

Etude intégrative et comparative du métabolisme primaire des fruits au cours de leur développement Léa Roch

▶ To cite this version:

Léa Roch. Etude intégrative et comparative du métabolisme primaire des fruits au cours de leur développement. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0457 . tel-02172187

HAL Id: tel-02172187 https://theses.hal.science/tel-02172187

Submitted on 3 Jul 2019

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 PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE

Science de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ

Biologie Végétale

Par Léa ROCH

Etude intégrative et comparative du métabolisme primaire des fruits au cours de leur développement

Sous la direction de : Yves GIBON

Soutenue le 19 décembre 2018

Membres du jury :

Mme. BUITINK, Julia M. BOUCHEREAU, Alain Mme. OLLAT, Nathalie M. MESNARD, François Mme. MOING, Annick M. GIBON, Yves DR INRA Angers PR Université de Rennes 1 IR ISVV Bordeaux PR Université de Picardie DR INRA Bordeaux DR INRA Bordeaux

Rapporteur Rapporteur Examinateur Président du jury Invitée Directeur de thèse

Remerciements

Voici, plus de trois ans qui se sont écoulés depuis mon arrivée au sein du laboratoire. Temps qui a été mis à profit pour échanger sur les thématiques du fruit et de son développement, récolter, analyser, retourner les données pour en trouver le sens, mon projet de thèse arrive maintenant à sa conclusion ! Bien plus qu'un projet personnel, ce projet était avant tout collaboratif, un travail d'équipe et je n'aurai jamais pu l'amener aussi loin sans l'aide de nombreuses personnes que je souhaite aujourd'hui remercier chaleureusement.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Yves Gibon pour la confiance qu'il m'a accordée dans la mission qui est de mener ce projet à bien. Ces échanges intellectuellement stimulants dont nous avons pu extraire un panel large d'idées ont été une véritable mine d'inspiration. Merci également pour la relecture du manuscrit et des suggestions apportées pour le consolider.

Maintenant, de tout cœur, je remercie Annick Moing qui a fait bien plus que simplement « co-encadrer » cette thèse. Ton soutien moral et ta vision scientifique clairvoyante m'ont permis de repousser toujours plus loin les frontières de mes connaissances et compétences. Merci pour l'ensemble des corrections que tu as apporté au manuscrit ainsi que pour l'ensemble de tes conseils tout au long de cette thèse. Grâce à toi j'en ressors grandie !

Je souhaite à présent remercier Mme Julia Buitink et M. Alain Bouchereau qui ont accepté de relire et corriger ce mémoire de thèse, ainsi que Mme Nathalie Ollat et M. François Mesnard qui ont accepté d'évaluer cette thèse lors de la soutenance en tant qu'examinateurs. J'adresse également mes remerciements aux membres de mon comité de mi-thèse, Mme Sarah Cookson, M. Raphaël Lugan ainsi qu'à mon tuteur M. Marc Bonneu pour les conseils et les idées qu'ils ont chacun apportés pour la poursuite de mes travaux.

Ce projet n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien financier de l'ANR, l'accueil de l'INRA de Bordeaux ainsi que celui de la plateforme Métabolome qui m'ont permis de réaliser l'ensemble de mes analyses durant ces trois années. Cette réalisation est également le fruit d'une grande collaboration entre professionnels de la filière fruit et des équipes de recherche de différents laboratoires. C'est pourquoi je tiens à remercier tout particulièrement le centre de recherche et d'expérimentation INVENIO ainsi que ses membres, Mme Fanny Thiery, Messieurs Pierre Gaillard, Henri Clerc et Eric Sclaunich, et l'ensemble des serristes pour leur collaboration. Que ce soit pour leurs conseils sur les fruits et leurs développements, pour m'avoir accueillie pendant près d'un an dans leur centre et pour avoir pris soin des cultures, de mes fruits, durant toute l'année des récoltes. Le CTIFL de Carquefou, l'INRA de Corse, l'INRA de Valence et leurs équipes ont également collaboré à ce projet et ont permis la collecte de nombreux échantillons, c'est pourquoi je tiens à leur exprimer ma gratitude. Ce projet ambitieux est une collaboration pleine avec l'équipe d'Avignon. Merci à ces Messieurs Michel Genard et Gilles Vercambre et tout particulièrement Coffi Capko, mon jumeau de thèse, qui s'est chargé de la moitié des récoltes et qui m'a fourni de précieux échantillons pour la réalisation de mes travaux. Merci pour ces échanges et les messages de soutien durant ces trois années. J'espère que les analyses que j'ai pu réaliser vont te permettre de mener à bien ta thèse !

