



**UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI**  
**ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE**  
**UMR CNRS 6134 (SPE)**



**Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR EN ASPECTS MOLECULAIRES ET  
CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

**Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Soutenue publiquement par  
Florine Gonord  
le 28 septembre 2011**

---

**Etude des effets des facteurs de l'environnement sur la  
concentration en caroténoïdes dans la pulpe de clémentines (*Citrus  
clementina* Hort. Ex Tan.)**

---

**Directeurs:**

Mr Laurent Urban, Professeur, Université d'Avignon  
Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse

**Rapporteurs :**

Mme Hélène Gautier, Dr-HDR, INRA d'Avignon  
Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux

**Jury**

Mr Laurent Urban, Professeur, Université d'Avignon  
Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse  
Mme Hélène Gautier, Dr-HDR, INRA d'Avignon  
Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux  
Mr Félix Tomi, Professeur, Université de Corse  
Mr Frédéric Bourgaud, Professeur, Université de Nancy

## RESUME

Les fruits représentent une source majeure de vitamines et de métabolites secondaires. Bien qu'il y ait débat sur les mécanismes d'action des métabolites secondaires sur la santé humaine, il y a un consensus général sur le fait que les avantages santé des fruits sont en partie attribuables à leur forte concentration en vitamines et en métabolites secondaires. Les caroténoïdes, et principalement les caroténoïdes précurseurs de la vitamine A ( $\beta$ -carotène,  $\alpha$ -carotène et  $\beta$ -cryptoxanthine) sont des composants essentiels au régime alimentaire de l'Homme. Un certain nombre d'observations suggèrent qu'ils jouent des rôles dans la prévention de certaines maladies. Les agrumes représentent une source majeure de caroténoïdes à la fois par leur concentration et par leur diversité.

Dans le but de produire des fruits d'agrumes à teneurs augmentées ou garanties en caroténoïdes, nous avons testé deux hypothèses. La première concernait l'implication de la disponibilité en carbone dans la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes et la deuxième le rôle du stress oxydatif ou des variations de statut rédox sur cette biosynthèse.

L'effet des sucres sur la biosynthèse des caroténoïdes, a été étudié à l'aide de trois niveaux de charge en fruits. Nos premières observations indiquent qu'une charge en fruit élevée impacte fortement les critères de qualité du fruit. On observe ainsi : une diminution du calibre, une diminution de la concentration en sucres, un retard de la maturité, et une augmentation de la concentration en acides organiques et en caroténoïdes. Nos résultats contredisent l'idée selon laquelle un statut carboné élevé est favorable à la synthèse des caroténoïdes dans les fruits par une disponibilité accrue en précurseurs. L'étude de l'effet de la charge en fruits nous a également permis de montrer que la concentration en caroténoïdes des fruits était déterminée précocement au cours du développement du fruit. Nous émettons l'hypothèse que l'alimentation carbonée influence précocement la synthèse des caroténoïdes ou leur accumulation en agissant sur le nombre ou la taille des plastes.

L'impact sur la biosynthèse des caroténoïdes du stress oxydatif ou des variations de statut redox qui lui sont associées a été étudié, sur des rameaux isolés par annélation, par l'application de différents niveaux de stress photo-oxydatif sur des feuilles voisines du fruit. Nos résultats suggèrent, tout d'abord, que le statut rédox de l'ascorbate et le métabolisme antioxydant peuvent être influencés dans la pulpe des fruits quand un stress photo-oxydatif est appliqué sur les feuilles voisines. Ils suggèrent également que le stress photo-oxydatif pourrait être utilisé pour augmenter la concentration des caroténoïdes dans les fruits.

Les données recueillies ont permis d'émettre certaines hypothèses sur le rôle essentiel des sucres et du stress oxydatif sur la synthèse des caroténoïdes, mais des études complémentaires seront nécessaires afin de déterminer les processus impliqués et de pouvoir proposer des itinéraires cultureux favorables à une augmentation la concentration en caroténoïdes dans les fruits d'agrumes.

## SUMMARY

Fruits are a major source of vitamins and secondary metabolites. Although there is a debate about the way secondary metabolites impact human health, there is a general consensus that the much praised health benefits of fruits are, at least partially, attributable to their high concentrations in vitamins and secondary metabolites. Carotenoids, and in particular carotenoids endowed with provitamin A activity ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthine) are vital components of the human diet. Many observations suggest that they have an impact in preventing of diseases. Citrus fruits are a major source of carotenoids by both concentration and diversity.

