hormone involved in adjustment to water stress (Daszkowska-Golec, 2016), and the resulting drop in stomatal conductance (Fig. 62), may explain the decrease in glucose-6-phosphate (Kempa et al., 2008), fructose-6-phosphate, succinate, and 2-oxoglutarate levels, and reflect a slowdown in central carbon metabolism. Proline accumulation was expected, since it is the main compatible solute accumulating under drought in *C. chinense* (Escalante-Magaña et al., 2019b). It is known to regulate osmotic potential and redox balance (Alvarez et al., 2022). The accumulation of galactinol and raffinose is also typically associated with acclimation to abiotic and biotic stresses. These compounds are thought to act positively in part because of their antioxidant properties (Nishizawa et al., 2008), as is allantoin, which was also reported to activate ABA metabolism (Brychkova et al., 2008; Watanabe et al., 2010; Watanabe et al., 2014). Other well-documented stress markers, such as 4-hydroxyproline and BCAAs, are currently not associated with protective roles on their own but may rather indirectly reflect metabolic adaptations favorable to acclimation. 4-hydroxyproline originates from stress-induced cell wall hydroxyproline-rich protein

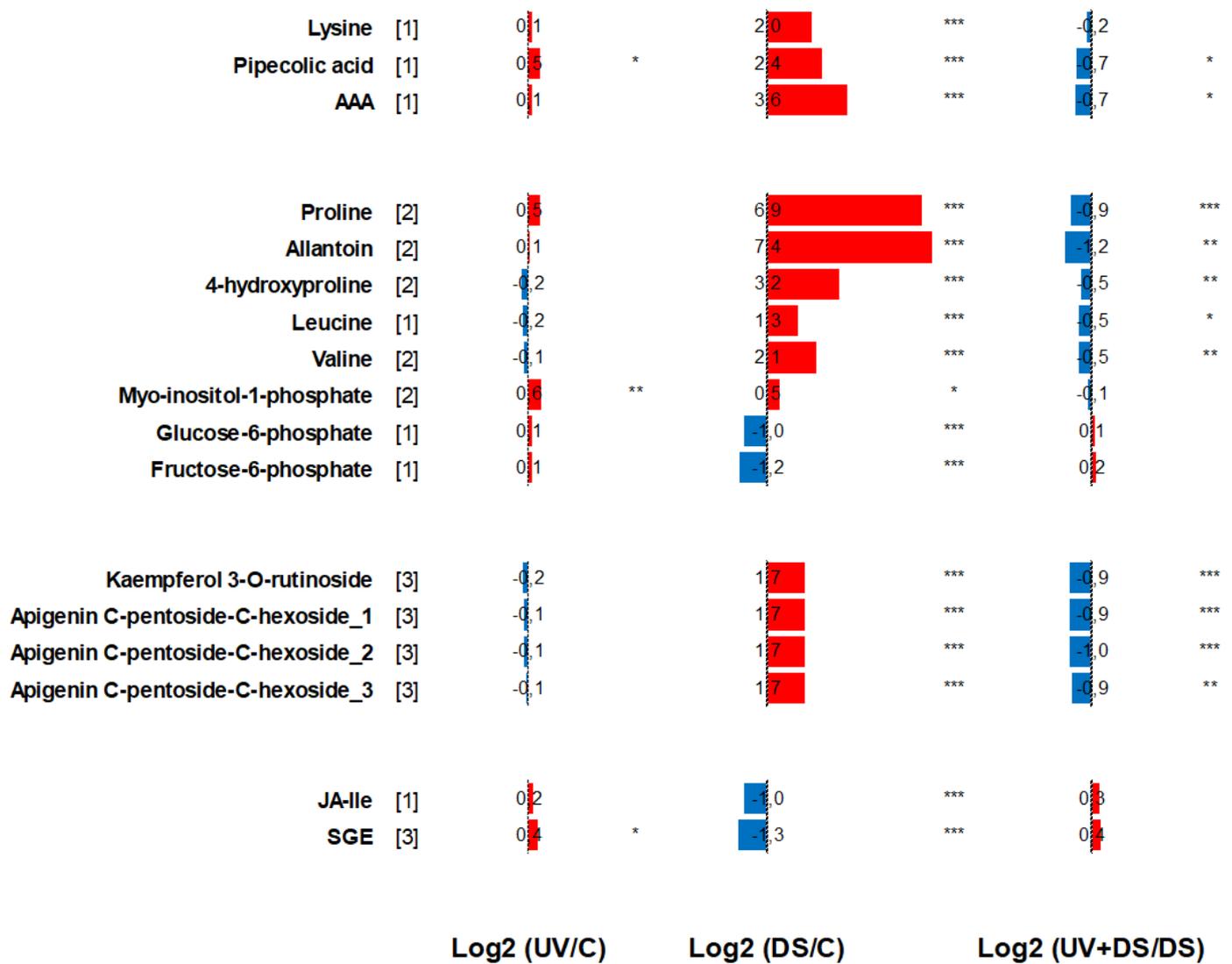


Figure 65. Selection of metabolites whose drought-induced variations in *C. chinense* was mitigated by the UV-C flashes. A. Lysine catabolites. B. Abiotic stress metabolic markers. C. Flavonoids. D. Phytohormones. [1], [2], [3]: Identification level according to Schymanski et al., 2014; p-value of Mann-Whitney test for pairwise comparisons of C vs UV; C vs DS; DS vs UV+DS at threshold  $\alpha = 0.10$  \*;  $\alpha = 0.05$  \*\*;  $\alpha = 0.01$  \*\*\*; C: control; UV: UV-C treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C treated and drought-stressed plants.

turnover (Kieliszewski et al., 2018), whereas BCAAs originate from ABA-dependent proteolysis and feed an important catabolism pathway for plants acclimation to drought (Pires et al., 2016; Huang and Jander, 2017). Drought also triggered the accumulation of secondary metabolites, notably apigenin glycosides, which belong to the flavonoids, a class of protective antioxidants under drought stress (Nakabayashi et al., 2014), as well as the phytohormones SA and pipecolate. The involvement of SA in response to abiotic stresses, including drought, has been reported for a long time (Munné-Bosch and Peñuelas, 2003; Horváth et al., 2007; Abreu and Munné-Bosch, 2008). The coincident decreases in SGE and JA-Ile levels may be interpreted as the respective depletion of a vacuolar pool of SA reserve (Vaca et al., 2017) and a hormonal antagonism (Thaler et al., 2012), already documented in *Salvia officinalis* (Abreu and Munné-Bosch, 2008). Pipecolate is a product of lysine catabolism, which is activated by osmotic stress in bacteria as well as in plants, where it is under the control of ABA (Stepansky et al., 2005; Moulin et al., 2006; Neshich et al., 2013). Pipecolate itself is considered a compatible solute, similar to proline, for which it is the 6-carbons structural homologue (Neshich et al., 2013; Pérez-García et al., 2019).

Most of these metabolic changes were attenuated by UV-C pretreatment. The trend was clear for a series of compounds emblematic of water stress (Fig. 65), notably proline, whose drought-induced accumulation was only half as high in UV-C pretreated plants, as compared to non-pretreated plants. This phenotype is consistent with the better leaves hydration provoked by UV-C, since proline accumulates after osmotic stress in many species, both extremophilic and non-extremophilic, in a manner proportional to the intensity of dehydration (Lugan et al., 2010). The same trend of a more moderate accumulation was observed for allantoin, hydroxyproline, BCAAs as well as for lysine and its catabolites, *i.e.* pipecolate and AAA, apigenin-derived flavonoids and, although not statistically significant, raffinose and SA (Table S8). UV-C alleviation of drought-induced metabolic reconfigurations also concerned the set of compounds whose levels had decreased after drought stress, such as for hexose phosphate, JA-Ile and SGE, although not in a statistically significant way.

In summary, the UV-C treatment reduced dehydration of aerial parts, a pattern characteristic of dehydration avoidance classically associated with osmotic adjustment and regulation of stomatal opening by ABA (Blum and Tuberosa, 2018). However, it did not attenuate plant shrinkage, ABA accumulation or the decrease in stomatal conductance, suggesting a specific action of UV-C flashes that remains to be elucidated. Taken together, the physiological and metabolic data show that UV-C pretreatments triggered mechanisms globally mitigating dehydration over the 14 days period of drought stress, thereby tempering the metabolic costs associated with drought acclimation, including central metabolism repression and investments in the synthesis of compatible solutes and maintenance of redox homeostasis.



## 5.2 UV-C flashes pretreatment primed the plants against drought stress.

Fourteen days after the last UV-C flash treatment and in the absence of drought stress, there was no significant impact on any of the measured physiological variables, especially plant height (Fig. 62). Even more remarkable, the impact on the metabolome was found to be very small, whether assessed by global fingerprinting of analytical features (Fig. 63 A and B), or by analysis of annotated metabolites (Fig. 64 A and supplementary Fig. S4). Our results contrast with numerous observations reporting a protective effect of UV treatments against drought relying on cross-acclimation rather than priming (Jansen et al., 2019; Jansen et al., 2022). Robson et al. (2015), for example, showed that UV-B-induced protection of birch plants against water stress occurred through physiological changes such as thickening of epidermal cell walls, maintenance of turgor and accumulation of antioxidant flavonoids. Other authors reported an attenuation of dehydration with UV pretreatments at the cost of increased cell damage (Alexieva et al., 2001; Nogués et al., 1998). The idea of rice UV-B priming against drought has been raised in recent years, but in relation to different physiological responses than those observed in our experiment, since additive effects on proline accumulation and antioxidant devices were observed (Thomas et al., 2019; Thomas and Puthur, 2020). The UV-C treatment reported here, on the contrary, had a less than additive effect on stress symptoms, and there was no fitness costs associated with the immediate expression of defense mechanisms as in the case of acclimation (van Hulten et al., 2006a). This is consistent with what is known about the effect of a typical priming, when an initial stimulation with chemical, biological or physical factors, induces a physiological state where plants accumulate inactive proteins involved in the transduction and amplification of stress signals, such as "dormant" Mitogen-Activated Protein Kinases and conjugated forms of hormones, together with silent chromatin modifications (Conrath, 2011b), which all increase the strength and speed of local or systemic immunity upon subsequent exposure to low levels of stimuli. Initial stimulation may involve mechanisms described in induced systemic resistance, especially systemic acquired resistance, according to the vocabulary clarified by Kesel et al. (2021), with accumulation of SA during the initial priming phase. The idea of an UV-C-induced primed state is further reinforced by the finding of higher pipecolate levels in UV-C treated plants. The accumulated levels were much lower than those accumulated after drought, presumably excluding a role as a compatible solute. Pipecolate accumulates after biological or chemical elicitation (Návarová et al., 2012) and is an essential component of priming against biotic stresses, contributing to the establishment of SAR and controlling a partially SA-dependent systemic response as a precursor to the hydroxylated active form, N-hydroxypipecolate (Bernsdorff et al., 2016; Hartmann et al., 2018). While it has often been reported that UV-B and UV-C treatments activate SA accumulation (Yalpani et al., 1994; Ramos et al., 2018;



Mannucci et al., 2020; Escobar-Bravo et al., 2019), pipecolate and N-hydroxypipecolate accumulation have only be recently reported in this context (Mohnike et al., 2021; Mohnike et al., 2023). The accumulation dynamics of SA and pipecolate likely explains why we did not observe accumulation of SA, which peaks early while pipecolate accumulates more gradually (Yalpani et al., 1994; Bandurska and Cieślak, 2013; Vogel-Adghough et al., 2013; Mannucci et al., 2020). The absence of early measurements in our experiment only allows us to speculate about the underlying mechanisms of plant response to UV-C. According to the meta-analysis of Jansen et al. (2022), 33% of the UV treatments studied caused a reduction in stomatal conductance but none had any effect on leaf water content. This raises the question of an involvement of ABA in UV priming, which cannot be ruled out even if the literature is ambiguous on this issue (Mannucci et al., 2020; Vanhaelewyn et al., 2016). Mutual antagonism between SA-controlled signaling pathways under biotic stress and ABA-controlled pathways under abiotic stress has been reported (Yasuda et al., 2008; Bostock et al., 2014). This hormonal interplay depends on the central regulator NPR1 (Ding et al., 2016a) and appears to be contextual, depending in particular on leaf age (Berens et al., 2019a). Earlier measurements would have shed light on the roles of SA, pipecolate and ABA signaling pathways in UV-C priming against drought stress.

### 5.3 Benefits of UV-C flashes over other UV stimulations

In contrast to the present work, several studies have not shown a protective effect of UV against the effects of drought: Rodríguez-Calzada et al. (2019) in bell pepper, Rajabbeigi et al. (2013) in lettuce or Sáenz-de la O et al. (2021) in tobacco. Also, most studies report strong impacts of UV treatments on metabolism, like increased flavonoid contents (Rodríguez-Calzada et al., 2019; Robson et al., 2015) and even deleterious effects on growth: reduction of leaf dry matter, reduction in stem length or leaf area (Nogués et al., 1998; Rodríguez-Calzada et al., 2019; Sáenz-de la O et al., 2021). A critical point to limit UV negative side effects upon growth is to respect certain hormonal balances, as UV-B inhibits growth by interacting with auxins and gibberellins in the shade avoidance mechanism (Hayes et al., 2014). The metabolic fingerprinting technique we employed here demonstrates, on the contrary, that flashes of UV-C light do not exert negative effects on growth, using similar approach as metabolomics-based substantial equivalence of genetically modified crops (Catchpole et al., 2005). It reinforces the conclusions drawn from the growth and water status data, suggesting the absence of any silent phenotype following UV-C treatment. The biological effect of UV radiations depends on their wavelengths, their fluence rate, the total dose administered, the frequency and duration of treatments, the time of day when treatments are applied, as well as the specific susceptibility of each organism. This makes comparisons between experiments very difficult. The near lack of UV-C flashes



effect in our experiment was established in samples taken 14 days after the last UV-C treatment; it might thus partly result from plants recovery from earlier disturbances. It is also possibly related to the low dose applied (fluence):  $3 \text{ kJ m}^{-2}$  UV-C administered in 1 week in our experiment, which is much lower than the  $17.1 \text{ kJ m}^{-2}$  of UV-B administered in two weeks in the experiment on *C. annuum* reported by (Rodríguez-Calzada et al., 2019). Interestingly, significant protective effects of UV-C are observed for low doses. For example, a maximum reduction of 67% of *Sclerotinia minor* foliar lesions was recorded after UV-C pre-treatment at the single dose of only  $0.85 \text{ kJ m}^{-2}$ , with no negative effect on growth, although an increase in total phenolics had been measured a few days after the treatment (Ouhibi et al., 2015). The fluence rate is also important. Although varying considerably as a function of season and climate, natural UV-B fluence rates reaching the surface range from a few to dozens  $\text{kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (of the order of  $15 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in the Mediterranean basin, Piccini et al., 2020). In general, the fluence rates of UV-B applied as elicitation treatments are higher than the rates administered in our experiment:  $12 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  of UV-B on *C. annuum* (León-Chan et al., 2017),  $5.1 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  in addition to the natural dose on soybean (Sullivan and Teramura, 1990), or  $6.9 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  on *Nicotiana benthamiana* (Mátai et al., 2019). UV treatments efficacy also depends on their duration and repetition. Casati and Walbot (2004) showed that equal UV-B doses applied in 2 hours caused the differential expression of 106 genes in maize, but only 5 when applied in 8 hours. Similarly, in Arabidopsis, pulsed UV-B treatments with recovery periods between applications, showed enhanced production of flavonols and sinapate derivatives compared to an identical dose administered continuously (Höll et al., 2019). In addition, the pulse treatment caused a much smaller reduction in rosette diameter compared to the control than the continuous treatment. Strawberry cultivars treated with moderate doses of UV-C ( $0.85$  and  $1.7 \text{ kJ m}^{-2}$ ), applied for 1-3 minutes, 4 times at 2-day intervals, show a reduction in leaf damage due to *Botrytis cinerea* by 25%, with no apparent negative effect on growth and production (Forges et al., 2018). Even more recently, the efficacy of the same dose of UV-C pre-treatment applied in 1s or 60s was compared on different species (Aarrouf and Urban, 2020), with or without a booster treatment every 48h. The dose applied in 1s was found to be more effective against necrotrophic fungi, especially when repeated, without affecting photosystems. A systemic effect was also observed, with a reduction of necrotic symptoms in leaves that had not been irradiated. The application modalities of elicitation treatments are therefore still under investigation, aiming at maximizing their positive effects and minimizing their negative effects. In the present case, the absence of negative effect will have to be confirmed by a follow-up of plants over a longer period of time to verify the absence of phenological impact.



## 6 Conclusions and perspectives

We showed that UV-C flash treatments can prime *C. chinense* plants and significantly decrease the physiological and metabolic effects of dehydration during drought stress. In well-watered plants, UV-C induced no physiological changes compared to control plants and only very limited metabolic changes, including long term pipecolate accumulation. It remains to establish over a longer period of time if the UV-C treatment, followed or not by drought stress, causes phenological changes (early flowering and fruit set) that impact yield components. Short term effects should also be addressed, to assess the chronology of molecular events, in particular the dynamic variations of SA, ABA, pipecolate and N-hydroxypipecolate. UV-C flashes treatments are applicable during production and present the advantage of priming against both biotic and abiotic stress, which often occur simultaneously in the field. Beyond the demonstration of an effective UV priming against drought, this work opens exciting research perspectives to elucidate the underlying molecular mechanisms.



# Chapitre 6

---

Discussion générale



ID PHYT CAPCIN est l'un des produits phares de l'entreprise ID4FEED, fabriqué à partir d'un assemblage de poudres de piment encapsulées dans une matrice grasse (0,5% minimum du mélange final). Le prix des matières premières étant déterminé par la teneur en capsaïcinoïdes, cette dernière peut être avantageusement ajustée par l'ajout de quantités modérées d'une poudre de piment à fort taux de capsaïcinoïdes. Ceci permet de réduire les coûts en achetant peu de matière première très concentrée.

L'objectif premier de cette thèse était d'étudier l'effet des traitements d'élicitation sur le métabolisme du piment et d'identifier un traitement efficace pour augmenter les concentrations en caroténoïdes et capsaïcinoïdes durant la croissance. Une série d'optimisations méthodologiques a d'abord été effectuée pour améliorer les analyses biochimiques ainsi que les modalités d'application des traitements. Dans un deuxième temps, l'effet des traitements UV-C et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes des fruits a été étudié. Les hypothèses avancées, soutenues par la littérature scientifique, n'ont pas été confirmées et aucun effet de ces traitements sur les composés ciblés n'a pu être mis en évidence, en raison notamment de la grande variabilité des fruits au sein des espèces. Dans un troisième temps, le rôle des UV-C dans la prévention des symptômes induits par le manque d'eau à un stade végétatif chez le piment a été étudiée, ainsi que les déterminants moléculaires de la réponse aux UV-C en combinant profilages métabolomiques non ciblés et multiciblés en GC-MS et LC-MS/MS, couplés à des traitements de données par réseaux moléculaires et d'analyses statistiques multivariées. Cette étude, qui a fait l'objet d'une soumission d'article dans un journal à comité de lecture, a mis en évidence une protection significative des plantes traitées aux UV-C contre les effets physiologiques et métaboliques du stress hydrique. Les empreintes métaboliques (*fingerprints*) établies à partir de 1505 marqueurs ont révélé l'absence de perturbation du métabolome par le traitement UV-C, et au contraire une atténuation des symptômes métaboliques de stress hydrique lorsqu'un épisode de sécheresse suivait le traitement UV-C. L'identification d'une centaine de composés a, en outre, montré l'implication de l'acide pipécolique, élément essentiel de la SAR au côté du SA, dans l'élicitation par les flashes d'UV-C (Chapitre 5).

Les méthodes analytiques d'approches ciblée ou non ciblée ayant permis la quantification des composés d'intérêt ou la détection de marqueurs sont comparées et discutées par la suite. Les traitements d'élicitation n'ont pas permis de répondre à l'objectif industriel d'augmentation des concentrations en caroténoïdes et en capsaïcinoïdes dans les fruits de piment et ceci pose un certain nombre de questions pratiques et fondamentales, discutées dans les points suivants.



## 1 Comparaison des approches analytiques

La mise au point des méthodes a été initiée au commencement de la thèse mais a nécessité une adaptation constante en fonction du matériel végétal et des approches analytiques utilisées. Ces optimisations sont essentielles pour l'analyse des résultats et un dosage correct des composés d'intérêt.

### 1.1 Approches ciblées

Les méthodes de dosage utilisées sont des méthodes coûteuses et complexes à mettre en œuvre (développement de méthodes MRM), tandis que des méthodes plus simples existent. Le dosage des caroténoïdes par exemple, peut être effectué pour la quantité totale par dosage spectrophotométrique. Néanmoins, l'intérêt de développer une méthode MRM réside dans le fait de pouvoir doser individuellement les composés. En effet, et malgré les résultats observés, l'élicitation peut entraîner l'accumulation de certains caroténoïdes aux dépens d'autres, résultant en une concentration totale inchangée mais un ratio différent. Il a ainsi été montré par exemple, que l'application de methyl jasmonate sur des tiges de tomate, a entraîné dans cet organe une augmentation d' $\alpha$ -carotène d'un facteur 15, tandis que les concentrations en  $\beta$ -carotène et phytoène n'avaient pas été modifiées (Errard et al., 2015).

L'activité antioxydante des caroténoïdes est différente selon leur structure, notamment en fonction du nombre de doubles liaisons et de la présence de groupes fonctionnels tels que des alcools (Maoka et al., 2001). La capacité antioxydante totale peut alors varier selon la composition en caroténoïdes, modifiant en conséquence l'intérêt du produit en nutrition animale. La propriété de pigmentation peut également varier en fonction de la composition en caroténoïdes, avec l'accumulation soit de pigments jaunes, soit de pigments rouges, bien que, dans le cadre d'une élicitation, ces changements restent mineurs et difficilement perceptibles pour l'œil du consommateur. La capsorubine et la capsanthine possèdent les activités antioxydantes les plus importantes parmi les caroténoïdes du piment, et contribuent à la coloration rouge du fruit (Maoka et al., 2001). Le gène *Ccs*, codant pour la capsanthine capsorubine synthase, semble donc être un gène candidat à cibler lors d'une élicitation visant à augmenter les concentrations en capsanthine et en capsorubine.

L'identification du composé inconnu prépondérant que nous avons tenté de purifier (voir chapitre 3) peut être une piste intéressante pour enrichir notre connaissance du métabolome du piment. Il



resterait toutefois d'abord à confirmer qu'il s'agit d'un composé inédit, ce qui est peu probable. La piste la plus simple est celle d'un ester auquel nous n'aurions pas pensé : étant donnée l'absence de capsorubine constatée et la rapidité d'estérification de cette dernière (Goda et al., 1995), cette molécule inconnue pourrait être un ester de capsorubine, conjuguée avec un acide gras non identifié ici, ou doublement conjugué.

Les analyses du métabolisme réalisées dans le chapitre 4 étant dirigées vers les caroténoïdes et les capsainoïdes dans les fruits, un effet plus global sur le métabolisme a pu être manqué. Une analyse non ciblée avec un traitement de données par des méthodes supervisées (OPLS-DA par exemple), aurait pu révéler des marqueurs de ces traitements d'élicitation. Les métabolites ciblés n'ont pas été impactés dans ces conditions mais d'autres métabolites dans les fruits, autres que les 55 métabolites primaires détectés en GC-EI-TOF, ont pu être impactés par les traitements. Par ailleurs, lorsque l'analyse non ciblée du métabolome des plantes a été effectuée sur 1505 *features*, elle a révélé certains marqueurs des UV-C, notamment le pipécolate, avec une présence durable car il a été retrouvé 15 jours après la fin des traitements.

## 1.2 Approches non ciblées

L'utilisation de méthodes d'analyses non ciblées permet de trouver des marqueurs sans *a priori*. Les logiciels de traitements des données permettent d'obtenir un grand nombre de *features* parmi lesquelles certaines sont annotées. En GC-MS, de très nombreuses annotations ont été réalisées tandis qu'en LC-MS, le nombre reste faible. Néanmoins, la justesse de l'annotation automatique de ces *features* s'est avérée globalement décevante. Pour les données acquises en GC-MS, l'indice de rétention représente un vrai avantage pour la standardisation des résultats, mais la non prise en compte de ce paramètre lors de l'utilisation de la plateforme GNPS, constitue un réel frein dans la précision de ces propositions. En LC-MS, l'identification reste difficile en raison des différences de propriétés des sources d'ions utilisées et des cellules de fragmentation MS<sup>2</sup> entre les instruments, auxquels s'ajoute une couverture limitée des banques spectrales actuelles (Morehouse et al., 2023). De plus, Witting et Böcker (2020) soulignent que la combinaison des données MS/MS avec les données de temps de rétention en tant qu'information orthogonale serait bénéfique, mais elle fait actuellement défaut en LC en raison d'une sensibilité importante des temps de rétention aux conditions analytiques (solvants, débits, colonnes, température, etc.). Il est donc très difficile d'obtenir des marqueurs annotés de manière automatisée. Par ailleurs, plus de 70 logiciels, *packages* ou outils de traitements des données de métabolomiques existent, possédant chacun des algorithmes et étapes de traitement différents (Misra, 2021), accroissant encore l'incertitude quant à la performance des annotations. Une



étude examinant les *features* obtenues par quatre logiciels différents a montré une faible cohérence entre quatre outils (MZmine2, enviMass, XCMS online et Compound Discoverer), avec un recouplement des *features* entre les outils de 10 % (Hohrenk et al., 2020). De plus, le choix des bases de données va influencer les propositions d'annotations : le taux de faux positifs, FDR (*False Discovery Rate*) sera d'autant plus important que le nombre de bases de données utilisé sera grand. En effet, des bases de données personnalisées plus petites simplifient l'annotation en réduisant le choix et donc les FDR, au prix de l'omission de composés moins courants (Matsuda et al., 2009; Böcker, 2017). La qualité des annotations reste donc une tâche ardue à l'heure actuelle en raison des variations propres à chaque préparation d'échantillon et techniques d'analyses (Chaleckis et al., 2019) et les logiciels d'annotation doivent servir de base pour une annotation manuelle supervisée.

## 2 Seuils de déclenchement de l'élicitation par les UV : effets dose et durée des expositions

Les UV-C ont été utilisés à deux doses différentes, pour deux approches différentes au cours de cette étude : l'augmentation des métabolites secondaires d'intérêt (Chapitre 4), ou la tolérance au stress abiotiques (Chapitre 5). Le choix de la dose est primordial. En effet, lors d'une application d'UV-B sur *Arabidopsis*, la dose peut déclencher une réponse spécifique impliquant le récepteur UVR8, telles qu'une morphologie et une architecture altérée (10 kJ.m<sup>-2</sup> appliqués en 2h) ou une réponse de stress, non spécifique comme une diminution de l'assimilation du carbone (86,4 kJ.m<sup>-2</sup> appliqués en 4h) (Hectors et al., 2007).

Dans la première approche, l'application d'UV-C avait pour but d'augmenter les concentrations en métabolites secondaires d'intérêt, c'est-à-dire les caroténoïdes ou les capsaïcinoïdes. Cette utilisation implique un traitement sur plantes possédant des fruits, donc à un stade phénologique relativement avancé, dont la croissance végétative n'est plus prioritaire. Dans une deuxième approche, les traitements UV-C ont été utilisés dans le but d'améliorer la tolérance de la plante à un stress abiotique. Les doses utilisées ont été réduites afin d'éviter des effets négatifs non souhaités sur la morphologie. On peut émettre l'hypothèse que le stade d'application des traitements UV-C implique des doses différentes : les doses appliquées au stade reproductif peuvent alors être plus importantes, sans crainte d'une atteinte sur la croissance, l'objectif étant de déclencher les voies de signalisation des caroténoïdes pour influencer les concentrations dans les fruits, tout en conservant une dose hormétique.



La dose hormétique est définie pour n'exercer aucun effet négatif sur la photosynthèse des plantes, la croissance et les performances des cultures (Urban et al., 2022). Néanmoins, il reste à établir si une dose entraînant de faibles dommages sur les paramètres énoncés mais une augmentation d'un autre paramètre (concentration en métabolites secondaires, meilleure conservation ou meilleure résistance par exemple) peut être acceptable. Quels sont alors les dégâts qui pourraient être acceptés pour entraîner l'effet désiré ? Des dégâts acceptables pourraient inclure un pourcentage de surface foliaire abimé en contrepartie de fruits enrichis en métabolites secondaires d'intérêt par exemple. Une légère atteinte sur les feuilles à un stade où les fruits ont déjà été remplis n'entraînerait pas une perte de rendement pour un producteur de fruits, et seraient d'autant plus acceptables que le traitement engendre des fruits de meilleure qualité nutritionnelle, où des fruits dont la conservation est améliorée. Les fruits et légumes constituent une source majeure de substances biologiquement actives telles que les vitamines et les métabolites secondaires (Poiroux-Gonord et al., 2010). Un rendement très légèrement réduit en nombre de fruit serait également acceptable, de surcroît si l'apport en vitamines et métabolites secondaires est amélioré. Pour cela, il conviendrait que le rendement soit calculé en fonction du pourcentage de composés biologiquement actif par unité de matière sèche et non un rendement en masse totale de fruit ; un fruit concentré en composés d'intérêt étant nutritionnellement plus intéressant qu'un fruit plus gros, gorgé d'eau.

Fortement lié à la dose, le temps de traitement était différent entre les deux approches utilisées au cours de la thèse (10 secondes au stade reproductif contre 2 secondes au stade végétatif). La dose n'est pas le seul paramètre à prendre en compte : le temps de traitement influence les réponses de la plante. En effet, à dose égale, les UV-C apportés sous forme de flashes d'une seconde ont été plus efficaces que des expositions longues (60 s) pour stimuler les défenses contre des stress biotiques pour plusieurs espèces végétales (Aarouf and Urban, 2020b). En effet, la reconfiguration moléculaire déclenchant les réponses de défenses aboutissant à un *priming* pourraient ne pas être déclenchées si le temps de traitement est trop long. La rupture de liaisons chimiques, en réponse à une exposition aux UV ne se produit que lorsque la dose nécessaire de radiation a été reçue. Dans ce cas, une reconfiguration moléculaire radiation-dépendante se produit (monomérisation de UVR8 par exemple), qui déclenche une cascade d'évènements, avec potentiellement la migration de facteurs de transcription dans le noyau, régulant l'expression de gènes pour aboutir à un *priming*. Or, si une dose efficace est apportée en plusieurs minutes ou heures, la reconfiguration moléculaire peut ne plus être déclenchée. Nous émettons l'hypothèse que, à dose égale, les UV-C appliqués en un temps très courts déclenchent une cascade de signalisation, qui serait bloquée par d'autres évènements (détoxification par exemple) lors d'une exposition longue.



Ces évènements pourraient correspondre par exemple à l'accumulation de flavonoïdes ou encore le renforcement de la cuticule qui absorbent les rayonnements et empêchent leur pénétration. Néanmoins, ces évènements impliquent l'expression des gènes, l'accumulation des enzymes et l'orientation des flux métaboliques. La réalisation de tels évènements en un temps si court paraît peu probable. Une transformation chimique rapide ou une relocalisation instantanée pourraient avoir lieu.

Une autre hypothèse serait que, en un temps très court, la cible produit des ROS en quantité importante, qui, si le seuil est atteint, déclenchent les réponses, alors que si la dose est apportée plus lentement, les mécanismes de détoxification s'enclenchent avant que le seuil de ROS ne soit atteint.

On peut supposer qu'au-delà de 2s, donc dans l'expérimentation sur fruits, l'exposition de 10 secondes était trop longue pour atteindre le seuil de déclenchement des réponses de défenses.

### 3 Médiateurs potentiels de l'expression des gènes de voies de biosynthèse cibles

Afin d'être efficaces, les traitements d'élicitation doivent cibler les médiateurs potentiels de l'expression des gènes des voies de biosynthèse des caroténoïdes et capsaïcinoïdes. La voie de biosynthèse des capsaïcinoïdes est fortement régulée par le facteur de transcription (FT) *CaMYB31* (Gutiérrez-Carbajal et al., 2010), dont l'expression a été induite par un traitement au SA (Arce-Rodríguez and Ochoa-Alejo, 2017). Sachant que les flash d'UV-C stimulent la voie du SA (Urban et al., 2022), on peut formuler l'hypothèse qu'ils peuvent stimuler *CaMYB31* à travers l'augmentation de la concentration en SA.

La voie de biosynthèse des caroténoïdes est régulée négativement par les FT PIF (phytochrome interacting factors) qui entraînent la sous-expression du gène codant pour la phytoène synthase (*Psy*), une enzyme flux déterminante dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes, en se fixant sur son promoteur (Toledo-Ortiz et al., 2010). Le FT HY5 (bZIP LONG HYPOCOTYL 5) est un puissant antagoniste des FT PIF (Kami et al., 2010; Lau and Deng, 2010; Leivar and Quail, 2011), et régule positivement la biosynthèse des caroténoïdes (Lee et al., 2007b; Zhang et al., 2013). Comme les PIF, les niveaux de HY5 sont régulés par la lumière, mais contrairement aux PIF qui sont labiles à la lumière, HY5 est stabilisé par la lumière (Hardtke et al., 2000; Osterlund et al., 2000; Leivar and Quail, 2011).

De multiples photorécepteurs participent à l'accumulation de la protéine HY5 à la lumière blanche, en partie en réduisant les taux de COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) au niveau

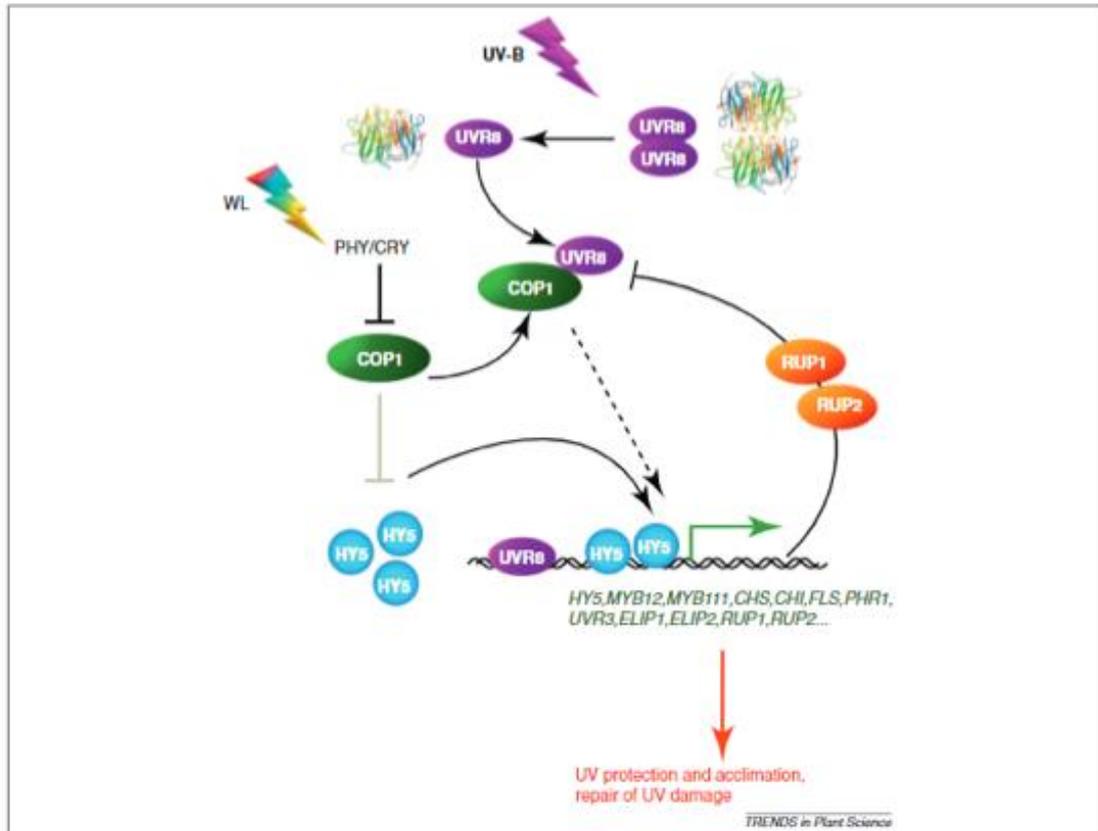


Figure 66. Modèle de la fonction de COP1 et UVR8 dans la voie de photorégulation des UV-B/C. Dans des conditions de lumière blanche (WL) dépourvues d'UV-B, UVR8 est présent principalement sous la forme de dimère. COP1 réprime la photomorphogénèse en favorisant la dégradation de HY5 (et d'autres facteurs de transcription promoteurs), mais est sous le contrôle négatif des phytochromes et cryptochromes activés par la lumière. En présence de rayonnement UV-B, UVR8 se monomérisse et interagit avec COP1. Le facteur de transcription bZIP HY5 est stabilisé et les gènes répondant aux UV-B sont activés. D'après Heijde and Ulm (2012).