Pour avoir conduit les récoltes des baies de raisin et pour avoir réalisé le dosage du tartrate, je voudrai remercier les membres de l'équipe EGFV et plus particulièrement Mesdames Christel Renaud et Ghislaine Hilbert ainsi que Messieurs Zhanwu DAi et Eric Gomès.

Je remercie également Mme Laetitia Fouillen et Pierre Van delft du LBM, pour la quantification des acides gras.

J'ai également une pensée particulière pour les membres de l'Institute for Botany and Molecular Genetics de Aachen qui m'ont permis de réaliser les mesures des parois cellulaires. Je songe notamment à Messieurs Björn Usadel et Holger Klose ainsi que Mme Alexandra Wormit, pour leur accueil durant ces six semaines et les échanges que nous poursuivons à propos des résultats et de leurs interprétations. Merci à Bianka Reiss, Pascal Bendels et Lancelot Seillier pour m'avoir assistée et guidée dans le laboratoire, avoir continué à passer mes échantillons même après mon départ et surtout pour m'avoir intégrée dans l'équipe.

Mes pensées s'orientent à présent vers mon équipe « Méta » et ses membres sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci à chacun d'entre vous d'avoir à un moment ou un autre participé à ce projet de thèse que ce soit aux récoltes ou aux analyses.

Je souhaite tout d'abord remercier Marie-Hélène Andrieu qui m'a accompagnée et aidée tout au long des récoltes et qui s'est également chargée de toute la partie cytologie. Sans toi, l'exploitation des résultats sur les volumes et la compartimentation subcellulaire n'aurait pas été possible. Merci pour ta grande contribution aux résultats de cette thèse.

Ensuite, je souhaite exprimer mon attachement à Patricia Ballias, Virginie Cocureau et Cédric Cassan qui m'ont accompagnée sur la plateforme Hit-ME durant ces trois années ! Merci pour cette bonne ambiance, ces fous rires et ces visages en panique lorsque Heracles et ses compagnons nous faisaient des blagues.

Un grand merci à Catherine Deborde et Stéphane Bernillon qui me conseillent, me corrigent et m'accompagnent sur les analyses RMN et masse depuis mon stage de master. Merci pour votre implication dans ce projet, votre temps et surtout de m'intégrer dans la communauté scientifique au-delà de celle du laboratoire, cela représente beaucoup à mes yeux. Catherine, merci infiniment pour toutes les corrections que tu as pu apporter sur ce manuscrit lors de la dernière ligne droite.

Bertrand Beauvoit et Sophie Colombié, pour votre participation aux récoltes, pour l'ensemble de vos conseils et les pistes qui ont pu guider mes choix dans ce projet, je vous exprime ma plus grande estime. J'espère que l'ensemble de mes analyses vous permettront à tous les deux d'aller plus loin dans vos modèles et de percer les mystères du métabolisme du fruit !

Je remercie maintenant, Daniel Jacob ainsi que Sylvain Prigent qui, lors du dernier sprint m'ont grandement appuyée sur l'analyse des résultats et ont permis la naissance des premières idées de ce manuscrit.

J'ai également une pensée particulière pour Thierry Berton qui a développé la méthode de quantification des intermédiaires ainsi que Amélie Flandin pour son aide sur les échantillons et son soutien.

Je tiens par ailleurs à remercier ma stagiaire Anaïs Clavé pour les analyses qu'elle a pu réaliser durant son stage ainsi que l'ensemble des stagiaires qui ont pu intervenir sur le projet.

Merci à Mickaël Maucourt pour sa bienveillance et son soutien, merci à Martine Dieuaide-Noubhani pour les échanges et ses conseils sur les analyses enzymatiques, merci à Cécile Cabasson pour les analyses complémentaires sur le projet, merci à Pierre Petriacq pour ses conseils et ses corrections sur la fin et merci à Marie-Louise Lombard et Florence Lartigaut pour leur soutien administratif et pour leur bonne humeur. Merci également à tous les autres membres de l'équipe avec qui j'ai pu interagir à un moment ou un autre.

Je remercie les membres des équipes G1 et G2 avec qui j'ai également pu interagir, échanger et partager de nombreux gâteaux !

Un grand merci à tous mes compagnons qui partagent cette même expérience qu'est la thèse. Merci à Marc, Clémence, Alice, Simon, Jiao Jiao, Isma, Edouard, Arthur, Constance, Paul et tous les autres d'avoir rempli ces trois années de joie, de fous rires, de soirées et de bons souvenirs !