With the objective to produce citrus fruit with increased or guaranteed amounts of carotenoids, we tested two hypotheses. The first is that sugar supply influences biosynthesis and accumulation of carotenoids, and the second, is that oxidative stress or the associated variations in redox status in this biosynthesis.

The effect of sugars on the biosynthesis of carotenoids had been studied using three levels of fruit load. Our results showed clearly that high fruit load has a strong impact on criteria of fruit quality. We observed: a decrease in size in total sugars concentration, a delay in maturity and an increase in the concentrations of total organic acids and carotenoids. Our results do not support the common view that a high carbon status is favorable to synthesis of carotenoids in fruits through its positive influence on precursor availability. Our observations also show that the concentration of carotenoids in fruits is determined during early fruit development. We hypothesize that carbon supply influences synthesis of carotenoids or their accumulation by affecting the number or size of plastids.

The impact of oxidative stress on the biosynthesis of carotenoids was studied on fruiting branches isolated by girdling, by applying different levels of photo-oxidative stress on leaves close to the fruits. Our results suggest: firstly, that the redox status of ascorbate and antioxidant metabolism of fruits can be affected when photo-oxidative stress is applied to their neighboring leaves. They also suggest that the photo-oxidative stress could be exploited to increase the concentration of carotenoids in fruits.

Data collected were used to develop hypotheses on the role of sugars and oxidative stress in synthesis of carotenoids, but further studies are needed to determine the processes involved and to offer viable cultural routes to increase the concentration of carotenoids in citrus fruits.

Pierre Baldet  
UMR-1332 Biologie du Fruit et Pathologie  
INRA BP81  
33883 Villenave d'Ornon Cedex

Tél : 05 57 12 25 29  
Fax : 05 57 12 25 41  
Email : pierre.baldet@bordeaux.inra.fr

**Rapport de P. Baldet**, Chargé de Recherches à l'INRA,  
Sur le mémoire présenté par

**Florine GONORD**

pour obtenir le titre de  
Docteur en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie  
de l'Université de Corse – Pascal PAOLI  
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

intitulé

**Etude des effets des facteurs de l'environnement sur la  
concentration en caroténoïdes dans la pulpe de clémentines  
(Citrus clementina Hort. Ex Tan.).**



Le manuscrit présenté par Mlle Florine Gonord expose les résultats de ses travaux, co-dirigés par Liliane Berti (Université de Corse) et Laurent Urban (Université d'Avignon), obtenus sur l'étude des effets des facteurs de l'environnement sur la concentration en caroténoïdes dans la pulpe de clémentines (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.).

Plusieurs facteurs participent à la notion de qualité du fruit, parmi eux un certain nombre de critères comme l'aspect gustatif (sucre & acide) et nutritionnel (vitamine & micronutriments) ont fait l'objet de travaux récents. L'originalité du travail de thèse présenté par Florine Gonord est d'essayer de comprendre les mécanismes qui gouvernent la teneur en métabolites secondaires, plus particulièrement les caroténoïdes, chez les fruits d'agrumes, dans le cas présent la clémentine et l'orange, en réponse à des variations des relations sources/puits des plantes et également de l'environnement lumineux selon des approches écophysiological et métabolique.

Florine Gonord a déjà un article de synthèse en tant que premier auteur paru en 2010 dans la revue *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Par ailleurs, les résultats correspondant à la première partie de son travail ont été récemment valorisés et soumis sous forme d'article de recherche dans cette même revue. Je regrette cependant que cet article n'ait pas été inclus dans les annexes du manuscrit de thèse. J'encourage Florine à rapidement faire partager avec la communauté scientifique « Fruit » les autres données, notamment celles issues de la deuxième approche expérimentale, car son travail ouvre des perspectives extrêmement intéressantes au niveau fondamental et appliqué pour la compréhension des mécanismes physiologiques et écophysiological qui gouvernent la teneur en caroténoïdes du fruit d'agrumes. Enfin, Florine a déjà communiqué ses travaux sous forme de présentation orale (1) et posters (4) lors de 5 congrès.

Sur la forme, le manuscrit de thèse est de très bonne qualité. Il pourra servir de guide à des chercheurs travaillant sur le fruit d'agrumes au niveau de son développement, le métabolisme des caroténoïdes et la régulation, par la clarté du document, la présence de schémas synthétiques expliquant les différentes voies de biosynthèse et la qualité des nombreux tableaux et figures. L'absence de fautes et « coquilles » renforce la qualité du document.