Abréviations : CHI, chalcone isomerase ; CHS, chalcone synthase ; CRY, cryptochrome ; COP1, constitutively photomorphogenic 1 ; ELIP1 et ELIP2, early light inducible protein 1 et 2 ; FLS, flavonol synthase ; HY5, elongated hypocotyl 5 ; MYB12 et MYB111, MYB domaine protein 12 et 111 ; PHR1, photolyase 1 ; PHY, phytochrome ; RUP1 et RUP2, repressor of UV-B photomorphogenesis 1 et 2 ; UV-B, ultraviolet-B radiation ; UVR3, UV repair defective 3 ; UVR8, UV resistance locus 8 ; WL, white light.

du noyau, une E3 ubiquitine ligase, qui entraîne la dégradation par le protéasome de HY5 (Hardtke et al., 2000; Osterlund et al., 2000; Pokhilko et al., 2011).

La forme active du récepteur UVR8, après exposition aux UV-B par exemple, interagit directement avec COP1, empêchant alors la dégradation de HY5 (Figure 66) (Favory et al., 2009). On s'attendrait à ce que les UV-C, en étant perçus par UVR8 (Aarouf et al., 2022b), évitent la dégradation de HY5, puissant antagoniste de PIF, et favorisent ainsi la biosynthèse des caroténoïdes, en particulier ceux qui sont directement liés à la photoprotection (Jenkins, 2009a; Jenkins, 2014).

## 4 Elicitation UV-C au stade végétatif contre les effets de la sécheresse

Lorsqu'ils ont été appliqués au stade végétatif, les UV-C ont considérablement amélioré la réponse des plantes au stress hydrique (Chapitre 5). Les UV-C pourraient être utilisés dans un but agronomique afin d'améliorer la tolérance aux stress abiotiques de variétés à fort taux de capsaïcinoïdes.

Les avantages d'un tel traitement pour la filière agricole sont nombreux. En condition de plein champ, les stress abiotiques sont fréquents en raison des aléas climatiques, et peuvent impacter le rendement en masse de fruits par surface cultivée. Les traitements UV-C appliqués pourraient permettre de conserver le rendement attendu, malgré les conditions climatiques non contrôlées ou encore d'améliorer la qualité des fruits en évitant des atteintes liées aux stress abiotiques, telles que des fruits moins remplis ou de petite taille. L'impact des traitements UV-C sur les paramètres de rendement en masse de fruits par unité de surface cultivée, reste à déterminer afin, notamment, de caractériser leur effet sur la production de fruits, leur impact sur la précocité de la récolte ou encore la conservation des fruits.

L'application de traitements phytosanitaires utilisés dans les mêmes buts impose des contraintes liées à des conditions environnementales strictes, contrairement aux UV-C. Les traitements aux UV-C peuvent être réalisés quelles que soient les conditions météorologiques, permettant un usage facilité au moment opportun. Cet avantage permet d'effectuer un traitement ciblant un stade critique menaçant le rendement, comme par exemple la nouaison (Khalid et al., 2022), sans prendre en compte les conditions climatiques.

L'impact écologique des traitements par flashes d'UV-C est également avantageux par rapport à des traitements phytosanitaires, dont l'impact sur l'environnement est néfaste. Les traitements aux UV-C n'engendrent pas de dérives ni de lessivages, c'est-à-dire que leur application physique n'entraîne pas de risque de pollution du sol, de l'eau ou de l'air. Les traitements peuvent avoir lieu



avant ou après les pluies. Cette technique n'engendre pas de résidus dans l'environnement, et donc aucun délai de rentrée, ou avant récolte.

Une action des UV-C également rapportée concerne la meilleure conservation des fruits en *post-récolte* (Vicente et al., 2005). D'un point de vue industriel, les traitements par flashes d'UV-C, en améliorant la qualité de conservation des fruits, pourraient entraîner des pertes moins importantes lors du transport et du stockage des fruits.

L'utilisation de traitements UV-C pour améliorer la tolérance des plantes notamment au stress hydrique a également un intérêt économique. La meilleure tolérance des plantes à un manque d'eau permettrait de diminuer la fréquence d'irrigation, ou la quantité d'eau apportée. Cette réduction semble être un avantage non négligeable dans un contexte de ressources en eau restreintes.

Cette solution de traitement par UV-C est actuellement commercialisée par l'entreprise UV Boosting, dans le but d'améliorer les défenses des plantes contre les stress biotiques et la tolérance aux stress abiotiques, en condition de plein champ.

Le coût économique d'une telle solution doit être pris en compte. Le dispositif actuellement commercialisé par UV Boosting pour le traitement de la vigne comprend des panneaux lumineux à équiper derrière un tracteur, qui roule à une vitesse comprise entre 2 et 4 km/h. Le prix d'un tel dispositif est compris entre 36 000 et 55 000 euros, en fonction du nombre de panneaux lumineux à équiper derrière un tracteur, permettant de traiter les surfaces nécessaires (UV Boosting, communication personnelle). Le coût peut paraître conséquent, mais la technique permet de s'affranchir de nombreux autres frais, liés notamment aux produits phytosanitaires évités, ou à la consommation en eau réduite. A la diminution des frais, peut s'ajouter un rendement amélioré en raison de la meilleure tolérance des plantes aux stress biotiques et abiotiques, permettant de positionner les UV-C comme une solution physique de traitement prometteuse et respectueuse de l'environnement. D'après les résultats obtenus sur *Capsicum*, les variétés sont à choisir en fonction de résultats *in situ*.

## 5 Elicitations par flashes d'UV : acclimatation ou *priming* ?

Ce traitement a pour but d'induire un état physiologique dans lequel la plante est préparée à répondre plus vite et plus fort en cas d'agression ou de stress abiotique. Différentes notions sont directement reliées aux interactions entre génome et environnement, telles que l'acclimatation, la résistance croisée ou encore le *priming*.



L'acclimatation est la capacité des organismes à s'adapter rapidement aux changements environnementaux durant leur vie, via la modulation des voies de signalisation, et les reconfigurations transcriptionnelles et métaboliques (Kleine et al., 2021). Elle peut se produire face à une ou plusieurs variables environnementales co-occurentes, avec des réponses additives, synergiques ou antagonistes. Dans ce dernier cas, les réponses à deux variables peuvent même s'annuler (Jansen et al., 2019).

L'acclimatation peut parfois induire une résistance croisée. La résistance croisée fait référence à l'acclimatation d'un organisme résultant de l'exposition à une variable considérée comme un stress modéré, entraînant un certain niveau de protection contre une autre. Par exemple, les flavonoïdes foliaires induits en réponse au rayonnement UV-B, via la voie médiée par le photorécepteur UVR8, ont permis d'augmenter la résistance contre la chenille *Pieris brassicae* et le puceron *Myzus persicae* chez le brocoli (Mewis et al., 2012). Ces réponses recouvrent les effets physiques ou chimiques de deux stress différents (froid/sel/sécheresse) et/ou l'activation de voies signalétiques plus ou moins partagées (UV/ravageur).

Ce concept suppose que la première exposition soit considérée comme un stress. Néanmoins, selon nos observations, les UV-C appliqués à dose hormétique n'ont pas induit un état de stress chez les plantes. Le *priming* est un cas particulier de résistance croisée, par lequel la première stimulation, qui n'est pas considérée comme un stress, entraîne une réponse améliorée à une deuxième stimulation, stressante (Savvides et al., 2016; Jansen et al., 2019). Selon cette définition, le *priming* entraîne une suractivation des défenses de la plante de manière persistante, entraînant des réponses de défenses plus rapides ou plus fortes qu'en condition témoin (Goellner and Conrath, 2008). Le *priming* est utilisé pour lutter contre les stress abiotiques et biotiques. L'application de chitosan (une sous-unité de polymères naturels) sur le pommier *Malus sieversii* et le riz *Oryza sativa* a amélioré la tolérance des plantes au stress hydrique notamment par l'augmentation de l'activité enzymatique antioxydante (Yang et al., 2009; Pongprayoon et al., 2013), tandis que l'utilisation d'UV-B a entraîné une meilleure résistance du brocoli contre le puceron (Mewis et al., 2012).

Il reste à démontrer formellement qu'une réponse physiologique ou moléculaire est activée plus fortement et/ou plus rapidement.

Les flashes UV-C ont induit des phénotypes de résistance au regard des profils métaboliques et de la teneur en eau. L'impact des UV-C sur le *priming* des plantes au stress hydrique semble impliquer une gestion de l'eau, dans la phase précoce du stress, différente, avec des paramètres qui pourraient être engagés comme la fermeture stomatique ou le maintien de la turgescence (action sur l'ajustement osmotique et/ou l'élasticité des parois). Les réponses de défense à la sécheresse étaient plus efficaces



après traitement UV-C mais ne s'exprimaient pas sans stress hydrique ultérieur. La nature des altérations qui ont eu lieu lors de la stimulation de la résistance induite n'est pas connue mais comprend probablement des altérations épigénétiques (modification d'histones comme H3K4me3 ou H3K9ac), une présence accrue de récepteurs ou encore une accumulation de protéines (MPK3 et MPK6) (Goellner and Conrath, 2008; Conrath et al., 2015). Une telle mobilisation des défenses entraîne des coûts pour la plante (Wilkinson et al., 2019). Par exemple, des coûts d'allocation peuvent résulter de la réorientation des ressources de la croissance ou reproduction vers la défense (Neilson et al., 2013). Dans des conditions non stressantes, où le *priming* n'est pas suivi par un stress, ce coût d'allocation associé peut alors rendre le *priming* défavorable, rendant la mobilisation des ressources vaines (van Hulten et al., 2006b; Walters et al., 2008; Douma et al., 2017). En revanche, les flashes d'UV-C ne semblent pas entraîner de coûts en terme de photosynthèse (Ledermann et al., 2021).

Le *priming* peut également engendrer un coût écologique en entraînant la perte d'interactions avec des symbiotes bénéfiques et la sensibilité accrue à d'autres agresseurs en raison d'une signalisation croisée (Kliebenstein and Rowe, 2008; Luna et al., 2012; Pieterse et al., 2012). Dans certains cas, le *priming* peut également entraîner des coûts de perte de spécificité ; l'état de défense amorcé servant de médiateur à une réponse de défense accrue à un *stimulus* inapproprié (Beckers et al., 2009; Jaskiewicz et al., 2011).

Cependant, malgré ces exemples de coûts, une telle induction de la résistance a l'avantage d'apporter des coûts de *fitness* inférieurs à l'induction directe de la défense des plantes, et même à l'acclimatation (van Hulten et al., 2006b; Buswell et al., 2018). Les avantages de la protection l'emportent sur les coûts, ce qui fait du *priming* une stratégie précieuse aidant les plantes à survivre dans des environnements hostiles (Douma et al., 2017).

## 6 Rôle de l'immunité systémique dans l'élicitation UV-C

L'analyse du métabolome des plantes (Chapitre 5) a révélé la présence de pipécolate dans les feuilles 15 jours après les traitements UV-C. Mohnike et al. (2021) ont par ailleurs rapporté une augmentation de l'accumulation de N-hydroxypipécolate (NHP), NHP-O-glucoside (NHP-Glc), SA et SA-O-β-glucoside (SAG) à la suite d'un traitement UV-C de la même manière qu'après une infection par *Pseudomonas syringae*, ce qui indique qu'un traitement UV-C peut être utilisé pour mimer une infection biotique, en déclenchant les mêmes réponses de résistance.

En effet, le catabolisme de la lysine est connu depuis longtemps pour son implication dans les réponses de stress chez les végétaux (Galili et al., 2001). Le NHP, qui est un produit de la dégradation



de la lysine, et le SA participent à la SAR dans les relations plantes/pathogènes. Le NHP a été rapporté pour la première fois en 2018 en tant que métabolite de défense s'accumulant chez *Arabidopsis* (Chen et al., 2018; Hartmann et al., 2018b), tandis que le SA en revanche, a été reconnu comme l'hormone qui contrôle la SAR, il y a au moins 25 ans (Gaffney et al., 1993; Nawrath and Métraux, 1999; Wildermuth et al., 2001). Les deux voies sont contrôlées négativement par la même glycosyltransférase, UGT76B1, qui est inductible par les stress biotiques et produit le NHP-Glc et le SAG (Zeier, 2021; Shields et al., 2022). Elles dépendent plus en aval du régulateur transcriptionnel *NPR1*, qui contrôle l'expression des gènes de la SAR. Le NHP s'accumule suite à une première attaque et déclenche la réponse transcriptionnelle de la SAR, tandis que le SA est, quant à lui, nécessaire pour amplifier la reprogrammation systémique induite par le NHP, qui constitue le signal mobile de la SAR, *via* le phloème (Yildiz et al., 2021; Zeier, 2021).

Dans notre étude, le pipécolate semble avoir agi comme un signal durable dont l'accumulation différentielle est encore visible 15 jours après les traitements. Le NHP, signal mobile retrouvé 24h après le traitement UV-C par Mohnike et al. (2021), n'a pas été dosé, car la méthode d'analyse utilisée n'a pas permis de le détecter. Le SA, en revanche, n'a pas montré d'accumulation différente entre les conditions 15 jours après les traitements, ce qui indique ici une dynamique et une mobilité différentes entre le SA et l'acide pipécolique. D'après Vogel-Adghough et al. (2013), après inoculation de plants de tabac par *Pseudomonas syringae*, le SA produit un pic d'accumulation 24 hpi (*hours post inoculation*) puis reste stable jusqu'à 72 hpi, tandis que le pipécolate augmente linéairement pendant 72 hpi, montrant que les deux molécules suivent des cinétiques différentes d'accumulation. Il serait donc pertinent d'effectuer des analyses cinétiques, avec notamment un prélèvement d'échantillon foliaire 24h après les traitements par flashes d'UV-C afin d'observer les réponses à court terme en dosant le plus de phytohormones possibles, incluant le NHP et son glycoside.

RUP1 et RUP2 (REPRESSOR OF UV-B PHOTOMORPHOGENESIS) sont des protéines nucléaires qui promeuvent la redimérisation d'UVR8 (la forme active étant un monomère), et régulent négativement la fonction d'UVR8. Des travaux suggèrent que l'interaction des protéines UVR8 et RUP sont plus fortes en présence de rayonnement UV-B (Heijde and Ulm, 2013; Yang et al., 2015; Camacho et al., 2019; Tossi et al., 2019), mais à notre connaissance, aucune étude n'a étudié le lien avec les UV-C. La régulation négative de UVR8 par RUP a pu contribuer au recouvrement d'un statut physiologique équivalent au témoin 15 jours après les traitements UV-C, même s'il faut considérer l'implication éventuelle d'autres récepteurs.

Nous avons observé que le pipécolate s'est accumulé après un traitement par flashes d'UV-C, et plus fortement après un stress hydrique seul. En condition de sécheresse, l'accumulation a été moins

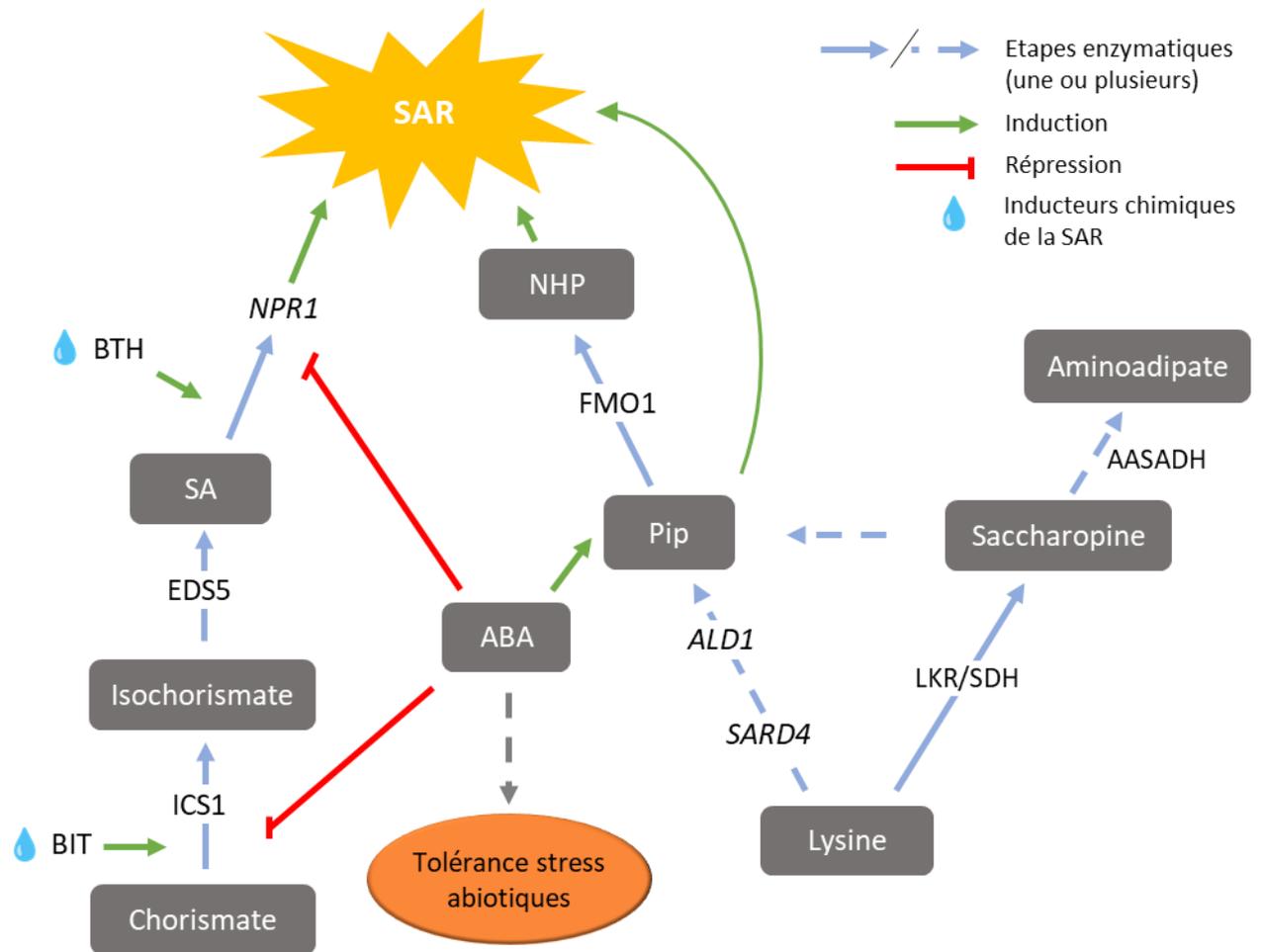


Figure 67. Voies de signalisation du SA et du pipécolate dans la mise en place de la SAR, en interaction avec l'ABA lié à la tolérance aux stress abiotiques. Les hormones peuvent être soit directement impliquées dans la signalisation ou l'antagonisme des voies, soit avoir un rôle indirect.

ALD1 (AGD2-Like Defence response protein 1) encode une aminotransférase ; BIT : 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one1,1-dioxide ; BTH : benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BIT et BTH sont des inducteurs de la SAR) ; EDS5 : Enhanced Disease Susceptibility 5 ; FMO1 : flavin containing monooxygenase 1 ; ICS1 : Isochorismate synthase 1 ; LKR/SDH : Lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase ; NPR1 : Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 ; Pip : pipécolate.

forte lorsque les plantes ont été prétraitées aux UV-C. Le SA, quant à lui, n'a pas été différentiellement accumulé dans cette expérience. Il convient de se demander quelle est l'action des UV-C sur la voie de signalisation du pipécolate, du SA et plus généralement de la mise en place de la SAR.

En conservant les mêmes modalités que dans l'expérience précédente, une comparaison de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation du pipécolate (*ALD1*, *FMO1*), du SA (*ICS1*, *EDS5*) et de la mise en place de la SAR (*NPR1*) dans les différentes modalités, ainsi qu'un dosage du SA, pipécolate et NHP permettraient d'identifier les étapes impactées par les UV-C. Ces gènes ont été allumés 4h après un flash d'UV-C chez *Arabidopsis* (Urban, communication personnelle).

Un aspect inattendu et remarquable de nos résultats est que le prétraitement par flashes d'UV-C a entraîné une tolérance accrue au stress hydrique par évitement de la déshydratation. L'ABA est impliqué dans les processus de tolérance aux stress abiotiques, dont le stress hydrique, notamment *via* la fermeture des stomates (Addicott et al., 1968; Cutler et al., 2010), ainsi que dans la régulation négative de la SAR (Yasuda et al., 2008). Il reste à établir le lien entre l'action des UV-C en fonction de la concentration en ABA, c'est-à-dire, si l'action des UV-C est dépendante de la concentration endogène en ABA.

Dans un mécanisme conservé par l'évolution, la signalisation des phytohormones médiée par l'ABA favorise la tolérance aux stress abiotiques et supprime, par effet d'antagonisme, la signalisation de la phytohormone liée au stress biotique : le SA (Berens et al., 2019b). Cet antagonisme doit être interprété en termes de régulation quand la plante doit arbitrer entre fonctions de défense contre les pathogènes et fonctions de tolérance contre les stress abiotiques, notamment le stress hydrique. Chez *Arabidopsis*, Yasuda et al. (2008) ont étudié l'antagonisme entre ces deux voies de signalisation à l'aide d'une approche pharmacologique et d'une approche génétique. L'effet de l'ABA a été élucidé par différents moyens : en application exogène, en utilisant des mutants surexprimant une enzyme catabolisant l'ABA (*CYP707A3*) ou en induisant une production d'ABA endogène par un stress salin. Il a été montré que l'ABA supprime l'induction de la SAR en amont et en aval du SA, en inhibant l'expression du gène de biosynthèse du SA (*SA INDUCTION DEFICIENT 2*, *SID2*, qui code pour *ICS1*) et entraîne également la dégradation par le protéasome du récepteur du SA, *NPR1* (Yasuda et al., 2008; Ding et al., 2016b), tandis que Gruner et al. (2013), suggèrent un rôle positif de l'ABA dans les premières étapes de la voie de signalisation du pipécolate (Figure 67). La diaphonie entre les voies de signalisation de l'ABA et du SA se fait dans les deux sens : l'activation de la SAR par des inducteurs chimiques (BIT ou BTH en amont ou en aval du SA) a ainsi supprimé l'expression des gènes liés à la voie de signalisation de l'ABA, avec une contribution de *NPR1* (Yasuda et al., 2008). L'antagonisme existe à



de multiples étapes entre la signalisation de l'induction de la SAR médiée par le SA et la signalisation des réponses au stress environnemental médiée par l'ABA.

Etant donnée son implication dans la tolérance aux stress abiotiques ainsi que dans celle de la régulation négative de la SAR, les recherches doivent continuer sur la compréhension du rôle de l'ABA dans l'action des UV-C. Pour ce faire, le modèle d'étude pourrait être modifié en faveur d'*Arabidopsis*, afin de pouvoir bénéficier d'une collection de mutants existants. Un mutant déficient en ABA (*aba4*) (North et al., 2007), insensible à l'ABA (*abi-4*) (Bossi et al., 2009) ou encore une plante transgénique surexprimant l'enzyme qui catabolise l'ABA (CYP707A3) (Umezawa et al., 2006) pourraient être utilisés dans le même dispositif, utilisant les UV-C associés ou non à un stress hydrique. Si, dans un mutant ABA, le pipécolate montre le même schéma d'accumulation que dans l'expérimentation réalisée (accumulation réduite dans UV+DS par rapport à DS), cela signifierait que l'action des UV-C n'est pas dépendante de l'ABA. En revanche, si l'accumulation est différente, l'évitement de la déshydratation observé chez des plantes prétraitées aux UV-C exposées à un stress hydrique, serait ABA-dépendante.

## 7 Conclusion

Ce travail de recherche de traitement d'élicitation dans un but d'enrichissement en métabolites secondaires n'a pas identifié de traitement efficace dans les conditions testées sur les variétés choisies. En revanche, une étude préliminaire de l'impact des traitements UV-C sur le métabolome des plants en condition de stress hydrique ou non, par une approche holistique sans hypothèse à *priori*, a montré l'implication de certains métabolites dans l'atténuation des symptômes métaboliques de stress hydrique, lorsque les plantes étaient prétraitées aux UV-C.

Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre l'étendue des effets des UV-C :

- Cinétique à la suite des traitements UV-C afin d'identifier les métabolites impliqués dans la réponse à court terme aux UV-C.
- Approfondissement de l'effet des UV-C sur les voies de signalisation liées à la SAR en comparant l'expression de gènes impliqués dans la mise en place de la SAR.
- Implication de l'ABA dans l'action des UV-C à travers l'utilisation de mutants déficients en ABA.

Les résultats préliminaires obtenus sont à confirmer en répétant les expériences, afin de vérifier la robustesse du résultat. L'emploi des UV-C dans ces conditions pourra être testé sur d'autres espèces afin de pouvoir donner une portée générale aux conclusions. Enfin, afin d'étudier les mécanismes



impliqués dans la réponse des plantes aux UV-C en condition de stress hydrique, un autre modèle de plante pourra être utilisé (*Arabidopsis*), largement caractérisé, permettant l'emploi facilité de mutants.

Ce travail a mis en évidence des applications directes pour ID4FEED. Les traitements d'élicitation testés n'ont pas permis d'atteindre le but d'augmentation des caroténoïdes et capsaïcinoïdes dans les fruits des variétés 'Habanero' et 'BJ' dans les conditions environnementales testées. Néanmoins, la divergence entre les réponses attendues et observées nous a permis de voir que les interactions sont nombreuses. La génétique conditionne une teneur de base en métabolites secondaires. Les modifications induites par les éliciteurs sont conditionnées par ce statut de base et par l'effet des conditions environnementales, ce qui engendre la nécessité pour ID4FEED, de faire des essais *in situ* afin de voir le comportement d'une variété dans un lieu donné avant d'envisager une technique d'élicitation.

A l'origine, l'élicitation visait uniquement l'augmentation des métabolites secondaires. Après les résultats obtenus, cette technique peut être envisagée par l'entreprise afin d'améliorer la tolérance aux stress abiotiques. Une meilleure tolérance aux stress abiotiques permettrait de pouvoir cultiver des plantes à fort taux de capsaïcinoïdes, sensibles aux conditions environnementales, dans des conditions de cultures stressantes ou simplement non adaptées à ces variétés, dans lesquelles la culture n'aurait pas été possible sans élicitation. L'élicitation dans ce cas-là, permettrait de maintenir le statut de base des variétés en réduisant l'impact que l'environnement peut avoir sur la croissance et les défenses de la plante.

Aucune variété ne possède toutes les caractéristiques idéales (bon rendement, fortes teneurs en capsaïcinoïdes et caroténoïdes, bonnes résistances aux stress biotiques, et bonne tolérance aux stress abiotiques). L'idée serait alors d'augmenter une ou plusieurs caractéristiques grâce à l'élicitation, pour profiter des autres qualités de la variété en question : augmenter la teneur en capsaïcinoïdes d'une variété avec un bon rendement, sécuriser la teneur en capsaïcinoïdes d'une variété à fort taux de capsaïcinoïdes quelles que soient les zones de production, ou encore améliorer le rendement en fruits d'une variété avec une forte teneur en capsaïcinoïdes.

Des essais avec les variétés choisies, dans les zones de production souhaitées, sont nécessaires et ont d'ores et déjà été mis en place au cours de la thèse par ID4FEED, à la suite des résultats obtenus.



## Références bibliographiques

- A Omolo M** (2014) Antimicrobial Properties of Chili Peppers. *J Infect Dis Ther.* doi: 10.4172/2332-0877.1000145
- Aarrouf J, Ben HD, Diot A, Bornard I, Lauri F, Urban L** (2022a) Flashes of UV-C light are perceived by UVR8, the photoreceptor of UV-B light. *J. Journal Of Plant Science and Phytopathology* **6**: 151–153
- Aarrouf J, Ben HD, Diot A, Bornard I, Lauri F, Urban L** (2022b) Flashes of UV-C light are perceived by UVR8, the photoreceptor of UV-B light. *J. Journal Of Plant Science and Phytopathology* **6**: 151–153
- Aarrouf J, Goncalves H, Ledermann L, Matton Y, Lizzi Y, Jungle S, Urban L** (2020) Stimulation des defenses du fraisier par les flashs d'UV-C. *Phytoma* **732**: 48–51
- Aarrouf J, Urban L** (2020a) Flashes of UV-C light: An innovative method for stimulating plant defences. *PLoS One* **15**: e0235918
- Aarrouf J, Urban L** (2020b) Flashes of UV-C light: An innovative method for stimulating plant defences. *PLOS ONE* **15**: e0235918
- Abd El-Hack ME, Alagawany M, Abdelnour S** (2019) Responses of growing rabbits to supplementing diet with a mixture of black and red pepper oils as a natural growth promoter. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **103**: 509–517
- Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, Gado AR, Nader MM, Saad AM, El-Tahan AM, Taha AE, Salem HM, El-Tarabily KA** (2022) Hot red pepper powder as a safe alternative to antibiotics in organic poultry feed: an updated review. *Poultry Science* **101**: 101684
- Abdelnour S, Alagawany M, Abd El-Hack ME, Sheiha AM, Saadeldin IM, Swelum AA** (2018) Growth, Carcass Traits, Blood Hematology, Serum Metabolites, Immunity, and Oxidative Indices of Growing Rabbits Fed Diets Supplemented with Red or Black Pepper Oils. *Animals* **8**: 168
- Abreu ME, Munné-Bosch S** (2008) Salicylic acid may be involved in the regulation of drought-induced leaf senescence in perennials: A case study in field-grown *Salvia officinalis* L. plants. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 105–112
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1968) Abscisic Acid: A New Name for Abscisin II (Dormin). *Science* **159**: 1493–1493
- Agarwal P, Das C, Dias O, Shanbhag T** (2017) Antimicrobial property of Capsaicin. *International research journal of biological sciences* **6**: 2278–3202
- Agathokleous E, Kitao M, Calabrese EJ** (2019) Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends in Plant Science* **24**: 318–327
- A.-H.-Mackerness S, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B** (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment* **22**: 1413–1423
- Ahmad I, Zhou G, Zhu G, Ahmad Z, Song X, Hao G, Jamal Y, Ibrahim MEH** (2021) Response of leaf characteristics of BT cotton plants to ratio of nitrogen, phosphorus and potassium. *PAKJBOT.* doi: 10.30848/PJB2021-3(33)
- Aizat WM, Able JA, Stangoulis JC, Able AJ** (2013) Characterisation of ethylene pathway components in non-climacteric capsicum. *BMC Plant Biol* **13**: 191
- Aksenov AA, Laponogov I, Zhang Z, Doran SLF, Belluomo I, Veselkov D, Bittremieux W, Nothias LF, Nothias-Esposito M, Maloney KN, et al** (2021) Auto-deconvolution and molecular networking of gas chromatography–mass spectrometry data. *Nat Biotechnol* **39**: 169–173

- Al Othman ZAA, Ahmed YBH, Habila MA, Ghafar AA** (2011) Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules* **16**: 8919–8929
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E** (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* **24**: 1337–1344
- Ali B** (2021) Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **31**: 101884
- Al-Kassie GAM, Butris GY, Ajeena SJ** (2012) THE POTENCY OF FEED SUPPLEMENTED MIXTURE OF HOT RED PEPPER AND BLACK PEPPER ON THE PERFORMANCE AND SOME HEMATOLOGICAL BLOOD TRAITS IN BROILER DIET. *Biology 2*:
- Almela L, Lopez-Roca JM, Candela ME, Alcazar MD** (1991) Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *J Agric Food Chem* **39**: 1606–1609
- Alscher RG, Hess JL** (1993) Antioxidants in Higher Plants, 1st ed. doi: 10.1201/9781315149899
- Altúzar-Molina AR, Muñoz-Sánchez JA, Vázquez-Flota F, Monforte-González M, Racagni-Di Palma G, Hernández-Sotomayor SMT** (2011) Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 151–158
- Aluru MR, Mazourek M, Landry LG, Curry J, Jahn M, O'Connell MA** (2003) Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J Exp Bot* **54**: 1655–1664
- Alvarez ME, Savouré A, Szabados L** (2022) Proline metabolism as regulatory hub. *Trends in Plant Science* **27**: 39–55
- Álvaro MM, Luis RR, Joaquin S de LP** (2019) The origins of zoopharmacognosy: how humans learned about self-medication from animals. *International Journal of Applied Research* **5**: 73–79
- Alvino A, Centritto M, Lorenzi FD** (1994) Photosynthesis Response of Sunlit and Shade Pepper (*Capsicum annuum*) Leaves at Different Positions in the Canopy Under Two Water Regimes. *Functional Plant Biol* **21**: 377–391
- Ambrózy Zs** (2016) Effect of net shading technology and harvest times on yield and fruit quality of sweet pepper. *Appl Ecol Env Res* **14**: 99–109
- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P** (2014a) Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **56**: 49–73
- Amorim-Carrilho KT, Cepeda A, Fente C, Regal P** (2014b) Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **56**: 49–73
- Ananthan R, Subhash K, Longvah T** (2018) Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). *Food Chem* **238**: 51–57
- Ananthan R, Subhash K, Longvah T** (2016) Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.073
- Andrade Cuvi MJ, Vicente AR, Concellón A, Chaves AR** (2011) Changes in red pepper antioxidants as affected by UV-C treatments and storage at chilling temperatures. *LWT - Food Science and Technology* **44**: 1666–1671
- Angeles G, Bond B, Boyer JS, Brodrigg T, Brooks JR, Burns MJ, Cavender-Bares J, Clearwater M, Cochard H, Comstock J, et al** (2004) The cohesion-tension theory. *New Phytologist* **163**: 451–452
- Angelova Z, Georgiev S, Roos W** (2006) Elicitation of Plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **20**: 72–83

- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373–399
- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N** (2015) Silencing AT3 gene reduces the expression of pAmt, BCAT, Kas, and Acl genes involved in capsaicinoid biosynthesis in chili pepper fruits. *Biologia plant* **59**: 477–484
- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N** (2017) An R2R3-MYB Transcription Factor Regulates Capsaicinoid Biosynthesis. *Plant Physiol* **174**: 1359–1370
- Arce-Rodríguez ML, Ochoa-Alejo N** (2019) Biochemistry and molecular biology of capsaicinoid biosynthesis: recent advances and perspectives. *Plant Cell Reports*. doi: 10.1007/s00299-019-02406-0
- Arruda P, Barreto P** (2020) Lysine Catabolism Through the Saccharopine Pathway: Enzymes and Intermediates Involved in Plant Responses to Abiotic and Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Atapattu N, Belpagodagamage UD** (2011) EFFECT OF DIETARY CHILLI POWDER ON GROWTH PERFORMANCE AND SERUM CHOLESTEROL CONTENTS OF BROILER CHICKEN. *Tropical Agricultural Research and Extension* **13**: 106–109
- Atkinson NJ, Dew TP, Orfila C, Urwin PE** (2011) Influence of Combined Biotic and Abiotic Stress on Nutritional Quality Parameters in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Agric Food Chem* **59**: 9673–9682
- Atlas RM** (2013) One Health: Its Origins and Future. *In* JS Mackenzie, M Jeggo, P Daszak, JA Richt, eds, *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases: The Concept and Examples of a One Health Approach*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–13
- van Aubel G, Cambier P, Dieu M, Van Cutsem P** (2016) Plant immunity induced by COS-OGA elicitor is a cumulative process that involves salicylic acid. *Plant Science* **247**: 60–70
- Avramova Z** (2015) Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal* **83**: 149–159
- Aziz ABA** (1968) Seasonal Changes in the Physical and Chemical Composition of Tomato Fruits as Affected by Nitrogen Levels. H. Veenman
- Bacanlı M, Başaran N** (2019) Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology* **125**: 462–466
- Backes TM, Rössler OG, Hui X, Grötzinger C, Lipp P, Thiel G** (2018) Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor. *Biochem Pharmacol* **150**: 160–169
- Badia AD, Spina AA, Vassalotti G** (2017) *Capsicum annuum* L.: An Overview of Biological Activities and Potential Nutraceutical Properties in Humans and Animals. *Journal of Nutritional Ecology and Food Research* **4**: 167–177
- Baka M, Mercier J, Corcuff R, Castaigne F, Arul J** (1999) Photochemical Treatment to Improve Storability of Fresh Strawberries. *Journal of Food Science* **64**: 1068–1072
- Bandurska H, Cieślak M** (2013) The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany* **94**: 9–18
- Barbero G, Aguiar A, Carrera C, Olachea Á, Ferreira-González M, Martínez J, Palma M, Barroso C** (2016) Evolution of Capsaicinoids in Peter Pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) During Fruit Ripening. *Chemistry & Biodiversity*. doi: 10.1002/cbdv.201500503
- Barbero GF, Liazid A, Palma M, Barroso CG** (2008) Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta* **75**: 1332–1337
- Barbero GF, Ruiz AG, Liazid A, Palma M, Vera JC, Barroso CG** (2014) Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry* **153**: 200–206

- Bartley GE, Scolnik PA** (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**: 1027–1038
- Batiha GE-S, Alqahtani A, Ojo OA, Shaheen HM, Wasef L, Elzeiny M, Ismail M, Shalaby M, Murata T, Zaragoza-Bastida A, et al** (2020) Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some Capsicum spp. and Capsaicinoids. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 5179
- Beckers GJM, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S, Conrath U** (2009) Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **21**: 944–953
- Berens ML, Wolinska KW, Spaepen S, Ziegler J, Nobori T, Nair A, Krüler V, Winkel Müller TM, Wang Y, Mine A, et al** (2019a) Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 2364–2373
- Berens ML, Wolinska KW, Spaepen S, Ziegler J, Nobori T, Nair A, Krüler V, Winkel Müller TM, Wang Y, Mine A, et al** (2019b) Balancing trade-offs between biotic and abiotic stress responses through leaf age-dependent variation in stress hormone cross-talk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**: 2364–2373
- Bernal MA, Calderon AA, Pedreno MA, Munoz Romualdo, Ros Barcelo A, Merino de Caceres F** (1993) Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annum* (variety *Annum*) fruits. *J Agric Food Chem* **41**: 1041–1044
- Bernsdorff F, Döring A-C, Gruner K, Schuck S, Bräutigam A, Zeier J** (2016) Pipecolic Acid Orchestrates Plant Systemic Acquired Resistance and Defense Priming via Salicylic Acid-Dependent and -Independent Pathways. *Plant Cell* **28**: 102–129
- Biacs PA, Daood HG, Pavis A, Hajdu F** (1989) Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L.var Sz-20). *J Agric Food Chem* **37**: 350–353
- Binotti EDC, Costa E, Binotti FF da S, Batista TB** (2018) CHEMICAL AGENTS AND SHADING LEVELS FOR THE PRODUCTION OF PEPPER SEEDLINGS. *Eng Agríc* **38**: 450–456
- Bintsis T, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK** (2000) Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 637–645
- Bishop NI** (1961) The Possible Rôle of Plastoquinone (Q-254) in the Electron Transport System of Photosynthesis. *Ciba Foundation Symposium - Endocrinology of the Testis (Colloquia on Endocrinology)*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 385–424
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489–504
- Blum A, Tuberosa R** (2018) Dehydration survival of crop plants and its measurement. *J Exp Bot* **69**: 975–981
- Böcker S** (2017) Searching molecular structure databases using tandem MS data: are we there yet? *Current Opinion in Chemical Biology* **36**: 1–6
- Bond BJ** (2000) Age-related changes in photosynthesis of woody plants. *Trends in Plant Science* **5**: 349–353
- Borghesi E, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Malorgio F, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ** (2011) Effects of Salinity Stress on Carotenoids, Anthocyanins, and Color of Diverse Tomato Genotypes. *J Agric Food Chem* **59**: 11676–11682
- Bornman JF, Evert RF, Mierzwa RJ** (1983) The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma* **117**: 7–16
- Bosland PW** (1994) Chile: History, cultivation and uses. *Spices, Herbs and Edible Fungi*

- Bosland PW, Baral JB** (2007) 'Bhut Jolokia'—The World's Hottest Known Chile Pepper is a Putative Naturally Occurring Interspecific Hybrid. *HortScience* **42**: 222–224
- Bosland PW, Coon D, Cooke PH** (2015) Novel Formation of Ectopic (Nonplacental) Capsaicinoid Secreting Vesicles on Fruit Walls Explains the Morphological Mechanism for Super-hot Chile Peppers. *J Amer Soc Hort Sci* **140**: 253–256
- Bossi F, Cordoba E, Dupré P, Mendoza MS, Román CS, León P** (2009) The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant Journal* **59**: 359–374
- Bostock RM, Pye MF, Roubtsova TV** (2014) Predisposition in Plant Disease: Exploiting the Nexus in Abiotic and Biotic Stress Perception and Response. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 517–549
- Bouvier F, Backhaus RA, Camara B** (1998) Induction and Control of Chromoplast-specific Carotenoid Genes by Oxidative Stress. *J Biol Chem* **273**: 30651–30659
- Bouvier F, Hugueney P, D'Harlingue A, Kuntz M, Camara B** (1994) Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *The Plant Journal* **6**: 45–54
- Bravo S, García-Alonso J, Martín-Pozuelo G, Gómez V, García-Valverde V, Navarro-González I, Periago MJ** (2013) Effects of postharvest UV-C treatment on carotenoids and phenolic compounds of vine-ripe tomatoes. *International Journal of Food Science & Technology* **48**: 1744–1749
- Brederode FTh, Linthorst HJM, Bol JF** (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* **17**: 1117–1125
- Breithaupt DE** (2007) Modern application of xanthophylls in animal feeding – a review. *Trends in Food Science & Technology* **18**: 501–506
- Breithaupt DE, Schwack W** (2000) Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annum* L.) by LC/MS. *European Food Research and Technology* **211**: 52–55
- Brevet FR3100955** déposé le 24/09/2019 aux noms de ID4FEED et de l'Universidad Autónoma de Querétaro et relatif à un « PROCÉDE D'ELICITATION CONTROLÉE DE PLANTS DE PIMENT DURANT LEUR CULTURE POUR AUGMENTER LEUR SYNTHÈSE DE MÉTABOLITES SECONDAIRES D'INTERET INDUSTRIEL »
- Britton G** (1996) Carotenoids. In GAF Hendry, JD Houghton, eds, *Natural Food Colorants*. Springer US, Boston, MA, pp 197–243
- Britton G** (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal* **9**: 1551–1558
- Britton G, Young AJ** (1993) Methods for the isolation and analysis of carotenoids. In AJ Young, G Britton, eds, *Carotenoids in Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 409–457
- Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW** (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* **56**: 323–336
- Brown BA, Jenkins GI** (2008) UV-B Signaling Pathways with Different Fluence-Rate Response Profiles Are Distinguished in Mature Arabidopsis Leaf Tissue by Requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiology* **146**: 323–324
- Brychkova G, Alikulov Z, Fluhr R, Sagi M** (2008) A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. *Plant J* **54**: 496–509

- Bunea A, Socaciu C, Pinteá A** (2014) Xanthophyll Esters in Fruits and Vegetables. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **42**: 310–324
- Buswell W, Schwarzenbacher RE, Luna E, Sellwood M, Chen B, Flors V, Pétriacq P, Ton J** (2018) Chemical priming of immunity without costs to plant growth. *New Phytol* **218**: 1205–1216
- Buttery RG, Teranishi R, Ling LC, Flath RA, Stern DJ** (1988) Quantitative studies on origins of fresh tomato aroma volatiles. *J Agric Food Chem* **36**: 1247–1250
- Caicedo-Lopez LH, Guevara-Gonzalez RG, Ramirez-Jimenez AK, Feregrino-Perez AA, Contreras-Medina LM** (2022) Eustress application through-controlled elicitation strategies as an effective agrobiotechnology tool for capsaicinoids increase: a review. *Phytochem Rev* **21**: 1941–1968
- Camacho IS, Theisen A, Johannissen LO, Díaz-Ramos LA, Christie JM, Jenkins GI, Bellina B, Barran P, Jones AR** (2019) Native mass spectrometry reveals the conformational diversity of the UVR8 photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 1116–1125
- Camara B** (1984) Terpenoid Metabolism in Plastids. *Plant Physiol* **74**: 112–116
- Camara B** (1985) Prenylation of chlorophyllide a in *Capsicum* plastids. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 274–281
- Camara B, Brangeon J** (1981) Carotenoid metabolism during chloroplast to chromoplast transformation in *Capsicum annuum* fruit. *Planta* **151**: 359–364
- Camara B, Monéger R** (1978) Free and esterified carotenoids in green and red fruits of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry* **17**: 91–93
- Campa C, Urban L, Mondolot L, Fabre D, Roques S, Lizzi Y, Aarouf J, Doubeau S, Breitler J-C, Letrez C, et al** (2017) Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase. *Front Plant Sci* **8**: 1126
- Campos H, Trejo C, Peña-Valdivia CB, García-Nava R, Conde-Martínez FV, Cruz-Ortega MR** (2014) Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environmental and Experimental Botany* **98**: 56–64
- Campos MRS, Gómez KR, Ordoñez YM, Ancona DB** (2013) Polyphenols, Ascorbic Acid and Carotenoids Contents and Antioxidant Properties of Habanero Pepper (*Capsicum chinense*) Fruit. doi: 10.4236/fns.2013.48A006
- Canto-Flick A, Balam-Uc E, Bello-Bello JJ, Lecona-Guzmán C, Solís-Marroquín D, Avilés-Viñas S, Gómez-Uc E, López-Puc G, Santana-Buzzy N, Iglesias-Andreu LG** (2008) Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest Known Cultivars. *HortScience*: a publication of the American Society for Horticultural Science
- Casati P, Walbot V** (2004) Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biol* **5**: R16
- Casierra-Posada F, Matallana-Díaz YA, Zapata-Casierra E** (2014) Growth of bell pepper plants (*Capsicum annuum*) affected by coloured covers. *Gesunde Pflanzen* **66**: 149–155
- Castillejo N, Martínez-Zamora L, Artés-Hernández F** (2022) Postharvest UV radiation enhanced biosynthesis of flavonoids and carotenes in bell peppers. *Postharvest Biology and Technology* **184**: 111774
- Catchpole GS, Beckmann M, Enot DP, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, Hardy N, Smith A, King RD, Kell DB, et al** (2005) Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 14458–14462
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D** (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**: 816–824
- Chaleckis R, Meister I, Zhang P, Wheelock CE** (2019) Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **55**: 44–50

- Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A, Bley K** (2008) In Vitro Hepatic and Skin Metabolism of Capsaicin. *Drug Metab Dispos* **36**: 670–675
- Charles MT, Mercier J, Makhoul J, Arul J** (2008) Physiological basis of UV-C-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit: I. Role of pre- and post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. *Postharvest Biology and Technology* **47**: 10–20
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS** (2003) Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biol* **30**: 239
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osorio ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C** (2002) How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Annals of Botany* **89**: 907–916
- Chen H-C, Klein A, Xiang M, Backhaus RA, Kuntz M** (1998) Drought- and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *The Plant Journal* **14**: 317–326
- Chen Y-C, Holmes EC, Rajniak J, Kim J-G, Tang S, Fischer CR, Mudgett MB, Sattely ES** (2018) N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: E4920–E4929
- Christians U, Klepacki J, Shokati T, Klawitter J, Klawitter J** (2012) Mass Spectrometry-Based Multiplexing for the Analysis of Biomarkers in Drug Development and Clinical Diagnostics- How Much is too Much? *Microchem J* **105**: 32–38
- Cipollini ML, Levey DJ** (1997) Secondary Metabolites of Fleshy Vertebrate-Dispersed Fruits: Adaptive Hypotheses and Implications for Seed Dispersal. *The American Naturalist* **150**: 346–372
- Cochard H, Forestier S, Améglio T** (2001) A new validation of the Scholander pressure chamber technique based on stem diameter variations. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1361–1365
- Cohn J, Sessa G, Martin GB** (2001) Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology* **13**: 55–62
- Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW** (1995) Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience* **30**: 137–139
- Conforti F, Statti GA, Menichini F** (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry* **102**: 1096–1104
- Conrath U** (2011a) Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science* **16**: 524–531
- Conrath U** (2011b) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci* **16**: 524–531
- Conrath U, Beckers GJM, Langenbach CJG, Jaskiewicz MR** (2015) Priming for Enhanced Defense. *Annu Rev Phytopathol* **53**: 97–119
- Contreras-Padilla M, Yahia EM** (1998) Changes in Capsaicinoids during Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 2075–2079
- Couto D, Zipfel C** (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* **16**: 537–552
- Cunningham FX, Gantt E** (1998) Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 557–583
- Curry J, Aluru M, Mendoza M, Nevarez J, Melendrez M, O'Connell MA** (1999) Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science* **148**: 47–57
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 651–679

- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L** (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* **33**: 1419–1438
- Danon A, Gallois P** (1998) UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **437**: 131–136
- Darras AI, Bali I, Argyropoulou E** (2015) Disease resistance and growth responses in *Pelargonium hortorum* plants to brief pulses of UV-C irradiation. *Scientia Horticulturae* **181**: 95–101
- Daszkowska-Golec A** (2016) The Role of Abscisic Acid in Drought Stress: How ABA Helps Plants to Cope with Drought Stress. In MA Hossain, SH Wani, S Bhattacharjee, DJ Burritt, L-SP Tran, eds, *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2: Molecular and Genetic Perspectives*. Springer International Publishing, Cham, pp 123–151
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* **57**: 779–795
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO** (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**: 4022–4034
- De AK** (2003) *Capsicum: The genus Capsicum*. CRC Press
- Deepa N, Kaur C, George B, Singh B, Kapoor HC** (2007) Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT - Food Science and Technology* **40**: 121–129
- Delfine S, Tognetti R, Loreto F, Alvino A** (2002) Physiological and growth responses to water stress in Field-grown bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **77**: 697–704
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O** (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40**: 173–289
- Deli J, Matus Z, Tóth G** (2000) Carotenoid Composition in the Fruits of *Asparagus officinalis*. *J Agric Food Chem* **48**: 2793–2796
- Deli J, Molnár P, Matus Z, Tóth G** (2001) Carotenoid Composition in the Fruits of Red Paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during Ripening; Biosynthesis of Carotenoids in Red Paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 1517–1523
- Demarque DP, Dusi RG, de Sousa FDM, Grossi SM, Silvério MRS, Lopes NP, Espindola LS** (2020) Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. *Sci Rep* **10**: 1051
- Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballaré CL** (2010) Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiol* **152**: 1084–1095
- Demkura PV, Ballaré CL** (2012) UVR8 mediates UV-B-induced *Arabidopsis* defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation. *Mol Plant* **5**: 642–652
- Demmig-Adams B, Adams WW** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**: 21–26
- Deruère J, Römer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B** (1994) Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell* **6**: 119–133
- Díaz J, Pomar F, Bernal A, Merino F** (2004) Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews* **3**: 141–157
- Ding Y, Dommel M, Mou Z** (2016a) Abscisic acid promotes proteasome-mediated degradation of the transcription coactivator NPR1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **86**: 20–34

- Ding Y, Dommel M, Mou Z** (2016b) Abscisic acid promotes proteasome-mediated degradation of the transcription coactivator NPR1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **86**: 20–34
- Ding Y, Sun T, Ao K, Peng Y, Zhang Y, Li X, Zhang Y** (2018) Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* **173**: 1454–1467.e15
- Dixon RA, Dey PM, Murphy DL, Whitehead IM** (1981) Dose responses for *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-mediated enzyme induction in French bean cell suspension cultures. *Planta* **151**: 272–280
- Dogbo O, Camara B** (1987) Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **920**: 140–148
- Douma JC, Vermeulen PJ, Poelman EH, Dicke M, Anten NPR** (2017) When does it pay off to prime for defense? A modeling analysis. *New Phytol* **216**: 782–797
- Driessche JJ van den, Plat J, Mensink RP** (2018) Effects of superfoods on risk factors of metabolic syndrome: a systematic review of human intervention trials. *Food Funct* **9**: 1944–1966
- Du L, Tian Q, Yu T, Meng Q, Jancso T, Udvardy P, Huang Y** (2013) A comprehensive drought monitoring method integrating MODIS and TRMM data. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* **23**: 245–253
- Duelund L, Mouritsen OG** (2017) Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. *Food Chemistry* **221**: 913–918
- Dumont D, Danielato G, Chastellier A, Hibrand Saint Oyant L, Fanciullino A-L, Lugan R** (2020) Multi-Targeted Metabolic Profiling of Carotenoids, Phenolic Compounds and Primary Metabolites in Goji (*Lycium* spp.) Berry and Tomato (*Solanum lycopersicum*) Reveals Inter and Intra Genus Biomarkers. *Metabolites* **10**: 422
- Ekesa B, Poulaert M, Davey MW, Kimiywe J, Bergh IV den, Blomme G, Dhuique-Mayer C** (2012) Bioaccessibility of provitamin A carotenoids in bananas (*Musa* spp.) and derived dishes in African countries. *Food Chemistry* **133**: 1471–1477
- Eldeeb MA, Metwally MA, Galal AE** (2006) The impact of botanical extract, capsicum (*Capsicum frutescens* L), oil supplementation and their interactions on the productive performance of broiler chicks. EPC 2006 - 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 September, 2006
- Elwan MWM, El-Hamahmy MAM** (2009) Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse pepper. *Scientia Horticulturae* **122**: 521–526
- Epler KS, Sander LC, Ziegler RG, Wise SA, Craft NE** (1992) Evaluation of reversed-phase liquid chromatographic columns for recovery and selectivity of selected carotenoids. *Journal of Chromatography A* **595**: 89–101
- Erdost H, Ozer A, Yakisik M, Ozfiliz N, Zik B** (2006) FSH and LH cells in the laying hens and cocks, fed with a diet containing red hot pepper. *Journal of Food Agriculture and Environment* **4**: 119
- Eroglu A, Harrison EH** (2013) Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *Journal of Lipid Research* **54**: 1719–1730
- Errard A, Ulrichs C, Kühne S, Mewis I, Drungowski M, Schreiner M, Baldermann S** (2015) Single- versus Multiple-Pest Infestation Affects Differently the Biochemistry of Tomato (*Solanum lycopersicum* 'Ailsa Craig'). *J Agric Food Chem* **63**: 10103–10111
- Escalante-Magaña C, Aguilar-Caamal LF, Echevarría-Machado I, Medina-Lara F, Cach LS, Martínez-Estévez M** (2019a) Contribution of Glycine Betaine and Proline to Water Deficit Tolerance in Pepper Plants. *horts* **54**: 1044–1054

- Escalante-Magaña C, Aguilar-Caamal LF, Echevarría-Machado I, Medina-Lara F, Cach LS, Martínez-Estévez M** (2019b) Contribution of Glycine Betaine and Proline to Water Deficit Tolerance in Pepper Plants. *HortScience* **54**: 1044–1054
- Escobar-Bravo R, Chen G, Kim HK, Grosser K, van Dam NM, Leiss KA, Klinkhamer PGL** (2019) Ultraviolet radiation exposure time and intensity modulate tomato resistance to herbivory through activation of jasmonic acid signaling. *J Exp Bot* **70**: 315–327
- Escobar-Bravo R, Nederpel C, Naranjo S, Kim HK, Rodríguez-López MJ, Chen G, Glauser G, Leiss KA, Klinkhamer PGL** (2021) Ultraviolet radiation modulates both constitutive and inducible plant defenses against thrips but is dose and plant genotype dependent. *J Pest Sci* **94**: 69–81
- Estrada B, Bernal MA, Díaz J, Pomar F, Merino F** (2002) Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annuum* L. in Relation to Fruiting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 1188–1191
- Evrard P, Bellamy, Berry, Buffiere, Capy, Dumoulin, Guillou, Hutin, Izard** (2002) Le poivron, CTIFL.
- Fabela-Morón MF, Cuevas-Bernardino JC, Ayora-Talavera T, Pacheco N** (2020) Trends in Capsaicinoids Extraction from Habanero Chili Pepper (*Capsicum Chinense* Jacq.): Recent Advanced Techniques. *Food Reviews International* **36**: 105–134
- Fanciullino AL, Bidel LPR, Urban L** (2014) Carotenoid responses to environmental stimuli: integrating redox and carbon controls into a fruit model. *Plant, Cell & Environment* **37**: 273–289
- Fanciullino A-L, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P** (2006) Carotenoid Diversity in Cultivated Citrus Is Highly Influenced by Genetic Factors. *J Agric Food Chem* **54**: 4397–4406
- Fanciullino A-L, Gautier H** (2014) Enrichissement des fruits charnus en caroténoïdes: exemple de la tomate et des agrumes. 14
- Fang Y, Xiong L** (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences* **72**: 673–689
- Favory J-J, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravec A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ, et al** (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J* **28**: 591–601
- Fayos O, De Aguiar AC, Jiménez-Cantizano A, Ferreiro-González M, Garcés-Claver A, Martínez J, Mallor C, Ruiz-Rodríguez A, Palma M, Barroso CG, et al** (2017) Ontogenetic Variation of Individual and Total Capsaicinoids in Malagueta Peppers (*Capsicum frutescens*) during Fruit Maturation. *Molecules* **22**: 736
- Finger FL, Pereira GM** (2016) Physiology and Postharvest of Pepper Fruits. *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum spp.)*. Springer International Publishing, Cham, pp 27–40
- Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M** (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* **127**: 343–352
- Florencio-Ortiz V, Sellés-Marchart S, Zubcoff-Vallejo J, Jander G, Casas JL** (2018) Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLOS ONE* **13**: e0198093
- Flores P, Navarro JM, Garrido C, Rubio JS, Martínez V** (2004) Influence of Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> and NO<sub>3</sub>-fertilisation on nutritional quality of pepper. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 569–574
- Flores-Sánchez JJ, Ortega-López J, Montes-Horcasitas M del C, Ramos-Valdivia AC** (2002) Biosynthesis of Sterols and Triterpenes in Cell Suspension Cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant Cell Physiol* **43**: 1502–1509
- Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R** (2009) (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**: 344–350

- Forges M, Bardin M, Urban L, Aarrouf J, Charles F** (2020) Impact of UV-C Radiation Applied during Plant Growth on Pre- and Postharvest Disease Sensitivity and Fruit Quality of Strawberry. *Plant Disease* PDIS-02-20-0306-RE
- Forges M, Vàsquez H, Charles F, Sari DC, Urban L, Lizzi Y, Bardin M, Aarrouf J** (2018) Impact of UV-C radiation on the sensitivity of three strawberry plant cultivars (*Fragaria x ananassa*) against *Botrytis cinerea*. *Scientia Horticulturae* **240**: 603–613
- Frank HA, Cogdell R** (1996) Carotenoids in Photosynthesis. *Photochemistry and photobiology* **63**: 257–264
- Fraser PD, Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* **43**: 228–265
- Fraser PD, Truesdale MR, Bird CR, Schuch W, Bramley PM** (1994) Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol* **105**: 405–413
- Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM** (2008) Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. *Plant Physiol* **146**: 818–824
- Fu X, Cheng S, Feng C, Kang M, Huang B, Jiang Y, Duan X, Grierson D, Yang Z** (2019) Lycopene cyclases determine high  $\alpha$ -/ $\beta$ -carotene ratio and increased carotenoids in bananas ripening at high temperatures. *Food Chemistry* **283**: 131–140
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 436–442
- Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K** (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues in *Capsicum* fruit II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant Cell Physiol* **21**: 1023–1030
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* **261**: 754–756
- Galili G, Tang G, Zhu X, Gakiere B** (2001) Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 261–266
- Garcia-Mier L, Jimenez-Garcia SN, Guevara-González RG, Feregrino-Perez AA, Contreras-Medina LM, Torres-Pacheco I** (2015) Elicitor Mixtures Significantly Increase Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Quality Parameters in Sweet Bell Pepper. *Journal of Chemistry* **2015**: e269296
- García-Plazaola JI, Esteban R, Fernández-Marín B, Kranner I, Porcar-Castell A** (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the *Arabidopsis* model. *Photosynth Res* **113**: 89–103
- Garruña-Hernández R, Monforte-González M, Canto-Aguilar A, Vázquez-Flota F, Orellana R** (2013) Enrichment of carbon dioxide in the atmosphere increases the capsaicinoids content in Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **93**: 1385–1388
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J** (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**: 263–285
- Gautier H, Rocci A, Buret M, Grasselly D, Dumas Y, Causse M** (2005) Effect of photoselective filters on the physical and chemical traits of vine-ripened tomato fruits. *Can J Plant Sci* **85**: 439–446
- GEVES** (2022) Le Catalogue officiel des espèces et variétés de plantes cultivées en France. GEVES
- Giuffrida D, Dugo P, Torre G, Bignardi C, Cavazza A, Corradini C, Dugo G** (2014) Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. *Food Research International* **65**: 163–170

- Giuffrida D, Dugo P, Torre G, Bignardi C, Cavazza A, Corradini C, Dugo G** (2013) Characterization of 12 Capsicum varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry* **140**: 794–802
- Giuliano G, Bartley GE, Scolnik PA** (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**: 379–387
- Goda Y, Sakamoto S, Nakanishi T, Maitani T, Yamada T** (1995) Identification of monoesterified capsanthin in paprika (*Capsicum annuum*): the nature of esterification of capsanthin. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **43**: 1248–1250
- Goellner K, Conrath U** (2008) Priming: it's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* **121**: 233–242
- Goltsev VN, Kalaji HM, Paunov M, Bąba W, Horaczek T, Mojski J, Kociel H, Allakhverdiev SI** (2016) Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ J Plant Physiol* **63**: 869–893
- Gómez-García M, Ochoa-Alejo N** (2013) Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *IJMS* **14**: 19025–19053
- González-Zamora A, Sierra-Campos E, Luna-Ortega JG, Pérez-Morales R, Ortiz JCR, García-Hernández JL** (2013) Characterization of Different Capsicum Varieties by Evaluation of Their Capsaicinoids Content by High Performance Liquid Chromatography, Determination of Pungency and Effect of High Temperature. *Molecules* **18**: 13471–13486
- Goodwin T** (1980) *The Biochemistry of the Carotenoids: Volume I Plants*. Springer Science & Business Media
- Goszcz K, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL** (2017) Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *Br J Pharmacol* **174**: 1209–1225
- Goto K, Yabuta S, Ssenyonga P, Tamaru S, Sakagami J-I** (2021) Response of leaf water potential, stomatal conductance and chlorophyll content under different levels of soil water, air vapor pressure deficit and solar radiation in chili pepper (*Capsicum chinense*). *Scientia Horticulturae* **281**: 109943
- Govindjee** (1995) 63 Years since Kautsky-chlorophyll-a fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 131–160
- Grant JJ, Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* **124**: 21–29
- Grassi S, Piro G, Lee JM, Zheng Y, Fei Z, Dalessandro G, Giovannoni JJ, Lenucci MS** (2013) Comparative genomics reveals candidate carotenoid pathway regulators of ripening watermelon fruit. *BMC Genomics* **14**: 781
- Grigoletto NTS, Takiya CS, Bugoni M, Nunes AT, Junior PCV, Chesini RG, da Silva GG, Mariane dos Santos F, Rennó FP** (2023) Influence of encapsulated pepper on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and performance in dairy cows. *Livestock Science* **267**: 105140
- Gruner K, Griebel T, Návarová H, Attaran E, Zeier J** (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* **4**:
- Guo D I., Wang Z g., Li Q, Gu S c., Zhang G h., Yu Y h.** (2019) Hydrogen peroxide treatment promotes early ripening of Kyoho grape. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **25**: 357–362
- Gupta P, Sreelakshmi Y, Sharma R** (2015) A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods* **11**: 5
- Gurung T, Techawongstien S, Suriharn B, Techawongstien S** (2011) Impact of Environments on the Accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* spp. *horts* **46**: 1576–1581

- Gurung T, Techawongstien S, Suriharn B, Techawongstien S** (2012) Stability analysis of yield and capsaicinoids content in chili (*Capsicum* spp.) grown across six environments. *Euphytica* **187**: 11–18
- Gururaj HB, Giridhar P, Ravishankar GA** (2012) Laminarin as a potential non-conventional elicitor for enhancement of capsaicinoid metabolites. 6
- Gutiérrez-Carbajal MG, Monforte-González M, Miranda-Ham M de L, Godoy-Hernández G, Vázquez-Flota F** (2010) Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate. *BIOLOGIA PLANTARUM* **54**: 430–434
- Ha S-H, Kim J-B, Park J-S, Lee S-W, Cho K-J** (2007) A comparison of the carotenoid accumulation in *Capsicum* varieties that show different ripening colours: deletion of the capsanthin-capsorubin synthase gene is not a prerequisite for the formation of a yellow pepper. *Journal of Experimental Botany* **58**: 3135–3144
- Haak DC, McGinnis LA, Levey DJ, Tewksbury JJ** (2012) Why are not all chilies hot? A trade-off limits pungency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 2012–2017
- Hagen SF, Borge GIA, Bengtsson GB, Bilger W, Berge A, Haffner K, Solhaug KA** (2007) Phenolic contents and other health and sensory related properties of apple fruit (*Malus domestica* Borkh., cv. Aroma): Effect of postharvest UV-B irradiation. *Postharvest Biology and Technology* **45**: 1–10
- Haggag WM** (2015) Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **7**: 882–889
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW** (2000) HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* **19**: 4997–5006
- Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F, Reichel-Deland V, Kim D, Hohmann M, Scholten N, Schuck S, Bräutigam A, Hölzel T, et al** (2018a) Flavin Monooxygenase-Generated N-Hydroxy-pipecolic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* **173**: 456–469.e16
- Hartmann M, Zeier T, Bernsdorff F, Reichel-Deland V, Kim D, Hohmann M, Scholten N, Schuck S, Bräutigam A, Hölzel T, et al** (2018b) Flavin Monooxygenase-Generated N-Hydroxy-pipecolic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* **173**: 456–469.e16
- Hasan SA, Irfan Mohd, Masrahi YS, Khalaf MA, Hayat S** (2016) Growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Vigna unguiculata* L. treated with hydrogen peroxide. *Cogent Food & Agriculture* **2**: 1155331
- Hayes S, Velanis CN, Jenkins GI, Franklin KA** (2014) UV-B detected by the UVR8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 11894–11899
- Hayman M, Kam PCA** (2008) Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care* **19**: 338–343
- Hectors K, Prinsen E, De Coen W, Jansen MAK, Guisez Y** (2007a) *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist* **175**: 255–270
- Hectors K, Prinsen E, De Coen W, Jansen MAK, Guisez Y** (2007b) *Arabidopsis thaliana* plants acclimated to low dose rates of ultraviolet B radiation show specific changes in morphology and gene expression in the absence of stress symptoms. *New Phytologist* **175**: 255–270
- Heijde M, Ulm R** (2012) UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science* **17**: 230–237
- Heijde M, Ulm R** (2013) Reversion of the *Arabidopsis* UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 1113–1118

- Hempel J, Schädle CN, Sprenger J, Heller A, Carle R, Schweiggert RM** (2017) Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). *Food Chemistry* **218**: 525–533
- Herms DA, Mattson WJ** (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The quarterly review of biology* **67**: 283–335
- Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megías MD** (2004) Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size<sup>1</sup>. *Poultry Science* **83**: 169–174
- Hieber AD, Bugos RC, Yamamoto HY** (2000) Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1482**: 84–91
- Higashiguchi F, Nakamura H, Hayashi H, Kometani T** (2006) Purification and Structure Determination of Glucosides of Capsaicin and Dihydrocapsaicin from Various Capsicum Fruits. *J Agric Food Chem* **54**: 5948–5953
- Hirayama O, Nakamura K, Hamada S, Kobayasi Y** (1994) Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids* **29**: 149–150
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 210–218
- Hohrenk LL, Itzel F, Baetz N, Tuerk J, Vosough M, Schmidt TC** (2020) Comparison of Software Tools for Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Data Processing in Nontarget Screening of Environmental Samples. *Anal Chem* **92**: 1898–1907
- Höll J, Lindner S, Walter H, Joshi D, Poschet G, Pflieger S, Ziegler T, Hell R, Bogs J, Rausch T** (2019) Impact of pulsed UV-B stress exposure on plant performance: How recovery periods stimulate secondary metabolism while reducing adaptive growth attenuation. *Plant Cell Environ* **42**: 801–814
- Hornero-Méndez D, Gómez-Ladrón de Guevara R, Mínguez-Mosquera MI** (2000) Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars during Ripening. Cultivar Selection for Breeding. *J Agric Food Chem* **48**: 3857–3864
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI** (2000) Xanthophyll Esterification Accompanying Carotenoid Overaccumulation in Chromoplast of *Capsicum annuum* Ripening Fruits Is a Constitutive Process and Useful for Ripeness Index. *J Agric Food Chem* **48**: 1617–1622
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI** (2001) Rapid Spectrophotometric Determination of Red and Yellow Isochromic Carotenoid Fractions in Paprika and Red Pepper Oleoresins. *J Agric Food Chem* **49**: 3584–3588
- Horváth E, Szalai G, Janda T** (2007) Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *J Plant Growth Regul* **26**: 290–300
- Howard LR, Talcott ST, Brenes CH, Villalon B** (2000) Changes in Phytochemical and Antioxidant Activity of Selected Pepper Cultivars (*Capsicum* Species) As Influenced by Maturity. *J Agric Food Chem* **48**: 1713–1720
- Howitz KT, Sinclair DA** (2008) Xenohormesis: Sensing the Chemical Cues of Other Species. *Cell* **133**: 387–391
- Hu Y, Poh HM, Chua N-H** (2006) The Arabidopsis ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *Plant J* **47**: 1–9
- Huang T, Jander G** (2017) Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **246**: 737–747
- Huguene P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J** (1996) Developmental and Stress Regulation of Gene Expression for Plastid and Cytosolic Isoprenoid Pathways in Pepper Fruits'. **8**