De manière plus personnelle j'aimerai remercier mon compagnon de route, Gwénaël, qui a vécu cette thèse avec moi et qui m'a toujours soutenu dans les moments difficiles, dans les moments de doutes. (Merci également pour les montages photo). À mon tour de te soutenir dans cette grande aventure qu'est la thèse !

Enfin je voudrai remercier mes parents, car c'est également grâce à eux et à leur soutien sans faille que je peux aujourd'hui finaliser ces huit années d'études et prétendre au titre de docteur.

Merci ! Merci à tous, merci pour tout !

Table des matières

List	e des fi	gures6	
List	iste des tableaux		
List	e des a	nnexes	
List	e des al	bréviations	
Cha	pitre I :	: Introduction	
١.	Cor	ntexte économique, sociétal et agronomique16	
	1.	Production mondiale et importance économique des fruits charnus 16	
	2.	Valeur nutritionnelle des fruits17	
II	. Les	fruits charnus et leur développement 21	
	1.	Structure et classement des fruits charnus 21	
	2.	Croissance et développement du fruit 24	
	3.	Régulation hormonale du développement du fruit26	
II	I.	Rôle du métabolisme chez les fruits	
	1.	Le métabolisme, définition	
	2. fruits	Structure, régulation et implication dans le développement du métabolisme primaire des 30	
	a.	Description des voies du métabolisme central 32	
	b.	Métabolisme des sucres et de l'amidon chez les fruits en développement	
	c. dév	Glycolyse, métabolisme des acides organiques et respiration chez les fruits en veloppement	
	3.	Les parois cellulaires	
	4.	Métabolisme rédox	
١١	/.	Amélioration de la qualité du fruit par différentes pratiques	
	1. fruit	Différentes approches génétiques pour l'amélioration du rendement et de la qualité du 43	
	2.	Amélioration de la qualité du fruit par des pratiques culturales 46	
V	. Obj	jectifs des travaux de thèse	
Cha	pitre II	: Matériels et méthodes 51	
١.	Cor	nduite de culture des espèces et plan expérimental 52	
	1.	Fruits et variétés sélectionnées et leur conduite de culture	
	2.	Plan d'expérience, échantillonnage des fruits et conservation	
	3.	Broyage des échantillons58	
	4.	Lyophilisation des échantillons58	
П	. Ana	alyses biochimiques ciblées de composés par spectrophotométrie UV-visible	

1		Extraction des composés pour dosage ciblé par spectrophotométrie UV-visible	58
	a.	Fractionnement éthanolique pour l'analyse de composés ciblés à haut débit	58
	b.	Extraction acide pour l'analyse de l'ascorbate total et réduit	59
2 v	isible	Dosage ciblé des métabolites, amidon et protéines solubles par spectrophotométrie U 59	V-
	a.	Dosages des hexoses	60
	b.	Dosage du sorbitol	61
	c.	Dosage du malate	62
	d.	Dosage du citrate	62
	e.	Dosage de la proline	63
	f.	Dosage des acides aminés libres totaux	63
	g.	Dosage des protéines totales solubles	63
	h.	Dosage de l'amidon	64
	i.	Dosage de l'ascorbate	64
3		Extraction robotisée et détermination des capacités enzymatiques	64
	a.	Extraction des enzymes solubles	64
	b.	Détermination des capacités enzymatiques : dosage direct	65
	c.	Détermination des capacités enzymatiques : dosage indirect	68
III.		Analyses qualitative et quantitative des métabolites polaires d'extraits de fruits par RM	/N
du	oroto	٦	70
1		Extraction hydro-alcoolique des « mix » et des séries développementales	70
2		Acquisitions des spectres RMN ¹ H 1D	71
3		Traitement des spectres RMN ¹ H 1D pour l'analyse des profils métabolomiques	72
4	•	Analyses RMN complémentaires pour l'identification des métabolites	72
IV.		Analyse de la composition de la paroi cellulaire du péricarpe de fruit	73
1 Ia	a paro	Préparation des résidus insolubles dans l'alcool (RIA) pour l'analyse des composants de i cellulaire	e 73
2		Analyse de la composition des polysaccharides des parois dans les fruits	73
3		Analyse de la teneur en cellulose cristalline dans les fruits	74
V.	Qua	ntification des métabolites intermédiaires du métabolisme central	74
1		Extraction des intermédiaires du métabolisme	74
VI.		Analyse des acides gras totaux	76
VII.		Analyses cytologiques	76
VIII		Modélisation des données de croissance des fruits, de croissance des cellules et calcul	de
la v	itesse	et du taux relatif de croissance (RGR)	77
1		Modélisation des données de croissance et de composition	77
2	•	Modélisation des données de croissance des cellules et des volumes subcellulaires	78