Le mémoire comporte un chapitre d'Introduction suivi d'un chapitre de Matériels et Méthodes, qui précèdent un chapitre de Résultats & Discussion. Ceux-ci sont suivis par un chapitre de Conclusion et Perspectives, une partie Bibliographique et enfin des Annexes correspondant à l'article de revue et les posters.

L'introduction est très documentée, peut-être un peu trop, puisqu'elle représente 1/3 du manuscrit. Un effort afin de la rendre plus concise aurait été souhaitable. Elle aborde les deux thèmes principaux de ce travail : La caractérisation de la qualité du fruit d'agrumes et son importance en santé humaine, le fruit d'agrumes *per se*, la clémentine, sa définition, son développement ainsi que ses principaux nutriments. Puis les caroténoïdes, leurs caractéristiques structurales, les deux voies de biosynthèse cytosolique et plastidiale et la régulation connue de l'une d'entre elles, les rôles connus chez les plantes et enfin l'influence de l'environnement (lumière) et l'état redox des cellules sur la teneur en caroténoïdes du fruit. Un effort particulier de présentation didactique de ces différentes notions nécessaires pour aborder la problématique de cette étude, soutenu par une bibliographie judicieuse, fait de cette partie une revue de synthèse.

Le chapitre de Matériel et Méthodes est très court (17 pages). Il établit les bases expérimentales et les dispositifs de l'étude : 1) le matériel végétal (arbustes de clémentine et d'orange). 2) les protocoles de modification de relation sources/puits et des conditions environnementales de lumière sont très bien schématisés et donc faciles à comprendre. 3) les mesures physiologiques et biochimiques mises en œuvre. 4) les analyses statistiques indispensables pour l'interprétation des données. Les détails expérimentaux sont bien énoncés, ils sont suffisamment précis et détaillés pour permettre de reproduire les expérimentations réalisées. Une exception toutefois, les protocoles pour la mesure des activités enzymatiques superoxyde dismutase (SOD), ascorbate peroxydase (APX), Monodéshydroascorbate réductase (MDHAR), Déshydroascorbate réductase (DHAR) et catalase (CAT) citées dans la deuxième expérience de la thèse n'ont été décrits ; Je considère indispensable que dans la version finale du manuscrit cet oubli soit rectifié, même s'il s'agit de travaux réalisés dans le cadre du M2 d'un autre étudiant.

La partie Résultats et Discussion comprend deux chapitres. Le premier chapitre s'intitule « Effet de l'alimentation en sucres sur la biosynthèse des caroténoïdes ». L'objectif était de savoir s'il est possible d'améliorer la qualité des fruits d'agrumes, dans ce cas la clémentine, et plus particulièrement la teneur en caroténoïdes du fruit en fonction de la disponibilité en ressources carbonés des plantes. Dans ce cadre, Florine Gonord a abordé l'analyse des effets d'une variation des relations sources/puits sur l'accumulation des caroténoïdes dans le fruit de clémentine. Cette étude repose sur 1) l'utilisation de deux approches expérimentales, défoliation et ombrage des rameaux, visant à modifier la fourniture en sucre dans les fruits, 2) trois conditions d'intensité de tels traitements et 3) trois stades de développement du fruit auxquels ces traitements sont appliqués. La question centrale était de caractériser le rôle des sucres soit en tant que précurseurs direct dans les voies de biosynthèse des caroténoïdes, soit en tant que régulateurs agissant de façon indirecte sur l'expression des gènes codant les enzymes qui participent à leur synthèse. D'une manière générale, les données physiologies telles que le diamètre, le poids, la croissance du fruit ainsi que des données métaboliques comme les teneurs en sucres, acides, caroténoïdes et l'indice de maturité des fruits sont présentées de façon claire et variée. L'ensemble de ce travail qui est en cours de soumission dans la revue *Journal of Agricultural and Food Chemistry* donne l'impression d'un travail très fouillé qui apparaît par moment complexe en termes d'interprétations ; par exemple selon que les données sont exprimées par quantité de matière extraite ou par fruit. Ce point sera abordé et discuté au cours de la soutenance. En résumé, les résultats démontrent 1) qu'une variation de la charge en fruit des plantes affecte la croissance et la cinétique de murissement des fruits, leurs teneurs en sucres, acides et caroténoïdes et 2) que l'effet observé sera d'autant plus marqué que le stade de développement du fruit auquel le traitement est appliqué sera précoce. Ainsi, Florine Gonord démontre clairement que lors d'une forte charge en fruit induite par défoliation ou ombrage, il y a réduction de la taille des fruits, de la teneur en sucre et augmentation de la teneur en acides et caroténoïdes, pour conclure que la synthèse des caroténoïdes n'est pas dépendante de la fourniture en photo-assimilats dans le fruit de clémentine. Pour clore cette partie, Florine Gonord discute tout d'abord ses résultats et les liens qui peuvent exister entre le métabolisme primaire et secondaire et les processus de croissance des tissus en se basant sur les théories déterministes et mécanistes. Enfin, elle termine sa discussion en citant très brièvement l'importance de la biogénèse des chloro/chromoplastes (taille et nombre) et la régulation dans le processus d'accumulation des caroténoïdes dans le fruit. Il me semble que ce dernier