- Huguenev P, Römer S, Kuntz M, Camara B** (1992) Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and  $\zeta$ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *European Journal of Biochemistry* **209**: 399–407
- Huh JH, Kang BC, Nahm SH, Kim S, Ha KS, Lee MH, Kim BD** (2001) A candidate gene approach identified phytoene synthase as the locus for mature fruit color in red pepper (*Capsicum* spp.). *Theor Appl Genet* **102**: 524–530
- van Hulst M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J** (2006a) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5602–5607
- van Hulst M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J** (2006b) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5602–5607
- Hurtado-Hernandez H, Smith PG** (1985) Inheritance of mature fruit color in *Capsicum annuum* L. *Journal of Heredity* **76**: 211–213
- Hussain F, Abid M** (2011) Pests and diseases of chilli crop in Pakistan: A review. *International Journal of Biology and Biotechnology (Pakistan)*
- Ileke KD, Bulus DS, Aladegoroye AY** (2013) Effects of three medicinal plant products on survival, oviposition and progeny development of cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Chrysomelidae] infesting cowpea seeds in storage. *Jordan Journal of Biological Science* **6**: 61–66
- Ilyas M, Nisar M, Khan N, Hazrat A, Khan AH, Hayat K, Fahad S, Khan A, Ullah A** (2021) Drought Tolerance Strategies in Plants: A Mechanistic Approach. *J Plant Growth Regul* **40**: 926–944
- Indrabi SA, Malik AA, Hussain K, Malik G, Narayan S, Akhter A, Sultan A, Javeed I, Rashid M** (2022) Evaluation of Chilli (*Capsicum annuum* L.) Genotypes for Growth and Yield Attributing Traits. *Journal of Community Mobilization and Sustainable Development* **17**:
- Isah T** (2019) Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* **52**: 39
- Islam MA, Sharma SS, Sinha P, Negi MS, Neog B, Tripathi SB** (2015) Variability in capsaicinoid content in different landraces of *Capsicum* cultivated in north-eastern India. *Scientia Horticulturae* **183**: 66–71
- Iwai K, Lee K-R, Kobashi M, Suzuki T** (1977a) Formation of Pungent Principles in Fruits of Sweet Pepper, *Capsicum annuum* L. var. *grossum* during Post-harvest Ripening under Continuous Light. *Agricultural and Biological Chemistry* **41**: 1873–1876
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H** (1979a) Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at Different Growth Stages after Flowering. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**: 2493–2498
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H** (1979b) Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at Different Growth Stages after Flowering. *Agricultural and Biological Chemistry* **43**: 2493–2498
- Iwai K, Suzuki T, Lee K-R, Kobashi M, Oka S** (1977b) In Vivo and In Vitro Formation of Dihydrocapsaicin in Sweet Pepper Fruits, *Capsicum annuum* L. var. *grossum*. *Agricultural and Biological Chemistry* **41**: 1877–1882
- Jagadeesh SL, Charles MT, Garipey Y, Goyette B, Raghavan GSV, Vigneault C** (2011) Influence of Postharvest UV-C Hormesis on the Bioactive Components of Tomato during Post-treatment Handling. *Food Bioprocess Technol* **4**: 1463–1472
- Jang YK, Jung ES, Lee H-A, Choi D, Lee CH** (2015) Metabolomic Characterization of Hot Pepper (*Capsicum annuum* “CM334”) during Fruit Development. *J Agric Food Chem* **63**: 9452–9460
- Jansen MAK, Ač A, Klem K, Urban O** (2022a) A meta-analysis of the interactive effects of UV and drought on plants. *Plant Cell & Environment* **45**: 41–54

- Jansen MAK, Ač A, Klem K, Urban O** (2022b) A meta-analysis of the interactive effects of UV and drought on plants. *Plant, Cell & Environment* **45**: 41–54
- Jansen MAK, Bilger W, Hideg É, Strid Å, Aphalo P, Brelsford C, Klem K, Mátaí A, Llorens L, Nezval J, et al** (2019) Editorial: Interactive effects of UV-B radiation in a complex environment. *Plant Physiology and Biochemistry* **134**: 1–8
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhänsel C** (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO reports* **12**: 50–55
- Jeeatid N, Techawongstien S, Suriharn B, Bosland PW, Techawongstien S** (2017) Light intensity affects capsaicinoid accumulation in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* **58**: 103–110
- Jenkins GI** (2009a) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 407–431
- Jenkins GI** (2014) The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *The Plant Cell* **26**: 21–37
- Jenkins GI** (2009b) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 407–431
- Jeong H-B, Jang S-J, Kang M-Y, Kim S, Kwon J-K, Kang B-C** (2020) Candidate Gene Analysis Reveals That the Fruit Color Locus C1 Corresponds to PRR2 in Pepper (*Capsicum frutescens*). *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Jiang L, Wang Y, Olof Björn L, He J-X, Li S** (2012) Sensing of UV-B radiation by plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 999–1003
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW** (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**: 217–230
- Johnson CD, Decoteau DR** (1996) Nitrogen and Potassium Fertility Affects Jalapeño Pepper Plant Growth, Pod Yield, and Pungency. *HortSci* **31**: 1119–1123
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Joshi V, Joung J-G, Fei Z, Jander G** (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* **39**: 933–947
- Joung E-J, Li M-H, Lee HG, Somparn N, Jung YS, Na H-K, Kim S-H, Cha Y-N, Surh Y-J** (2007) Capsaicin Induces Heme Oxygenase-1 Expression in HepG2 Cells *Via* Activation of PI3K-Nrf2 Signaling: NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase as a Potential Target. *Antioxidants & Redox Signaling* **9**: 2087–2098
- Jumaah F, Plaza M, Abrahamsson V, Turner C, Sandahl M** (2016) A fast and sensitive method for the separation of carotenoids using ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **408**: 5883–5894
- Jung K-A, Kwak M-K** (2010) The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* **15**: 7266–7291
- Kaducová M, Monje-Rueda MD, García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Eliášová A, Gajdošová S, Petruřová V, Betti M, Márquez AJ, Pařove-Balang P** (2019) Induction of isoflavonoid biosynthesis in *Lotus japonicus* after UV-B irradiation. *Journal of Plant Physiology* **236**: 88–95
- Kaiser M, Higuera I, Goycoolea FM** (2017) Capsaicinoids: occurrence, chemistry, biosynthesis, and biological effects. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2nd Edition 499–514
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, et al** (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Research* **122**: 121–158

- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C** (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**: 29–66
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L** (2013) The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology* **1**: 45–49
- Kato-Noguchi H, Tanaka Y** (2003) Effects of capsaicin on plant growth. *Biologia plantarum* **47**: 157–159
- Kaulmann A, Bohn T** (2014) Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research* **34**: 907–929
- Kempa S, Krasensky J, Santo SD, Kopka J, Jonak C** (2008) A Central Role of Abscisic Acid in Stress-Regulated Carbohydrate Metabolism. *PLOS ONE* **3**: e3935
- Kesel JD, Conrath U, Flors V, Luna E, Mageroy MH, Mauch-Mani B, Pastor V, Pozo MJ, Pieterse CMJ, Ton J, et al** (2021) The Induced Resistance Lexicon: Do's and Don'ts. *Trends in Plant Science* **26**: 685–691
- Keyhaninejad N, Curry J, Romero J, O'Connell MA** (2014) Fruit specific variability in capsaicinoid accumulation and transcription of structural and regulatory genes in Capsicum fruit. *Plant Science* **215–216**: 59–68
- Khalid MF, Huda S, Yong M, Li L, Li L, Chen Z-H, Ahmed T** (2022) Alleviation of drought and salt stress in vegetables: crop responses and mitigation strategies. *Plant Growth Regul.* doi: 10.1007/s10725-022-00905-x
- Khan ZH, Khan MMA, Aftab T, Idrees M, Naeem M** (2011) Influence of alginate oligosaccharides on growth, yield and alkaloid production of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Front Agric China* **5**: 122–127
- Kieliszewski MJ, Lamport DTA, Tan L, Cannon MC** (2018) Hydroxyproline-Rich Glycoproteins: Form and Function. *Annual Plant Reviews online*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 321–342
- Kim J, Cha Y-N, Surh Y-J** (2010a) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* **690**: 12–23
- Kim J-S, Park M, Lee DJ, Kim B-D** (2009) Characterization of putative capsaicin synthase promoter activity. *Mol Cells* **28**: 331–339
- Kim OR, Cho M-C, Kim B-D, Huh JH** (2010b) A splicing mutation in the gene encoding phytoene synthase causes orange coloration in Habanero pepper fruits. *Mol Cells* **30**: 569–574
- Kind T, Fiehn O** (2010) Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev* **2**: 23–60
- Kirschbaum-Titze P, Mueller-Seitz E, Petz M** (2002) Pungency in Paprika (*Capsicum annuum*). 2. Heterogeneity of Capsaicinoid Content in Individual Fruits from One Plant. *J Agric Food Chem* **50**: 1264–1266
- Kleine T, Nägele T, Neuhaus HE, Schmitz-Linneweber C, Fernie AR, Geigenberger P, Grimm B, Kaufmann K, Klipp E, Meurer J, et al** (2021) Acclimation in plants – the Green Hub consortium. *The Plant Journal* **106**: 23–40
- Klepacki J, Klawitter J, Klawitter J, Karimpour-fard A, Thurman J, Ingle G, Patel D, Christians U** (2016) Amino acids in a targeted versus a non-targeted metabolomics LC-MS/MS assay. Are the results consistent? *Clinical Biochemistry* **49**: 955–961
- Kliebenstein DJ, Rowe HC** (2008) Ecological costs of biotrophic versus necrotrophic pathogen resistance, the hypersensitive response and signal transduction. *Plant Science* **174**: 551–556
- Ko H-C, Haile M, Lee S, Hwang A, Lee G-A, Choi Y-M, Hahn B-S, Ro N** (2022) Correlation of Carotenoids Content and ASTA Values of Pepper (*Capsicum chinense*) Genetic Resources. *Horticulturae* **8**: 486

- Kobata K, Sutoh K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T** (1999) Nordihydrocapsiate, a New Capsinoid from the Fruits of a Nonpungent Pepper, *Capsicum annum*. *J Nat Prod* **62**: 335–336
- Kobata K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T** (1998) Novel Capsaicinoid-like Substances, Capsiate and Dihydrocapsiate, from the Fruits of a Nonpungent Cultivar, CH-19 Sweet, of Pepper (*Capsicum annum* L.). *J Agric Food Chem* **46**: 1695–1697
- Kogure K, Goto S, Nishimura M, Yasumoto M, Abe K, Ohiwa C, Sassa H, Kusumi T, Terada H** (2002) Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1573**: 84–92
- Kombrink E, Hahlbrock K** (1986) Responses of Cultured Parsley Cells to Elicitors from Phytopathogenic Fungi: Timing and Dose Dependency of Elicitor-Induced Reactions. *Plant Physiology* **81**: 216–221
- Koornneef A, Pieterse CMJ** (2008) Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* **146**: 839–844
- Kopta T, Šlosár M, Andrejiová A, Jurica M, Pokluda R** (2019) The influence of genotype and season on the biological potential of chilli pepper cultivars. *Folia Horticulturae* **31**: 365–374
- Kozukue N, Han J-S, Kozukue E, Lee S-J, Kim J-A, Lee K-R, Levin CE, Friedman M** (2005) Analysis of Eight Capsaicinoids in Peppers and Pepper-Containing Foods by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **53**: 9172–9181
- Kreuz BS, Duarte M de S, Albino LFT, Borges SO, Piazza MCN, Carvalho MES de, Miranda JV de S, Calderano AA** (2022) Capsaicinoids affect intestinal mRNA expression of genes related to oxidative stress in broilers. *Revista Brasileira de Zootecnia* **51**:
- Krinsky NI** (2001) Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* **17**: 815–817
- Kultys E, Kurek MA** (2022) Green Extraction of Carotenoids from Fruit and Vegetable Byproducts: A Review. *Molecules* **27**: 518
- Kumar A, Kumar S, Thomas TD, Ramchiary N, Swamy MK, Ahmad I** (2019) Linking Omics Approaches to Medicinal Plants and Human Health. *In* MS Akhtar, MK Swamy, eds, *Natural Bio-active Compounds: Volume 3: Biotechnology, Bioengineering, and Molecular Approaches*. Springer, Singapore, pp 31–57
- Kuntz M, Römer S, Suire C, Hugueney P, Weil J h., Schantz R, Camara B** (1992) Identification of a cDNA for the plastid-located geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum annum*: correlative increase in enzyme activity and transcript level during fruit ripening. *The Plant Journal* **2**: 25–34
- Kunz BA, Dando PK, Grice DM, Mohr PG, Schenk PM, Cahill DM** (2008) UV-Induced DNA Damage Promotes Resistance to the Biotrophic Pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **148**: 1021–1031
- Lacrampe N, Colombié S, Dumont D, Nicot P, Lecompte F, Lugan R** (2023) Nitrogen-mediated metabolic patterns of susceptibility to *Botrytis cinerea* infection in tomato (*Solanum lycopersicum*) stems. *Planta* **257**: 41
- Lake JA, Field KJ, Davey MP, Beerling DJ, Lomax BH** (2009) Metabolomic and physiological responses reveal multi-phasic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to chronic UV radiation. *Plant, Cell & Environment* **32**: 1377–1389
- Lamb C, Dixon RA** (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251–275
- Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA** (2004) Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Mol Microbiol* **53**: 1003–1009
- Latscha T** (1990) Carotenoids - their nature and significance in animal feeds. *Carotenoids - their nature and significance in animal feeds*.

- Lau OS, Deng XW** (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 571–577
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J** (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 863–870
- Le Boulch P, Poëssel J-L, Roux D, Lugan R** (2022a) Molecular mechanisms of resistance to *Myzus persicae* conferred by the peach Rm2 gene: A multi-omics view. *Front Plant Sci* **13**: 992544
- Le Boulch P, Poëssel J-L, Roux D, Lugan R** (2022b) Molecular mechanisms of resistance to *Myzus persicae* conferred by the peach Rm2 gene: A multi-omics view. *Front Plant Sci* **13**: 992544
- Lê S, Josse J, Husson F** (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* **25**: 1
- Ledermann L, Daouda S, Gouttesoulard C, Aarouf J, Urban L** (2021) Flashes of UV-C Light Stimulate Defenses of *Vitis vinifera* L. ‘Chardonnay’ Against *Erysiphe necator* in Greenhouse and Vineyard Conditions. *Plant Disease* **105**: 2106–2113
- Lee IO, Lee KH, Pyo JH, Kim JH, Choi YJ, Lee YC** (2007a) Anti-inflammatory Effect of Capsaicin in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *Helicobacter* **12**: 510–517
- Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW** (2007b) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* **19**: 731–749
- Lee JJ, Crosby KM, Pike LM, Yoo KS, Leskovar DI** (2005a) Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Scientia Horticulturae* **106**: 341–352
- Lee J-M, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA** (2005b) Nrf2, a multi-organ protector? *The FASEB Journal* **19**: 1061–1066
- Lefebvre V, Kuntz M, Camara B, Palloix A** (1998) The capsanthin-capsorubin synthase gene: a candidate gene for the y locus controlling the red fruit colour in pepper. *Plant Mol Biol* **36**: 785–789
- Leivar P, Quail PH** (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in plant science* **16**: 19–28
- Lekala CS, Madani KSH, Phan ADT, Maboko MM, Fotouo H, Soundy P, Sultanbawa Y, Sivakumar D** (2019) Cultivar-specific responses in red sweet peppers grown under shade nets and controlled-temperature plastic tunnel environment on antioxidant constituents at harvest. *Food Chemistry* **275**: 85–94
- León-Chan RG, López-Meyer M, Osuna-Enciso T, Sañudo-Barajas JA, Heredia JB, León-Félix J** (2017) Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany* **139**: 143–151
- Lerdau M, Litvak M, Monson R** (1994) Plant chemical defense: monoterpenes and the growth-differentiation balance hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* **9**: 58–61
- Li J, Liao X, Yin X, Deng Z, Hu G, Zhang W, Jiang F, Zhao L** (2022) Gut Microbiome and Serum Metabolome Profiles of Capsaicin with Cognitive Benefits in APP/PS1 Mice. *Nutrients* **15**: 118
- Li P, Cheng L** (2008) The shaded side of apple fruit becomes more sensitive to photoinhibition with fruit development. *Physiologia Plantarum* **134**: 282–292
- Li R, Li L, Hong P, Lang W, Hui J, Yang Y, Zheng X** (2021)  $\beta$ -Carotene prevents weaning-induced intestinal inflammation by modulating gut microbiota in piglets. *Anim Biosci* **34**: 1221–1234
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 350–382

- Linnewiel-Hermoni K, Motro Y, Miller Y, Levy J, Sharoni Y** (2014) Carotenoid derivatives inhibit nuclear factor kappa B activity in bone and cancer cells by targeting key thiol groups. *Free Radical Biology and Medicine* **75**: 105–120
- Lintig JV, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H** (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal* **12**: 625–634
- Liu A, Chen X, Huang Z, Chen D, Yu B, Chen H, He J, Yan H, Zheng P, Yu J, et al** (2022a) Effects of dietary lycopene supplementation on intestinal morphology, antioxidant capability and inflammatory response in finishing pigs. *Animal Biotechnology* **33**: 563–570
- Liu C, Cai L, Han X, Ying T** (2011) Temporary effect of postharvest UV-C irradiation on gene expression profile in tomato fruit. *Gene* **486**: 56–64
- Liu C, Luo S, Zhao Y, Miao Y, Wang Q, Ye L, Gao L, Ahammed GJ, Cheng Y** (2022b) Multiomics analyses reveal high temperature-induced molecular regulation of ascorbic acid and capsaicin biosynthesis in pepper fruits. *Environmental and Experimental Botany* **201**: 104941
- Loizzo MR, Pugliese A, Bonesi M, Menichini F, Tundis R** (2015) Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *LWT - Food Science and Technology* **64**: 623–631
- Long S, Liu S, Wang J, Mahfuz S, Piao X** (2021) Natural capsicum extract replacing chlortetracycline enhances performance via improving digestive enzyme activities, antioxidant capacity, anti-inflammatory function, and gut health in weaned pigs. *Animal Nutrition* **7**: 305–314
- Lopes MMA, Silva EO, Canuto KM, Silva LMA, Gallão MI, Urban L, Ayala-Zavala JF, Miranda MRA** (2016) Low fluence pulsed light enhanced phytochemical content and antioxidant potential of ‘Tommy Atkins’ mango peel and pulp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **33**: 216–224
- Lu C** (2003) Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 851–860
- Lucas A, Morales J, Velando A** (2013) Differential effects of specific carotenoids on oxidative damage and immune response of gull chicks. *Journal of Experimental Biology* jeb.098004
- Lugan R, Niogret M-F, Lepout L, Guégan J-P, Larher FR, Savouré A, Kopka J, Bouchereau A** (2010) Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *The Plant Journal* **64**: 215–229
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J** (2012) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **158**: 844–853
- Luo X-J, Peng J, Li Y-J** (2011) Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology* **650**: 1–7
- M S, Gaur R, Sharma V, Chhapekar SS, Das J, Kumar A, Yadava SK, Nitin M, Brahma V, Abraham SK, et al** (2016) Comparative Analysis of Fruit Metabolites and Pungency Candidate Genes Expression between Bhut Jolokia and Other Capsicum Species. *PLOS ONE* **11**: e0167791
- Mahdavian K, Ghorbanli M, Kalantari KM** (2008a) The Effects of Ultraviolet Radiation on the Contents of Chlorophyll, Flavonoid, Anthocyanin and Proline in *Capsicum annuum* L. *Turk J Bot* **9**
- Mahdavian K, Kalantari KM, Ghorbanli M, Torkzade M** (2008b) The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. *Biologia plant* **52**: 170–172
- Manac’h N, Kuntz M** (1999) Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events. *Plant Physiol Biochem* **37**: 859–868

- Manavalan LP, Guttikonda SK, Phan Tran L-S, Nguyen HT** (2009) Physiological and Molecular Approaches to Improve Drought Resistance in Soybean. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1260–1276
- Mannucci A, Mariotti L, Castagna A, Santin M, Trivellini A, Reyes TH, Mensuali-Sodi A, Ranieri A, Quartacci MF** (2020) Hormone profile changes occur in roots and leaves of Micro-Tom tomato plants when exposing the aerial part to low doses of UV-B radiation. *Plant Physiology and Biochemistry* **148**: 291–301
- Maoka T, Goto Y, Isobe K, Fujiwara Y, Hashimoto K, Mochida K** (2001) Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from Paprika (*Capsicum annuum*). *J Oleo Sci* **50**: 663–665
- Marounek M, Febriansyah A** (2018) Use of carotenoids in feed mixtures for poultry: a review. *Agricultura Tropica et Subtropica* **51**: 107–111
- Martin MJ, Thottathil SE, Newman TB** (2015) Antibiotics Overuse in Animal Agriculture: A Call to Action for Health Care Providers. *Am J Public Health* **105**: 2409–2410
- Martínez C, Pons E, Prats G, León J** (2004) Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J* **37**: 209–217
- Marty I, Bureau S, Sarkissian G, Gouble B, Audergon JM, Albagnac G** (2005) Ethylene regulation of carotenoid accumulation and carotenogenic gene expression in colour-contrasted apricot varieties (*Prunus armeniaca*). *Journal of Experimental Botany* **56**: 1877–1886
- Mátai A, Nagy D, Hideg É** (2019) UV-B strengthens antioxidant responses to drought in *Nicotiana benthamiana* leaves not only as supplementary irradiation but also as pre-treatment. *Plant Physiology and Biochemistry* **134**: 9–19
- Matsuda F, Shinbo Y, Oikawa A, Hirai MY, Fiehn O, Kanaya S, Saito K** (2009) Assessment of Metabolome Annotation Quality: A Method for Evaluating the False Discovery Rate of Elemental Composition Searches. *PLoS ONE* **4**: e7490
- Matsufuji H, Nakamura H, Chino M, Takeda M** (1998) Antioxidant Activity of Capsanthin and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annuum*). *J Agric Food Chem* **46**: 3468–3472
- Matsuzoe N, Zushi K, Johjima T** (1998) Effect of soil water deficit on coloring and carotene formation in fruits of red, pink, and yellow type cherry tomatoes [*Lycopersicon esculentum*]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany* **51**: 659–668
- Mazourek M, Pujar A, Borovsky Y, Paran I, Mueller L, Jahn M** (2009) A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiol* **150**: 1806–1821
- McAlister ED, Myers J** (1940) The time course of photosynthesis and fluorescence observed simultaneously. *Smithsonian Miscellaneous Collections*
- McLay ER, Pontaroli AC, Wargent JJ** (2020) UV-B Induced Flavonoids Contribute to Reduced Biotrophic Disease Susceptibility in Lettuce Seedlings. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Medina-Juárez LÁ, Molina-Quijada DMA, Toro-Sánchez CLD, González-Aguilar GA, Gámez-Meza N** (2012) ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPPERS (*Capsicum annuum* L.) EXTRACTS AND CHARACTERIZATION OF THEIR PHENOLIC CONSTITUENTS. **37**: 7
- Medina-Lara F, Echevarría-Machado I, Pacheco-Arjona R, Ruiz-Lau N, Guzmán-Antonio A, Martínez-Estevez M** (2008) Influence of Nitrogen and Potassium Fertilization on Fruiting and Capsaicin Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *horts* **43**: 1549–1554
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ** (2007) Review: Analysis of carotenoids in orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**: 638–649
- Mena E, Warade S, Ansari MT, Ramjan M** (2018) Evaluation of capsaicin, ascorbic acid,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene in Bhut Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.) genotypes from North East India. *The Pharma Innovation Journal* **7**: 93–97

- Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, De Cindio B, Houghton PJ, Menichini F** (2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry* **114**: 553–560
- Meotti F, Andrade E, Calixto J** (2014) TRP Modulation by Natural Compounds. *Handbook of experimental pharmacology* **223**: 1177–238
- Mercadante AZ, Rodrigues DB, Petry FC, Mariutti LRB** (2017) Carotenoid esters in foods - A review and practical directions on analysis and occurrence. *Food Research International* **99**: 830–850
- Mercier J, Baka M, Reddy B, Corcuff R, Arul J** (2001a) Shortwave Ultraviolet Irradiation for Control of Decay Caused by *Botrytis cinerea* in Bell Pepper: Induced Resistance and Germicidal Effects. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 128–133
- Mercier J, Baka M, Reddy B, Corcuff R, Arul J** (2001b) Shortwave Ultraviolet Irradiation for Control of Decay Caused by *Botrytis cinerea* in Bell Pepper: Induced Resistance and Germicidal Effects. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 128–133
- Mert-Türk F** (2002) Phytoalexins: Defence or just a response to stress? *Journal of Cell and Molecular biology* 1–6
- Messant C** (2021) Effets de la distribution d'une poudre de Capsicum à des truies en lactation et à leur descendance après le sevrage. pp 205–206
- Mewis I, Schreiner M, Nguyen CN, Krumbein A, Ulrichs C, Lohse M, Zrenner R** (2012) UV-B Irradiation Changes Specifically the Secondary Metabolite Profile in Broccoli Sprouts: Induced Signaling Overlaps with Defense Response to Biotic Stressors. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1546–1560
- Meyer P, Van de Poel B, De Coninck B** (2021) UV-B light and its application potential to reduce disease and pest incidence in crops. *Hortic Res* **8**: 194
- Milan EB, Mandoulakani BA, Kheradmand F** (2017) Effect of methyl jasmonate on the expression of phenylalanine ammonia lyase and eugenol-o-methyl transferase genes in basil. *Philippine Agricultural Scientist (Philippines)*
- Minguez-Mosquera MI, Hornero-Mendez D** (1994) Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola and Agridulce. *J Agric Food Chem* **42**: 38–44
- Minguez-Mosquera MI, Hornero-Méndez D, Pérez-Gálvez A** (2008) Carotenoids and provitamin A in functional foods. *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 277–336
- Mintoff SJL, Rookes JE, Cahill DM** (2015) Sub-lethal UV-C radiation induces callose, hydrogen peroxide and defence-related gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* **17**: 703–711
- Mishra AK, Choi S-J, Baek K-H** (2020) Application of ultraviolet C irradiation for the increased production of secondary metabolites in plants. *The Journal of Animal and Plant Sciences* **30**: 10
- Misra BB** (2021) New software tools, databases, and resources in metabolomics: updates from 2020. *Metabolomics* **17**: 49
- Mohnike L, Huang W, Worbs B, Feussner K, Zhang Y, Feussner I** (2023) N-Hydroxy pipelicolic acid methyl ester is involved in *Arabidopsis* immunity. *J Exp Bot* **74**: 458–471
- Mohnike L, Rehkter D, Huang W, Feussner K, Tian H, Herrfurth C, Zhang Y, Feussner I** (2021a) The glycosyltransferase UGT76B1 modulates N-hydroxy-pipelicolic acid homeostasis and plant immunity. *The Plant Cell* **33**: 735–749
- Mohnike L, Rehkter D, Huang W, Feussner K, Tian H, Herrfurth C, Zhang Y, Feussner I** (2021b) The glycosyltransferase UGT76B1 modulates N-hydroxy-pipelicolic acid homeostasis and plant immunity. *The Plant Cell* **33**: 735–749
- Mokhtar M, Russo M, Cacciola F, Donato P, Giuffrida D, Riaz A, Farnetti S, Dugo P, Mondello L** (2016a) Capsaicinoids and Carotenoids in *Capsicum annuum* L.: Optimization of the Extraction

- Method, Analytical Characterization, and Evaluation of its Biological Properties. Food Analytical Methods. doi: 10.1007/s12161-015-0311-7
- Mokhtar M, Russo M, Cacciola F, Donato P, Giuffrida D, Riazi A, Farnetti S, Dugo P, Mondello L** (2016b) Capsaicinoids and Carotenoids in *Capsicum annuum* L.: Optimization of the Extraction Method, Analytical Characterization, and Evaluation of its Biological Properties. Food Analytical Methods **9**: 1381–1390
- Monforte-González M, Guzmán-Antonio A, Uuh-Chim F, Vázquez-Flota F** (2010) Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). Journal of the Science of Food and Agriculture **90**: 764–768
- Monson RK, Trowbridge AM, Lindroth RL, Lerdau MT** (2022) Coordinated resource allocation to plant growth–defense tradeoffs. New Phytologist **233**: 1051–1066
- Moraes DCA, Nagi JG, Fritzen J, Vitagliano LA, Oliveira ER, Oba A, Silva CA** (2022) Effect of capsaicin on the feed intake and immunoglobulin concentration of sows, and performance of piglets. Trop Anim Health Prod **54**: 241
- Morehouse NJ, Clark TN, McMann EJ, van Santen JA, Haeckl FPJ, Gray CA, Linington RG** (2023) Annotation of natural product compound families using molecular networking topology and structural similarity fingerprinting. Nat Commun **14**: 308
- Morel J-B, Dangl JL** (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. Cell Death Differ **4**: 671–683
- Moulin M, Deleu C, Larher F, Bouchereau A** (2006) The lysine-ketoglutarate reductase–saccharopine dehydrogenase is involved in the osmo-induced synthesis of pipercolic acid in rapeseed leaf tissues. Plant Physiology and Biochemistry **44**: 474–482
- Mozafar A** (1993) Nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: A review. Journal of Plant Nutrition **16**: 2479–2506
- Mozzo M, Dall’Osto L, Hienerwadel R, Bassi R, Croce R** (2008) Photoprotection in the Antenna Complexes of Photosystem II: ROLE OF INDIVIDUAL XANTHOPHYLLS IN CHLOROPHYLL TRIPLET QUENCHING\*. Journal of Biological Chemistry **283**: 6184–6192
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y** (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. Journal of Experimental Botany **62**: 1715–1729
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK** (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy1. Plant Physiology **125**: 1558–1566
- Munglang NN, Vidyarthi VK** (2019) Hot Red Pepper Powder Supplementation Diet of Broiler Chicken - A Review. 07:
- Munné-Bosch S, Peñuelas J** (2003) Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. Planta **217**: 758–766
- Murakami, Ido, Masuda** (2006) Fruit pungency of ‘Shishito’ pepper as affected by a dark interval in continuous fluorescent illumination with temperature alteration. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/shita/18/4/18\\_4\\_284/\\_pdf/-char/en](https://www.jstage.jst.go.jp/article/shita/18/4/18_4_284/_pdf/-char/en)
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H** (2014) Effect of salt stress on tomato fruit antioxidant systems depends on fruit development stage. Physiol Mol Biol Plants **20**: 15–29
- Na H-K, Surh Y-J** (2008) Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. Food and Chemical Toxicology **46**: 1271–1278
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, et al** (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. The Plant Journal **77**: 367–379

- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165–185
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C, Zeier J** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–5141
- Naves ER, de Ávila Silva L, Sulpice R, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Peres LEP, Zsögön A** (2019) Capsaicinoids: Pungency beyond Capsicum. *Trends in Plant Science* **24**: 109–120
- Nawrath C, Heck S, Parinthewong N, Métraux J-P** (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**: 275–286
- Nawrath C, Métraux JP** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393–1404
- Naz S, Vallejo M, García A, Barbas C** (2014) Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A* **1353**: 99–105
- Neilson EH, Goodger JQD, Woodrow IE, Møller BL** (2013) Plant chemical defense: at what cost? *Trends Plant Sci* **18**: 250–258
- Neshich IA, Kiyota E, Arruda P** (2013) Genome-wide analysis of lysine catabolism in bacteria reveals new connections with osmotic stress resistance. *ISME J* **7**: 2400–2410
- Nieto-Garibay A, Barraza A, Caamal-Chan G, Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez E, Burgoa-Cruz CA, Jaramillo-Limón JN, Loera-Muro A** (2022) Habanero pepper (*Capsicum chinense*) adaptation to water-deficit stress in a protected agricultural system. *Funct Plant Biol* **49**: 295–306
- Nigro F, Ippolito A, Lattanzio V, Di Venere D, Salerno M** (2000) Effect of Ultraviolet-C Light on Postharvest Decay of Strawberry. *Journal of Plant Pathology* **82**: 29–37
- Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y** (2009) Cancer prevention by carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **483**: 165–168
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiol* **147**: 1251–1263
- Niu Z, Fu J, Gao Y, Liu F** (2008) Influence of Paprika Extract Supplement on Egg Quality of Laying Hens Fed Wheat-Based Diet. *International J of Poultry Science* **7**: 887–889
- Nogués S, Allen DJ, Morison JIL, Baker NR** (1998) Ultraviolet-B Radiation Effects on Water Relations, Leaf Development, and Photosynthesis in Droughted Pea Plants. *Plant Physiol* **117**: 173–181
- North HM, Almeida AD, Boutin J-P, Frey A, To A, Botran L, Sotta B, Marion-Poll A** (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal* **50**: 810–824
- Nothias-Scaglia L, Esposito M, Costa J, Paolini J, Touboul D, Litaudon M** (2015) Molecular networks, a bioinformatic tool for tandem mass spectrometry data interpretation. *Spectra Analyse* **307**: 73–78
- Nys Y** (2000) Dietary carotenoids and egg yolk coloration - a review. *Archiv für Geflügelkunde Sonderheft* **64**: 45–54
- Oboh G, Puntel RL, Rocha JBT** (2007) Hot pepper (*Capsicum annum*, *Tepin* and *Capsicum chinense*, *Habanero*) prevents Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. *Food Chemistry* **102**: 178–185
- O'Donoghue EM, Brummell DA, McKenzie MJ, Hunter DA, Lill RE** (2018) Sweet capsicum: postharvest physiology and technologies. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **46**: 269–297

