



**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
DE L'UNIVERSITE DE CORSE
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire**

**Soutenue publiquement par
Sandrine ANTOINE
le 12 juillet 2013**

**Etude des mécanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes en
conditions d'assimilats contrastés.**

Directeurs :

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
Mr François Luro, Dr-HDR, INRA de Corse

Rapporteurs :

Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux
Mr Charles Romieu, Dr-HDR, INRA de Montpellier

Jury

Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse
Mr François Luro, Dr-HDR, INRA de Corse
Mr Charles Romieu, Dr-HDR, INRA de Montpellier
Mr Pierre Baldet, Dr-HDR, INRA de Bordeaux
Mr Félix Tomi, Professeur, Université de Corse
Mr Jean-Luc Regnard, Professeur, Université de Montpellier

RESUME

Le groupe des agrumes d'acidité intermédiaire (orange, clémentine et mandarine) perd l'acidité au cours de la maturation (stade III), mais cette chute semble plus forte depuis quelques années dans la zone méditerranéenne. Il a été suggéré que cette perte d'acidité serait liée au climat (automne plus doux) ce qui entraînerait une augmentation de la respiration des fruits avec une photopériode plus courte à cette période et se traduirait par un déséquilibre carboné. Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi d'étudier l'effet d'un déséquilibre carboné, induit par une défoliation partielle, soit en début soit en fin de stade II, qui est la phase de grossissement cellulaire où les sucres et les acides organiques s'accumulent dans la vacuole des cellules des sacs à jus. Nous avons établi un bilan sucres-acides des fruits soumis aux différentes réductions d'apport carboné et identifié la ou les périodes où la réduction de l'apport carboné a le plus d'impact sur les teneurs en sucres et en acides organique. Puis, nous avons regardé l'impact de ce déséquilibre sur le métabolisme du fruit en étudiant l'activité spécifique d'enzyme spécifiques (phosphofructokinase, invertase acide, phosphoenolpyruvate carboxylase, isocitrate déshydrogénase cytoplasmique) et l'expression de gènes d'intérêts (CsCit1, succinate semialdéhyde déshydrogénase, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthétase) et identifié les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à la limitation des apports carbonés. Les résultats obtenus montrent que les fruits ne sont pas capables de compenser la réduction des apports carbonés (poids et calibre) que la réduction foliaire soit précoce ou plus tardive au cours du stade II. Lorsque la réduction foliaire est précoce et à court terme (48h et une semaine), l'apport carboné n'est pas affecté puisque les teneurs en saccharose sont similaires à celles du témoin. Nous avons observé une augmentation de l'activité enzymatique de la PFK qui est envisageable grâce au déstockage de la vacuole par l'action de l'invertase acide. La PEPC permet la synthèse d'oxaloacétate et maintient la production d'acide citrique, qui sera dégradé dans le cytoplasme par la NADP-IDH en α -cétoglutarate qui va donner du glutamate et du GABA. La voie du GABA « shunt » semble favorisée puisque l'expression du gène codant pour la SSADH est augmentée. A long terme (7 semaines), l'apport carboné a été affecté puisque les teneurs en saccharose ont fortement diminué par rapport au témoin. Il y a un déstockage de l'acide citrique de la vacuole par CsCit1 mais pas d'activation de la voie du GABA shunt ce qui est compatible avec l'hypothèse que cette voie serait activée par un stress. Lorsque la cellule est en phase d'accumulation des acides organiques, elle privilégie la synthèse d'acide citrique. En revanche, lorsque la réduction foliaire est tardive, les teneurs en sucres sont fortement affectées 48h après la réduction, le flux glycolytique est ralenti et il ne semble pas y avoir un déstockage de la vacuole. Les teneurs en acide malique et en acide malique chutent également mais l'activité de la PEPC est augmentée pour favoriser la synthèse d'acide citrique. Nous avons observé une formation importante de proline qui provient du glutamate. Comme nous n'avons pas observé, 48h après la réduction foliaire, une augmentation des niveaux de transcrits de la P5CS, la voie de l'ornithine serait impliquée. Il serait intéressant de confirmer ou non l'hypothèse de la formation de ROS lors des deux réductions foliaires ce qui nous permettrait de savoir si la voie du GABA « shunt » lors de la réduction foliaire précoce ou bien la formation de proline lors de la réduction foliaire tardive sont fortement sollicitées afin de lutter contre le stress oxydatif provenant de la réduction des apports carbonés.

ABSTRACT

The intermediate acidity group of citrus (orange, clementine and mandarin) loses acidity during maturation (stage III). But this decrease seems to get stronger since several years in the mediterranean basin. It has been suggested that the wider loss of this acidity could be linked to climate (warmer autumns) which would increase fruit respiration at the time when photoperiod is short inducing a carbon imbalance. To check this hypothesis, we chose to study the effect of a carbon imbalance induced by partial defoliation, either at the beginning or at the end of stage II, which is the phase of cell enlargement where sugars and organic acids accumulate in the juice cells bags vacuole. We have established a sugar-acid balance of fruit submitted to different carbon reductions and identified the period or periods for which the reduction of the carbon input had the greatest impact on sugars and organic acids contents. Then, we watched the impact of this imbalance on fruit metabolism studying specific enzyme activity (phosphofructokinase, acid invertase, phosphoenolpyruvate carboxylase, cytoplasmic isocitrate dehydrogenase) and genes of interest expression (CsCit1, succinate semialdehyde dehydrogenase genes Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase). We also identified the biochemical mechanisms involved in the response to the carbon inputs limitation.

The obtained results showed that fruits are not able to offset the limitation of carbon inputs (weight and size) whether the leaf reduction is early or late during stage II. When the leaf reduction is early, for a short-term (48 hours and one week), the carbon contribution is not affected since sucrose contents are similar to those of the control. We observed an increase in PFK enzymatic activity of which is suitable through the destocking of the vacuole due to the action of acid invertase. PEPC allows oxaloacetate synthesis and maintains citric acid production, which will be degraded in the cytoplasm by the NADP-HDI in α -ketoglutarate which will give glutamate and GABA. The GABA "shunt" response seems to be promoted since the expression of the gene encoding the SSADH is increasing. In long-term (7 weeks), the carbon contribution was affected since sucrose contents decreased significantly compared to control fruit. Citric acid is destocked from the vacuole by CsCit1 but no activation of the GABA shunt occurs which is consistent with the hypothesis that this pathway would be activated by stress. Thus, when the cell is in the process of organic acids accumulation, it seems the synthesis of citric acid. In return, when the leaf reduction is late, the sugar contents are strongly affected 48h after reduction, the glycolytic flux is slow and it does not seem to have remobilization of sugars from vacuole. The contents of malic acid and citric acid also fall but PEPC activity is increased to promote the synthesis of citric acid. A significant formation of proline from glutamate is observed. Since we did not observe, 48 hours after foliar reduction, an increase in P5CS transcript levels, ornithine pathway could be involved. It would be interesting to confirm or not the hypothesis of ROS inducing in both foliar reductions in order to see if the GABA "shunt" for early leaf reduction or the proline formation for late leaf reduction are heavily involved in oxidative stress response that might be induce by carbon inputs limitation.