point basé sur une hypothèse originale aurait pu être plus approfondi, il soulève un certain nombre de questions qui seront abordées lors de la soutenance.

Le deuxième chapitre s'intitule « Effet du stress oxydatif et du statut redox sur la biosynthèse des caroténoïdes ». Pour cette expérience, le modèle végétal a changé puisque le fruit d'orange a été choisi. Un stress photo-oxydatif a été appliqué par l'utilisation de techniques d'alternance d'ombrage/forte lumière à des feuilles à proximité de fruits, fruits qui ont ensuite été analysés. L'influence de tels traitements sur le métabolisme antioxydant des fruits d'orange ainsi que leurs critères de qualité ont été caractérisés. Par cette approche originale Florine Gonord démontre clairement que 1) Au niveau des feuilles, l'efficacité de la photosynthèse mesurée par divers paramètres tels que l'indice de performance (IP), le rendement quantique maximum du PS-II (Fv/Fm), est fortement perturbée en fonction de l'intensité lumineuse perçue. Comme attendu dans le cas d'un stress lumière fort, le rendement photosynthétique est diminué et il y a induction de photoinhibition. 2) Les indicateurs biochimiques comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ainsi que les activités enzymatiques telles que la SOD, APX, MDHAR, DHAR et CAT chargées de réduire les espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour le maintien de l'intégrité de la machinerie cellulaire augmentent significativement dans les fruits en cas de stress photo-oxydatif appliqué aux feuilles proximales. En conséquence, Florine Gonord suggère l'existence d'un signal transmis de la feuille au fruit en réponse à une perturbation du statut redox de la plante, elle propose le monoxyde d'azote (NO) comme candidat. 3) Les perturbations de statut redox de la plante ont un effet mineur sur les critères de qualité du fruit. Aucun effet sur la teneur en sucre et une faible augmentation des teneurs en acides et caroténoïdes du fruit ont été observés. Pour clore cette partie, Florine Gonord discute la régulation des gènes de la voie des caroténoïdes par le statut redox des cellules puis très brièvement le rôle éventuel du NO comme messenger. La discussion de cette deuxième partie est moins fouillée que la précédente, elle donne l'impression d'un travail préliminaire notamment en ce qui concerne les variations du statut redox dans le fruit basées sur le rapport ascorbate réduit/ascorbate oxydé. Ce travail mérite d'être approfondi, il permettra d'aboutir à des conclusions sur le rôle de la lumière au niveau des feuilles et son impact sur le métabolisme des caroténoïdes dans le fruit d'agrume.


Pour terminer, la dernière partie du manuscrit comprend une partie Conclusions et Perspectives du travail qui reprennent les questions émises au début de cette thèse et propose un certain nombre de pistes à explorer. Dans l'ensemble, les hypothèses sous-jacentes, démarches suivies et perspectives sont présentées clairement. L'étude ouvre des perspectives nouvelles dans l'étude de la régulation de la teneur en caroténoïdes dans le fruit d'agrume, en soulignant fortement la nécessité d'intégrer l'aspect environnemental dans toute étude sur le sujet et en proposant des pistes nouvelles pour comprendre les caractéristiques finales de qualité du fruit. Je regrette cependant que Florine Gonord n'ait pas clôturé son manuscrit de thèse en proposant des idées de modèles de conduite des cultures de verger d'agrume visant à améliorer les principaux critères de qualité des fruits, puisque c'était au départ la finalité de ce travail.