	3.	Calcul des vitesses d'accumulation des composés	79
	4.	Modèles linéaires généralisés pour la prédiction du RGR à partir des concentrations en	l
	métab	olites	79
IX	•	Analyse statistique des données	80
	1.	Analyses statistiques multivariées	80
	2.	Analyses statistiques univariées	81
	3.	Combinaison des analyses univariées et multivariées	81
	4.	Matrice de corrélation	82
	5.	Classification hiérarchique et carte de chaleur	82
Chaj du fi	oitre III ruit	: Comparaison multi-espèces pour étudier les relations entre croissance et composition	ı 83
I.	Des 84	cription de la croissance et du développement du fruit chez huit espèces de fruits charn	us
	1.	Caractérisation des profils de croissance et du développement de fruits charnus	84
	a.	Description des évolutions de la croissance du fruit	84
	b.	Diversité de la caractérisation phénotypique de la croissance entre les espèces fruitière 87	es
	2.	Mise à profit des données de croissance pour la comparaison inter-espèces	88
	3.	Evolution de la teneur en matière sèche des huit fruits charnus	90
١١.	Cara	actérisation de la composition de huit espèces de fruits charnus	91
	1.	Identification des métabolites polaires majeurs chez huit espèces de fruits charnus	91
	2.	Polymères et autres composés non solubles dans le fruit	94
	3.	Explication de la matière sèche par la composition	94
111		Comparaison intra et inter espèces au cours du développement	96
	1.	Evolution de la composition au cours du développement pour chaque fruit	96
	2. du dév	Comparaison inter-espèce et évolution des grandes tendances de composition au cour eloppement	rs 99
	3.	Comparaison inter-espèce et évolution de la composition au cours du développement 100	
	4. discrim	Comparaison de différents groupes d'espèces fruitières par analyse multivariée ninante1	102
IV du	'. u fruit	Prédiction du taux relatif de croissance par la composition au cours du développement 105	t
	1.	Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR chez l'ensemble des fruits 1	105
	2.	Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR pour différentes phases de	
	croissa	ince des fruits	106
V.	Disc	ussion 1	108

1. pł	nénot	Croissance et développement des fruits : classification basées sur les données cypiques
2.		Composition des fruits et évolution de la composition au cours du développement 111
3.		Explication de la matière sèche par la composition113
4.		Modélisation de la croissance à travers les données de composition 114
5.		Différenciation des fruits climatériques et non climactériques
Chapitr Solana	re IV cées.	: Approche intégrative du métabolisme central au cours du développement de trois
١.	Desc	ription de la croissance et du développement des deux Solanacées 120
1.		Croissance des fruits120
2. co	ours d	Evolution des volumes cellulaires et des proportions des compartiments cellulaires au lu développement du fruit
ll. leur	Desc déve	cription du métabolome et de l'activome des fruits d'aubergine et de poivron au cours de loppement
1. et	du p	Evolution des composés accumulés au cours du développement du fruit de l'aubergine oivron
	a.	Evolution des métabolites majeurs et de l'amidon au cours du développement 124
	b.	Evolution des composés structuraux au cours du développement du fruit
2. co	ours c	Evolution des intermédiaires du métabolisme primaire et des capacités enzymatiques au lu développement du fruit
	a. fruit	Evolution des intermédiaires du métabolisme primaire au cours du développement du 127
	b.	Evolution des capacités enzymatiques au cours du développement du fruit 129
3.		Comparaison des profils d'évolution des enzymes au cours du développement du fruit 131
III. Solai	nacée	Comparaison combinée de la composition et de la régulation du métabolisme des deux es au cours du développement du fruit135
1.		Intégration de l'ensemble des données pour la comparaison inter-espèce
2.		Analyse de la différence inter-espèce
3.		Analyse de l'effet du développement du fruit commun aux deux espèces
4.		Corrélation entre le RGR et les données du métabolisme
5.		Corrélation entre le métabolome et l'activome
IV. activ	/ités e	Analyse des vitesses d'accumulation des composés dans le fruit en corrélation avec les enzymatiques
1. ca	pacit	Recherche des relations entre les vitesses d'accumulation des composés par fruit et les sés enzymatiques au cours du développement du fruit
2. er	nzyma	Corrélation entre les vitesses d'accumulation des composés et les capacités atiques du fruit à travers le développement du fruit142
V.	Disc	ussion

