



**HAL**  
open science

## Enrichissement des fruits charnus en caroténoïdes : exemple de la tomate et des agrumes

Anne-Laure Fanciullino, Hélène Gautier

### ► To cite this version:

Anne-Laure Fanciullino, Hélène Gautier. Enrichissement des fruits charnus en caroténoïdes : exemple de la tomate et des agrumes. *Innovations Agronomiques*, 2014, 42, pp.77-89. hal-02630007

**HAL Id: hal-02630007**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02630007>**

Submitted on 27 May 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

## Enrichissement des fruits charnus en caroténoïdes : exemple de la tomate et des agrumes

Fanciullino A.L.<sup>1</sup>, Gautier H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Domaine St-Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon

Correspondance : anne-laure.fanciullino@avignon.inra.fr

### Résumé

Les caroténoïdes sont des pigments responsables des couleurs jaune, orange, ou rouge des fruits, et sont des déterminants majeurs de leur qualité organoleptique et nutritionnelle. Dans la plante, les caroténoïdes participent à plusieurs grandes fonctions physiologiques et permettent à la plante de s'adapter à un environnement fluctuant. Ainsi, de nombreux programmes ont pour objectif d'augmenter leur concentration dans la plante et notamment les fruits. Cet article compare les résultats obtenus sur la tomate et les agrumes pour synthétiser les connaissances acquises sur les contrôles développementaux, génétiques et environnementaux, et discuter des leviers à creuser. Sur cette base, nous proposons un modèle d'accumulation des caroténoïdes dans les fruits rendant compte de l'effet des facteurs environnementaux. L'établissement d'un modèle de simulation de la concentration en caroténoïdes dans le fruit ouvrira la voie à un meilleur pilotage de l'accumulation de ces métabolites.

**Mots-clés :** caroténoïdes, qualité, facteurs génétiques, conditions environnementales, développement

### Abstract: Enhancement of carotenoid contents in fleshy fruits: the case of tomato and citrus

Carotenoids are pigments responsible for the yellow, orange or red colour of fruits; they play a major role in their organoleptic and nutritional qualities. In plants, carotenoids contribute to important physiological functions and they help plants to adapt to changing environmental conditions. Thus, numerous works on this subject aim at enhancing carotenoid contents in plant and particularly in fruits. This review draws comparisons between the results obtained on tomato and citrus before synthesizing insights gained into developmental, genetic, and environmental controls and discussing possible developments. On this basis, we propose a conceptual model of carotenoid accumulation in fruits that accounts for the role played by environmental factors. The development of such a model allowing simulations of carotenoid contents will pave the way of a better management of these metabolites.

**Keywords:** carotenoids, quality, genetic factors, environmental conditions, development

### 1. Contexte et enjeux

Les caroténoïdes sont des déterminants majeurs de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits. Ces métabolites sont par exemple responsables de la couleur rouge de la tomate ou de la teinte orange vif de la clémentine. Chez l'homme, les caroténoïdes provitamines A et antioxydants joueraient un rôle important dans la prévention de plusieurs pathologies : maladies dues à une carence en vitamine A, maladies cardiovasculaires ou encore certains cancers. L'effet santé des fruits et légumes serait en partie dû à ces phytomicronutriments. Les animaux ne peuvent pas synthétiser ces métabolites et doivent compter sur leur alimentation, en particulier sur les fruits et légumes, pour augmenter leurs apports. En France, malgré les injonctions du Programme National Nutrition Santé de consommer au

moins cinq portions de fruits et/ou légumes par jour, la consommation de fruits et légumes reste insuffisante.

Par ailleurs, les caroténoïdes synthétisés par les algues et les plantes supérieures jouent également un rôle important dans l'adaptation de ces organismes à des fluctuations de leur environnement. Par exemple, les caroténoïdes collectant l'énergie lumineuse entre 400 et 500 nm permettent à la plante d'élargir la gamme des longueurs d'ondes collectées par les chlorophylles et jouent un rôle important dans les processus de photosynthèse et d'adaptation à des conditions de lumière fluctuantes. Dans ce contexte, de nombreux programmes de recherche ont pour objectif d'enrichir les plantes cultivées en caroténoïdes pour augmenter la qualité des produits ou pour permettre à la plante de mieux s'adapter aux contraintes environnementales. Ces travaux ont montré que la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes est complexe, et ont mis en évidence l'existence de contrôles développementaux, génétiques, et environnementaux, ainsi que des interactions entre ces facteurs. La capacité à proposer des fruits et légumes enrichis en caroténoïdes repose donc sur une meilleure compréhension de ces facteurs et de leurs interactions.

Cet article détaille les propriétés des caroténoïdes et leur synthèse chez les fruits charnus pour expliquer les résultats acquis sur les contrôles développementaux, génétiques et environnementaux avant de discuter des pistes à creuser pour lever des verrous scientifiques et techniques et augmenter leurs concentrations. La tomate (*Solanum lycopersicum*) et les agrumes, désignant huit espèces commerciales telles que la clémentine (*Citrus clementina*) ou les oranges (*Citrus sinensis*) ou encore les pomélos (*Citrus paradisi*), sont de bons exemples pour détailler les connaissances acquises. Ces fruits charnus sont riches en caroténoïdes. D'un point de vue physiologique, il s'agit de deux modèles différents ; la tomate étant un fruit climactérique et les agrumes des fruits non-climactériques. La comparaison de ces deux modèles permettra de faire ressortir la généralité de certains processus. Ce sont deux modèles très étudiés car la production d'agrumes, avec plus de 100 millions de tonnes produits par an, représente la première production fruitière mondiale, et la tomate constitue une production majeure dans le bassin méditerranéen. Le pilotage de l'accumulation des caroténoïdes dans un contexte environnemental donné constitue un enjeu important pour ces deux filières. Les questions sur l'élaboration des concentrations en phytomicronutriments intéressent les acteurs du développement local (logique de différenciation des produits) et aussi les industriels de l'agroalimentaire ou de la pharmacie. Dans un contexte d'augmentation des contraintes (changement climatique, réductions des intrants, demande croissante de produits de qualité et souci de préserver l'environnement), l'enjeu est de valoriser une agriculture sous contraintes avec la production de fruits à teneurs enrichies en caroténoïdes en appliquant des pratiques agricoles plus respectueuses de l'environnement.