En conclusion, le bilan scientifique de ce travail est très positif. La quantité de données présentées sur un même thème mais avec des approches et des outils variés forme un ensemble très original. Leur analyse intégrée, leur discussion et les hypothèses novatrices présentées, sont le fait de Florine Gonord et représentent une contribution de grande valeur aux études actuelles sur le métabolisme des caroténoïdes et sa régulation dans les fruits d'agrume. Enfin pour terminer, je tiens à

souligner la qualité de la démarche scientifique appliquée à des arbres fruitiers en champ par rapport à des modèles de plantes ou fruits plus classiques et les difficultés de travailler dans de telles conditions « naturelles » qui, peut être dans un souci de modestie de la part de Florine Gonord, ne transparaissent pas dans son manuscrit.

Pour ces raisons, j'émet un avis très favorable pour la soutenance de la thèse de Mlle Florine Gonord pour obtenir le titre de Docteur de l'Université de Corse-Pascal Paoli, spécialité Biochimie et Biologie Moléculaire.

Fait à Bordeaux, le 31 Août 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Baldet', enclosed within a large, loopy, oval-shaped flourish.

P Baldet

Avignon, le 06/09/11

Dr Hélène Gautier  
INRA – UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles,  
Equipe Ecophysiologie des Plantes Horticoles (EPH)  
PSH Domaine de St Paul, Site Agroparc  
84914 Avignon Cedex 9, FRANCE  
Email: [helene.gautier@avignon.inra.fr](mailto:helene.gautier@avignon.inra.fr)  
Tel : 33 (0)4 32 72 23 45  
Fax : 33 (0)4 32 72 24 32

A l'attention de MH. Cinqui,

Ecole Doctorale

Université de Corse Pasquale Paoli

Madame,

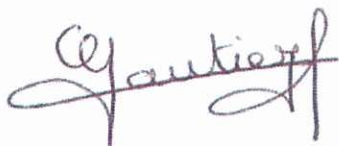
**Veillez trouver ci joint mon rapport sur le manuscrit de thèse de Florine GONORD, en vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Corse Pasquale Paoli**

**Intitulé**

**Etude des effets des facteurs de l'environnement sur la concentration en caroténoïdes dans la pulpe de clémentines (Citrus clementina Hort. Ex Tan.)**

Cordialement

Hélène Gautier



## Rapport sur le manuscrit de thèse de Florine GONORD

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Corse Pasquale Poali, Florine Gonord soumet un manuscrit intitulé : « **Etude des effets des facteurs de l'environnement sur la concentration en caroténoïdes dans la pulpe de clémentines (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.)** ». Ce manuscrit présente les résultats de travaux réalisés au sein de l'Unité de Recherche GEQA, « Génétique et Ecophysiologie de la Qualité des Agrumes » de l'INRA de San Giuliano, co-encadrés par Laurent Urban (Professeur au laboratoire de Physiologie des Fruits et Légumes à l'Université D'Avignon et des Pays de Vaucluse) et par Mme Liliane Berti (Professeur et Directrice du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Végétal à l'Université de Corse). L'unité GEQA étudie le contrôle par le génome et l'environnement de l'élaboration de la qualité gustative et nutritionnelle des agrumes. Cette thèse avait pour objectif de déterminer si des modifications de facteurs environnementaux et des pratiques culturales pouvaient permettre de stimuler la biosynthèse des caroténoïdes afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des agrumes.

Le manuscrit présenté est agréable à lire ; il se présente sous la forme d'un volume de 184 pages structuré en 4 parties, l'« Introduction », la partie « Matériels et Méthodes », une partie « Résultats et Discussion » et enfin la partie « Conclusion et Perspectives » suivie des références bibliographiques et des annexes. Une synthèse bibliographique (publiée en premier auteur dans la revue *Journal of Agricultural and Food Biochemistry*) a permis à Florine Gonord de faire un état des lieux des connaissances sur la régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires et des vitamines. A partir de ce travail de synthèse, elle a formulé deux hypothèses sur des mécanismes susceptibles de stimuler la biosynthèse des caroténoïdes : soit par augmentation de la disponibilité en carbone (hypothèse 1) ou par induction d'un stress oxydatif ou d'une modification de statut redox (hypothèse 2) qui ont ensuite été testées durant la thèse.