- Oh J, Harper M, Giallongo F, Bravo D, Wall E, Hristov A** (2017) Effects of rumen-protected Capsicum oleoresin on productivity and responses to a glucose tolerance test in lactating dairy cows. *Journal of dairy science* **100**: 1888–1901
- Oh J, Wall EH, Bravo DM, Hristov AN** (2016) Phytonutrients as additives in ruminants: the unexpected target organ. *J Anim Sci* **94**: 496–497
- O'Hara A, Headland LR, Díaz-Ramos LA, Morales LO, Strid Å, Jenkins GI** (2019) Regulation of Arabidopsis gene expression by low fluence rate UV-B independently of UVR8 and stress signaling. *Photochem Photobiol Sci* **18**: 1675–1684
- Okunlola GO, Olatunji OA, Akinwale RO, Tariq A, Adelusi AA** (2017) Physiological response of the three most cultivated pepper species (*Capsicum* spp.) in Africa to drought stress imposed at three stages of growth and development. *Scientia Horticulturae* **224**: 198–205
- Olatunji TL, Afolayan AJ** (2020) Comparison of nutritional, antioxidant vitamins and capsaicin contents in *Capsicum annum* and *C. frutescens*. *International Journal of Vegetable Science* **26**: 190–207
- Olguín-Rojas JA, Fayos O, Vázquez-León LA, Ferreiro-González M, Rodríguez-Jimenes G del C, Palma M, Garcés-Claver A, Barbero GF** (2019) Progression of the Total and Individual Capsaicinoids Content in the Fruits of Three Different Cultivars of *Capsicum chinense* Jacq. *Agronomy* **9**: 141
- Olson JA** (1989) Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of  $\beta$ -Carotene into Vitamin A. *The Journal of Nutrition* **119**: 105–108
- Ombódi A, Pék Z, Szuvandzsiev P, Lugasi A, Darázi HL, Helyes L** (2016) Effect of coloured shade nets on some nutritional characteristics of a kapia type pepper grown in plastic tunnel. *COLUMELLA – Journal of Agricultural and Environmental Sciences* **3**: 25–33
- Oni M** (2011) Evaluation of Seed and Fruit Powders of *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens* for Control of *Callosobruchus maculatus* (F.) in Stored Cowpea and *Sitophilus zeamais* (Motsch) in Stored Maize. *International Journal of Biology*. doi: 10.5539/ijb.v3n2p185
- Orellana-Escobedo L, Garcia-Amezquita LE, Olivas GI, Ornelas-Paz JJ, Sepulveda DR** (2013) Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp.) cultivated in the State of Chihuahua. *CyTA - Journal of Food* **11**: 179–184
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW** (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462–466
- Othman ZAA, Ahmed** (2011) Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. 11
- Othman ZAA, Ahmed YBH, Habila MA, Ghafar AA** (2011) Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules* **16**: 8919–8929
- Ouhibi C, Attia H, Nicot P, Lecompte F, Vidal V, Lachaâl M, URBAN L, Aarrouf J** (2015) Effects of nitrogen supply and of UV-C irradiation on the susceptibility of *Lactuca sativa* L to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia minor*. *Plant Soil* **393**: 35–46
- Özer A, Zik B, Erdost H, Özfiliz N** (2006) Histological investigations on the effects of feeding with a diet containing red hot pepper on the reproductive system organs of the cock. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*
- Pan T, Liu M, Kreslavski VD, Zharmukhamedov SK, Nie C, Yu M, Kuznetsov VV, Allakhverdiev SI, Shabala S** (2021) Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **51**: 791–825
- Pastor V, Balmer A, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B** (2014) Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Front Plant Sci* **5**: 295

- Pataro G, Sinik M, Capitoli MM, Donsì G, Ferrari G** (2015) The influence of post-harvest UV-C and pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of tomato fruits during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **30**: 103–111
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G** (2012) Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 263–269
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Hirschberg J** (1996) Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening | SpringerLink. *Plant Mol Biol* **30**: 807–819
- Penna S** (2003) Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci* **8**: 355–357
- Pérez-Ambrocio A, Guerrero-Beltrán JA, Aparicio-Fernández X, Ávila-Sosa R, Hernández-Carranza P, Cid-Pérez S, Ochoa-Velasco CE** (2018) Effect of blue and ultraviolet-C light irradiation on bioactive compounds and antioxidant capacity of habanero pepper (*Capsicum chinense*) during refrigeration storage. *Postharvest Biology and Technology* **135**: 19–26
- Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C** (2011) Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry* **129**: 35–44
- Pérez-García F, Brito LF, Wendisch VF** (2019) Function of L-Pipecolic Acid as Compatible Solute in *Corynebacterium glutamicum* as Basis for Its Production Under Hyperosmolar Conditions. *Front Microbiol* **10**: 340
- Petit A-N, Baillieul F, Vaillant-Gaveau N, Jacquens L, Conreux A, Jeandet P, Clément C, Fontaine F** (2009) Low responsiveness of grapevine flowers and berries at fruit set to UV-C irradiation. *J Exp Bot* **60**: 1155–1162
- Phimchan P, Techawongstien S, Chanthai S, Bosland PW** (2012) Impact of Drought Stress on the Accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* Cultivars with Different Initial Capsaicinoid Levels. *Horts* **47**: 1204–1209
- Picini C, Cai G, Dias MC, Romi M, Longo R, Cantini C** (2020) UV-B Radiation Affects Photosynthesis-Related Processes of Two Italian *Olea europaea* (L.) Varieties Differently. *Plants (Basel)* **9**: 1712
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM** (2012) Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **28**: 489–521
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM** (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 347–375
- Piggott JJ, Townsend CR, Matthaei CD** (2015a) Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and Evolution* **5**: 1538–1547
- Piggott JJ, Townsend CR, Matthaei CD** (2015b) Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and Evolution* **5**: 1538–1547
- Pinheiro J, Alegria C, Abreu M, Gonçalves EM, Silva CLM** (2015) Use of UV-C postharvest treatment for extending fresh whole tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Zinac) shelf-life. *J Food Sci Technol* **52**: 5066–5074
- Pires MV, Pereira Júnior AA, Medeiros DB, Daloso DM, Pham PA, Barros KA, Engqvist MKM, Florian A, Krahnert I, Maurino VG, et al** (2016) The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **39**: 1304–1319
- Poiroux-Gonord F, Bidel LPR, Fanciullino A-L, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L** (2010) Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *J Agric Food Chem* **58**: 12065–12082
- Poiroux-Gonord F, Fanciullino A-L, Poggi I, Urban L** (2013) Carbohydrate control over carotenoid build-up is conditional on fruit ontogeny in clementine fruits. *Physiologia Plantarum* **147**: 417–431

- Pokhilko A, Ramos JA, Holtan H, Maszle DR, Khanna R, Millar AJ** (2011) Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: A hypothesis. *J Theor Biol* **270**: 31–41
- Pola W, Sugaya S, Photchanachai S** (2020) Influence of Postharvest Temperatures on Carotenoid Biosynthesis and Phytochemicals in Mature Green Chili (*Capsicum annum* L.). *Antioxidants* **9**: 203
- Pongprayoon W, Roytrakul S, Pichyangkura R, Chadchawan S** (2013) The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*. doi: 10.1007/s10725-013-9789-4
- Popelka P, Jevinová P, Šmejkal K, Roba P** (2017) Determination of Capsaicin Content and Pungency Level of Different Fresh and Dried Chilli Peppers. *Folia Veterinaria* **61**: 11–16
- Pott I, Breithaupt DE, Carle R** (2003) Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry* **64**: 825–829
- Poulev A, O'Neal JM, Logendra S, Pouleva RB, Timeva V, Garvey AS, Gleba D, Jenkins IS, Halpern BT, Kneer R, et al** (2003) Elicitation, a New Window into Plant Chemodiversity and Phytochemical Drug Discovery. *J Med Chem* **46**: 2542–2547
- Pozo MJ, Van Der Ent S, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2008) Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **180**: 511–523
- Pretel MT, Serrano M, Amoros A, Riquelme F, Romojaro F** (1995) Non-involvement of ACC and ACC oxidase activity in pepper fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* **5**: 295–302
- Promyou S** (2012) Effect of ultraviolet-C (UV-C) illumination on postharvest quality and bioactive compounds in yellow bell pepper fruit (*Capsicum annum* L.) during storage. *AFRICAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*. doi: 10.5897/AJAR12.242
- Pugliese A, O'Callaghan Y, Tundis R, Galvin K, Menichini F, O'Brien N, Loizzo MR** (2014) In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annum*). *Eur J Nutr* **53**: 501–510
- Puvača N, Ljiljana Kostadinović, Dragana Ljubojević, Dragomir Lukač, Jovanka Lević, Sanja Popović, Nikolina Novakov, Bojana Vidović, Olivera Đuragić, Puva** (2015) Effect of garlic, black pepper and hot red pepper on productive performances and blood lipid profile of broiler chickens. *EuropPoultSci*. doi: 10.1399/eps.2015.73
- Qi J, Zhang M, Lu C, Hettenhausen C, Tan Q, Cao G, Zhu X, Wu G, Wu J** (2018) Ultraviolet-B enhances the resistance of multiple plant species to lepidopteran insect herbivory through the jasmonic acid pathway. *Sci Rep* **8**: 277
- Qin C, Yu C, Shen Y, Fang X, Chen L, Min J, Cheng J, Zhao S, Xu M, Luo Y, et al** (2014) Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 5135–5140
- Quián-Ulloa R, Stange C** (2021) Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: The Role of Light. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1184
- R Core Team** (2021) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rahman M, Inden H** (2012) Effect of nutrient solution and temperature on capsaicin content and yield contributing characteristics in six sweet pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Journal of Food Agriculture and Environment* **10**: 524–529
- Rajabbeigi E, Eichholz I, Beesk N, Ulrichs C, Kroh LW, Rohn S, Huyskens-Keil S** (2013) Interaction of drought stress and UV-B radiation - impact on biomass production and flavonoid metabolism in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. doi: 10.5073/JABFQ.2013.086.026

- Ramos AEF, Evanno L, Poupon E, Champy P, Beniddir MA** (2019) Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat Prod Rep* **36**: 960–980
- Ramos P, Rivas N, Pollmann S, Casati P, Molina-Montenegro MA** (2018) Hormonal and physiological changes driven by fungal endophytes increase Antarctic plant performance under UV-B radiation. *Fungal Ecology* **34**: 76–82
- Raw A** (2000) Foraging Behaviour of Wild Bees at Hot Pepper Flowers (*Capsicum annuum*) and its Possible Influence on Cross Pollination. *Annals of Botany* **85**: 487–492
- Reddy UK, Almeida A, Abburi VL, Alaparathi SB, Unselt D, Hankins G, Park M, Choi D, Nimmakayala P** (2014) Identification of Gene-Specific Polymorphisms and Association with Capsaicin Pathway Metabolites in *Capsicum annuum* L. Collections. *PLoS ONE* **9**: e86393
- Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA** (2001) Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **912**: 259–267
- Ricardez-Miranda LE, Lagunes-Espinoza LC, Hernández-Nataren E, Palma-López DJ, Conde-Martínez FV** (2021) Water restriction during the vegetative and reproductive stages of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, and its effect on growth, secondary metabolites and fruit yield. *Scientia Horticulturae* **285**: 110129
- Riggi E, Patané C, Ruberto G, Riggi E, Patané C, Ruberto G** (2008) Content of carotenoids at different ripening stages in processing tomato in relation to soil water availability. *Aust J Agric Res* **59**: 348–353
- Ripoll J, Bertin N, Bidet LPR, Urban L** (2016a) A User's View of the Parameters Derived from the Induction Curves of Maximal Chlorophyll a Fluorescence: Perspectives for Analyzing Stress. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Ripoll J, Urban L, Brunel B, Bertin N** (2016b) Water deficit effects on tomato quality depend on fruit developmental stage and genotype. *J Plant Physiol* **190**: 26–35
- Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidet LP, Bertin N** (2014a) Water shortage and quality of fleshy fruits—making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4097–4117
- Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidet LPR, Bertin N** (2014b) Water shortage and quality of fleshy fruits--making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4097–4117
- Rivera SM, Christou P, Canela-Garayoa R** (2014) Identification of carotenoids using mass spectrometry: IDENTIFICATION OF CAROTENOIDS. *Mass Spec Rev* **33**: 353–372
- Rivera-Pastrana DM, Gardea AA, Yahia EM, Martínez-Téllez MA, González-Aguilar GA** (2014) Effect of UV-C irradiation and low temperature storage on bioactive compounds, antioxidant enzymes and radical scavenging activity of papaya fruit. *J Food Sci Technol* **51**: 3821–3829
- Robert B, Horton P, Pascal AA, Ruban AV** (2004) Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo. *Trends in Plant Science* **9**: 385–390
- Robinson SP, Downton WJS, Millhouse JA** (1983) Photosynthesis and Ion Content of Leaves and Isolated Chloroplasts of Salt-Stressed Spinach. *Plant Physiol* **73**: 238–242
- Robson TM, Hartikainen SM, Aphalo PJ** (2015) How does solar ultraviolet-B radiation improve drought tolerance of silver birch (*Betula pendula* Roth.) seedlings? *Plant, Cell & Environment* **38**: 953–967
- Rochon A, Boyle P, Wignes T, Fobert PR, Després C** (2006) The coactivator function of Arabidopsis NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell* **18**: 3670–3685
- Rodas-Junco BA, Cab-Guillen Y, Muñoz-Sanchez JA, Vázquez-Flota F, Monforte-Gonzalez M, Hernández-Sotomayor SMT** (2013) Salicylic acid induces vanillin synthesis through the

- phospholipid signaling pathway in *Capsicum chinense* cell cultures. *Plant Signaling & Behavior* **8**: e26752
- Rodoni LM, Concellón A, Chaves AR, Vicente AR** (2012) Use of UV-C Treatments to Maintain Quality and Extend the Shelf Life of Green Fresh-cut Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science* **77**: C632–C639
- Rodriguez-Amaya DB** (2001) A guide to carotenoid analysis in foods, ILSI Press. Washington
- Rodriguez-Amaya DB, Kimura M** (2004) HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. 63
- Rodríguez-Burruezo A, González-Mas M del C, Nuez F** (2010) Carotenoid Composition and Vitamin A Value in Ají (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 Pepper Species from the Andean Region. *Journal of Food Science* **75**: S446–S453
- Rodríguez-Calzada T, Qian M, Strid Å, Neugart S, Schreiner M, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG** (2019) Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiol Biochem* **134**: 94–102
- Rodríguez-Concepción M, Campos N, Ferrer A, Boronat A** (2013) Biosynthesis of Isoprenoid Precursors in Arabidopsis. In TJ Bach, M Rohmer, eds, *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms: New Concepts and Experimental Approaches*. Springer, New York, NY, pp 439–456
- Rodriguez-Concepcion M, Foreés O, Martiénez-Garciéa JF, González V, Phillips MA, Ferrer A, Boronat A** (2004) Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *The Plant Cell* **16**: 144–156
- Rodriguez-Dominguez CM, Forner A, Martorell S, Choat B, Lopez R, Peters JMR, Pfautsch S, Mayr S, Carins-Murphy MR, McAdam SAM, et al** (2022) Leaf water potential measurements using the pressure chamber: Synthetic testing of assumptions towards best practices for precision and accuracy. *Plant, Cell & Environment* **45**: 2037–2061
- Roessner U, Luedemann A, Brust D, Fiehn O, Linke T, Willmitzer L, Fernie A** (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**: 11–29
- Roessner U, Wagner C, Kopka J, Trethewey RN, Willmitzer L** (2000) Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal* **23**: 131–142
- del Rosario Abraham-Juárez M, del Carmen Rocha-Granados M, López MG, Rivera-Bustamante RF, Ochoa-Alejo N** (2008) Virus-induced silencing of Comt, pAmt and Kas genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta* **227**: 681–695
- Roy A** (2016) Bhut jolokia (*Capsicum chinense* Jacq): a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)* **7**: 882–889
- Ruiz D, Reich M, Bureau S, Renard CMGC, Audergon J-M** (2008) Application of Reflectance Colorimeter Measurements and Infrared Spectroscopy Methods to Rapid and Nondestructive Evaluation of Carotenoids Content in Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J Agric Food Chem* **56**: 4916–4922
- Ryals J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner H, Hunt M** (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809–1819
- Ryu W-K, Kim H-W, Kim G-D, Rhee H-I** (2017) Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**: 798–803
- Sáenz-de la O D, Morales LO, Strid Å, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG** (2021) Ultraviolet-B exposure and exogenous hydrogen peroxide application lead to cross-tolerance toward drought in *Nicotiana tabacum* L. *Physiol Plant* **173**: 666–679
- Sahin K, Orhan C, Smith MO, Sahin N** (2013) Molecular targets of dietary phytochemicals for the alleviation of heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal* **69**: 113–124

- Sahin N, Orhan C, Tuzcu M, Juturu V, Sahin K** (2017) Capsaicinoids improve egg production by regulating ovary nuclear transcription factors against heat stress in quail. *British Poultry Science* **58**: 177–183
- Saini RK, Keum Y-S** (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry* **240**: 90–103
- Saini RK, Nile SH, Park SW** (2015) Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International* **76**: 735–750
- Saito M, Yoneshiro T** (2013) Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. *Curr Opin Lipidol* **24**: 71–77
- Saleh BK, Omer A, Teweldemedhin B** (2018) Medicinal uses and health benefits of chili pepper (*Capsicum* spp.): a review. *MOJFPT*. doi: 10.15406/mojfpt.2018.06.00183
- Sánchez-Sampedro MA, Fernández-Tárrago J, Corchete P** (2005) Yeast extract and methyl jasmonate-induced silymarin production in cell cultures of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. *Journal of Biotechnology* **119**: 60–69
- dos Santos TB, Vieira LGE** (2020) Involvement of the galactinol synthase gene in abiotic and biotic stress responses: A review on current knowledge. *Plant Gene* **24**: 100258
- Sarabi B, Fresneau C, Ghaderi N, Bolandnazar S, Streb P, Badeck F-W, Citerne S, Tangama M, David A, Ghashghaie J** (2019) Stomatal and non-stomatal limitations are responsible in down-regulation of photosynthesis in melon plants grown under the saline condition: Application of carbon isotope discrimination as a reliable proxy. *Plant Physiology and Biochemistry* **141**: 1–19
- Sarghein S, Carapetian J, Khara J** (2008) Effects of UV-Radiation on photosynthetic pigments and UV absorbing compounds in *Capsicum longum* (L.).
- Sarpras M, Ahmad I, Rawoof A, Ramchiary N** (2019) Comparative analysis of developmental changes of fruit metabolites, antioxidant activities and mineral elements content in Bhut jolokia and other *Capsicum* species. *LWT* **105**: 363–370
- Savvides A, Ali S, Tester M, Fotopoulos V** (2016) Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? *Trends in Plant Science* **21**: 329–340
- Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, Akiyama K, Sakurai T, Matsuda F, Aoki T, et al** (2012) RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* **82**: 38–45
- Schreiner M, Mewis I, Neugart S, Zrenner R, Glaab J, Wiesner M, Jansen MAK** (2016) UV-B Elicitation of Secondary Plant Metabolites. In M Kneissl, J Rass, eds, *III-Nitride Ultraviolet Emitters: Technology and Applications*. Springer International Publishing, Cham, pp 387–414
- Schwanz P, Kimball BA, Idso SB, Hendrix DL, Polle A** (1996) Antioxidants in sun and shade leaves of sour orange trees (*Citrus aurantium*) after long-term acclimation to elevated CO<sub>2</sub>. *J Exp Bot* **47**: 1941–1950
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD** (2003) Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology* **131**: 1591–1601
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR** (1997) Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* **276**: 1872–1874
- Schweiggert RM, Kopec RE, Villalobos-Gutierrez MG, Högel J, Quesada S, Esquivel P, Schwartz SJ, Carle R** (2014) Carotenoids are more bioavailable from papaya than from tomato and carrot in humans: a randomised cross-over study. *British Journal of Nutrition* **111**: 490–498
- Schweiggert U, Carle R, Schieber A** (2006) Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **557**: 236–244

- Schweiggert U, Kammerer DR, Carle R, Schieber A** (2005) Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 2617–2628
- Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J** (2014) Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ Sci Technol* **48**: 2097–2098
- Seo M, Koshiba T** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 41–48
- Ševčíková S, Skřivan M, Dlouhá G** (2008) The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. *Czech J Anim Sci* **53**: 431–440
- Seymour GB, Thompson AK, John P** (1987) Inhibition of degreening in the peel of bananas ripened at tropical temperatures. *Annals of Applied Biology* **110**: 145–151
- Sharma A, Ambati RR, Chandrappa D, Ravi S, Aswathanarayana RG** (2011) Botryococcus braunii, a New Elicitor for Secondary Metabolite Production in *Capsicum frutescens*. *Functional Plant Science and Biotechnology* **5**: 9–13
- Sharma A, Shahzad B, Kumar V, Kohli SK, Sidhu GPS, Bali AS, Handa N, Kapoor D, Bhardwaj R, Zheng B** (2019) Phytohormones Regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. *Biomolecules* **9**: 285
- Sharma SK, Vij AS, Sharma M** (2013) Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European journal of pharmacology* **720**: 55–62
- Shavit N, Avron M** (1963) The effect of ultraviolet light on photophosphorylation and the hill reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* **66**: 187–195
- Shields A, Shivnauth V, Castroverde CDM** (2022) Salicylic Acid and N-Hydroxypipicolinic Acid at the Fulcrum of the Plant Immunity-Growth Equilibrium. *Front Plant Sci* **13**: 841688
- Siddiqui MdW, Momin CM, Acharya P, Kabir J, Debnath MK, Dhua RS** (2013) Dynamics of changes in bioactive molecules and antioxidant potential of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero at nine maturity stages. *Acta Physiol Plant* **35**: 1141–1148
- Sidibé A, Charles MT, Lucier J-F, Xu Y, Beaulieu C** (2021) Preharvest UV-C Hormesis Induces Key Genes Associated With Homeostasis, Growth and Defense in Lettuce Inoculated With *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Front Plant Sci* **12**: 793989
- Singh A, Yau YF, Leung KS, El-Nezami H, Lee JC-Y** (2020) Interaction of Polyphenols as Antioxidant and Anti-Inflammatory Compounds in Brain–Liver–Gut Axis. *Antioxidants* **9**: 669
- Singh S, Natarajan K, Aggarwal BB** (1996) Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *The Journal of Immunology* **157**: 4412–4420
- Singletary K** (2011) Red Pepper: Overview of Potential Health Benefits. *Nutrition Today* **46**: 33–47
- Stahl W, Sies H** (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* **24**: 345–351
- Stefanato FL, Abou-Mansour E, Buchala A, Kretschmer M, Mosbach A, Hahn M, Bochet CG, Métraux J-P, Schoonbeek H** (2009) The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **58**: 499–510
- Stepansky A, Yao Y, Tang G, Galili G** (2005) Regulation of lysine catabolism in *Arabidopsis* through concertedly regulated synthesis of the two distinct gene products of the composite AtLKR/SDH locus. *J Exp Bot* **56**: 525–536
- Steudle E** (2001) THE COHESION-TENSION MECHANISM AND THE ACQUISITION OF WATER BY PLANT ROOTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 847–875

- Stevens C, Khan VA, Tang AY, Lu JY** (1990a) The Effect of Ultraviolet Radiation on Mold Rots and Nutrients of Stored Sweet Potatoes. *Journal of Food Protection* **53**: 223–226
- Stevens C, Khan VA, Tang AY, Lu JY** (1990b) The Effect of Ultraviolet Radiation on Mold Rots and Nutrients of Stored Sweet Potatoes. *J Food Prot* **53**: 223–226
- Stewart C, Kang B-C, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim B-D, Paran I, Jahn MM** (2005) The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* **42**: 675–688
- Stewart C, Mazourek M, Stellari GM, O'Connell M, Jahn M** (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *J Exp Bot* **58**: 979–991
- Stipcovich T, Barbero GF, Ferreira-González M, Palma M, Barroso CG** (2018) Fast analysis of capsaicinoids in Naga Jolokia extracts (*Capsicum chinense*) by high-performance liquid chromatography using fused core columns. *Food Chemistry* **239**: 217–224
- Stirbet A, Govindjee** (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **104**: 236–257
- Stirbet A, Lazár D, Kromdijk J, Govindjee G** (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynth* **56**: 86–104
- Strasser BJ** (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP test. *Photosynthesis: from light to biosphere* 977–980
- Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M** (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* 445–483
- Sullivan JH, Teramura AH** (1990) Field Study of the Interaction between Solar Ultraviolet-B Radiation and Drought on Photosynthesis and Growth in Soybean. *Plant Physiol* **92**: 141–146
- Sun T, Xu Z, Wu C-T, Janes M, Prinyawiwatkul W, No HK** (2007) Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science* **72**: S98–S102
- Sung Y, Chang Y-Y, Ting N-L** (2005) Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**: 8
- Surplus SL, Jordan BR, Murphy AM, Carr JP, Thomas B, -Mackerness S a.-H.** (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant, Cell & Environment* **21**: 685–694
- Sutoh K, Kobata K, Yazawa S, Watanabe T** (2006) Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 sweet. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 1513–1516
- Suzuki K, Mori M, Ishikawa K, Takizawa K, Nunomura O** (2007) Carotenoid Composition in Mature *Capsicum Annuum*. *FSTR* **13**: 77–80
- Suzuki T, Fujiwake H, Iwai K** (1980) Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Karayatsubusa*. *Plant Cell Physiol* **21**: 839–853
- Suzuki T, Kawada T, Iwai K** (1981) Biosynthesis of Acyl Moieties of Capsaicin and its Analogues from Valine and Leucine in *Capsicum* Fruits1. *Plant and Cell Physiology* **22**: 23–32
- Sweat KG, Broatch J, Borrer C, Hagan K, Cahill TM** (2016) Variability in capsaicinoid content and Scoville heat ratings of commercially grown Jalapeño, Habanero and Bhut Jolokia peppers. *Food Chemistry* **210**: 606–612
- Sy C, Gleize B, Dangles O, Landrier J-F, Veyrat CC, Borel P** (2012) Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations. *Molecular Nutrition & Food Research* **56**: 1385–1397

- Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB** (2012) Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4741–4750
- Szabados L, Saviouré A** (2010a) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* **15**: 89–97
- Szabados L, Saviouré A** (2010b) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* **15**: 89–97
- Tak PP, Firestein GS** (2001) NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* **107**: 7–11
- Takeuchi Y, Inoue T, Takemura K, Hada M, Takahashi S, Ioki M, Nakajima N, Kondo N** (2007) Induction and inhibition of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in etiolated cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons after ultraviolet irradiation depends on wavelength. *J Plant Res* **120**: 365–374
- Tan CK, Ali ZM, Zainal Z** (2012) Changes in ethylene production, carbohydase activity and antioxidant status in pepper fruits during ripening. *Scientia Horticulturae* **142**: 23–31
- Tanaka Y, Nakashima F, Kirii E, Goto T, Yoshida Y, Yasuba K** (2017) Difference in capsaicinoid biosynthesis gene expression in the pericarp reveals elevation of capsaicinoid contents in chili peppers (*Capsicum chinense*). *Plant Cell Rep* **36**: 267–279
- Tardieu F, Granier C, Muller B** (2011) Water deficit and growth. Co-ordinating processes without an orchestrator? *Current opinion in plant biology* **14**: 283–289
- Tateda C, Zhang Z, Shrestha J, Jelenska J, Chinchilla D, Greenberg JT** (2014) Salicylic Acid Regulates Arabidopsis Microbial Pattern Receptor Kinase Levels and Signaling. *The Plant Cell* **26**: 4171–4187
- Teklić T, Parađiković N, Špoljarević M, Zeljković S, Lončarić Z, Lisjak M** (2021) Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. *Annals of Applied Biology* **178**: 169–191
- Tewksbury JJ, Nabhan GP** (2001) Directed deterrence by capsaicin in chillies. *Nature* **412**: 403–404
- Thakur M, Bhattacharya S, Khosla PK, Puri S** (2019) Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **12**: 1–12
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**: 260–270
- Thomas DTT, Challabathula D, Puthur JT** (2019) UV-B priming of *Oryza sativa* var. Kanchana seedlings augments its antioxidative potential and gene expression of stress-response proteins under various abiotic stresses. *3 Biotech* **9**: 375
- Thomas T, Nayak PC, Ghosh NC** (2015) Spatiotemporal Analysis of Drought Characteristics in the Bundelkhand Region of Central India using the Standardized Precipitation Index. *Journal of Hydrologic Engineering* **20**: 05015004
- Thomas TTD, Puthur JT** (2020) UV-B priming enhances specific secondary metabolites in *Oryza sativa* (L.) empowering to encounter diverse abiotic stresses. *Plant Growth Regul* **92**: 169–180
- Tian S-L, Lu B-Y, Gong Z-H, Shah SNM** (2014) Effects of drought stress on capsanthin during fruit development and ripening in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Agricultural Water Management* **137**: 46–51
- Tiecher A, de Paula LA, Chaves FC, Rombaldi CV** (2013) UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* **86**: 230–239
- Todd Jr. PH, Bensinger MG, Biftu T** (1977) Determination of Pungency Due to Capsicum by Gas-Liquid Chromatography. *Journal of Food Science* **42**: 660–665
- Todd PHJ, Young C, Hombergh AVD, Berdahl D** (2016) Oleoresins derived from a capsicum annuum exhibiting a hyper-accumulation of zeaxanthin and products derived therefrom.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M** (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 11626–11631

- Tossi VE, Regalado JJ, Iannicelli J, Laino LE, Burrieza HP, Escandón AS, Pitta-Álvarez SI** (2019) Beyond Arabidopsis: Differential UV-B Response Mediated by UVR8 in Diverse Species. *Frontiers in Plant Science* **10**:
- Tran TLH, Raymundo LC** (1999) Biosynthesis of carotenoids in bittermelon at high temperature. *Phytochemistry* **52**: 275–280
- Tsimilli-Michael M, Strasser RJ** (2008) In vivo Assessment of Stress Impact on Plant's Vitality: Applications in Detecting and Evaluating the Beneficial Role of Mycorrhization on Host Plants. *In A Varma, ed, Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 679–703
- Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M** (2015) MS-DIAL: Data Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat Methods* **12**: 523–526
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Kobayashi M, Koshiba T, Kamiya Y, Shinozaki K** (2006) CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **46**: 171–182
- Urban L, Aarrouf J, Bidel LPR** (2017) Assessing the Effects of Water Deficit on Photosynthesis Using Parameters Derived from Measurements of Leaf Gas Exchange and of Chlorophyll a Fluorescence. *Frontiers in Plant Science* **8**:
- Urban L, Chabane Sari D, Orsal B, Lopes M, Miranda R, Aarrouf J** (2018) UV-C light and pulsed light as alternatives to chemical and biological elicitors for stimulating plant natural defenses against fungal diseases. *Scientia Horticulturae* **235**: 452–459
- Urban L, Charles F, de Miranda MRA, Aarrouf J** (2016a) Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiol Biochem* **105**: 1–11
- Urban L, Charles F, de Miranda MRaA, Aarrouf J** (2016b) Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiol Biochem* **105**: 1–11
- Urban L, Lauri F, Ben Hdech D, Aarrouf J** (2022) Prospects for Increasing the Efficacy of Plant Resistance Inducers Stimulating Salicylic Acid. *Agronomy* **12**: 3151
- Vaca E, Behrens C, Theccanat T, Choe J-Y, Dean JV** (2017) Mechanistic differences in the uptake of salicylic acid glucose conjugates by vacuolar membrane-enriched vesicles isolated from Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* **161**: 322–338
- Vafaei N, Rempel CB, Scanlon MG, Jones PJH, Eskin MNA** (2022) Application of Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Tocopherols and Carotenoids (Hydrophobic Antioxidants) Compared to Non-SFE Methods. *AppliedChem* **2**: 68–92
- Valadon LRG, Mummery RS** (1977) Carotenoids of Lilies and of Red Pepper: Biogenesis of Capsanthin and Capsorubin. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **82**: 407–416
- Van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ** (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 443–448
- Vandenbussche F, Yu N, Li W, Vanhaelewyn L, Hamshou M, Van Der Straeten D, Smaghe G** (2018) An ultraviolet B condition that affects growth and defense in Arabidopsis. *Plant Science* **268**: 54–63
- Vanhaelewyn L, Prinsen E, Van Der Straeten D, Vandenbussche F** (2016) Hormone-controlled UV-B responses in plants. *Journal of Experimental Botany* **67**: 4469–4482
- Vargas-Hernández M, Torres-Pacheco I, Gautier F, Álvarez-Mayorga B, Cruz-Hernández A, García-Mier L, Jiménez-García SN, Ocampo-Velázquez RV, Feregrino-Perez AA, Guevara-Gonzalez RG** (2017) Influence of hydrogen peroxide foliar applications on in vitro antimicrobial activity

- in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **151**: 269–275
- Vasconsuelo A, Boland R** (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* **172**: 861–875
- Vasconsuelo A, Giulietti AM, Boland R** (2004) Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Science* **166**: 405–413
- Vásquez H, Ouhibi C, Forges M, Lizzi Y, Urban L, Aarrouf J** (2020) Hormetic doses of UV-C light decrease the susceptibility of tomato plants to *Botrytis cinerea* infection. *Journal of Phytopathology* **168**: 524–532
- Vásquez H, Ouhibi C, Lizzi Y, Azzouz N, Forges M, Bardin M, Nicot P, Urban L, Aarrouf J** (2017) Pre-harvest hormetic doses of UV-C radiation can decrease susceptibility of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) to *Botrytis cinerea* L. *Scientia Horticulturae* **222**: 32–39
- Vasquez-Velazquez MV, López-Vázquez JS, Ruiz-Sánchez E, Medina-Dzul KB, Latournerie-Moreno L, eds** (2021) Agronomic behavior and fruit quality in habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) as a response to formative pruning. *Agro Productividad*. doi: 10.22004/ag.econ.313413
- Vay L, Gu C, McNaughton PA** (2012) The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications: The thermo-TRP ion channel family. *British Journal of Pharmacology* **165**: 787–801
- Veloso J, Prego C, Varela MM, Carballeira R, Bernal A, Merino F, Díaz J** (2014) Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology* **16**: 177–185
- Verma PK, Rawat KK, Das N, Pradhan B** (2013) A botanical enigma of India's hottest chilli Bhoot Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.). *N Y Sci J* **6**: 49–51
- Vicente AR, Pineda C, Lemoine L, Civello PM, Martinez GA, Chaves AR** (2005) UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biology and Technology* **35**: 69–78
- Villa-Rivera MG, Martínez O, Ochoa-Alejo N** (2022) Putative Transcription Factor Genes Associated with Regulation of Carotenoid Biosynthesis in Chili Pepper Fruits Revealed by RNA-Seq Coexpression Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 11774
- Villavicencio L, Blankenship SM, Sanders DC, Swallow WH** (1999) Ethylene and Carbon Dioxide Production in Detached Fruit of Selected Pepper Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **124**: 402–406
- Vogel-Adghough D, Stahl E, Návarová H, Zeier J** (2013a) Pilocolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. *Plant Signal Behav* **8**: e26366
- Vogel-Adghough D, Stahl E, Návarová H, Zeier J** (2013b) Pilocolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. *Plant Signal Behav* **8**: e26366
- Vos IA, Moritz L, Pieterse CMJ, Van Wees SCM** (2015) Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Frontiers in Plant Science* **6**:
- Wahyuni Y, Ballester A-R, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG** (2013) Secondary Metabolites of *Capsicum* Species and Their Importance in the Human Diet. *J Nat Prod* **76**: 783–793
- Wahyuni Y, Ballester A-R, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG** (2011) Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* **72**: 1358–1370
- Wall MM, Waddell CA, Bosland PW** (2001) Variation in  $\beta$ -Carotene and Total Carotenoid Content in Fruits of *Capsicum*. *HortScience* **36**: 746–749

- Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G** (2005) Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. *Phytopathology*® **95**: 1368–1373
- Walters DR, Paterson L, Walsh DJ, Havis ND** (2008) Priming for plant defense in barley provides benefits only under high disease pressure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **73**: 95–100
- Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapon CA, Luzzatto-Knaan T, et al** (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **34**: 828–837
- Wani SP, Sreedevi TK, Rockström J, Ramakrishna YS** (2009) Rainfed agriculture - past trends and future prospects. *Rainfed agriculture: unlocking the potential* 1–35
- Watanabe S, Matsumoto M, Hakomori Y, Takagi H, Shimada H, Sakamoto A** (2014) The purine metabolite allantoin enhances abiotic stress tolerance through synergistic activation of abscisic acid metabolism. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1022–1036
- Watanabe S, Nakagawa A, Izumi S, Shimada H, Sakamoto A** (2010) RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* **584**: 1181–1186
- Webber H, Ewert F, Olesen JE, Müller C, Fronzek S, Ruane AC, Bourgault M, Martre P, Ababaei B, Bindi M, et al** (2018) Diverging importance of drought stress for maize and winter wheat in Europe. *Nature communications* **9**: 4249
- Welsch R, Maass D, Voegel T, DellaPenna D, Beyer P** (2007) Transcription Factor RAP2.2 and Its Interacting Partner SINAT2: Stable Elements in the Carotenogenesis of *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* **145**: 1073–1085
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, von Lintig J** (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 523–534
- Welsch R, Wust F, Bar C, Al-Babili S, Beyer P** (2008) A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology* **147**: 367–380
- Wickham H** (2009) ggplot2. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565
- Wilkinson SW, Magerøy MH, López Sánchez A, Smith LM, Furci L, Cotton TEA, Krokene P, Ton J** (2019) Surviving in a Hostile World: Plant Strategies to Resist Pests and Diseases. *Annual Review of Phytopathology* **57**: 505–529
- Wilson CL, Upchurch B, Ghaouth AE, Stevens C, Khan V, Droby S, Chalutz E** (1997) Using an On-line UV-C Apparatus to Treat Harvested Fruit for Controlling Postharvest Decay. *HortTechnology* **7**: 278–282
- Witting M, Böcker S** (2020) Current status of retention time prediction in metabolite identification. *Journal of Separation Science* **43**: 1746–1754
- Wituszyńska W, Szechyńska-Hebda M, Sobczak M, Rusaczonek A, Kozłowska-Makulska A, Witoń D, Karpiński S** (2015) LESION SIMULATING DISEASE 1 and ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **38**: 315–330
- WMO WMO** (2022a) State of the Climate in Asia 2021 (WMO-No. 1303). WMO, Geneva
- WMO WMO** (2022b) State of Global Water Resources 2021 (WMO-No. 1308). WMO, Geneva
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* **1**: 639–647

- Xiang Q, Guo W, Tang X, Cui S, Zhang F, Liu X, Zhao J, Zhang H, Mao B, Chen W** (2021) Capsaicin—the spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms. *Trends in Food Science & Technology* **116**: 755–765
- Xu Y, Charles MT, Luo Z, Mimee B, Tong Z, Véronneau P-Y, Roussel D, Rolland D** (2019) Ultraviolet-C priming of strawberry leaves against subsequent *Mycosphaerella fragariae* infection involves the action of reactive oxygen species, plant hormones, and terpenes. *Plant, Cell & Environment* **42**: 815–831
- Xu Y, Luo Z, Charles MT, Rolland D, Roussel D** (2017) Pre-harvest UV-C irradiation triggers VOCs accumulation with alteration of antioxidant enzymes and phytohormones in strawberry leaves. *J Plant Physiol* **218**: 265–274
- Yalpani N, Enyedi AJ, León J, Raskin I** (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* **193**: 372–376
- Yang F, Hu J, Li J, Wu X, Qian Y** (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regulation* **58**: 131–136
- Yang X, Montano S, Ren Z** (2015) How Does Photoreceptor UVR8 Perceive a UV-B Signal? *Photochem Photobiol* **91**: 993–1003
- Yao Y, Danna CH, Ausubel FM, Kovalchuk I** (2012) Perception of volatiles produced by UVC-irradiated plants alters the response to viral infection in naïve neighboring plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 741–745
- Yassin M, Ton J, Rolfe SA, Valentine TA, Cromey M, Holden N, Newton AC** (2021) The rise, fall and resurrection of chemical-induced resistance agents. *Pest Management Science* **77**: 3900–3909
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, et al** (2008a) Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 1678–1692
- Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, Seki M, Umezawa T, Asami T, Maruyama-Nakashita A, Kudo T, Shinozaki K, Yoshida S, et al** (2008b) Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **20**: 1678–1692
- Yildiz I, Mantz M, Hartmann M, Zeier T, Kessel J, Thurow C, Gatz C, Petzsch P, Köhrer K, Zeier J** (2021) Mobile SAR signal N-hydroxy-pipecolic acid induces NPR1-dependent transcriptional reprogramming and immune priming. *Plant Physiol* kiab166
- Yoo HJ, Kim J-H, Park K-S, Son JE, Lee JM** (2020) Light-Controlled Fruit Pigmentation and Flavor Volatiles in Tomato and Bell Pepper. *Antioxidants* **9**: 14
- Yoshioka M, Doucet E, Drapeau V, Dionne I, Tremblay A** (2001) Combined effects of red pepper and caffeine consumption on 24 h energy balance in subjects given free access to foods. *Br J Nutr* **85**: 203–211
- Zacchini M, de Agazio M** (2004) Spread of oxidative damage and antioxidative response through cell layers of tobacco callus after UV-C treatment. *Plant Physiol Biochem* **42**: 445–450
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF** (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* **14**: 415–421
- Zamboni A, Vrhovsek U** (2006) Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis* **45**: 63–68
- Zamljen T, Zupanc V, Slatnar A** (2020) Influence of irrigation on yield and primary and secondary metabolites in two chilies species, *Capsicum annuum* L. and *Capsicum chinense* Jacq. *Agricultural Water Management* **234**: 106104

- Zamski E, Shoham O, Palevitch D, Levy A** (1987) Ultrastructure of Capsaicinoid-Secreting Cells in Pungent and Nonpungent Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars. *Botanical Gazette* **148**: 1–6
- Zeier J** (2021) Metabolic regulation of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **62**: 102050
- Zewdie Y, Bosland PW** (2000) Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. **6**
- Zeyrek F, Oguz E** (2005) In vitro activity of capsaicin against *Helicobacter pylori*. *Annals of Microbiology* **55**: 41–43
- Zhang D, Hamazu Y** (2002) Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Journal of Food Agriculture and Environment* **1**:
- Zhang JF, Li J, Xie JM, Yu JH, Dawuda MM, Lyv J, Tang ZQ, Zhang J, Zhang XD, Tang CN** (2020) Changes in photosynthesis and carotenoid composition of pepper (*Capsicum annuum* L.) in response to low-light stress and low temperature combined with low-light stress. *Photosynth* **58**: 125–136
- Zhang Q, Hu J, Sheng L, Li Y** (2010) Simultaneous quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin in rat plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **878**: 2292–2297
- Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, Shi H, Tepperman JM, Speed TP, Quail PH** (2013) A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* **9**: e1003244
- Zhang Z, Zhang X, Yang Y, Wei J, Meng H, Gao Z, Xu Y** (2014) Hydrogen peroxide induces vessel occlusions and stimulates sesquiterpenes accumulation in stems of *Aquilaria sinensis*. *Plant Growth Regul* **72**: 81–87
- Zhao F-J, McGrath SP** (2009) Biofortification and phytoremediation. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 373–380
- Zhou J, Yin Y** (2016) Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst* **141**: 6362–6373
- Zhu J-K** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247–273
- Zhuang Y, Chen L, Sun L, Cao J** (2012) Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. *Journal of Functional Foods* **4**: 331–338
- Zia-Ul-Haq M, Dewanjee S, Riaz M, eds** (2021) Carotenoids: Structure and Function in the Human Body. doi: 10.1007/978-3-030-46459-2
- Zioutopoulou A, Patitaki E, O'Donnell L, Kaiserli E** (2022) Low Fluence Ultraviolet-B Promotes Ultraviolet Resistance 8-Modulated Flowering in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **13**:
- Zipfel C** (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **20**: 10–16
- Zook M** (1998) Biosynthesis of Camalexin from Tryptophan Pathway Intermediates in Cell-Suspension Cultures of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**: 1389–1393
- Zunun-Pérez AY, Guevara-Figueroa T, Jimenez-García SN, Feregrino-Pérez AA, Gautier F, Guevara-González RG** (2017) Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsaicin content and gene expression associated with capsaicinoids synthesis in *Capsicum annuum* L. *Journal of Biosciences* **42**: 245–250
- Zushi K, Matsuzoe N** (1998) Effect of Soil Water Deficit on Vitamin C, Sugar, Organic Acid, Amino Acid and Carotene Contents of Large-fruited Tomatoes. *Engei Gakkai zasshi* **67**: 927–933
- FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>

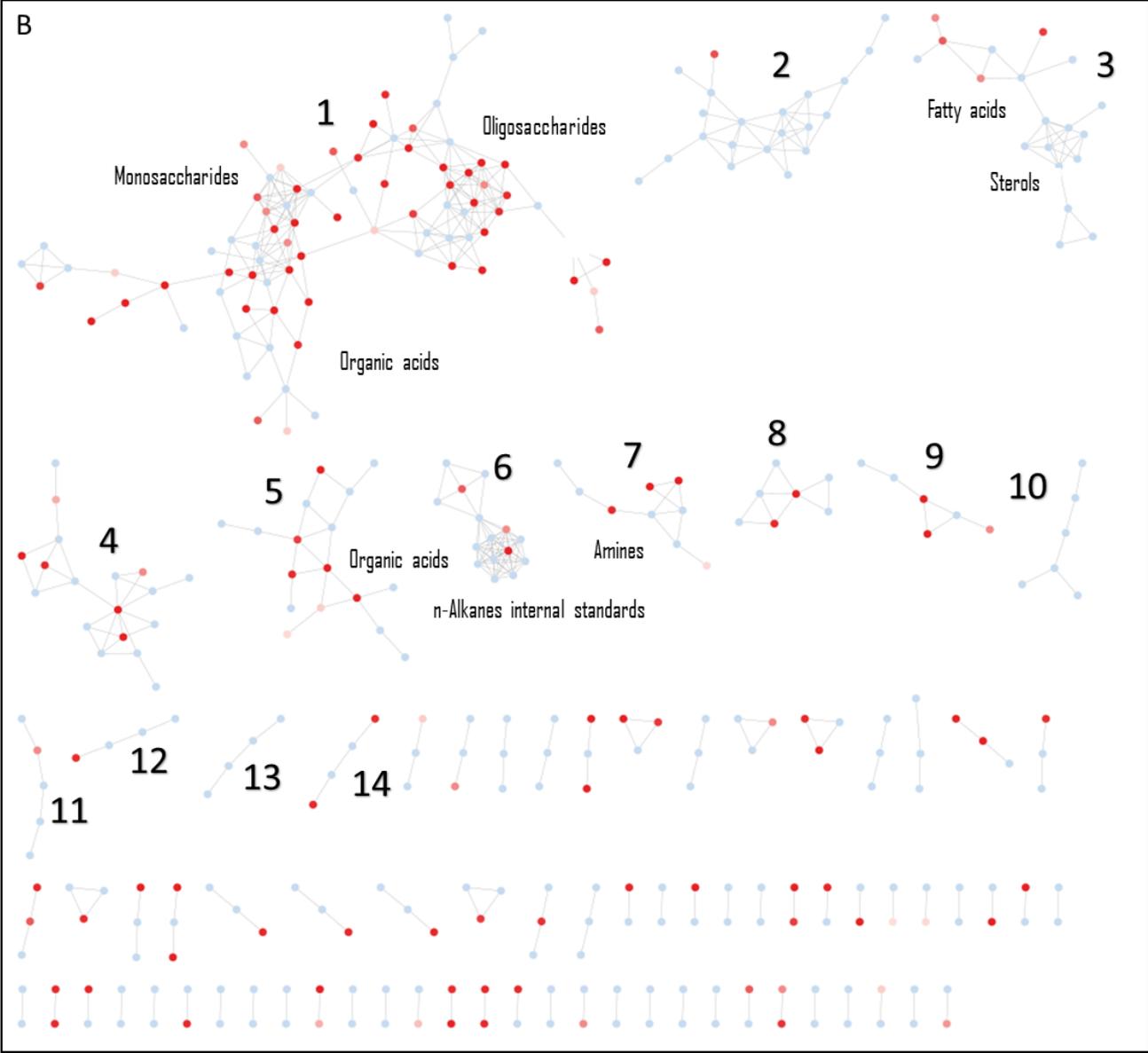
# Annexes

Annexe 1. Liste des 55 métabolites identifiés dans les feuilles de piment par GC-EI-TOFMS. Les niveaux d'identification ont été déterminés selon des critères inspirés de Schymanski et al. (2014). TR : temps de rétention. EIC : chromatogrammes d'ions extraits utilisés pour l'intégration chromatographique. « Reverse Match » : indice de similarité (%) entre les spectres expérimentaux et ceux de la base de données (900 ou plus : excellente correspondance ; 800-900, bonne correspondance ; 700-800, correspondance moyenne ; <600 mauvaise correspondance). RI : indice de rétention ;  $\Delta$ RI : pourcentage de la différence entre les indices de rétention mesurés et théoriques.

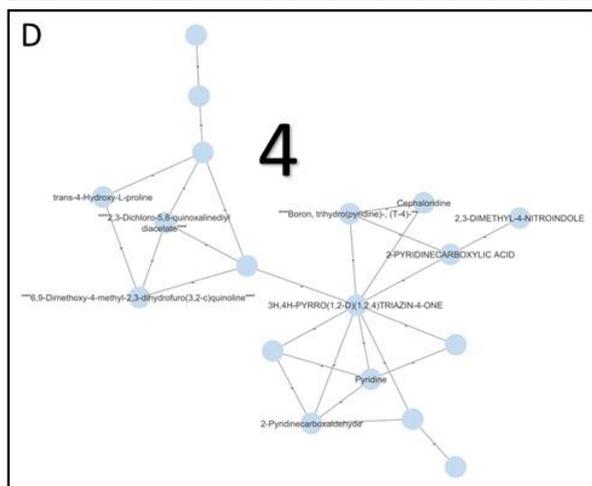
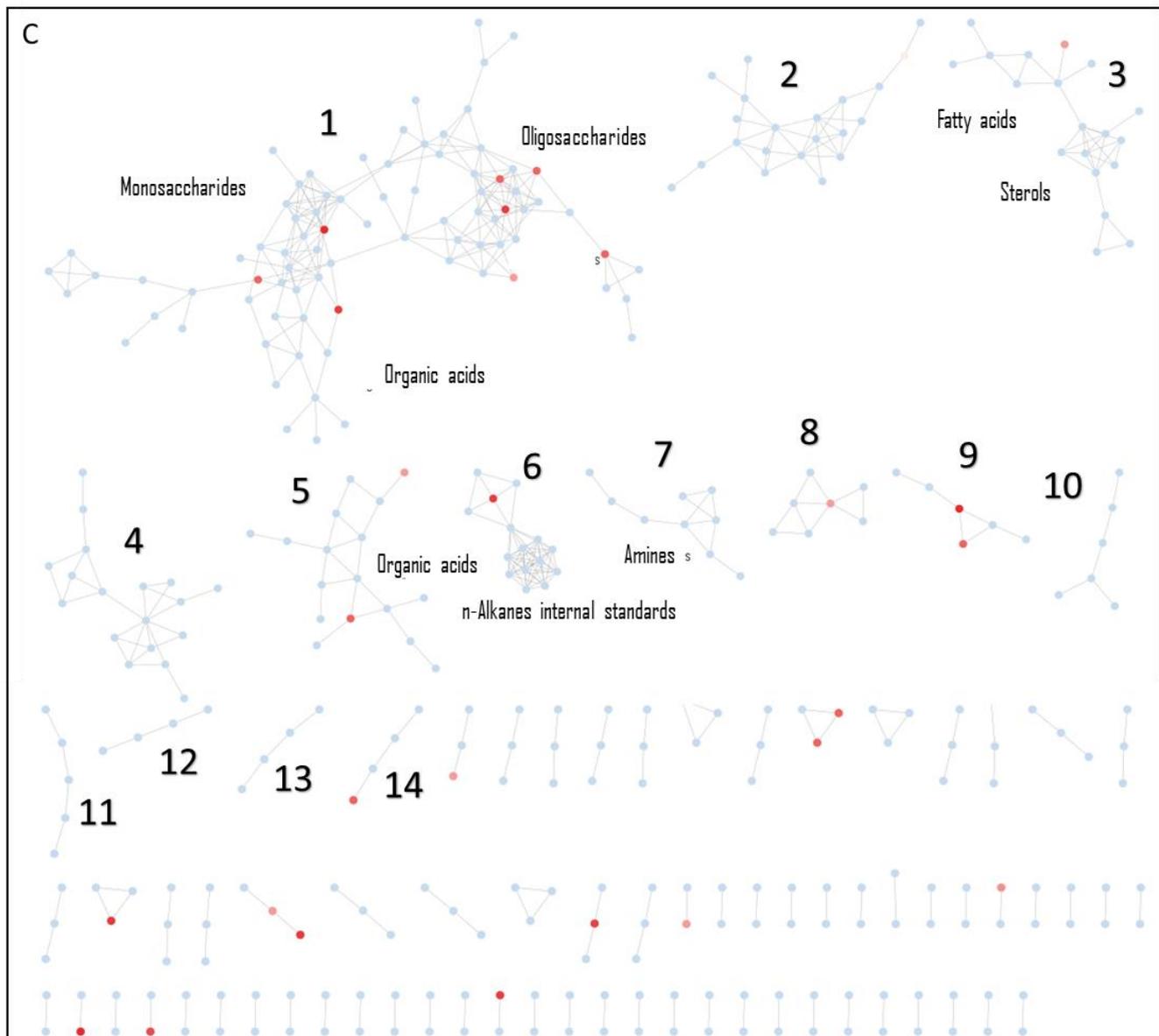
GC-TOF (MeOX+TMS)	Niveau d'identification	TR (min)	EIC	Reverse Match	RI	RI théorique	$\Delta$ RI
$\alpha$ -tocophérol	2	25,18	502,5	901	3143	3145	0,04%
1,6-anhydroglucose	2	14,73	160,1	829	1701	1699	0,15%
4-hydroxyproline	2	12,44	140,1	956	1521	1518	0,26%
Acide 5-O-coumaroylquinique	2	24,49	345,0	622	2973	2962	0,37%
Acide aconitique	2	15,41	211,0	776	1745	1740	0,29%
Acide ascorbique	1	17,55	332,2	753	1946	1937	0,43%
Acide aspartique	2	12,48	232,0	857	1514	1509	0,30%
Acide citrique	1	16,11	273,1	957	1812	1805	0,40%
Acide fumarique	1	9,99	245,1	748	1349	1346	0,26%
Acide gluconique-1,5-lactone	2	16,86	319,1	901	1877	1877	0,04%
Acide glutamique	2	13,69	246,2	957	1620	1615	0,28%
Acide glycérique	1	9,66	292,1	951	1326	1322	0,35%
Acide malique	1	11,93	233,1	936	1483	1477	0,43%
Acide mucique	2	18,53	333,2	717	2049	2032	0,82%
Acide oxalique	2	6,72	190,0	955	1122	1116	0,55%
Acide phosphorique	1	8,79	314,1	941	1266	1264	0,17%
Acide pyruvique	1	5,99	217,1	714	1072	1078	0,52%
Acide quinique	1	16,55	345,2	913	1851	1843	0,43%
Acide shikimique	2	16	204,1	934	1803	1801	0,11%
Acide succinique	1	9,46	247,1	953	1312	1310	0,18%
Acide thréonique	3	12,65	205,1	918	1538	1546	0,49%
Acide théonique-1,4-lactone	2	10,32	247,1	922	1372	1373	0,07%
Acide trans-3-caffeoylquinique	1	24,99	345,2	882	3104	3100	0,12%
Acide trans-4-hydroxycinnamique	1	17,53	293,1	907	1943	1940	0,14%
Acide trans-5-caffeoylquinique	1	25,37	307,1	739	3183	3178	0,17%
Acide trans-caféique	2	19,4	396,1	826	2142	2141	0,05%
Alanine	1	6,31	116,1	934	1094	1090	0,35%
Arabinose	1	14,2	307,2	853	1660	1654	0,39%
Asparagine	1	14,31	116,1	923	1669	1665	0,26%
Campestérol	2	25,82	343,4	910	3261	3279	0,55%
Cystéine	2	12,84	100,1	885	1553	1549	0,21%
Fructose	1	16,7	217,1	931	1864	1861	0,16%
Fructose-6-phosphate	1	20,64	459,2	828	2313	2292	0,95%
Galactinol	1	24,41	204,1	965	2979	2972	0,22%
Galactitol	2	17,55	319,0	808	1931	1934	0,16%
Glucose	1	16,99	319,2	912	1889	1886	0,16%
Glucose-6-phosphate	1	20,72	387,2	943	2327	2329	0,05%
Glycerol-3-phosphate	2	15,42	299,1	834	1756	1748	0,50%
Glycine	1	6,59	102,1	926	1114	1111	0,22%
Isoleucine	1	9,14	158,1	937	1290	1288	0,17%
Lysine	1	17,3	174,1	834	1919	1913	0,32%
Méthionine	2	10,89	104,1	706	1411	1414	0,19%
Myo-inositol	1	18,98	217,1	946	2096	2083	0,60%
Proline	2	9,22	133,1	917	1295	1298	0,18%
Raffinose	1	26,34	361,2	927	3348	3362	0,40%
Ribose	2	14,51	307,0	799	1673	1666	0,42%
Serine	2	10,11	204,1	949	1357	1353	0,33%
Sucrose	1	22,63	361,1	934	2644	2643	0,07%
Thréonine	2	10,48	218,2	935	1382	1379	0,25%
Tryptophane	2	20,02	202,1	918	2210	2214	0,17%
Tyrosine	2	17,49	100,1	873	1939	1932	0,37%
U_Acide nicotinique	3	9,2	180,1	923	1294		
U_Acide ribonique	3	15,44	292,0	646	1746		
Valine	2	7,98	144,1	930	1209	1208	0,08%
Xylose	1	14,11	307,2	914	1653	1651	0,15%



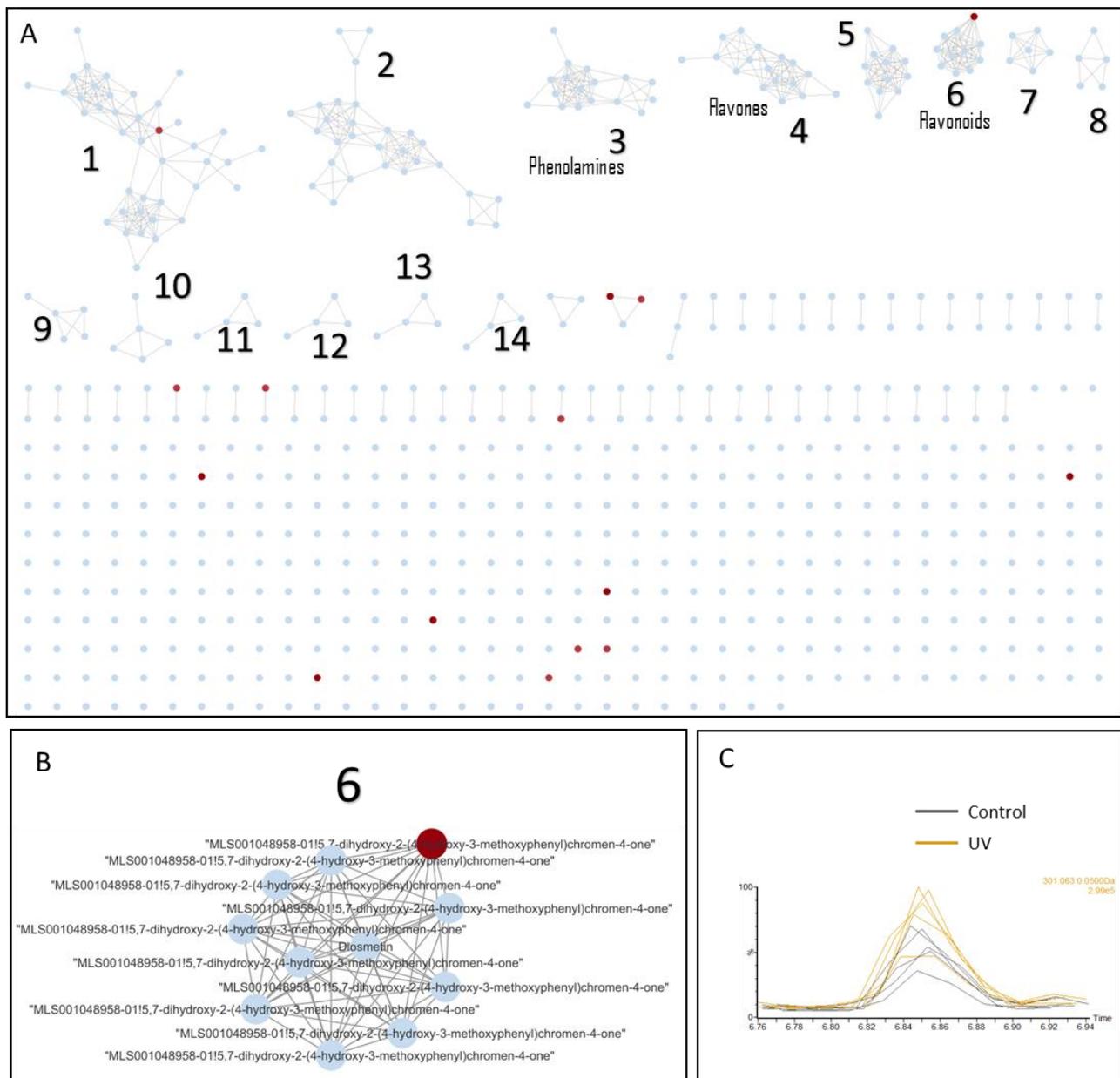
**(Continued) B** Discriminant nodes between Control and DS are shown in red (Mann-Whitney p-values < 0,05).



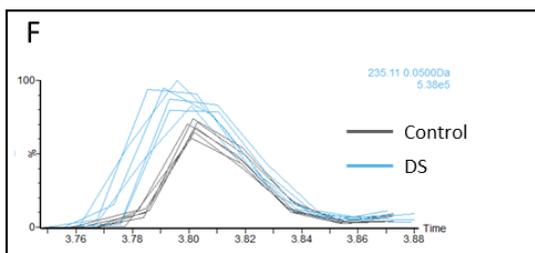
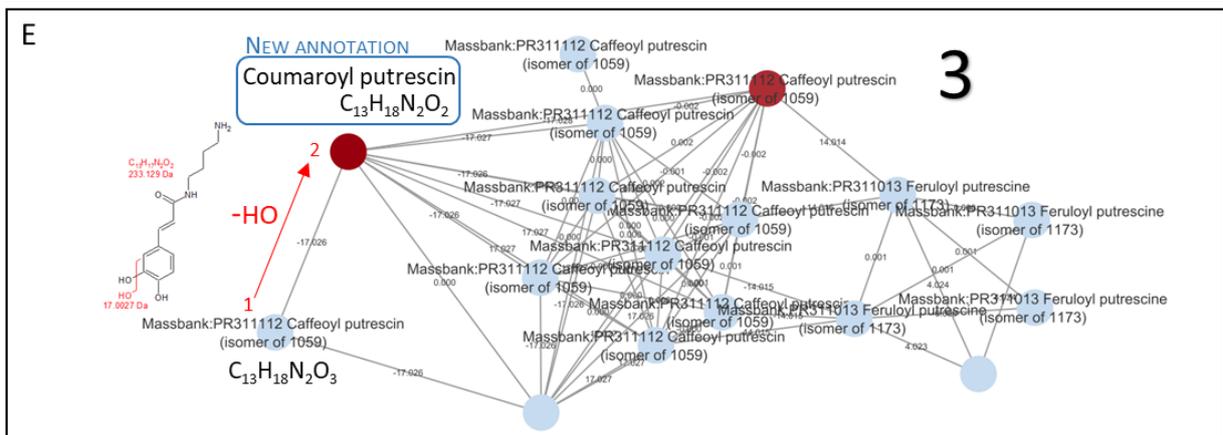
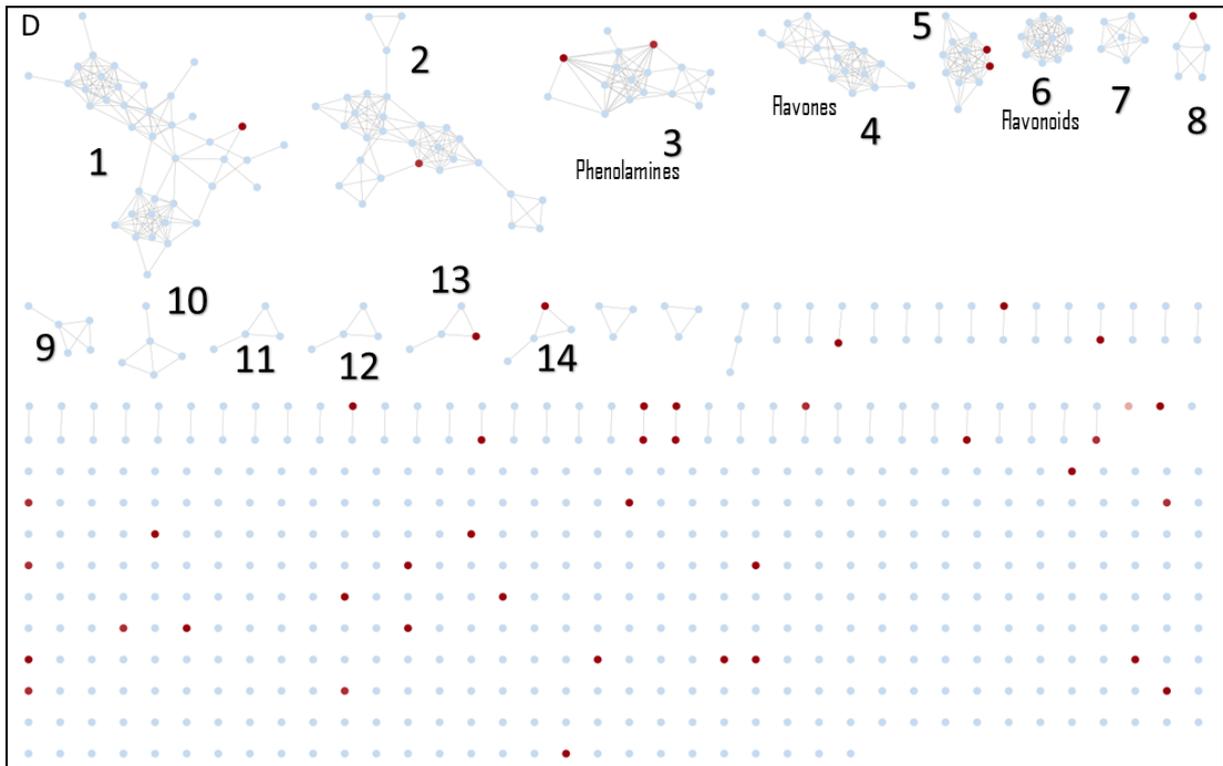
**(Continued) C)** Discriminant nodes between UV+DS and DS are shown in red (Mann-Whitney p-values < 0,05). **D)** Zoom on cluster 4, where trans-4-hydroxy-L-proline was correctly annotated.



**Figure S2. Effects of UV-C treatments, drought stress or a combination of both on the metabolome of chili plants (*C. chinense*): Feature-based molecular networks (GNPS) of LC-ESI(+)-MS data processed via MZMine 2.53.** Nodes were connected if they had a cosine score > 0.6 and more than 4 matched peaks. 14 clusters contained at least 4 nodes. UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants. **A)** Discriminant nodes between Control and UV are shown in red (Mann-Whitney p-values < 0,05). **B).** Zoom on cluster 6, containing a lot of flavonoid isomers. "MLS001048958-0115,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chromen-4-one" is also known as scoparol. **C)** Extracted ion chromatogram of scoparol m/z = 301.06 [M+H]<sup>+</sup> at RT = 6.85 min. Areas were not significantly different between control and UV-C-treated plants (Mann-Whitney, p-value > 0.05) contrary to what MZmine stated.

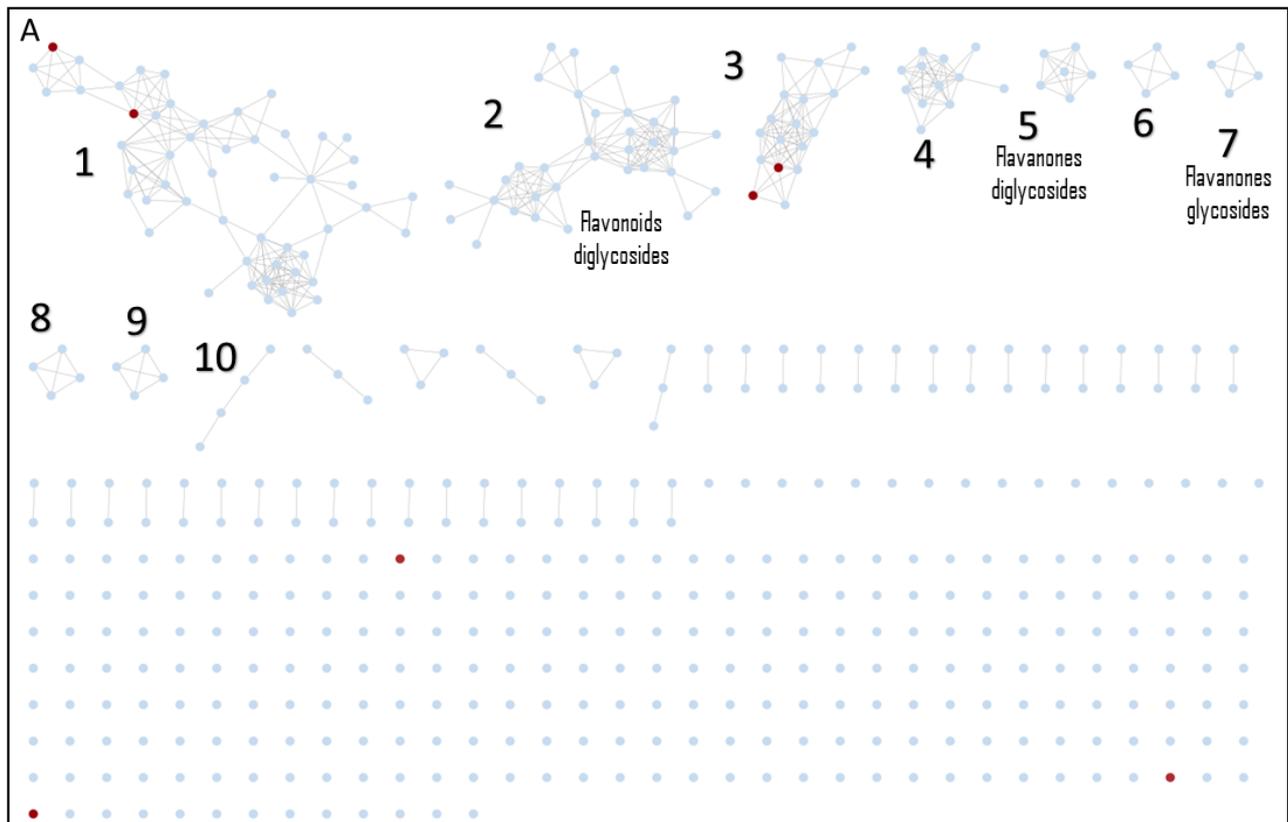


**(Continued) D)** Discriminant nodes between Control and DS are shown in red (Mann-Whitney p-values < 0,05). **E).** Zoom on cluster 3, containing phenolamides. Edge labels represent mass deltas between two linked nodes. Coumaroyl putrescin was identified from a node annotated Caffeoyl putrescin, which has an additional hydroxyl group (17.026 mass difference). **F)** Extracted ion chromatogram of coumaroyl putrescin  $m/z = 235.11$  [M+H]<sup>+</sup> at RT = 3.80 min. The area was significantly larger in the DS condition compared with the control condition (Mann-Whitney test, p-value < 0.05) in accordance with MZmine.