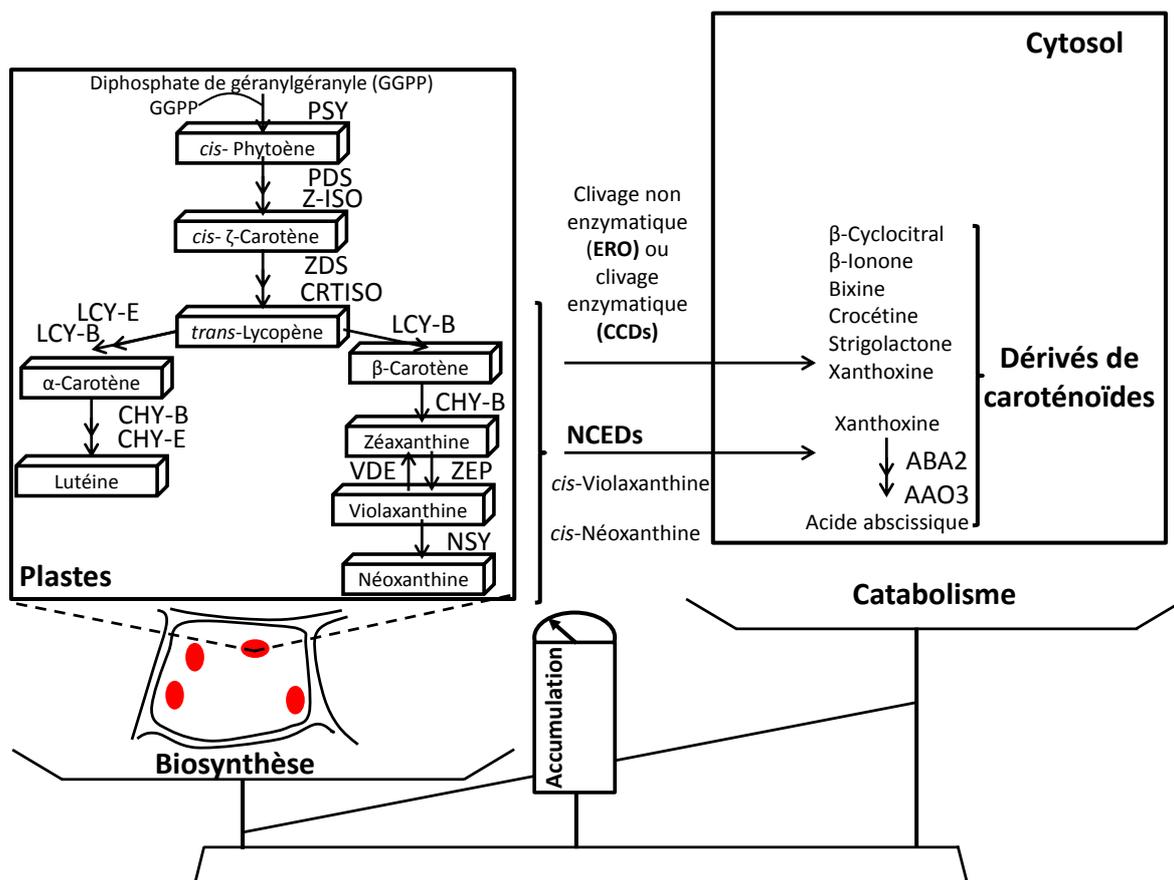
## 2. Propriétés des caroténoïdes

### 2.1 Propriétés des caroténoïdes et voie de biosynthèse

Les caroténoïdes sont des pigments apolaires synthétisés et stockés dans les plastes (chloroplastes et chromoplastes) sous l'action d'enzymes codées par des gènes nucléaires (Hirschberg, 2001; Fraser et Bramley, 2004 ; Phillips *et al.*, 2008) (Figure 1). Les précurseurs sont principalement formés à partir du 3-phosphoglyceraldéhyde et du pyruvate par la voie chloroplastique du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP ou voie de Rhomer) (Phillips *et al.*, 2008). La première étape de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, catalysée par la phytoène synthase (PSY) correspond à la condensation de deux molécules de diphosphate de géranylgeranyle (GGPP) pour former le phytoène en C<sub>40</sub> et comportant 9 doubles liaisons carbone-carbone. Les autres étapes, de désaturation ou d'hydroxylation, permettent de former le lycopène et les différentes xanthophylles.

L'accumulation des caroténoïdes correspond à un bilan entre la synthèse et la dégradation (Figure 1). D'après Cazzonelli et Pogson (2010), la disponibilité en précurseurs provenant de la glycolyse et/ou la

connexion entre les voies du méthylérythritol phosphate et des caroténoïdes joueraient un rôle de contrôle de la concentration en caroténoïdes. Les sorties possibles sont la dégradation des xanthophylles violaxanthine et néoxanthine, en aval de la voie par rapport aux carotènes, pour former l'acide abscissique (ABA) sous l'action des 9-*cis*-époxy-caroténoïde dioxygénases (NCED) (Chernys et Zeevaart, 2000). Les autres voies de catabolisme sont la formation des apocaroténoïdes en C<sub>30</sub>, précurseurs d'hormones, comme les strigolactones synthétisées dans les racines (Koltai, 2011), ou d'arômes, comme la  $\beta$ -ionone formée à partir du  $\beta$ -carotène (Simkin *et al.*, 2004).



**Figure 1 :** Synthèse et accumulation des caroténoïdes d'après Fanciullino *et al.* (2014). Les caroténoïdes apolaires sont formés dans les plastides à partir de la condensation de deux molécules de diphosphate de géranylgeranyle (GGPP) pour former une molécule à 40 atomes de carbone sous l'action de la phytoène synthase (PSY). Cette chaîne polyène est responsable de la nature hydrophobe des caroténoïdes et implique leur stockage sous forme de complexes formés par association avec des lipoprotéines. La stabilité de ce complexe influence leur catabolisme qui peut se faire par voie enzymatique ou non-enzymatique. Les enzymes intervenant dans les différentes étapes sont indiquées en abrégé et en majuscules. Les abréviations utilisées sont : AAO3, aldéhyde abscissique oxydase ; ABA2, déshydrogénase ; CCD, caroténoïde dioxygénase ; CHY-B, caroténoïde  $\beta$ -hydroxylase ; CHY-E, caroténoïde  $\epsilon$ -hydroxylase ; CRTISO, caroténoïde isomérase ; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; LCY-B, lycopène  $\beta$ -cyclase ; LCY-E, lycopène  $\epsilon$ -cyclase ; NCED, 9-*cis*-époxy-caroténoïde dioxygénase ; NSY, néoxanthine synthase ; PDS, phytoène désaturase ; VDE, violaxanthine dé-époxydase ; ZDS,  $\zeta$ -carotène désaturase ; ZEP, zéaxanthine époxydase ; Z-ISO,  $\zeta$ -carotène isomérase.