Le premier chapitre de **synthèse bibliographique** fait une rapide présentation des caroténoïdes et de leur rôle dans la santé humaine (4 pages), suivie d'informations sur les agrumes (le modèle d'étude choisi, 5 pages) et sur des critères de qualité gustative et nutritionnelle (liée à la concentration en caroténoïdes, 28 pages). Puis Florine Gonord aborde le cœur de son sujet concernant l'influence des facteurs de l'environnement sur la biosynthèse et l'accumulation des caroténoïdes (24 pages). Cette synthèse montre des résultats contradictoires, et deux hypothèses sont étudiées plus en détail, l'influence du statut carboné (4 pages), l'influence du stress oxydatif (17 pages), et les interactions entre statut carboné et statut redox ou stress oxydatif (3 pages) sur la concentration en caroténoïdes. En conclusion, la problématique étudiée et les objectifs sont présentés de façon très succincte (2 pages).

Dans la partie « **Matériels et Méthodes** », le matériel végétal utilisé (Clémentiniers et orangers) est brièvement présenté. Il aurait été intéressant de souligner l'originalité et les contraintes liées à ce matériel végétal ainsi que les spécificités liées, entre autre, au très faible taux de nouaison et à la période de maturation des fruits en hiver qui favorise la probabilité de se trouver un situation de stress oxydatif au niveau des feuilles au cours de la maturation des fruits (ce qui justifie l'une des deux hypothèses testées lors de ce travail).

Un deuxième paragraphe présente les dispositifs expérimentaux (l'absence de photographies illustrant les traitements d'ombrage ou de charge en fruit est compensée par un schéma clair résumant le dispositif expérimental). Pour tester la première hypothèse, deux expérimentations ont été réalisées afin de limiter, de façon irréversible (annélation) ou réversibles (ombrage), la disponibilité en carbone à différents stades de développement du fruit. Enfin une troisième étude a été réalisée afin de suivre l'effet d'un stress photo-oxydatif appliqué au niveau des feuilles sur la concentration en caroténoïdes des fruits situés à proximité. L'intérêt des mesures écophysiologiques réalisées sur feuilles (8 lignes) aurait pu être décrit plus précisément.

Les paragraphes suivant précisent les conditions de préparation des échantillons récoltés, les analyses immédiates de l'indice de maturité (le matériel sur lequel ces analyses sont faites n'est pas précisé) et

les protocoles utilisés pour réaliser les différents dosages biochimiques, suivis d'un petit chapitre sur les analyses statistiques. La description des analyses biochimiques est très bien détaillée (8 pages) et montre une grande rigueur dans la préparation des échantillons, leur conservation et leur analyse (identification, quantification), ce qui souligne l'important investissement réalisé par Florine Gonord dans le domaine analytique au cours de sa thèse.

Le chapitre « **Résultats et Discussions** » est divisé en deux parties correspondant aux deux hypothèses testées : 1 : l'effet de l'alimentation en sucres sur la biosynthèse des caroténoïdes et 2 : l'effet du stress oxydatif et du statut redox sur la biosynthèse des caroténoïdes. Florine Gonord trouve sur Clémentinier des résultats conformes à ceux décrits sur d'autres espèces, *ie* une augmentation de diamètre et de poids frais du fruit lorsque la charge en fruit diminue (erreur de légende sur la fig. 29 entre le traitement charge élevée et charge moyenne?), et une modification de la composition des fruits (augmentation de la concentration en sucres et diminution de la concentration en acides). Des résultats plus originaux montrent que l'augmentation de la charge en fruit diminue la concentration en caroténoïdes de la pulpe et accélère la vitesse de maturation du fruit, alors qu'il n'y a pas d'augmentation des quantités de caroténoïdes par fruit. Il serait intéressant d'exprimer ces concentrations en fonction de la matière sèche structurale (estimée à partir de la matière sèche après soustraction des sucres et des acides) afin d'écarter l'hypothèse d'un effet de dilution lié à des différences de concentration en sucres ou acides.

Cette expérimentation suggère qu'il n'existe aucune corrélation entre concentration en sucres totaux et en caroténoïdes. Le calcul a-t-il été réalisé uniquement à la dernière date de prélèvement ou sur les 3 dates regroupant ainsi les 27 résultats d'analyse ? Cette relation correspondant à une hypothèse forte de la thèse aurait méritée d'être illustrée par une figure. L'absence de corrélation soulève également la question du rôle modulateur des carbohydrates. L'auteur a-t-elle essayé de rechercher d'autres corrélations plus spécifiques entre concentrations en certains sucres (glucose par exemple ?) et caroténoïdes. Un tableau récapitulatif de ces corrélations (avec des concentrations exprimées en matière sèche structurale, plutôt qu'en matière sèche) permettrait de conclure de façon plus décisive quant à l'absence de corrélation entre sucres et caroténoïdes.