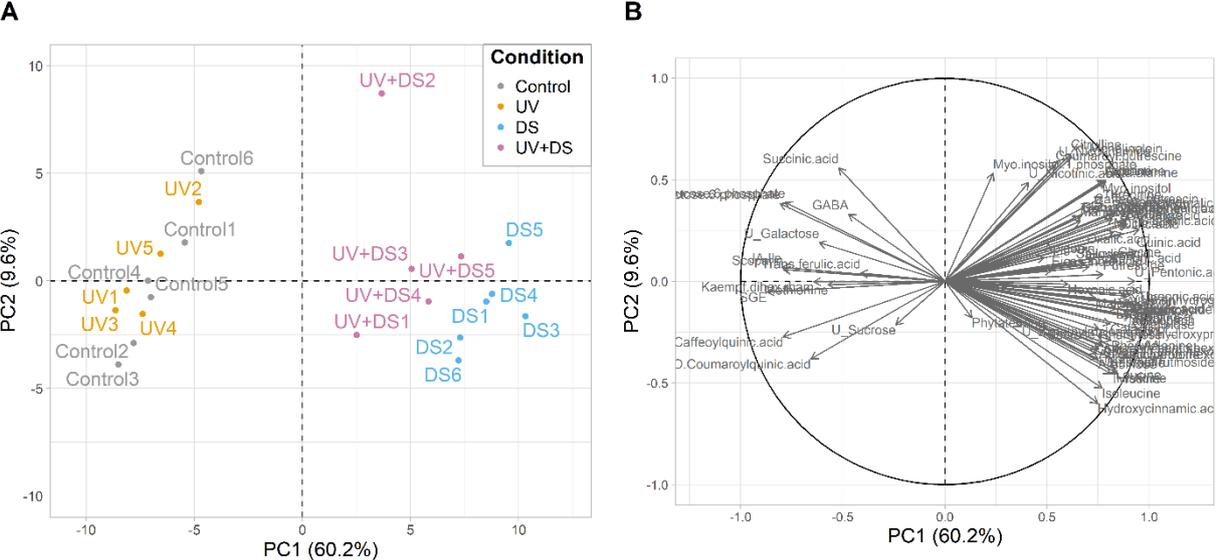


**Figure S3. Effects of UV-C treatments, drought stress or a combination of both on the metabolome of chili plants (*C. chinense*): Feature-based molecular networks (GNPS) of LC-ESI(-)-MS data processed via MZMine 2.53.** Nodes were connected if they had a cosine score > 0.7 and more than 6 matched peaks. 10 clusters contained at least 4 nodes. UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants. **A)** Discriminant nodes between Control and UV are shown in red (Mann-Whitney p-values < 0,05).





**Figure S4. Effects of UV-C treatments, drought stress or a combination of both on the metabolome of chili plants (*C. chinense*): Principal Component Analysis of compounds both annotated and discriminant, obtained by non-targeted GC-MS (68 compounds) and LC-MS/MS (19 compounds). Raw peak areas were normalized by sample dry mass and then mean-centered and divided by the standard deviation of each variable. UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants. **A.** Score plot. **B.** Loadings plot.**



**Figure S5. Effects of UV-C treatments, drought stress or a combination of both on the metabolome and physiology of chili plants (*C. chinense*): box-plots of variables significantly changed in at least one condition.** For metabolites, raw peak areas were normalized by sample dry mass and then mean-centered and divided by the standard deviation of each variable. Difference significance is indicated by letters, according to a Conover post-hoc test following a Kruskal-Wallis test ( $p$ -value < 0.05). UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants.



**Figure S5. (Continued)**



Figure S5. (Continued)

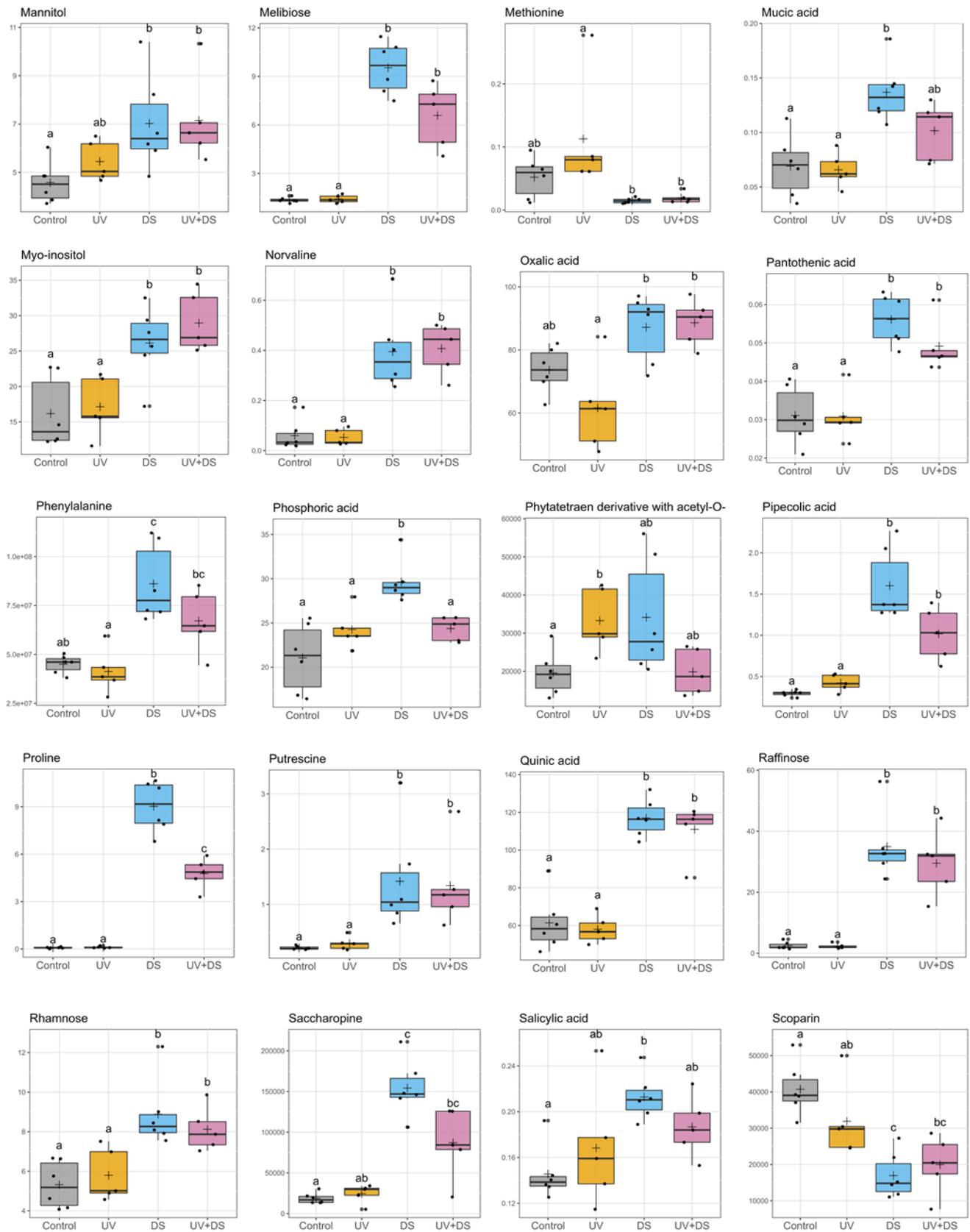
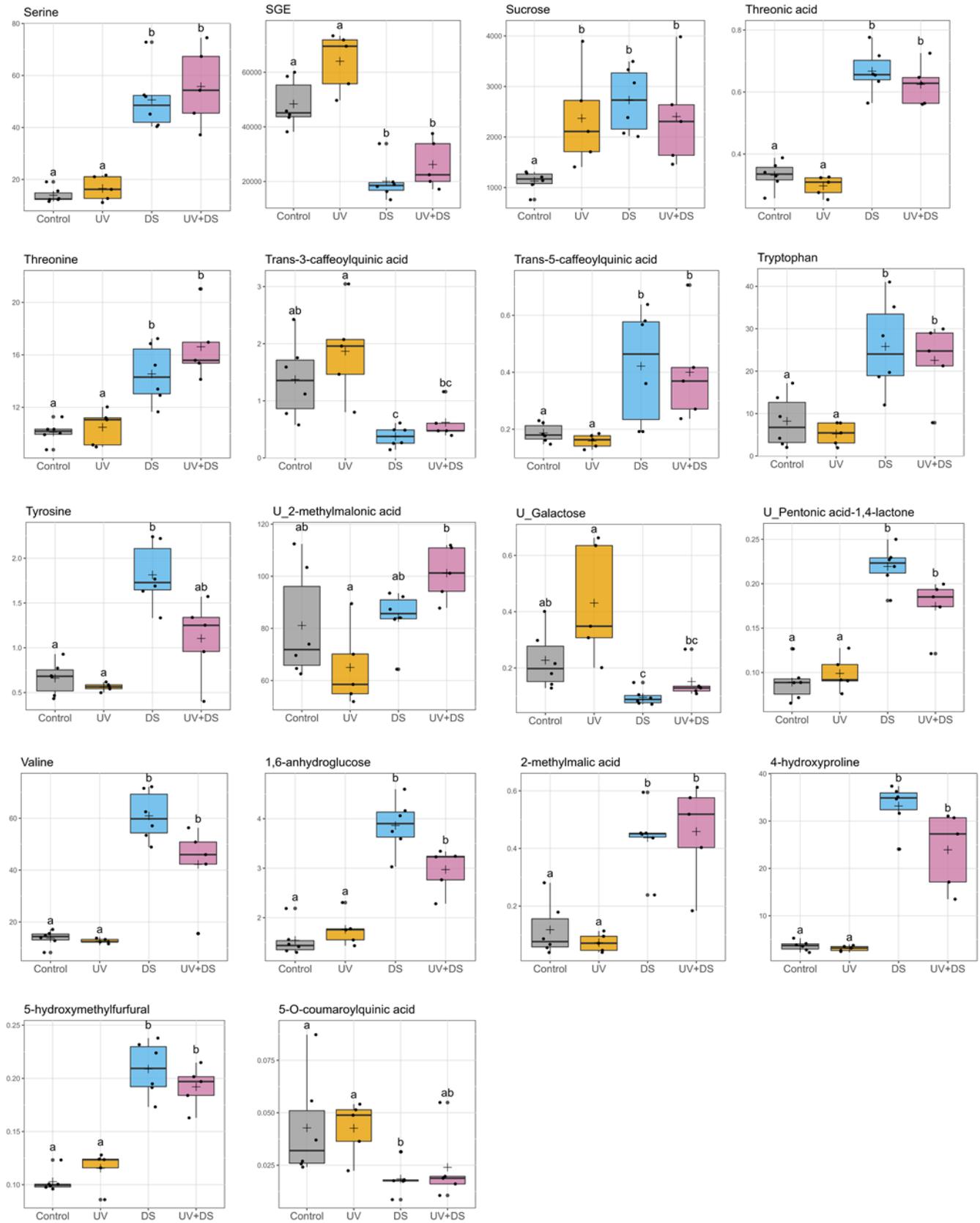


Figure S5. (Continued)



**Supplementary table S1.** List of the 94 metabolites identified in chili pepper leaves by GC-EI-TOFMS. Identification levels were determined according to criteria inspired by Schymanski et al., (2014). RT : retention time. EIC : extracted ion chromatograms used for chromatographic integration. "Reverse Match : similarity index (%) between experimental and database spectra (900 or greater : excellent match; 800–900, good match; 700–800, fair match; <600 poor match), RI : retention index. " $\Delta$ RI : percentage of the difference between measured and theoretical Retention Indices.

Name	Abbreviation	ID Level	RT (min)	EIC	Reverse Match	RI	Theoretical RI	$\Delta$ RI
1,6-anhydroglucose		[2]	14,73	160,1	829	1702	1699	0,15%
1-monolinolein		[2]	23,3	395,3	739	2755	2761	0,21%
2-aminoadipic acid	AAA	[1]	14,88	260,0	534	1713	1710	0,18%
2-aminobutyric acid	AABA	[2]	7,33	130,1	889	1165	1162	0,23%
2-methylmalic acid		[2]	11,69	115,1	717	1467	1464	0,20%
2-oxoglutaric acid		[2]	13,11	198,1	817	1575	1568	0,42%
4-hydroxybenzaldehyde		[2]	10,42	179,1	740	1379	1383	0,30%
4-hydroxyproline		[2]	12,44	140,1	956	1522	1518	0,26%
5-hydroxymethylfurfural	5-HMTF	[2]	10,76	189,1	769	1402	1400	0,16%
5-O-coumaroylquinic acid		[3]	24,39	372,2	622	2976	2962	0,46%
Alanine		[1]	6,31	116,1	934	1095	1091	0,35%
Allantoin		[2]	18,83	259,1	759	2082	2067	0,69%
Alpha-linolenic acid		[2]	20,06	335,3	848	2217	2216	0,06%
Alpha-tocopherol		[2]	25,18	502,5	901	3144	3145	0,04%
Apigenin		[2]	25,2	471,2	904	3148	3145	0,11%
Arabinose		[1]	14,2	307,2	853	1661	1654	0,39%
Arginine		[2]	16,19	157,1	721	1820	1814	0,32%
Ascorbic acid		[1]	17,55	332,2	753	1946	1938	0,43%
Asparagine		[1]	14,31	116,1	923	1669	1665	0,26%
Beta-alanine		[1]	7,63	176,1	854	1186	1183	0,25%
Calystegine B1		[2]	16,4	216,2	746	1838	1834	0,25%
Campesterol		[1]	25,82	343,4	910	3261	3279	0,55%
Citric acid		[1]	16,11	273,1	957	1812	1805	0,40%
Cysteine		[2]	12,84	100,1	885	1553	1550	0,21%
Eicosanoic acid		[2]	21,58	369,4	854	2469	2452	0,72%
Erythritol		[2]	12,07	217,1	911	1493	1493	0,03%
Fructose		[1]	16,7	217,1	931	1864	1861	0,16%
Fructose-6-phosphate		[1]	20,64	459,2	828	2314	2292	0,95%
Fumaric acid		[1]	9,99	245,1	748	1350	1346	0,26%
Galactinol		[1]	24,41	204,1	965	2979	2973	0,22%
Glucose		[1]	16,99	319,2	912	1889	1886	0,16%
Glucose-6-phosphate		[1]	20,72	387,2	943	2328	2329	0,05%
Glutamic acid		[2]	13,69	246,2	957	1620	1615	0,28%
Glyceric acid		[1]	9,66	292,1	951	1327	1322	0,35%
Glyceric acid-3-phosphate		[1]	15,95	299,1	774	1799	1790	0,49%
Glycerol-3-phosphate		[2]	15,42	299,1	834	1757	1748	0,50%
Glycine		[1]	6,59	102,1	926	1114	1112	0,22%
Glyoxylic acid		[2]	4,79	160,1	877	989	983	0,69%
Hexonic acid		[3]	18,02	333,2	719	1995	1989	0,30%
Indole-3-lactic acid		[3]	19,95	202,1	921	2199	2158	1,90%
Isoleucine		[1]	9,14	158,1	937	1290	1288	0,17%
Leucine		[1]	8,81	158,1	923	1268	1266	0,14%
Lysine		[1]	17,3	174,1	834	1919	1913	0,32%
Malic acid		[1]	11,93	233,1	936	1483	1477	0,43%
Malonic acid		[2]	7,8	233,1	854	1198	1195	0,23%
Mannitol		[1]	17,35	319,2	937	1925	1922	0,15%
Melibiose		[1]	23,8	204,1	921	2847	2854	0,24%
Methionine		[2]	10,89	104,1	706	1411	1414	0,19%
Mucic acid		[2]	18,53	333,2	717	2049	2033	0,82%
Myo-inositol		[1]	18,98	217,1	946	2097	2084	0,60%
Myo-inositol-1-phosphate		[2]	21,36	299	819	2433	2412	0,88%
Norvaline		[2]	8,34	144,1	868	1235	1233	0,14%
Orotic acid		[2]	15,23	254,1	867	1742	1739	0,20%
Oxalic acid		[2]	6,72	190	955	1123	1117	0,55%

**Supplementary table S1 (Continued)**

Pantothenic acid		[2]	18,04	291,2	701	1997	1997	0,02%
Phosphoric acid		[1]	8,79	314,1	941	1266	1264	0,17%
Pipecolic acid		[1]	10,2	156,1	813	1364	1366	0,17%
Proline		[2]	7,42	70,1	941	1171	1176	0,41%
Putrescine		[2]	12,27	142,1	880	1508	1508	0,03%
Pyrophosphate		[2]	14,17	451,1	839	1658	1652	0,36%
Pyruvic acid		[1]	5,55	174,1	892	1042	1038	0,41%
Quinic acid		[1]	16,55	345,2	913	1851	1843	0,43%
Raffinose		[1]	26,34	361,2	927	3349	3362	0,40%
Rhamnose		[2]	14,88	117,1	775	1714	1718	0,20%
Ribitol		[1]	14,97	319	894	1722	1715	0,38%
Salicylic acid	SA	[1]	12,24	267,1	799	1505	1507	0,11%
Serine		[2]	10,11	204,1	949	1358	1353	0,33%
Shikimic acid		[2]	16	204,1	934	1803	1801	0,11%
Stigmasterol		[2]	25,94	139,2	794	3281	3303	0,66%
Succinic acid		[1]	9,46	247,1	953	1312	1310	0,18%
Sucrose		[1]	22,63	361,1	934	2645	2643	0,07%
Sulfuric acid		[2]	7,16	227,1	951	1153	1154	0,02%
Threonic acid		[2]	12,65	205,1	918	1538	1546	0,49%
Threonic acid-1,4-lactone		[2]	10,32	247,1	922	1372	1373	0,07%
Threonine		[2]	10,48	218,2	935	1383	1379	0,25%
Trans-3-caffeoylquinic acid		[1]	24,99	345,2	882	3104	3100	0,12%
Trans-4-hydroxycinnamic acid		[1]	17,53	293,1	907	1943	1941	0,14%
Trans-5-caffeoylquinic acid		[1]	25,37	307,1	739	3184	3178	0,17%
Trans-caffeic acid		[2]	19,4	396,1	826	2142	2141	0,05%
Trans-ferulic acid		[2]	19,03	323,2	805	2102	2093	0,43%
Trehalose		[1]	23,22	191,1	941	2743	2730	0,47%
Tryptophan		[2]	20,02	202,1	918	2210	2214	0,17%
Tyrosine		[2]	17,49	100,1	873	1939	1932	0,37%
U_2-methylmalonic acid		[3]	5,8	89,1	844	1059		
U_Galactose		[3]	19,38	319,2	806	2139		
U_Nicotinamide		[3]	11,86	179,1	741	1479		
U_Nicotinic acid		[3]	9,2	180,1	923	1294		
U_Pentonic acid-1,4-lactone		[3]	13,87	259,1	890	1635		
U_Phytol		[3]	19,71	143,1	794	2174		
U_Picolinic acid		[3]	9,6	180,1	932	1322		
U_Sucrose		[3]	21,98	361,2	926	2537		
Uric acid		[2]	19,06	387,2	832	2105	2090	0,76%
Valine		[2]	7,98	144,1	930	1210	1209	0,08%
Xylose		[1]	14,11	307,2	914	1653	1651	0,15%



**Supplementary table S3.** List of the 8 metabolites identified in chili pepper leaves by UPLC-ESI-TQMS.

Identification level 1 according to criteria defined by Schymanski et al., (2014)

Name	Abbreviation	RT (min)	MRM transition (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (V)
4-aminobutyric acid	GABA	4,31	274,04>171,0	21	24
Citrulline		3,05	346,11>171,0	29	24
Glutamine		2,01	317,09>171,0	21	24
Histidine		1,08	326,09>156,0	13	12
Phenylalanine		7,94	336,14>171,0	13	24
Saccharopine		2,54	447,0>171,0	30	24
Abscisic acid	ABA	3,34	263,0>153,0	30	8
Jasmonoyl-isoleucine	JA-ile	4,71	324,2>151,0	20	16

**Supplementary table S4.** Description of the main clusters (more than 4 nodes) obtained by automatic deconvolution (MSHub), library searching and molecular networking on GNPS.

GC-MS network		
Cluster number	Number of nodes	Family
1	82	Monosaccharides, Oligosaccharides, Organic acids
2	21	
3	19	Fatty acids, Sterols
4	18	
5	17	Organic acids
6	15	n-Alkanes (including internal standards)
7	9	Amines
8	7	
9	6	
10	6	
11	5	
12	4	
13	4	
14	4	

Supplementary table S4 (Continued)

LC-ESI(+)/MS network		
Cluster number	Number of nodes	Family
1	40	
2	29	
3	17	Phenolamides
4	17	Flavones
5	12	
6	11	Flavonoids
7	6	
8	5	
9	5	
10	5	
11	4	
12	4	
13	4	
14	4	

LC-ESI(-)/MS network		
Cluster number	Number of nodes	Family
1	52	
2	24	Flavonoid diglucoside
3	18	
4	12	
5	6	Flavanone diglucoside
6	4	
7	4	Flavanone glucoside
8	4	
9	4	
10	4	

**Supplementary table S5.** Comparison of GC-MS annotations obtained by automatic deconvolution via MSHub and automatic deconvolution via ChromaTOF with manual verification

Cluster #		ID	RT	m/z	MQScore/RM	$\Delta$ RI	Database
1	MSHub/GNPS result	228 Phenylalanine	13,78	218	0,86	0,12%	Riken
	ChromaTOF® result at this RT	Phenylalanine 2TMS	13,78	218	818	0,12%	GOLM
4	MSHub/GNPS result	197 trans-4-hydroxyproline	12,44	140	0,93	0,26%	GL Sciences, Japan
	ChromaTOF® result at this RT	trans-4-hydroxyproline	12,44	140	956	0,26%	GOLM
14	MSHub/GNPS result	327 Citrulline	18,04	185	0,67	10%	Kitakyushu Univ, Japan
	ChromaTOF® result at this RT	Panhotenic acid 3TMS	18,04	185	701	0,02%	GOLM
	Citrulline searching on ChromaTOF®	Citrulline	/	/	/	/	
26	MSHub/GNPS result	176 – DL-pipecolic acid	11,5	156	0,76	49,50%	Osaka Univ
	ChromaTOF® result at this RT	2,2'-Bipyridine	11,5	156	887	1,36%	GOLM
	Pipecolic acid searching on ChromaTOF®	Pipecolic acid 2 TMS	22,7	156	813	0,17%	GOLM
32	MSHub/GNPS result	231 Glycine	13,94	102	0,57	27,6% (3TMS) 47,6% (2TMS)	MoNA
	ChromaTOF® result at this RT	2-[(Z)-[(2-Anilino-1-methyl-2-p-methoxyphenyl)ethenyl]-2-oxazoline	13,94	307	884	/	GOLM
	Glycine searching on ChromaTOF®	Glycine 2TMS	6,59	102	926	0,22% (2TMS) 3TMS not found	GOLM
	ChromaTOF®	Proline 1 TMS	7,42	70	941	0,41%	GOLM
	MSHub/GNPS result at 7,42	/	/	/	/	/	/
	ChromaTOF®	Proline 2 TMS	9,22	133	917	0,18%	GOLM
	MSHub/GNPS result at 9,22	/	/	/	/	/	/

**Supplemental table S6.** Comparison of LC-MS/MS annotations obtained by deconvolution on DDA data via MZMine or DIA data via Progenesis and/or manual verification.ID: identification by automatic deconvolution by MSHub or by ChromaTOF®; RT: retention time; m/z: majority ion

Cluster #	MZmine/GNPS result (DDA)						Progenesis result (DIA)							
	ID	RT	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS (ESI <sup>-</sup> ) m/z	C/UV	C/DS	UV+DS/DS	ID	RT	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS m/z	C/UV	C/DS	UV+DS/DS
	-	-	-	-	-	-	-	Hydroxycinnamic acid	1.78	163,0395	119;165;147;121;119	0.177	0.002	0.017
	-	-	-	-	-	-	-	Salicylic acid glucose ester	3.8	299,0765	-	0.052	0.002	0.177
	-	-	-	-	-	-	-	Isoscaparin	4.96	461,107	371;341;311	0.931	0.002	0.017
	-	-	-	-	-	-	-	Kaempferol-O-coumaroyl-O-rhamnose	5.12	917,2343	455;355;609	0.429	0.240	0.052
	-	-	-	-	-	-	-	Kaempferol-O-rhamnoside	5.61	755,2025	801,299	0.004	0.026	0.429
	-	-	-	-	-	-	-	Phytolactone derivative with acetyl-O-glucose	7.41	907,3795	(+)-931;503;665;607;289;459;801;417;255	0.017	0.026	0.126
5	Flavanone base +4O, O-Hex, C-Pen	4.85	581,1515	239;209;269;167;125;198;329	0.66	0.02	0.66	Flavanone base +4O, O-Hex, C-Pen	4.82	581,1506	-	0.792	0.589	0.662
7	Isoschaftoside	5.1	563,1403	353;383;297;354;325;443;473	0.330	0.002	0.017	Apigenin C-pentose-Chexose_1	5.08	563,1400	443;473;411;383;353;353	0.792	0.002	0.004
7	Isoschaftoside	5.2	563,1411	353;383;297;443;354;473;325	0.247	0.180	0.792	Apigenin C-pentose-Chexoside_2	5.19	563,1404	443;473;383;353;297	0.792	0.002	0.004
31	Scoparin	5.92	461,1085	341;298;335;342;313;326	0.79	0.004	0.53	Scoparin	5.9	461,1111	-	0.247	0.589	0.792
5	-	4.16	235,1435 [M+H] <sup>+</sup>	(+)-147;119;91;146;120;210	0.421	0.662	0.330	Coumaroylputrescine	4.13	235,1454 [M+H] <sup>+</sup>	(+)-235;147;119;91	0.931	0.041	1.000
7	PR307061.NP-000002(10)	4.88	593,1505	353;383;473;297;365;325	0.931	0.002	0.017	Kaempferol 3-O-rutinoside	4.86	593,1496	473;535;383;297	0.931	0.002	0.004
7	PR307031.NP-000062(6)	5.34	563,1405	353;383;443;297;473;325;354	0.082	0.002	0.030	Apigenin C-pentose-Chexoside_3	5.32	563,1386	443;473;383;324;297	1.000	0.002	0.017
1	PEL18,0(0); [M-H] <sup>-</sup> ; C33H47N1O7P1	13.75	480,3085	283;255;480;196;485;152;196	0.58	0.004	0.93	(2-aminoethoxy)[2-hydroxy-3-(octadecanoyloxy)propyl]phosphonic acid	13.69	480,3089	-	1.000	0.004	0.792
2	Apilin	6.56	563,1398	269;563	0.33	0.008	0.79	-	-	-	-	-	-	-
6	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)chroman-4-one (Scoparol)	6.86	301,0709 [M+H] <sup>+</sup>	(+)-269;286;259;229;153;287;257	0.008	0.24	0.93	-	-	-	-	-	-	-

**Supplemental table S7 (on the left).** Metabolites variations induced by UV-C treatment in chili leaves (*C. chinense*) under well-watered conditions. C: control; UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants.

Compound identity	Class (1)	Family	Identification level (2)	Control		UV		DS		UV+DS		p-value (3)	p-value (4)	Log2 ratios		
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			UV/C	DS/C (UV+DS)/DS	
Sucrose	I	Oligosaccharides	[1]	1126.50 ± 202.15	202.15	2370.32 ± 986.4	2731.18 ± 651.1	2426.03 ± 1004.6	2426.03 ± 1004.6	4.36E-03	2.2E-03	5.4E-01	1.0	1.0	1.0	1.0
Kempferol-3-O-rhamnoside	II	Flavonoids	[3]	7960.05 ± 2027.3	2027.3	35549.79 ± 4996.6	51930.1 ± 1006.3	6056.86 ± 2482.0	6056.86 ± 2482.0	2.6E-03	4.3E-03	4.3E-01	1.3	1.3	1.3	1.3
U-Galactose	I	Monosaccharides	[3]	0.23 ± 0.1	0.1	0.43 ± 0.2	0.10 ± 0.0	0.15 ± 0.1	0.15 ± 0.1	2.2E-03	8.7E-03	5.2E-01	0.0	0.0	0.0	0.0
Phytosterin derivative with acetyl-D-glucose	II	Terpenoids derivatives	[3]	19548.24 ± 5802.4	5802.4	33272.89 ± 8403.0	344138.31 ± 18345.1	18849.30 ± 6029.9	18849.30 ± 6029.9	2.4E-02	1.7E-02	1.3E-01	0.0	0.0	0.0	0.0
Myo-inositol-1-phosphate	I	Polysols	[2]	0.19 ± 0.1	0.1	0.38 ± 0.0	0.26 ± 0.1	0.25 ± 0.1	0.25 ± 0.1	6.2E-02	5.9E-02	6.6E-01	0.0	0.0	0.0	0.0
Piccolic acid	PH	Phytohormones	[1]	0.30 ± 0.0	0.0	0.42 ± 0.1	1.50 ± 0.4	1.02 ± 0.3	1.02 ± 0.3	4.6E-04	1.7E-02	5.8E-02	0.0	0.0	0.0	0.0
SSE	II	Hydroxyamic acids and derivatives	[3]	48409.63 ± 8803.4	8803.4	64046.73 ± 10623.2	200663.7 ± 7139.0	36212.88 ± 8857.1	36212.88 ± 8857.1	5.9E-04	2.2E-03	1.8E-01	0.0	0.0	0.0	0.0
Malic acid	I	Organic acids	[2]	0.72 ± 0.1	0.1	0.60 ± 0.1	1.31 ± 0.1	1.02 ± 0.1	1.02 ± 0.1	3.1E-04	3.0E-02	8.7E-03	0.0	0.0	0.0	0.0
Scoparin	II	Flavonoids	[3]	40282.73 ± 7340.7	7340.7	31910.57 ± 10471.2	169612.38 ± 6313.6	19933.22 ± 8124.1	19933.22 ± 8124.1	2.2E-03	8.4E-02	5.4E-01	4.0	4.0	4.0	4.0
Hexonic acid	II	Organic acids	[3]	0.02 ± 0.0	0.0	0.02 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.03 ± 0.0	5.8E-03	3.6E-02	2.4E-01	3.3E-01	3.3E-01	3.3E-01	3.3E-01

Compound identity	Class (1)	Family	Identification level (2)	Control		UV		DS		UV+DS		p-value (3)	p-value (4)	Log2 ratios		
				Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD			UV/C	DS/C (UV+DS)/DS	
Saccharine	I	Amino acids	[1]	49733.71 ± 6643.92	6643.92	154593.36 ± 190840.70	288800.40 ± 218679.9	245158.7 ± 35059.75	245158.7 ± 35059.75	1.3E-03	1.6E-01	1.7E-02	1.0	1.0	1.0	1.0
Hellidine	II	Amino acids	[3]	50495.60 ± 239495.60	239495.60	190840.70 ± 435413.2	218679.9 ± 218679.9	60497.60 ± 193733.0	60497.60 ± 193733.0	3.9E-03	1.6E-01	6.6E-02	1.3	1.3	1.3	1.3
Kempferol-3-O-rhamnoside	II	Flavonoids	[3]	34817.45 ± 15844.5	15844.5	435413.2 ± 218679.9	218679.9 ± 218679.9	245158.7 ± 35059.75	245158.7 ± 35059.75	1.3E-03	1.6E-01	1.7E-02	1.0	1.0	1.0	1.0
U-Galactose	I	Monosaccharides	[3]	0.23 ± 0.1	0.1	0.43 ± 0.2	0.10 ± 0.0	0.15 ± 0.1	0.15 ± 0.1	2.2E-03	8.7E-03	5.2E-01	0.0	0.0	0.0	0.0
U-3-phenylacetic acid	I	Organic acids	[3]	81.11 ± 21.0	21.0	60.00 ± 19.3	64.84 ± 10.9	64.84 ± 10.9	64.84 ± 10.9	3.9E-03	1.6E-01	6.6E-02	1.3	1.3	1.3	1.3
Phenylacetic acid	I	Organic acids	[3]	81.11 ± 21.0	21.0	60.00 ± 19.3	64.84 ± 10.9	64.84 ± 10.9	64.84 ± 10.9	3.9E-03	1.6E-01	6.6E-02	1.3	1.3	1.3	1.3
Benzoic acid	I	Organic acids	[3]	21.06 ± 3.9	3.9	24.25 ± 2.3	24.25 ± 2.3	24.25 ± 2.3	24.25 ± 2.3	1.6E-03	1.3E-01	4.2E-02	0.0	0.0	0.0	0.0
U-2-thiopyridone-L-alanine	I	Organic acids	[3]	0.09 ± 0.0	0.0	0.10 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.0	3.7E-03	3.0E-02	3.6E-02	0.2	0.2	0.2	0.2
Malic acid	I	Organic acids	[2]	0.72 ± 0.1	0.1	0.60 ± 0.1	1.31 ± 0.1	1.02 ± 0.1	1.02 ± 0.1	3.1E-04	3.0E-02	8.7E-03	0.0	0.0	0.0	0.0
1,6-anhydroglucose	I	Monosaccharides	[2]	1.54 ± 0.3	0.3	1.76 ± 0.3	3.86 ± 0.5	2.97 ± 0.4	2.97 ± 0.4	6.2E-04	1.8E-01	8.7E-03	0.3	0.3	0.3	0.3
Mucic acid	I	Organic acids	[2]	0.07 ± 0.0	0.0	0.07 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	4.3E-03	9.1E-01	8.2E-02	0.1	0.1	0.1	0.1
4-hydroxyproline	I	Amino acids	[2]	3.65 ± 1.1	1.1	3.11 ± 0.5	13.18 ± 4.9	21.93 ± 8.1	21.93 ± 8.1	6.0E-04	3.1E-01	3.0E-02	0.2	0.2	0.2	0.2
Leucine	I	Amino acids	[2]	5.73 ± 1.4	1.4	5.00 ± 0.7	14.40 ± 2.5	10.12 ± 3.6	10.12 ± 3.6	3.8E-03	2.6E-01	3.0E-02	0.2	0.2	0.2	0.2
Valine	I	Amino acids	[2]	13.74 ± 3.1	3.1	12.65 ± 0.9	60.95 ± 9.6	42.20 ± 15.8	42.20 ± 15.8	6.1E-04	3.8E-01	3.0E-02	0.1	0.1	0.1	0.1
Melibiose	I	Oligosaccharides	[2]	1.35 ± 0.2	0.2	1.42 ± 0.2	9.53 ± 1.6	6.58 ± 2.0	6.58 ± 2.0	2.6E-04	7.9E-01	2.2E-03	3.0E-02	3.0E-02	3.0E-02	3.0E-02
Hydroxyamic acids and derivatives	II	Hydroxyamic acids and derivatives	[3]	98332.6 ± 9797.89	9797.89	133212.2 ± 3860.0	78868.9 ± 3277.3	4903.34 ± 1884.2	4903.34 ± 1884.2	2.6E-04	1.2E-01	2.2E-03	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02	1.7E-02
Piccolic acid	PH	Phytohormones	[3]	0.30 ± 0.0	0.0	0.42 ± 0.1	1.60 ± 0.4	1.02 ± 0.3	1.02 ± 0.3	4.6E-04	5.2E-03	5.2E-02	0.1	0.1	0.1	0.1
AAA	I	Amino acids	[3]	26.38 ± 6.3	6.3	28.41 ± 4.7	31.91 ± 5.16	19.29 ± 9.2	19.29 ± 9.2	6.0E-04	4.1E-01	2.2E-03	1.2E-02	1.2E-02	1.2E-02	1.2E-02
Tyrosine	I	Amino acids	[3]	0.66 ± 0.2	0.2	0.56 ± 0.0	0.81 ± 0.4	1.10 ± 0.5	1.10 ± 0.5	3.0E-03	4.1E-01	2.2E-03	1.2E-02	1.2E-02	1.2E-02	1.2E-02
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Proline	II	Amino acids	[2]	0.08 ± 0.1	0.1	0.11 ± 0.1	0.91 ± 0.6	0.77 ± 0.3	0.77 ± 0.3	4.7E-04	5.4E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Agmatin 5-phosphate	II	Phytohormones	[3]	10863.1 ± 6188.2	6188.2	13880.99 ± 5293.0	51702.29 ± 11059.73	2990.73 ± 4865.5	2990.73 ± 4865.5	1.1E-01	1.0E-01	2.2E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03	4.6E-03
Allantoin	I	Amino acids	[2]	0.04 ± 0.0	0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	6.8E-04	7.9E-01	2.2E-03	3.6E-02	3.6E-02	3.6E-02	3.6E-02

**Supplemental table S9 (on the right).** Metabolites variations induced in chili leaves (*C. chinense*) by drought and mitigated in UV-C treated plants. C: control; UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants.