## 2.2 Les caroténoïdes jouent un rôle important pour la santé humaine

Les bienfaits de la tomate quant à la santé humaine sont en partie dus à sa richesse en caroténoïdes pro-vitaminiques ( $\beta$ -carotène) et antioxydants (essentiellement lycopène et  $\beta$ -carotène) (Bendich et Olson, 1989 ; Kopsell et Kopsell, 2006). Les petits agrumes type clémentine ou mandarine et les oranges concentrent également des caroténoïdes pro-vitamines A tels que le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -carotène ou encore la  $\beta$ -cryptoxanthine qui comportent au moins une chaîne  $\beta$ -ionone et qui peuvent être convertis en vitamine A (Fanciullino *et al.*, 2006). Les propriétés antioxydantes des caroténoïdes seraient responsables de leur implication dans la prévention de maladies chroniques (Linnewiel *et al.*, 2009). Enfin, les caroténoïdes xanthophylles (lutéine et zéaxanthine) présents dans la pulpe des oranges et des mandarines sont des molécules importantes pour la vision notamment en ce qui concerne la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

## 2.3 Les caroténoïdes permettent à la plante de s'adapter à leur environnement

Dans la plante, les caroténoïdes, pigments secondaires collectant l'énergie lumineuse, antioxydants et précurseurs d'hormones (acide abscissique et strigolactones), contribuent à plusieurs grandes fonctions physiologiques et participent à l'adaptation de la plante aux variations microclimatiques (DellaPenna, 1999 ; Gomez-Roldan *et al.*, 2008). Par ailleurs, les caroténoïdes s'accumulent dans les chromoplastes des fleurs et des fruits où ils ont pour rôle principal d'attirer, à un stade développemental approprié, les agents responsables de la dissémination du pollen et des graines, respectivement. Ainsi, la performance des plantes en terme physiologique et évolutif repose en partie sur leur capacité à ajuster leur teneur en caroténoïdes au bon moment et dans le bon tissu.

## 3. Les fruits charnus et élaboration de la qualité

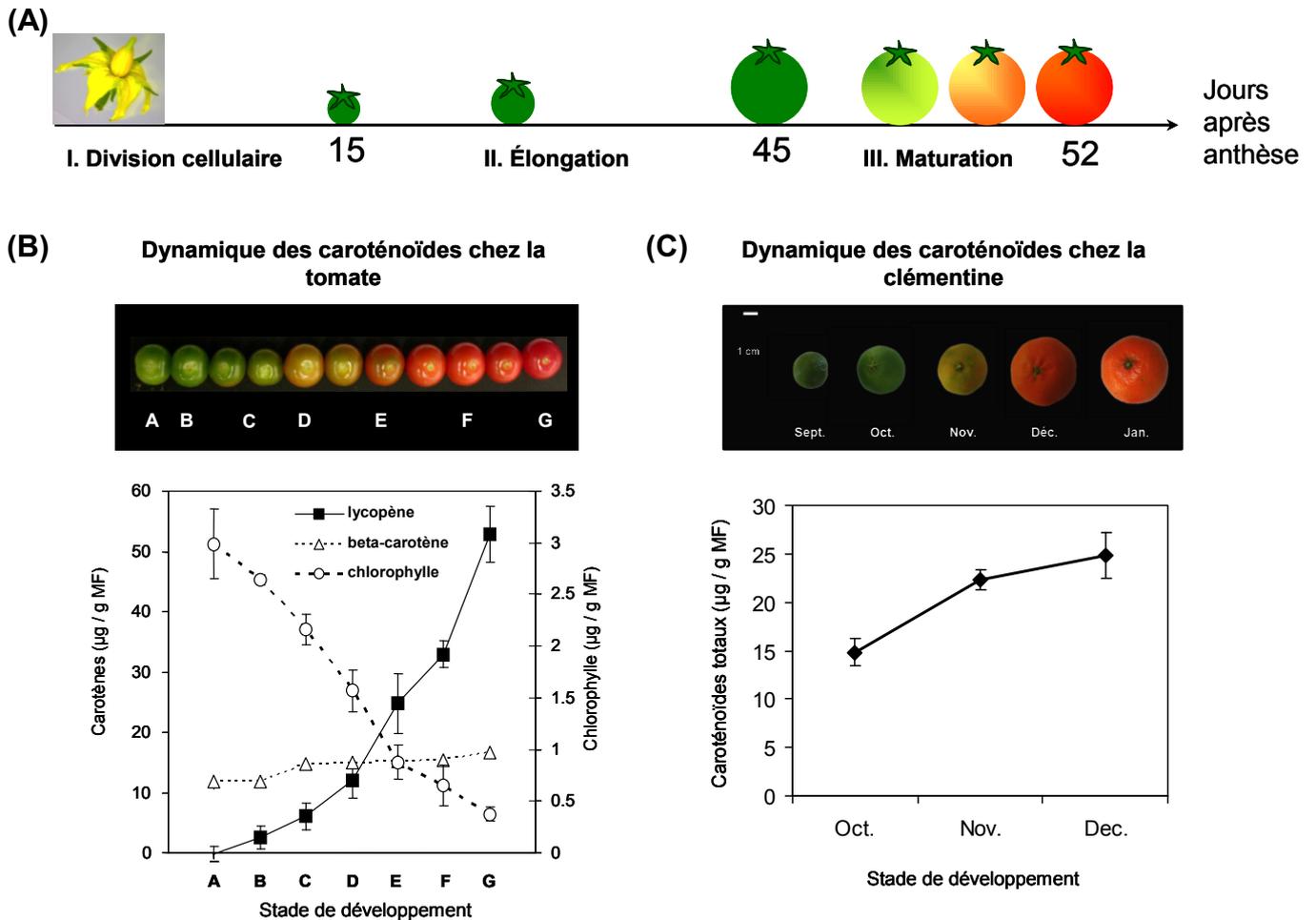
### 3.1 Le développement des fruits charnus comprend trois phases

Les fruits charnus peuvent être classés en deux catégories : les fruits climactériques (tomates, bananes, pêches, pommes...) caractérisés par une forte augmentation de la production d'éthylène et de la respiration au cours de la dernière phase de maturation, et les fruits non climactériques (agrumes, raisin, poivrons, fraises...) pour lesquels la maturation ne s'accompagne pas d'un pic de production d'éthylène. Bien qu'appartenant à des catégories distinctes, la tomate et les agrumes partagent le même profil de développement en trois phases : une première phase de division cellulaire, une deuxième phase d'expansion cellulaire et une troisième phase de maturation (Figure 2). Des travaux récents comparant le développement des fruits climactériques et non climactériques suggèrent que les processus en jeu sont identiques mais que leurs régulations peuvent être différentes surtout lors de la phase de maturation (Osorio *et al.*, 2012). Les résultats développés dans la suite de l'article ne concernent que les processus communs aux fruits charnus climactériques et non climactériques. En particulier, le contrôle hormonal par l'éthylène n'est pas abordé.