Cette expérimentation apporte des résultats originaux : on peut noter en particulier la réponse singulière du glucose comparée à celle du fructose et du saccharose et des différences de proportions entre les différentes formes de caroténoïdes et d'acides. Ces résultats permettent de répondre à l'hypothèse 1 par la négative : On ne peut pas augmenter la concentration en caroténoïdes des fruits de citrus en augmentant leur teneur en sucres. L'interprétation des résultats soulève toutefois la question de l'âge physiologique de ces fruits et on aurait aimé avoir en introduction une présentation sur le témoin de l'évolution de ces composés au cours de la maturation, pour s'affranchir d'un éventuel effet du stade de maturité plus avancé qui pourrait expliquer l'accumulation préférentielle des caroténoïdes de fin de chaîne dans le traitement à faible charge en fruit.

Le chapitre suivant avait pour objectif de compléter ces résultats en considérant deux facteurs supplémentaires, le stade de développement du fruit lors de l'application de la limitation carbonée et la durée de la limitation carbonée et confirme qu'il existe un antagonisme entre accumulation des sucres et des caroténoïdes. C'est un résultat original qui n'a pas été décrit sur d'autres espèces. Il est en accord avec la GDBH « Growth Differentiation Balance Hypothesis », qui prédit des modifications de répartition du carbone entre métabolites primaires et secondaires en fonction de la disponibilité en ressources. Cette représentation théorique de la répartition du carbone n'apporte pas d'information sur les mécanismes mis en jeu. Florine Gonord fait l'hypothèse qu'une situation de limitation carbonée précoce augmente le nombre et/ou la taille des plastes et en conséquence leur capacité de stockage, ce qui favoriserait l'accumulation des caroténoïdes. Cette hypothèse n'a pas été testée, et reste une piste très intéressante à étudier dans le futur.

Le chapitre suivant présente une expérimentation visant à tester la deuxième hypothèse : l'effet du stress oxydatif et du statut redox sur la biosynthèse des caroténoïdes. Après ombrage, les rameaux ont été replacés en pleine lumière ou sous ombrières intermédiaires ce qui a provoqué un stress photooxydatif comparé au témoin resté sous ombrières. Différents indicateurs de stress oxydatifs ont été recherchés dans la pulpe des fruits : concentrations en peroxyde d'hydrogène, ascorbate réduit,

oxydé ou rapport entre les deux formes, tout en suivant la composition des fruits en sucres acides et caroténoïdes. Les résultats observés suggèrent une augmentation de certains caroténoïdes dans la pulpe des fruits après induction d'un stress oxydatif sur les feuilles. La caractérisation plus complète des effets du stress oxydatif sur les différentes activités enzymatiques impliquées (uniquement mentionnée sans présentation des résultats) aurait complété de façon intéressante cette étude qui reste très descriptive.

La dernière partie « **Conclusion et perspectives** » est très courte et reprend les principaux résultats de la thèse en suggérant différentes hypothèses sur les mécanismes impliqués dans la régulation des caroténoïdes. En complément de la discussion, le rôle direct ou indirect des sucres sur la voie de synthèse des caroténoïdes est évoqué : la disponibilité en carbone jouant sur les teneurs en sucres pourrait moduler de façon directe l'expression des gènes de la voie de synthèse des caroténoïdes ou de façon indirecte en influençant la synthèse et la division des plastes. Des mesures histologiques ou un suivi du niveau d'expression des gènes codant pour les principales étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (PSY ou PDS) pourrait apporter des indications précieuses, pour aider à élucider le rôle des sucres sur la régulation de la voie de synthèse des caroténoïdes.

#### **Les points forts de ce travail :**

Au cours de sa thèse Florine Gonord a réalisé une excellente synthèse bibliographique qui souligne la complexité des interactions entre facteurs intervenant dans la régulation de la biosynthèse de composés secondaires et de vitamines. L'important travail expérimental qu'elle a réalisé a confirmé la complexité de la régulation des concentrations en caroténoïdes dans les tissus, et l'existence de transferts de signaux ou d'hormones entre feuilles et fruits.