# Supplemental table S8

Metabolites variations induced in chili leaves (*C. chinense*) by drought stress. C: control; UV: UV-C-treated plants; DS: drought-stressed plants; UV+DS: UV-C-treated and drought-stressed plants.

Compound Identity	Class (1)	Family	Identification level (2)	Control			UV			DS			UV+DS			p-value (3)	p-value (4)			Log2 ratios		
				Mean	SD	*	Mean	SD	*	Mean	SD	*	Mean	SD	*		C vs UV	C vs DS	DS vs UV+DS	UV/C	DS/C	(UV+DS)/DS
Atactin	I	Amine	[2]	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.04 ± 0.0	6.19 ± 2.4	6.19 ± 2.4	6.19 ± 2.4	2.79 ± 1.6	2.79 ± 1.6	2.79 ± 1.6	5.8504	7.9E-01	2.2E-03	3.0E-03	0.1	1.2	1.2	1.2	1.2	-1.2
Proline	I	Amino acids	[2]	0.08 ± 0.1	0.11 ± 0.1	0.11 ± 0.1	9.05 ± 1.6	9.05 ± 1.6	9.05 ± 1.6	4.77 ± 1.0	4.77 ± 1.0	4.77 ± 1.0	4.7504	5.4E-01	2.2E-02	4.3E-03	0.5	0.9	0.9	0.9	0.9	-0.9
Isoascorbin	II	Flavonoids	[3]	85.37 ± 46.0	94.23 ± 60.2	94.23 ± 60.2	5151.43 ± 1702.0	5151.43 ± 1702.0	5151.43 ± 1702.0	2592.43 ± 844.2	2592.43 ± 844.2	2592.43 ± 844.2	6.2E-04	9.3E-01	2.2E-03	1.7E-02	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Raffinose	I	Oligosaccharides	[1]	2.49 ± 1.2	2.31 ± 0.8	2.31 ± 0.8	34.97 ± 11.0	34.97 ± 11.0	34.97 ± 11.0	29.51 ± 10.8	29.51 ± 10.8	29.51 ± 10.8	1.1E-03	1.0E+00	2.2E-03	3.3E-01	-0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	-0.2
AAA	I	Organic acids	[1]	26.38 ± 6.3	28.41 ± 4.7	28.41 ± 4.7	315.01 ± 51.6	315.01 ± 51.6	315.01 ± 51.6	192.92 ± 99.2	192.92 ± 99.2	192.92 ± 99.2	6.9E-04	4.3E-01	2.2E-03	5.2E-02	0.1	0.7	0.7	0.7	0.7	-0.7
4-hydroxyproline	I	Amino acids	[2]	3.65 ± 1.1	3.11 ± 0.5	3.11 ± 0.5	33.18 ± 4.9	33.18 ± 4.9	33.18 ± 4.9	23.93 ± 8.1	23.93 ± 8.1	23.93 ± 8.1	6.0E-04	3.3E-01	2.2E-03	3.6E-02	-0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	-0.5
AABA	I	Amino acids	[2]	0.40 ± 0.2	0.36 ± 0.1	0.36 ± 0.1	3.55 ± 0.8	3.55 ± 0.8	3.55 ± 0.8	2.58 ± 0.7	2.58 ± 0.7	2.58 ± 0.7	9.0E-04	9.3E-01	2.2E-03	1.3E-01	-0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	-0.5
Melibiose	I	Oligosaccharides	[1]	1.35 ± 0.2	1.42 ± 0.2	1.42 ± 0.2	9.53 ± 1.6	9.53 ± 1.6	9.53 ± 1.6	6.58 ± 2.0	6.58 ± 2.0	6.58 ± 2.0	6.8E-04	7.9E-01	2.2E-03	3.0E-02	0.1	0.8	0.8	0.8	0.8	-0.8
Putrescine	II	Polyamines	[2]	0.21 ± 0.0	0.29 ± 0.1	0.29 ± 0.1	1.42 ± 0.9	1.42 ± 0.9	1.42 ± 0.9	1.34 ± 0.8	1.34 ± 0.8	1.34 ± 0.8	1.0E-03	2.5E-01	2.2E-03	1.0E+00	0.5	0.7	0.7	0.7	0.7	-0.7
Norvaline	I	Amino acids	[2]	0.06 ± 0.1	0.05 ± 0.0	0.05 ± 0.0	0.40 ± 0.2	0.40 ± 0.2	0.40 ± 0.2	0.41 ± 0.1	0.41 ± 0.1	0.41 ± 0.1	1.2E-03	7.9E-01	2.2E-03	5.4E-01	-0.2	0.7	0.7	0.7	0.7	-0.7
Pepecolic acid	PH	Phytosterols	[1]	0.30 ± 0.0	0.42 ± 0.1	0.42 ± 0.1	1.60 ± 0.4	1.60 ± 0.4	1.60 ± 0.4	1.02 ± 0.3	1.02 ± 0.3	1.02 ± 0.3	4.6E-04	5.2E-02	2.2E-03	5.2E-02	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	-0.4
ABA	PH	Phytosterols	[1]	4091585.7 ± 595549	4010219.4 ± 947558	4010219.4 ± 947558	20086737.4 ± 3303924	20086737.4 ± 3303924	20086737.4 ± 3303924	18541007.9 ± 3711211	18541007.9 ± 3711211	18541007.9 ± 3711211	1.2E-03	6.6E-01	2.2E-03	6.6E-01	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	-0.3
Valine	I	Amino acids	[2]	13.74 ± 3.1	12.65 ± 0.9	12.65 ± 0.9	60.95 ± 9.6	60.95 ± 9.6	60.95 ± 9.6	42.20 ± 15.8	42.20 ± 15.8	42.20 ± 15.8	6.3E-04	1.8E-01	2.2E-03	3.0E-02	-0.1	2.1	2.1	2.1	2.1	-2.1
Lysine	I	Amino acids	[1]	0.13 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.50 ± 0.2	0.50 ± 0.2	0.50 ± 0.2	0.44 ± 0.1	0.44 ± 0.1	0.44 ± 0.1	1.2E-03	5.4E-01	2.2E-03	1.0E+00	0.1	2.0	2.0	2.0	2.0	-2.0
2-methylmalic acid	I	Organic acids	[2]	0.12 ± 0.1	0.07 ± 0.0	0.07 ± 0.0	0.44 ± 0.1	0.44 ± 0.1	0.44 ± 0.1	0.46 ± 0.2	0.46 ± 0.2	0.46 ± 0.2	1.9E-03	7.9E-01	4.3E-03	7.9E-01	-0.7	1.9	1.9	1.9	1.9	-1.9
Serine	I	Amino acids	[2]	13.90 ± 2.9	16.55 ± 4.8	16.55 ± 4.8	50.61 ± 12.1	50.61 ± 12.1	50.61 ± 12.1	55.77 ± 15.3	55.77 ± 15.3	55.77 ± 15.3	1.0E-03	3.3E-01	2.2E-03	5.4E-01	0.3	1.9	1.9	1.9	1.9	-1.9
Asparagine	I	Amino acids	[1]	0.93 ± 0.3	0.82 ± 0.3	0.82 ± 0.3	3.30 ± 0.9	3.30 ± 0.9	3.30 ± 0.9	3.72 ± 1.6	3.72 ± 1.6	3.72 ± 1.6	1.2E-03	6.6E-01	2.2E-03	9.3E-01	-0.2	1.8	1.8	1.8	1.8	-1.8
Apigenin C-pentoside-C-hexoside_1	II	Flavonoids	[3]	16584.73 ± 6500.2	15183.28 ± 3172.7	15183.28 ± 3172.7	53424.90 ± 16713.4	53424.90 ± 16713.4	53424.90 ± 16713.4	28010.35 ± 3858.1	28010.35 ± 3858.1	28010.35 ± 3858.1	6.8E-04	7.9E-01	2.2E-03	4.3E-03	-0.1	1.7	1.7	1.7	1.7	-1.7
Apigenin C-pentoside-C-hexoside_2	II	Flavonoids	[3]	19618.06 ± 8072.5	18304.86 ± 4514.8	18304.86 ± 4514.8	63079.84 ± 19772.8	63079.84 ± 19772.8	63079.84 ± 19772.8	31861.93 ± 4735.1	31861.93 ± 4735.1	31861.93 ± 4735.1	7.9E-04	7.9E-01	2.2E-03	4.3E-03	-0.1	1.7	1.7	1.7	1.7	-1.7
Kaempferol 3-O-rutinoside	II	Flavonoids	[3]	41006.93 ± 15486.7	36359.33 ± 7735.5	36359.33 ± 7735.5	130665.33 ± 25574.5	130665.33 ± 25574.5	130665.33 ± 25574.5	68250.45 ± 12467.4	68250.45 ± 12467.4	68250.45 ± 12467.4	8.1E-04	9.3E-01	2.2E-03	4.3E-03	-0.2	1.7	1.7	1.7	1.7	-1.7
Apigenin C-pentoside-C-hexoside_3	II	Flavonoids	[3]	16908.13 ± 6188.2	15885.99 ± 5293.0	15885.99 ± 5293.0	53702.29 ± 16589.7	53702.29 ± 16589.7	53702.29 ± 16589.7	29690.73 ± 4865.5	29690.73 ± 4865.5	29690.73 ± 4865.5	1.1E-03	1.0E+00	2.2E-03	1.7E-02	-0.1	1.7	1.7	1.7	1.7	-1.7
Tryptophan	I	Amino acids	[2]	8.21 ± 6.3	5.21 ± 2.7	5.21 ± 2.7	25.82 ± 11.0	25.82 ± 11.0	25.82 ± 11.0	22.56 ± 8.9	22.56 ± 8.9	22.56 ± 8.9	3.4E-03	5.4E-01	2.2E-03	9.3E-01	-0.7	1.7	1.7	1.7	1.7	-1.7
Galactinol	I	Oligosaccharides	[1]	5.75 ± 3.0	5.52 ± 2.0	5.52 ± 2.0	18.00 ± 7.8	18.00 ± 7.8	18.00 ± 7.8	18.61 ± 6.5	18.61 ± 6.5	18.61 ± 6.5	2.0E-03	9.3E-01	4.3E-03	1.0E+00	-0.1	1.6	1.6	1.6	1.6	-1.6
Isoleucine	I	Amino acids	[1]	9.74 ± 3.2	9.50 ± 2.3	9.50 ± 2.3	28.23 ± 6.3	28.23 ± 6.3	28.23 ± 6.3	20.25 ± 8.0	20.25 ± 8.0	20.25 ± 8.0	3.7E-03	7.9E-01	2.2E-03	1.3E-01	0.0	1.5	1.5	1.5	1.5	-1.5
Eicosanoic acid	I	Fatty acids	[2]	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.06 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.03 ± 0.0	0.03 ± 0.0	1.4E-02	2.5E-01	4.3E-03	1.8E-01	0.2	1.5	1.5	1.5	1.5	-1.5
Tyrosine	I	Amino acids	[2]	0.66 ± 0.2	0.56 ± 0.0	0.56 ± 0.0	1.91 ± 0.4	1.91 ± 0.4	1.91 ± 0.4	1.10 ± 0.5	1.10 ± 0.5	1.10 ± 0.5	3.0E-03	4.3E-01	2.2E-03	3.7E-02	-0.2	1.5	1.5	1.5	1.5	-1.5
1,6-anhydroglucose	I	Monosaccharides	[2]	1.24 ± 0.5	1.76 ± 0.5	1.76 ± 0.5	5.86 ± 0.5	5.86 ± 0.5	5.86 ± 0.5	2.57 ± 0.4	2.57 ± 0.4	2.57 ± 0.4	6.2E-04	1.8E-01	2.2E-03	3.6E-02	0.7	1.3	1.3	1.3	1.3	-1.3
Leucine	I	Amino acids	[1]	5.73 ± 1.4	5.01 ± 0.7	5.01 ± 0.7	14.30 ± 2.5	14.30 ± 2.5	14.30 ± 2.5	10.12 ± 3.6	10.12 ± 3.6	10.12 ± 3.6	3.8E-03	2.5E-01	2.2E-03	8.2E-02	-0.2	1.3	1.3	1.3	1.3	-1.3
U_pentonic acid 1,4 lactone	I	Organic acids	[3]	0.09 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.22 ± 0.0	0.22 ± 0.0	0.22 ± 0.0	0.17 ± 0.0	0.17 ± 0.0	0.17 ± 0.0	8.7E-04	3.3E-01	2.2E-03	3.6E-02	0.2	1.3	1.3	1.3	1.3	-1.3
Sucrose	I	Oligosaccharides	[1]	1126.50 ± 201.5	2370.32 ± 986.4	2370.32 ± 986.4	2731.18 ± 650.1	2731.18 ± 650.1	2731.18 ± 650.1	2405.03 ± 1004.6	2405.03 ± 1004.6	2405.03 ± 1004.6	4.8E-03	4.3E-02	2.2E-03	5.4E-01	1.1	1.3	1.3	1.3	1.3	-1.3
Trans-5-caffeoylquinic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[1]	0.19 ± 0.0	0.16 ± 0.0	0.16 ± 0.0	0.42 ± 0.2	0.42 ± 0.2	0.42 ± 0.2	0.40 ± 0.2	0.40 ± 0.2	0.40 ± 0.2	2.4E-03	3.3E-01	2.2E-03	9.3E-01	0.2	1.2	1.2	1.2	1.2	-1.2
Alanine	I	Amino acids	[1]	22.44 ± 7.5	21.48 ± 4.6	21.48 ± 4.6	50.42 ± 18.6	50.42 ± 18.6	50.42 ± 18.6	51.45 ± 15.0	51.45 ± 15.0	51.45 ± 15.0	1.6E-03	9.3E-01	4.3E-03	7.9E-01	-0.1	1.2	1.2	1.2	1.2	-1.2
Glyoxylic acid	I	Organic acids	[1]	1.27 ± 0.6	0.95 ± 0.3	0.95 ± 0.3	2.74 ± 0.6	2.74 ± 0.6	2.74 ± 0.6	2.65 ± 0.5	2.65 ± 0.5	2.65 ± 0.5	1.8E-03	4.3E-01	4.3E-03	1.0E+00	-0.4	1.1	1.1	1.1	1.1	-1.1
Glyoxylic acid	I	Organic acids	[2]	0.53 ± 0.1	0.47 ± 0.1	0.47 ± 0.1	1.14 ± 0.2	1.14 ± 0.2	1.14 ± 0.2	1.42 ± 0.7	1.42 ± 0.7	1.42 ± 0.7	1.1E-03	3.3E-01	2.2E-03	9.3E-01	-0.2	1.1	1.1	1.1	1.1	-1.1
Hydroxycinnamic acid	II	Hydroxycinnamic acids and derivatives	[3]	3633.26 ± 979.7	3132.12 ± 380.0	3132.12 ± 380.0	7636.89 ± 1217.3	7636.89 ± 1217.3	7636.89 ± 1217.3	4930.34 ± 1834.2	4930.34 ± 1834.2	4930.34 ± 1834.2	1.6E-03	1.8E-01	2.2E-03	1.7E-02	-0.2	1.1	1.1	1.1	1.1	-1.1
Arabinose	I	Monosaccharides	[1]	0.19 ± 0.0	0.23 ± 0.0	0.23 ± 0.0	0.40 ± 0.1	0.40 ± 0.1	0.40 ± 0.1	0.34 ± 0.1	0.34 ± 0.1	0.34 ± 0.1	6.0E-03	2.5E-01	2.2E-03	4.3E-01	0.3	1.1	1.1	1.1	1.1	-1.1
5-HMTF	I	Monosaccharides	[2]	0.10 ± 0.0	0.12 ± 0.0	0.12 ± 0.0	0.21 ± 0.0	0.21 ± 0.0	0.21 ± 0.0	0.19 ± 0.0	0.19 ± 0.0	0.19 ± 0.0	8.7E-04	1.8E-01	2.2E-03	4.3E-01	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Threonine acid	I	Organic acids	[2]	0.33 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.30 ± 0.0	0.67 ± 0.1	0.67 ± 0.1	0.67 ± 0.1	0.62 ± 0.1	0.62 ± 0.1	0.62 ± 0.1	7.4E-04	1.3E-01	2.2E-03	2.5E-01	-0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Beta-alanine	I	Amino acids	[1]	0.20 ± 0.1	0.20 ± 0.1	0.20 ± 0.1	0.40 ± 0.1	0.40 ± 0.1	0.40 ± 0.1	0.41 ± 0.1	0.41 ± 0.1	0.41 ± 0.1	7.7E-03	9.3E-01	4.3E-03	9.3E-01	-0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Mucic acid	I	Organic acids	[2]	0.07 ± 0.0	0.07 ± 0.0	0.07 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.14 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.10 ± 0.0	4.3E-03	9.3E-01	4.3E-03	8.2E-02	-0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Glutamic acid	I	Amino acids	[2]	43.54 ± 9.4	37.56 ± 10.2	37.56 ± 10.2	8															

## Methods S1 : Analytical procedures

### Untargeted GC-EI-TOFMS analysis

#### Data acquisition

Online derivatization using 9 n-alkanes as reference molecules was performed by a multipurpose sampler (Gerstel MPS, CTC Analytics AG, Switzerland). Analyses were conducted with a 7890B GC system (Agilent Technologies, CA, USA) hyphenated to a time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Pegasus BT, LECO, MI, USA). One microliter of sample was injected in split mode (1:30) into a ZB-SemiVolatiles column (34.59 m, internal diameter 250  $\mu$ m, film thickness 250  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, USA) heated at 230°C. The MultiPurpose Sampler was controlled by Maestro Version 1.4.40.1. Gerstel and the GC-MS system was controlled by ChromaTOF® Version 5.20.38.0.54864 (LECO, MI, USA). Raw dataset (accession number MSV000090722) can be downloaded from the publicly available MassIVE repository at the UCSD Center for Computational Mass Spectrometry website.

#### Molecular networking

Raw data were automatically deconvoluted by MSHub (Aksenov et al., 2021) and processed to create a molecular network with the Library Search/Molecular Networking GC workflow at GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Wang et al., 2016). Spectra were compared to GNPS GC libraries, and edges were filtered to have a cosine score above 0.6 and more than 6 matched peaks.

#### Data processing for improved metabolite annotation

Acquired data were deconvoluted with LECO NTD software (LECO, MI, USA) and the peak list was cleaned manually to remove deconvolution errors and contaminants. Peak annotation was based on spectral and retention index (RI) similarity using mass spectral libraries (Golm database, (Kopka et al., 2005); NIST 2014). The identification level of each metabolite was determined according to criteria inspired by Schymanski et al., (2014): level 1, confirmed structure by comparison with a reference standard, reverse match > 800, difference between retention index (RI) < 1%; level 2, probable structure, reverse match > 700 and difference between RI < 1%; level 3, tentative candidate, 600 < reverse match < 1000 and difference between RI > 1%. Peaks were integrated by choosing an *ad hoc* gaussian and intense extracted ion chromatogram (XIC) for each compound and by normalizing the areas against the internal standard pentadecane and the mass sample so the final dataset consisted of semi-quantitative information.

#### Data processing for improved relative quantification

GC-MS files were converted for automatic peak integration using TargetLynx (Waters, Milford, MA, USA). A specific extracted ion chromatogram (XIC) was chosen for peak integration using a single iteration of mean smoothing and apex tracking. Then areas were divided by the internal alkanes and the mass sample to obtain normalized semi-quantitative data.

## Untargeted UPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis

### Data acquisition

Analyses were performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated to a Synapt G2-Si quadrupole time-of-flight (QTOF) mass spectrometer (Waters, Manchester, UK) equipped with an electrospray ionization source (ESI). LC-MS grade solvents were purchased from Carlo Erba (Milano, Italy). A 1.5  $\mu\text{L}$  aliquot of sample was injected into an Acquity HSS T3 1.8  $\mu\text{m}$  column (2.1 x 100 mm) with an Acquity Vanguard HSS T3 pre-column (2.1 x 50 mm) from Waters (Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. The flow rate was 0.4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  and the elution gradient was as follows: 1% B for 1.5 min, then up to 99% B in 15 min maintained for 2.25 min. Then, a linear gradient was applied over 0.25 min to return to 99% A, which was held for 1 min (total run time 20 min). The column oven temperature was maintained at 45°C and the sample manager temperature at 10°C. The electrospray parameters were as follows: capillary voltage was 1 kV or 2.8 kV in positive and negative modes respectively, cone voltage was 40 V, source temperature 120°C, nitrogen as the drying and nebulizing gas, with 50  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  gas flow and 850  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$  desolvation gas flow and the desolvation temperature was set to 450°C.

The analyses were subject to technical replicates, each sample being injected 3 times, both in negative and positive ionization modes. Ten pooled samples were injected prior to the samples and a pool sample was injected every 5 samples to monitor the chromatographic reproducibility of peak intensities and retention times. A lock-mass solution of leucine enkephalin (2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) was used to ensure mass accuracy through the lock-spray system. The mass spectrometer was operated with a resolution of 20 000.

Data-dependent acquisitions (DDA) were performed to trigger the fragmentation of the five most abundant ions with a scan time of 0.1s in MS mode and 0.2s in MS/MS mode. Dual-dynamic collision energy was employed from 10 to 40 V for LM CE (low-mass collision energy) and 40 to 70 V for HM CE (high-mass collision energy), over the range of  $m/z$  50 to 1200. In order to observe minority ions, data-independent acquisitions (DIA) were also performed, simultaneously in MS and MS/MS modes ( $\text{MS}^e$ , continuum), with a collision energy ramp from 20 to 35 eV, over the range of  $m/z$  50 to 1200, with a scan time of 0.1s.

Data acquisition was carried out using MassLynx version 4.2 (Waters, USA). Raw dataset and metadata (accession number MSV000090716 for DIA mode ( $\text{MS}^e$ ) data and MSV00091102 for DDA data) can be downloaded from the publicly available MassIVE repository at the UCSD Center for Computational Mass Spectrometry website.

### Molecular networking of DDA data

Data acquired in DDA mode were processed using MZMine v.2.53 (Katajamaa et al., 2006; Pluskal et al., 2010). Data were converted using GNPS Vendor Convertor. The noise levels for peak detection in MS1 were set to  $5\cdot 10^3$  in positive and negative mode and to 0 in MS2. A wavelet (ADAP) algorithm was used to deconvolute the chromatogram (Myers et al., 2017). The “isotopic peaks grouper” was also performed with a  $m/z$  tolerance

of 10 ppm, and a retention time tolerance of 0.2 min. Peaks were aligned using a m/z tolerance of 10 ppm and a RT tolerance of 0.2 min. Duplicate peaks were removed and MS2 data were assigned to the remaining aligned peaks. The matrix was then filtered to keep only the peaks with MS2 scan. Finally, a linear normalization was performed, which divides the area of each peak by the intensity of the mean. The processed data were exported as CSV and MGF files for further processing.

A molecular network was created for each ionization mode with the Feature-Based Molecular Networking (FBMN) workflow (Nothias et al., 2020) on GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>, Wang et al., 2016). The precursor ion mass tolerance was set to 0.02 Da and the MS/MS fragment ion tolerance to 0.02 Da. Edges were filtered according to the cosine score (a spectral similarity score between two fragmentation spectra). Nodes were connected if they had a cosine score > 0.6 in positive ionization mode and > 0.7 in negative ionization mode and more than 4 or 6 matched peaks respectively. The spectra in the network were then searched against GNPS spectral libraries (Horai et al., 2010; Wang et al., 2016). Molecular networks were visualized using Cytoscape software version 3.9.1 (Shannon et al., 2003).

#### Processing of DIA data for improved metabolite annotation

Data acquired in DIA (MS<sup>e</sup>) function were processed using Progenesis Q1 software (Waters, USA) by alignment and peak picking. Filters were used to select only discriminant features (ANOVA, p<0.05, max fold change>1.5), with little variability within each condition (CV<30%). Metabolite annotation was based on MSMS spectral similarity using the ReSpec DB, a plant-specific MS/MS database (Sawada et al., 2012), downloaded from MS-DIAL spectral database (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>).

#### Data processing for improved relative quantification

A specific extracted ion chromatogram (XIC) was chosen for peak integration using a single iteration of mean smoothing and apex tracking. Then areas were divided by the mass sample to obtain normalized semi-quantitative data.

#### **Amino acids determination by UPLC-ESI-TQMS**

Data acquisition was performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated to a mass spectrometer Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source. The system was controlled by MassLynx Version 4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

Chromatographic separation of amino acids was achieved using an Acquity 1.7 µm BEH C18 UPLC column (50 × 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) and an Acquity BEH C18 1.7 µm UPLC pre-column (Waters, Milford, MA, USA). Samples were derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit, Waters, Milford, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microliter of the derivatized sample was injected into the chromatographic system. Separation was carried out at a constant temperature of 55 °C and flow rate of 0.7 mL·min<sup>-1</sup> using H<sub>2</sub>O:FA 99.9:0.1 v/v (A) and ACN:FA 99.9:0.1 v/v (B) as eluents. The chromatographic gradient started with 99.9% solvent A and changed as follows, 0.54 min: 99.9%,

4.5 min: 96.9%, 6.5 min: 90.9%, 8.5 min: 78.8%, 9.9 min: 40.4%, 10.5 min: 40.4%, 10.6 min: 99.9%, 12 min: 99.9%. The source temperature was set at 150 °C and the desolvation temperature 500 °C. The capillary voltage was set at 3.1 kV. Nitrogen was used as the drying and nebulizing gas at 150 L·h<sup>-1</sup> for the gas flow and 1000 L·h<sup>-1</sup> for the desolvation gas flow.

### **Phytohormones determination by targeted UPLC- ESI-TQMS**

Data acquisition was performed with an Acquity I-Class UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) hyphenated to a mass spectrometer Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA, USA) equipped with an electrospray ionization source. The system was controlled by MassLynx Version 4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

The polar extract was dried under vacuum and concentrated 5 times. The dry residue was recovered in ultrapure water. Pure standards (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were injected to identify the phytohormones in MRM (multiple reactions monitoring) acquisition in negative ESI mode (Table S3). The capillary voltage was set to 2.8kV, and the source temperature to 150°C. Nitrogen was used as drying and nebulizing gas at 150 L·h<sup>-1</sup> for the gas flow and 1000 L·h<sup>-1</sup> for the desolvation gas at 550°C.

Five microliters of sample were injected into an Acquity CSH C18 1.7 µm column (2.1 x 100 mm, Waters, Milford, MA, USA). Chromatographic separation was achieved using mobile phases consisting of water (A) and methanol (B), both containing 0.01% formic acid. The flow rate was 0.4 ml/min and the elution gradient was 25% B for 0.5 min, then 100% B in 5 min maintained for 2 min then back to initial conditions in 1.5 min (total run time 9.5 min). The column oven temperature and the sample manager temperature were maintained at 45°C and 10°C respectively. Data acquisition and processing were performed using MassLynx version 4.1 and TargetLynx software (Waters, Milford, USA).

### **Methods S2: Data analysis**

The boxplots were produced using the package “ggplot2” (Wickham, 2011), and “PMCMRplus” (Pohlert, 2022) to obtain the statistical classes (Fig. S5). PCA were generated using the "FactoMineR" package (Lê et al., 2008) on raw peak areas normalized by sample dry mass and then mean-centered and divided by the standard deviation of each variable. The OPLS-DA were generated with the ropls package (Thévenot et al., 2015) on raw peak areas normalized by sample dry mass and then log<sub>10</sub> transformed and Pareto normalized (mean-centered and divided by the root-square of standard deviation) of each variable. The quality of the model was determined by the values of R<sup>2</sup> (goodness of fit, corresponds to the proportion of variance in the data explained by the model) and Q<sup>2</sup> (goodness of prediction, the proportion of variance in the data predicted by the model). The VIP scores were generated to create a heatmap with the ComplexHeatmap package (Gu et al., 2016) containing the most discriminating metabolites (VIP > 1).

### **References**

Aksenov AA, Laponogov I, Zhang Z, Doran SLF, Belluomo I, Veselkov D, Bittremieux W, Nothias LF, Nothias-Esposito M, Maloney KN, et al (2021) Auto-deconvolution and molecular networking of gas chromatography–mass spectrometry data. *Nat Biotechnol* 39: 169–173

- Gu Z, Eils R, Schlesner M (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32: 2847–2849
- Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, et al (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry* 45: 703–714
- Katajamaa M, Miettinen J, Orešič M (2006) MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22: 634–636
- Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, Dörmann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, et al (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21: 1635–1638
- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25: 1
- Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X (2017) One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal Chem* 89: 8696–8703
- Nothias L-F, Petras D, Schmid R, Dührkop K, Rainer J, Sarvepalli A, Protsyuk I, Ernst M, Tsugawa H, Fleischauer M, et al (2020) Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nat Methods* 17: 905–908
- Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M (2010) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11: 395
- Pohlert T (2022) PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended. R package version 1.7.1. <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>
- Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, Akiyama K, Sakurai T, Matsuda F, Aoki T, et al (2012) RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: A plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry* 82: 38–45
- Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, Hollender J (2014) Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ Sci Technol* 48: 2097–2098
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res* 13: 2498–2504
- Thévenot EA, Roux A, Xu Y, Ezan E, Junot C (2015) Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J Proteome Res* 14: 3322–3335
- Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kapono CA, Luzzatto-Knaan T, et al (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34: 828–837
- Wickham H (2011) ggplot2. *Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics* 3: 180–185



# Résumé

ID4FEED est une société dont le siège est basé à Annecy (74), qui contribue à la recherche et au développement d'aliments complémentaires pour les animaux d'élevage, basés sur des extraits de plantes. Certains composés naturels des plantes renforçant les défenses immunitaires des animaux sont particulièrement prometteurs en tant qu'alternatives aux antibiotiques, comme les capsaïcinoïdes, qui, et les caroténoïdes. Ces deux familles de molécules sont accumulées simultanément et en quantités importantes dans les plantes du genre *Capsicum*. Plusieurs facteurs de stress biotiques ou abiotiques modulent les flux de biosynthèse du métabolisme secondaire des plantes et influencent notamment les concentrations en capsaïcinoïdes et caroténoïdes des piments. Parmi les facteurs physiques susceptibles de stimuler la synthèse de ces composés d'intérêt, les rayonnements UV-C sont actuellement très étudiés car ils amorcent des voies de signalisations moléculaires régulatrices du métabolisme secondaire.

Au cours de mes travaux de thèse, les effets des rayonnements UV-C, ainsi que du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un intermédiaire oxydatif des voies de signalisation du stress chez les végétaux, ont été étudiés sur la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes et des capsaïcinoïdes dans les fruits de deux génotypes de piment. Le premier objectif a été de développer des méthodes de profilage ciblées pour doser les métabolites d'intérêt, pour identifier les modalités d'application des traitements capables d'augmenter ces concentrations dans les fruits de deux génotypes de piment, *C. chinense* 'Habanero' et *C. frutescens* 'Bhut Jolokia'. L'innocuité des traitements de stimulation sur les plantes, fondamentale pour aboutir à un procédé valide industriellement, a été vérifiée systématiquement par la mesure de marqueurs physiologiques issus des courbes d'induction de la fluorescence maximale de la chlorophylle. Aucune des applications n'ayant permis d'augmenter la composition en caroténoïdes et capsaïcinoïdes des fruits, la réponse aux UV-C de plants de piment au stade végétatif a été étudiée. Des approches métabolomiques combinant profilages non ciblés et multiciblés en GC-MS et LC-MS/MS, couplées à des traitements de données par réseaux moléculaires et statistiques multivariées ont mis en évidence une protection très marquée des plantes traitées aux UV-C contre les effets physiologiques et métaboliques de la sécheresse. Les empreintes métaboliques (*fingerprints*) établies à partir de 1505 marqueurs ont révélé l'absence de perturbation du métabolome par le traitement UV-C, et au contraire une atténuation des symptômes métaboliques de stress hydrique lorsqu'un épisode de sécheresse suivait le traitement UV-C. L'identification d'une centaine de composés a en outre montré l'implication de l'acide pipécolique, élément essentiel de la SAR au côté du SA, dans l'élicitation UV-C.

En conclusion, les traitements d'élicitation testés n'ont pas permis de répondre à l'objectif industriel d'augmentation des concentrations en caroténoïdes et capsaïcinoïdes des fruits de piment. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'absence d'effets éliciteurs dans les fruits et sont discutés : comme la variabilité inter-individus, l'éclairage limitant dans nos conditions d'expérimentations ou simplement la physiologie des fruits. En revanche, lorsque la réponse a été étudiée à un stade plus précoce, sur des plantes en conditions contrôlées, les prétraitements aux UV-C ont amélioré considérablement la réponse des plantes au stress hydrique par effet de *priming*. La neutralité des traitements UV-C sur le métabolome et l'implication de l'acide pipécolique dans le *priming* aux UV-C sont rapportés, ouvrant à la fois des pistes de recherche inédites et des perspectives d'applications agronomiques.