### 3.2 Dynamique des caroténoïdes chez la tomate et les agrumes

A maturité, la tomate contient du lycopène, phytoène, phytofluène,  $\beta$ -carotène, et lutéine par ordre décroissant de concentration. Au cours de l'ontogénèse de la tomate, les concentrations en caroténoïdes totaux sont multipliées par un facteur 12 (Fraser *et al.*, 1994). La coloration du fruit résulte alors d'un double processus : la dégradation des chlorophylles et l'accumulation accrue de caroténoïdes (Figure 2). La phase d'accumulation rapide des caroténoïdes correspond à la maturation marquée par la transition chloroplaste/chromoplaste (« breaker stage » en anglais). Cette phase de transition a été largement étudiée. En effet, durant cette étape, la synthèse des caroténoïdes dans le fruit apparaît corrélée au niveau de transcription des gènes de la voie de biosynthèse et en particulier à l'augmentation de l'expression du gène *PSY* et à la diminution de l'expression des gènes codant pour la lycopène  $\epsilon$ -cyclase (*LCY-E*) et la lycopène  $\beta$ -cyclase (*LCY-B*), ce qui engendre l'accumulation des

carotènes (Fraser *et al.*, 1994) (Figure 1). Chez la tomate, des contrôles d'origine génétique, hormonale et environnementale de la transcription des gènes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes ont été mis en évidence (Cazzonelli et Pogson, 2010 ; Giovannoni, 2007 ; Fanciullino *et al.*, 2014).



**Figure 2 :** Développement des fruits charnus et élaboration de la concentration en caroténoïdes d'après Fanciullino *et al.* (2014) Poiroux-Gonord *et al.* (2013) et Gautier *et al.* (2008). Le développement des fruits charnus, climactériques ou non, se fait en en trois phases représentées en (A). A titre indicatif, nous avons donné le nombre de jours après anthèse nécessaires au développement de la tomate. Les graphiques présentés en (B) et (C) détaillent l'évolution de la coloration et de la concentration en caroténoïdes totaux dans respectivement le péricarpe de tomate et l'endocarpe de la clémentine. Les concentrations sont exprimées par rapport à la matière fraîche (MF).

Nous avons également montré que les concentrations en caroténoïdes varient fortement au cours du développement des agrumes (Fanciullino *et al.*, 2008, Poiroux-Gonord *et al.*, 2012). Par exemple, au cours du développement de la clémentine (*Citrus clementina*), la concentration en caroténoïdes totaux est multipliée par deux dans la peau du fruit (épicarpe) et jusqu'à un facteur dix dans la pulpe (endocarpe) (Figure 2). Les principaux caroténoïdes responsables de la couleur typique des agrumes sont la 9-*cis*-violaxanthine et la  $\beta$ -cryptoxanthine, et dans une moindre mesure la  $\beta$ -citaurine (Fanciullino *et al.*, 2006). Les profils en caroténoïdes dans la peau et dans la pulpe des fruits sont généralement similaires d'un point de vue qualitatif. Cependant, l'augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse des caroténoïdes dans la pulpe et l'accumulation des caroténoïdes interviennent

un peu plus tôt et plus progressivement dans la pulpe que dans la peau (Kato *et al.*, 2004). De plus, les teneurs en caroténoïdes de la pulpe sont environ cinq fois inférieures à celles mesurées dans la peau.

Ainsi, il paraît nécessaire de replacer et d'intégrer l'étude de l'élaboration de la concentration en caroténoïdes dans l'analyse d'un processus plus global qu'est le développement du fruit.

#### 4. Contrôles génétiques et moléculaires

##### 4.1 Identification des étapes clés de la voie de biosynthèse et développement de marqueurs

Chez les fruits d'agrumes arrivés à maturité, la diversité des profils de caroténoïdes permet de retracer l'histoire évolutive du genre *Citrus*. L'analyse phénotypique de l'ensemble des huit espèces cultivées du genre *Citrus* toutes issues d'une même zone géographique et soumises aux mêmes pratiques culturales a permis de déterminer les variations qualitatives et quantitatives des concentrations en caroténoïdes. Ces données ont apporté des informations sur l'importance du facteur génétique et les étapes de la voie de biosynthèse qui semblent impliquées dans les différences inter ou intra-spécifiques. Les travaux conduits sur 25 génotypes ont montré que la diversité des compositions qualitatives en caroténoïdes se structure en trois pôles : (1) mandariniers/orangers/bigaradiers, (2) pamplemoussiers/pomelos, (3) cédratiers/citronniers/limettiers (Fanciullino *et al.*, 2006). Le groupe des mandarines (*C. reticulata*), le groupe des cédrats (*C. medica*) et le groupe des pamplemousses (*C. maxima*) sont considérés comme étant les trois taxons de base à partir desquels dériveraient les espèces secondaires. Ainsi, cette organisation très voisine de la structuration génétique globale du genre *Citrus* suggère que la différenciation génétique à l'origine de la structuration inter-spécifique des teneurs en caroténoïdes est antérieure à la formation des espèces secondaires (orangers, pomelos, citronniers, limettiers, bigaradiers) à partir des trois taxons de base des formes cultivées. De plus, cette différenciation en trois pôles paraît reposer sur des variations pour cinq étapes de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

Le groupe des mandariniers et des orangers est celui où se retrouvent les plus grandes concentrations en caroténoïdes. Il explore les deux branches de la voie de biosynthèse des caroténoïdes avec l'accumulation de l'ensemble des composés. Les génotypes du groupe des cédrats synthétisent peu de caroténoïdes. Au-delà du lycopène, ils ne synthétisent pas de xanthophylles et s'arrêtent à la  $\beta$ -cryptoxanthine sur l'autre branche de la chaîne. Les génotypes du groupe des pamplemousses ne synthétisent que des carotènes : phytoène, phytofluène, lycopène et  $\beta$ -carotène généralement en faibles quantités. Ces résultats suggèrent que les étapes situées en amont de la chaîne sont limitantes pour le groupe des pamplemoussiers et cédratiers. Les étapes catalysées par les lycopène cyclases (LCY-B et LCY-E) contribuent également à la différenciation interspécifique, ainsi que la  $\beta$ -carotène hydroxylase (CHY-B) et la zéaxanthine époxydase (ZEP), impliquées dans la formation de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la *cis*-violaxanthine à partir du  $\beta$ -carotène.