Ces travaux apportent des informations originales sur les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Ils permettent en particulier de rejeter l'hypothèse de l'existence d'une corrélation positive entre concentration en sucres et en caroténoïdes dans la pulpe de citrus soulevant ainsi l'hypothèse d'une régulation différente des caroténoïdes selon le type d'organe considéré, feuille ou fruit et selon les espèces. Florine Gonord a montré que la disponibilité en carbone n'était pas limitante pour la voie de synthèse des caroténoïdes. Au contraire, elle a observé une augmentation maximale de la concentration en caroténoïdes lorsque la disponibilité en carbone était réduite dès les premières phases de développement du fruit, ce qui suggère un rôle à élucider de la fourniture carbonée dans la genèse des plastes (influençant leur taille ou leur nombre ?) qui mériterait d'être approfondi.

L'hypothèse de l'activation de la synthèse des caroténoïdes en réponse à un stress photo-oxydatif appliqué aux feuilles est cohérente avec l'augmentation observée des concentrations en certains caroténoïdes. Ces résultats soulignent l'existence de relations entre pool d'antioxydants dans les fruits tels que les caroténoïdes et la vitamine C, et montrent l'intérêt d'avoir une vision plus complète de la réponse de la plante en analysant également l'effet sur les activités enzymatiques anti-oxydantes.

Dans ce travail, le levier génétique n'a pas été abordé, mais les résultats spécifiques obtenus sur citrus comparés à ceux décrits dans la littérature et l'hypothèse intéressante de régulation de l'accumulation des caroténoïdes liée à leur capacité de stockage donnent des pistes intéressantes afin de mieux comprendre les interactions Génotype X Environnement. La maîtrise de l'environnement pour obtenir des fruits riches en composés secondaires et vitamines reste un domaine complexe tant que les mécanismes sous-jacents impliqués dans la régulation ne seront pas élucidés.

#### **Les points critiques de ce travail :**

Après la présentation bibliographique détaillée sur l'hypothèse du rôle du stress oxydatif sur le contrôle de la voie de synthèse des caroténoïdes, les résultats présentés pour étayer cette hypothèse sont très peu nombreux et ne permettent pas une analyse approfondie des mécanismes mis en jeu. Les résultats sur les variations d'activités enzymatiques impliquées dans le recyclage de la vitamine C, obtenues en collaboration avec l'Université de Corse (stage effectué sur les mêmes échantillons ?)

auraient mérité d'être présentés plus en détail car ils offrent une piste d'investigation intéressante pour mieux comprendre les processus impliqués dans l'adaptation de la plante à son environnement.

Les résultats descriptifs d'augmentation des concentrations en caroténoïdes après limitation carbonée n'ont pas été accompagnés d'une recherche des mécanismes impliqués soit au niveau de l'expression de certains gènes clés de la voie de synthèse des caroténoïdes, ou au niveau des divisions et du grandissement des plastes.

**En conclusion**, Florine Gonord a réalisé une synthèse bibliographique très intéressante sur les effets bénéfiques des vitamines et des composés secondaires et les moyens agronomiques existants pour améliorer la qualité nutritionnelle des fruits. Elle a ensuite testé deux méthodes susceptibles de stimuler l'accumulation de caroténoïdes dans les agrumes. Les expérimentations ainsi que les récoltes d'échantillons et leur analyse ont nécessité un travail expérimental conséquent qui a été réalisé avec beaucoup de rigueur. Ce travail a permis de rejeter l'hypothèse qu'une faible charge en fruit pouvait stimuler l'accumulation des caroténoïdes, et ouvert des pistes de recherches intéressantes à explorer concernant les phases précoces de formation des plastes, et le rôle du stress oxydatif dans l'activation de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. La revue bibliographique a été publiée (en premier auteur), et un deuxième article a été soumis portant sur les effets de la charge en fruits sur les concentrations en caroténoïdes dans les fruits de Clémentiniers (en premier auteur). Ce travail a par ailleurs été valorisé dans le cadre de la participation à un congrès international (présentation orale) et sous forme de posters à différentes occasions (3). En tant que rapporteur, je donne un avis favorable à la soutenance de thèse de Florine Gonord en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de l'Université de Corse.

Fait à Avignon le 5 septembre 2011

Hélène Gautier

Chargée de Recherche INRA