La variabilité allélique de deux gènes (*Lcy-b* et *Lcy-e*) codant pour les deux lycopènes cyclases impliquées dans la formation de l' $\alpha$  et du  $\beta$ -carotène à partir du lycopène a été associée à la diversité phénotypique (Fanciullino *et al.*, 2007). La variabilité des autres étapes clés est probablement liée à différents niveaux d'expression des gènes correspondants (Fanciullino *et al.*, 2008). Ainsi, la sous-expression des gènes *Dxs* et *Psy* codant pour les 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase et phytoène synthase situés en amont de la chaîne de biosynthèse est associée aux faibles teneurs globales en caroténoïdes du pamplemoussier et du citronnier. De même, l'absence de  $\beta$ -cryptoxanthine et des molécules en découlant dans les pamplemousses serait liée à la sous-expression du gène *Chy-b*. Ainsi, des marqueurs associés aux allèles impliqués dans la variabilité des compositions en caroténoïdes ont pu être développés.

## 4.2 Expression de ces déterminants génétiques

Des avancées significatives dans les programmes de sélection et de création variétale ont fait suite à l'ensemble des connaissances produites sur les déterminants génétiques et moléculaires des teneurs en caroténoïdes. Cependant, ces programmes ont rencontré plusieurs difficultés. D'une part, la voie de biosynthèse des caroténoïdes est connectée en plusieurs points à d'autres voies métaboliques. Ainsi, la surexpression de certains gènes clés de la voie des caroténoïdes perturbe d'autres grandes fonctions biologiques, comme illustré chez une lignée de tomate surexprimant *Psy*, dont la croissance de la partie aérienne est apparue très limitée par la réduction de la synthèse des gibbérellines, en compétition avec les caroténoïdes pour le même précurseur (Fray *et al.*, 1995). Ces premiers travaux ont souligné le manque de connaissances quant à l'orchestration des différentes voies métaboliques connectées à la voie des caroténoïdes au cours du développement de la plante et du fruit (Sandmann *et al.*, 2006). Par la suite, une meilleure prise en compte de l'interaction avec les facteurs développementaux et de la connexion avec les autres voies métaboliques a permis de lever en partie ces verrous et d'obtenir certains succès comme le « Golden rice 2 ». Ce riz, génétiquement modifié avec l'introduction d'un gène codant pour une caroténoïde désaturase *CrtI* issu de *Erwinia uredovora* et du gène *Psy* issu du maïs sous le contrôle de promoteurs spécifiques, accumule jusqu'à 37 µg/g MS de caroténoïdes totaux dans la graine (vs. 0 µg/g pour le riz non modifié ou 1,6 µg/g pour le riz modifié de première génération) (Paine *et al.*, 2005). Ce type d'approche reste limité et est confronté au rejet des plantes génétiquement modifiées par le consommateur, notamment en Europe. D'autre part, l'environnement influence la biosynthèse des caroténoïdes, et des interactions génotype × environnement ont été observées, mettant en évidence l'importance des conséquences de l'environnement sur la qualité du fruit (Dhuique-Mayer *et al.*, 2009). Ces travaux ont montré que les conditions climatiques et les pratiques culturales pouvaient être des leviers efficaces pour modifier les teneurs en caroténoïdes des fruits.

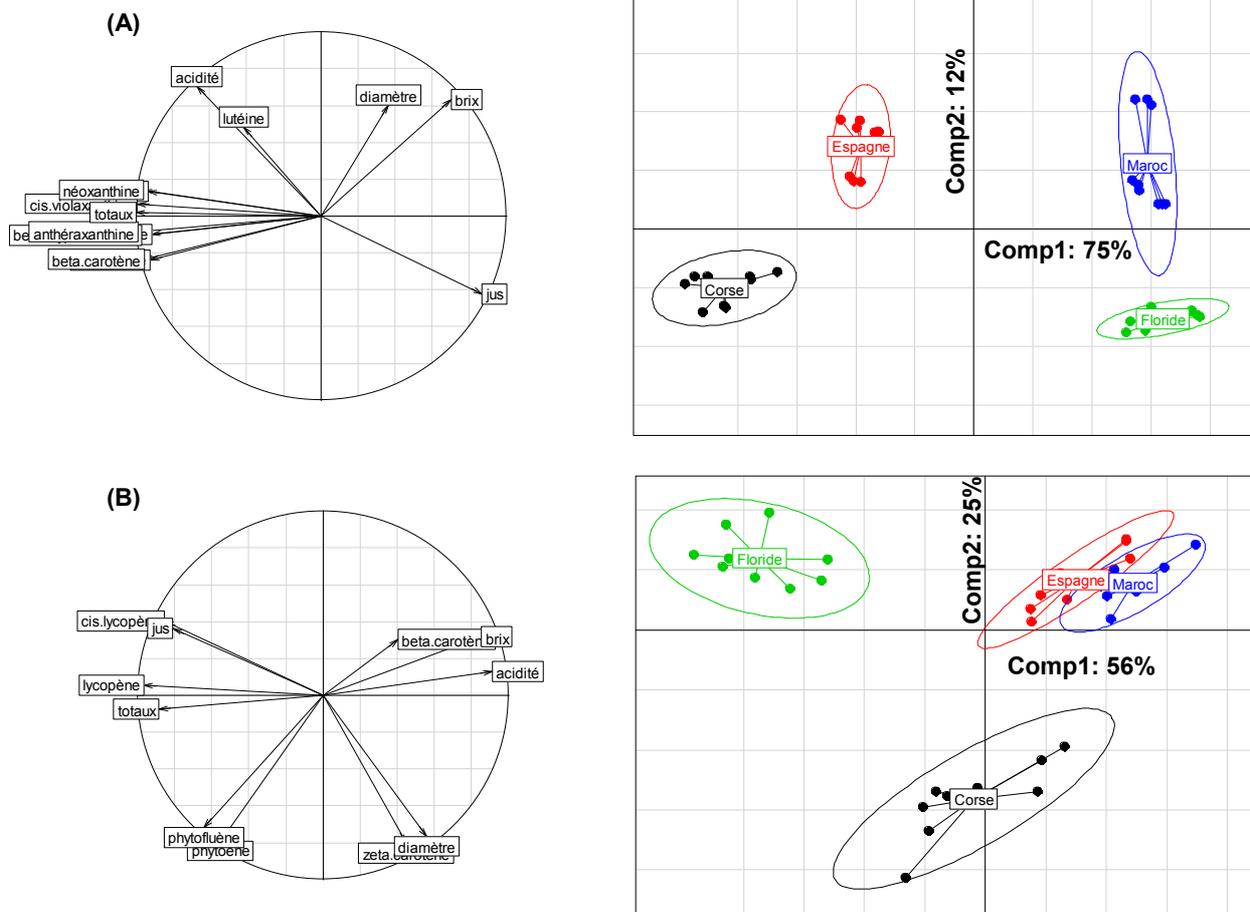
## 5. Quantification de l'effet des facteurs environnementaux

### 5.1 Une étude globale multisites réalisée sur agrumes a montré l'importance des interactions génotype × environnement

Une approche globale a permis de quantifier l'effet des facteurs environnementaux sur l'élaboration de la concentration en caroténoïdes chez les agrumes. Plusieurs cultivars d'intérêt commercial ont été cultivés suivant les mêmes pratiques culturales dans quatre zones géographiques: Corse, Espagne, Floride et Maroc. Une procédure a été rédigée et a servi de base pour le suivi du développement des fruits, la récolte et la préparation des échantillons dans chaque zone. En particulier, les mêmes combinaisons cultivars × porte-greffes ont été utilisées et les fruits ont été récoltés à maturité commerciale à partir d'indices définis pour chaque cultivar. Les métabolites ont été analysés dans un seul laboratoire pour éviter les confusions dues aux différentes méthodes d'analyses. La Figure 3 montre que les différentes zones de culture ont pu être différenciées sur la base des concentrations en caroténoïdes des fruits.

Cette étude a montré l'importance des facteurs climatiques avec par exemple pour l'orange Valencia (*C. sinensis*) produite en Corse une teneur en caroténoïdes totaux multipliée par quatre par rapport à la même orange cultivée en Floride sous climat tropical (Figure 3). De plus, les résultats ont montré que le climat méditerranéen accentuait les différences inter-spécifiques avec une augmentation des teneurs en β-cryptoxanthine et *cis*-violaxanthine chez l'orange et des concentrations en β-carotène, phytoène et phytofluène chez la mandarine dans ces conditions (Dhuique-Mayer *et al.*, 2009). Enfin, de fortes interactions génotype × environnement ont été mises en évidence, le climat tropical étant défavorable à l'accumulation des caroténoïdes chez l'orange « Valencia » mais ayant un effet positif sur la concentration en lycopène, doublée chez le pomelo « Star Ruby ». Cette étude a permis au partenaire industriel impliqué dans ce projet de mieux cibler les zones de production du matériel végétal entrant

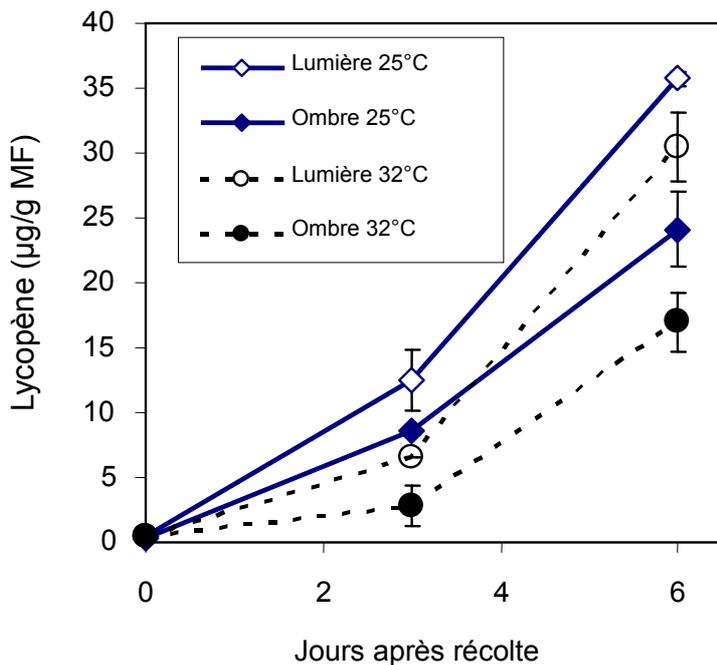
dans la fabrication de confitures et d'extraits afin d'augmenter les concentrations en phytomicronutriments d'intérêt dans ces produits.



**Figure 3 :** Illustration de l'effet de la zone géographique de production sur la qualité de l'orange « Valencia » (A) et du pomélo « Star Ruby » (B). L'analyse en composantes principales montre que les quatre zones de production de l'orange se différencient sur la base des teneurs en caroténoïdes qui contribuent le plus à la première composante. La première composante représente 75% de la variance. Les oranges produites en Corse et en Espagne se distinguent par leur richesse en caroténoïdes. Dans l'ACP présentée en (B), le lycopène et les caroténoïdes totaux contribuent le plus à la première composante qui explique 56% de la variance. Cet axe permet de séparer les pomélos de Floride des pomélos produits en Espagne et au Maroc. Les pomélos cultivés en Corse se distinguent par de plus faibles teneurs en lycopène et de plus fortes concentrations en caroténoïdes incolores phytoène et phytofluène.

### 5.2 La lumière, la température et les apports en eau sont les principaux facteurs impactant les teneurs en caroténoïdes

Des approches plus ciblées d'écophysiologie ont montré que trois facteurs prédominants influençaient les caroténoïdes des fruits charnus : la lumière, la température et l'alimentation en eau (Gautier *et al.*, 2008 ; Poiroux-Gonord *et al.*, 2010 ; Gautier *et al.*, 2005a ; Gautier *et al.*, 2005b). De manière générale, une forte intensité lumineuse, certaines longueurs d'ondes (dans le bleu ou le rouge) ou une température modérée (< 26 °C) apparaissent favorables à la synthèse des caroténoïdes chez la tomate (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010). Ainsi, éviter les températures extrêmes au cours du développement du fruit permet d'augmenter de plus de 100% la concentration en caroténoïdes totaux. Il existe par ailleurs des interactions entre température et lumière (Figure 4) (Gautier *et al.*, 2008).



**Figure 4 :** Effet des facteurs lumière et température sur l'accumulation du lycopène chez la tomate d'après Gautier *et al.* (2008). Les expérimentations ont été conduites sur des fruits détachés placés en conditions contrôlées pour éviter les confusions dues à des interactions entre organes et entre processus. Les fruits ont été détachés en début de maturation au stade vert mature (voir Figure 2), puis les deux niveaux de lumière et température ont été appliqués pendant 6 jours.

L'effet d'une limitation en eau sur la synthèse et l'accumulation des caroténoïdes reste controversé, avec un impact pouvant être positif ou négatif en fonction de l'intensité du stress, sa durée ou encore son moment d'application au cours de l'ontogénèse (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010). Dans les organes photosynthétiques, les caroténoïdes contribuent à adapter la plante aux variations environnementales, et leur métabolisme est influencé par ces mêmes stimuli. Par exemple, il est établi que la photosynthèse représente la principale source de formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la plante (Asada, 1999). Une inhibition du cycle de Calvin, liée par exemple à une diminution de la conductance stomatique en réponse à un stress hydrique, peut entraîner un excès d'énergie au niveau des antennes chlorophylliennes et la formation d'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) au niveau du photosystème II, et par transfert d'électrons à l'oxygène, la synthèse de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) au niveau du photosystème I (Apel et Hirt, 2004). Les caroténoïdes jouent alors un rôle important dans la protection des photosystèmes en éliminant l'excès d'énergie via le métabolisme des xanthophylles et la dé-époxydation enzymatique de la violaxanthine en antheraxanthine et zéaxanthine (Robert *et al.*, 2004). Il se pourrait que dans les jeunes fruits encore photosynthétiques, les mêmes mécanismes soient activés par un déficit hydrique. En revanche, dans les fruits en cours de maturation où les chloroplastes sont devenus chromoplastes, la réponse à un déficit hydrique pourrait faire intervenir d'autres processus. Il est probable qu'un stress hydrique diminuant la conductance stomatique et la photosynthèse des feuilles influence négativement la disponibilité en précurseurs dans les fruits. Cependant, la disponibilité en carbone dans les organes puits est généralement améliorée par le déficit hydrique, car leur croissance est beaucoup plus sensible aux stress hydriques que la photosynthèse des feuilles sources (Muller *et al.*, 2011 ; Pantin *et al.*, 2013). Enfin, l'effet d'une contrainte hydrique pourrait également s'exercer via le métabolisme de l'ABA, hormone synthétisée lors d'un déficit hydrique via le catabolisme des caroténoïdes (Galpaz *et al.*, 2008).

De cet état des lieux émerge le besoin d'acquérir des informations supplémentaires sur l'impact des différents facteurs environnementaux et de leurs interactions en fonction du stade de développement de l'organe fruit ou même de la plante.

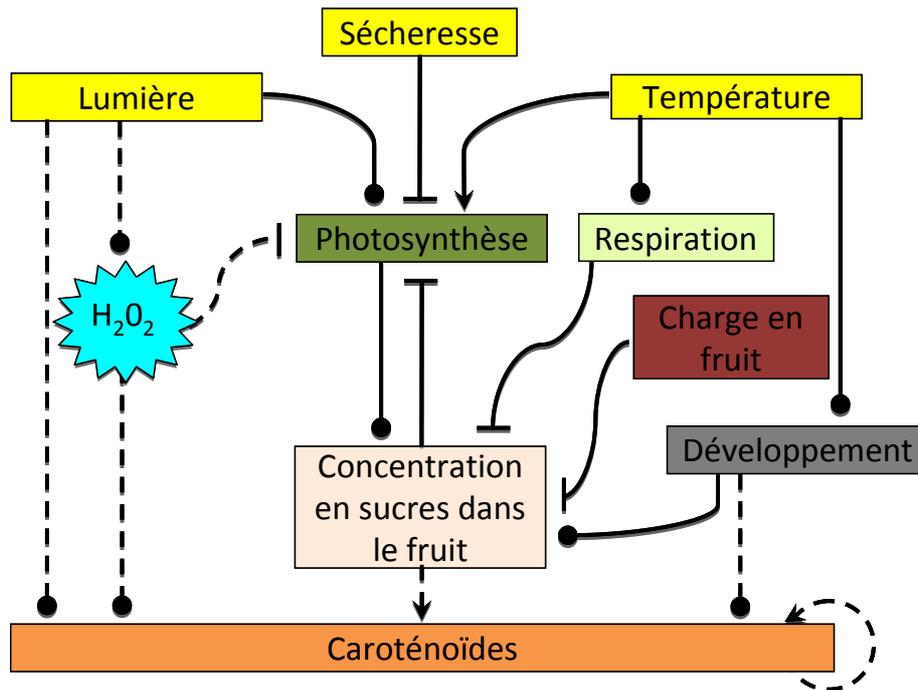
## 6. Perspectives et leviers à creuser

La façon dont les facteurs environnementaux influencent l'accumulation des caroténoïdes au cours du développement des feuilles et des fruits apparaît complexe. Nous avons développé l'hypothèse que ce système complexe pouvait être simplifié en considérant deux facteurs intégratifs : i) les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'état rédox d'une part, et ii) la disponibilité en carbone d'autre part (Fanciullino *et al.*, 2014).

Les différents travaux sur le sujet concourent à démontrer que, parmi tous les facteurs environnementaux, un stress modéré (qui ne conduit pas à la sénescence) est un levier très efficace pour modifier l'accumulation des caroténoïdes. En effet, tout stress, biotique ou abiotique, conduit à la formation de ROS comme  $H_2O_2$ . A leur tour, les ROS, ou les changements d'équilibres rédox induits par les ROS, modifient le métabolisme des caroténoïdes. A titre d'indicateur, la concentration en  $H_2O_2$  peut rendre compte de l'état rédox global et intègre l'effet de stress abiotiques sur la biosynthèse des caroténoïdes. Nous proposons ainsi d'utiliser la concentration en  $H_2O_2$  comme une voie possible de modélisation visant à rendre compte de l'effet de stress environnementaux sur l'accumulation des caroténoïdes des fruits. Parallèlement au métabolisme des ROS, les facteurs environnementaux comme la lumière, la température ou la disponibilité en eau, modifient les gains et les pertes en carbone dans les différents organes en compétition pour cet élément. La disponibilité en carbone qui en résulte modifie l'accumulation des caroténoïdes dans les feuilles et fruits. L'ensemble des données sur les relations entre métabolisme primaire et secondaire tend à démontrer que, dans le cas des caroténoïdes, les sucres jouent un rôle important mais pas en tant que simples précurseurs influençant le flux d'entrée dans la voie de biosynthèse. L'effet de la disponibilité en carbone semble ainsi plus complexe et indirect. Par exemple, les sucres solubles peuvent aussi bien induire que réprimer la synthèse des caroténoïdes en fonction du stade de développement de l'organe considéré.

Nos travaux sur les citrus ont révélé l'influence de la disponibilité en carbone sur la production des caroténoïdes dans le fruit au cours de l'ontogénèse (Poiroux-Gonord *et al.*, 2013). Comme l'avaient déjà observé d'autres auteurs, une charge élevée en fruits appliquée à des rameaux isolés par cintrage entraîne une carence en carbone comme le soulignent la diminution du diamètre des fruits (- 18%), l'épuisement des réserves amylacées dans les feuilles (- 95%), mais aussi une photosynthèse stimulée par la faible balance source/puits (+ 70%). De plus, ce traitement retarde la maturation des fruits (un mois de décalage chez la clémentine). Nous avons également mis en évidence que seuls les traitements précoces (appliqués au début de la phase de grossissement cellulaire) ont un effet significatif et durable (jusqu'à maturité des fruits) sur les teneurs en sucres (- 20%) et en caroténoïdes des fruits (+ 50%). De manière plus surprenante, nous n'avons pas obtenu de corrélation positive entre sucres solubles et caroténoïdes dans le fruit, mais au contraire, un effet négatif des sucres sur l'accumulation des caroténoïdes. Ces résultats, ajoutés au fait que les caroténoïdes représentent une portion quantitativement mineure du bilan carboné, nous ont conduits à proposer que les sucres ne jouaient pas un rôle direct dans la synthèse des caroténoïdes en tant que précurseurs, mais pouvaient constituer un signal influençant leur synthèse. Ces travaux ont souligné l'importance du processus de développement du fruit. D'un point de vue appliqué, nous avons montré que nous pouvions utiliser le levier agronomique (par exemple la taille des arbres) pour moduler les critères de qualité de la clémentine.

Cette démarche intégrative a finalement abouti à la proposition d'un modèle conceptuel d'accumulation des caroténoïdes dans les fruits (Figure 6). La prochaine étape sera de fournir des relations quantitatives entre les différentes variables du modèle.



**Figure 6** : Modèle simplifié de l'accumulation des caroténoïdes dans le fruit et intégration de l'effet des facteurs environnementaux d'après Fanciullino *et al.* (2014). La concentration en sucres intègre une large gamme de processus biologiques ainsi que leur réponse à l'environnement tandis que la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> représente l'état rédox résultant de l'exposition à un stress abiotique. La signification des relations entre les différents modules est la suivante : une relation se terminant par un point indique une activation ; par une barre, une inhibition et par une flèche un effet ambigu. Les relations en trait pointillé indiquent un effet qui reste à établir.

La proposition d'un modèle de l'élaboration des concentrations des caroténoïdes dans les fruits charnus rendant compte des différents facteurs et de leurs interactions ouvre la voie à un pilotage de l'accumulation de ces métabolites par la combinaison de pratiques culturales et de certaines conditions climatiques pour un matériel génétique donné.

### Références bibliographiques

- Apel K., Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639.
- Bendich A., Olson J.A., 1989. Biological actions of carotenoids. *The FASEB Journal* 3, 1927-1932.
- Cazzonelli C.I., Pogson B.J., 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 15, 266-274.
- Chernys J.T., Zeevaart J.A.D., 2000. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology* 124, 343-353.
- DellaPenna D., 1999. Carotenoid synthesis and function in plants: Insights from mutant studies in *Arabidopsis*. *Pure and Applied Chemistry* 71, 2205-2212.
- Dhuique-Mayer C., Fanciullino A.-L., Dubois C., Ollitrault P., 2009. Effect of genotype and environment on citrus juice carotenoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9160-9168.

- Fanciullino A.L., Bidel L.P.R., 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., Cercos M., Dhuique-Mayer C., Froelicher Y., Talon M., Ollitrault P., Morillon R., 2008. Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (10), 3628-3638.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4397-4406.
- Fanciullino A.L., Dhuique-Mayer C., Luro F., Morillon R., Ollitrault P., 2007. Carotenoid biosynthetic pathway in the *Citrus* genus: number of copies and phylogenetic diversity of seven genes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7405-7417.
- Fraser P.D., Bramley P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research* 43, 228-265.
- Fraser P.D., Truesdale M.R., Bird C.R., Schuch W., Bramley P.M., 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development (evidence for tissue-specific gene expression). *Plant Physiology* 105, 405-413.
- Fray R.G., Wallace A., Fraser P.D., Valero D., Hedden P., Bramley P.M., Grierson D., 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8, 693-701.
- Galpaz N., Wang Q., Menda N., Zamir D., Hirschberg J., 2008. Abscisic acid deficiency in the tomato mutant *high-pigment 3* leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *The Plant Journal* 53, 717-730.
- Gautier H., Diakou-Verdin V., Benard C., Reich M., Buret M., Bourgaud F., Poessel J-L., Génard M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1241-1250.
- Gautier H., Rocci A., Buret M., Grasselly D., Causse M., 2005a. Fruit load or fruit position alters response to temperature and subsequently cherry tomato quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 1009-1016.
- Gautier H., Rocci A., Buret M., Grasselly D., Dumas Y., Causse M., 2005b. Effect of photoselective filters on the physical and chemical traits of vine-ripened tomato fruits. *Canadian Journal of Plant Science* 85, 439-446.
- Giovannoni J.J., 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 283-289.
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P.B., Puech-Pagès V., Dun E.A., Pillot J.P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J.C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C.A., Rameau C., Rochange S.F., 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189-U22.
- Hirschberg J., 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 210-218.
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiura M., Hyodo H., Yano M., 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology* 134, 824-837.
- Koltai H., 2011. Strigolactones are regulators of root development. *New Phytologist* 190, 545-549.
- Kopsell D.A., Kopsell D.E., 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in Plant Science* 11, 499-507.
- Linnewiel K., Ernst H., Caris-Veyrat C., Ben-Dor A., Kampf A., Salman H., Danilenko M., Levy J., Sharoni Y., 2009. Structure activity relationship of carotenoid derivatives in activation of the electrophile/antioxidant response element transcription system. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 659-667.

- 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.
- Osorio S., Alba R., Nikoloski Z., Kochevenko A., Fernie A.R., Giovannoni J.J., 2012. Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior. *Plant Physiology* 159, 1713-1729.
- Paine J.A., Shipton C.A., Chaggar S., Howells R.M., Kennedy M.J., Vernon G., Wright S.Y., Hinchliffe E., Adams J.L., Silverstone A.L., Drake R., 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23, 482-487.
- Pantin F., Fanciullino A.-L., Massonnet C., Dauzat M., Simonneau T., Muller B., 2013. Buffering growth variations against water deficits through timely carbon usage. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Phillips M.A., Leon P., Boronat A., Rodriguez-Concepcion M., 2008. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in Plant Science* 13, 619-623.
- Poiroux-Gonord F., Bidel L.P.R., 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12065-12082.
- Poiroux-Gonord F., Fanciullino A.-L., Bert L., Urban L., 2012. Effect of fruit load on maturity and carotenoid content of clementine (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 2076-2083.
- 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.
- Robert B., Horton P., Pascal A.A., Ruban A.V., 2004. Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins *in vivo*. *Trends in Plant Science* 9, 385-390.
- Sandmann G., Romer S., Fraser P.D., 2006. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metabolic Engineering* 8, 291-302.
- Simkin A.J., Schwartz S.H., Auldridge M., Taylor M.G., Klee H.J., 2004. The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal* 40, 882-892.