1.		Croissance du fruit, croissance cellulaire et développement des Solanacées14	
ä	a.	Croissance des Solanacées et comparaison avec celle de la tomate144	
 b. Croissance cellulaire et évolution des compartimentations sub Solanacées 2. Evolution du métabolisme de l'amidon au cours du développer 148 		Croissance cellulaire et évolution des compartimentations subcellulaires chez les nacées	
		Evolution du métabolisme de l'amidon au cours du développement chez les Solanacées 148	
3.		Régulation du métabolisme primaire chez les Solanacées150	
â	a.	Régulation du métabolisme des sucres lors du développement des Solanacées151	
b. Régulation des étapes finale de la glycolyse chez les Solanacées au cours du développement		Régulation des étapes finale de la glycolyse chez les Solanacées au cours du loppement	
C	с.	Métabolisme turbo pendant la phase de croissance exponentielle153	
C	d.	Différenciation de la régulation du métabolisme par la maturation154	
e	e.	NADP-ME une enzyme catabolique chez l'aubergine154	
Chapitre Sites int	e V : erne	Conclusions et Perspectives	
Bibliogra	Bibliographie		

Liste des figures

Figure 1 :	Classement des 10 premiers pays producteurs de fruits d'Europe en 2016 17
Figure 2 :	Schémas de coupe transversale de baie et de drupe 21
Figure 3 :	Schéma d'une fleur à ovaire supère (a), à ovaire infère adhérent (b) et à ovaire infère non adhérent (c)
Figure 4 :	Schéma de classification des fruits charnus23
Figure 5 :	Section transversale de fruit de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom) à différents jours après anthèse (JAA)
Figure 6 :	Evolution des hormones dans le fruit au cours de son développement
Figure 7 :	Représentation schématique du métabolisme primaire chez les fruits
Figure 8 :	Structure des parois cellulaires chez les plantes
Figure 9 :	Photographie de six cultures réalisées au cours de l'année 2016
Figure 10	: Principe du dosage des hexoses60
Figure 11	: Principe du dosage du sorbitol61
Figure 12	: Principe du dosage du malate62
Figure 13	: Principe du dosage du citrate63
Figure 14	: Principe des dosages continus des activités enzymatiques
Figure 15	: Principe du dosage discontinu des activités Ald, NAD-GAPDH, ATP-PFK, HK, FK et PEPC
Figure 16	: Courbe de vitesse de croissance du fruit utilisée pour la sélection des stades, pour la comparaison inter-espèces
Figure 17	: Croissance de huit espèces de fruits charnus
Figure 18	: Matrice des corrélations entre les données phénotypiques
Figure 19	: Evolution de la teneur en matière sèche dans le tissu charnu de huit espèces de fruit au cours du développement
Figure 20	: Représentation qualitative et quantitative des composés polaires majeurs dans les extraits de tissus charnus de huit espèces fruitières analysées par RMN 1H93
Figure 21	: Evolution du pourcentage de matière sèche expliquée par les composés mesurés dans les tissus charnus des fruits
Figure 22	: Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour chacune des huit espèces fruitières à l'aide d'ACP

Figure 23	: Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour les huit espèces fruitières à l'aide d'une ACP sur 8 variables représentant des familles de composés
Figure 24	: Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour les huit espèces fruitières à l'aide d'une ACP de 28 composés individuels101
Figure 25	: Analyse discriminante des espèces climactériques et non climactériques par OSC- PLS-DA de 28 variables mesurées dans 39 échantillons correspondant à 5 stades de développement et 8 espèces de fruits charnus
Figure 26	: Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR à partir des teneurs des composés pour l'ensemble des espèces fruitières106
Figure 27	: Représentation des trois phases de développement sélectionnées pour la modélisation de la croissance, exemple du poivron
Figure 28	: Modèles linéaires généralisés pour la prédiction du RGR à partir des teneurs des composés pour trois phases de développement du fruit
Figure 29	: Description de la croissance du fruit d'aubergine et de poivron121
Figure 30	: Grandissement cellulaire dans le péricarpe du fruit des deux Solanacées au cours du développement du fruit122
Figure 31	: Evolution du volume des cellules et des compartiments subcellulaires du péricarpe au cours du développement du fruit
Figure 32	: Visualisation de l'évolution de la composition en métabolites et amidon de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'une ACP
Figure 33	: Visualisation de l'évolution des composés structuraux de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'une ACP
Figure 34	: Visualisation de l'évolution des intermédiaires du métabolisme primaire de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'ACP128
Figure 35	: Visualisation de l'évolution des capacités enzymatiques du métabolisme central de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'ACP
Figure 36	: Classement des capacités enzymatiques exprimées par matière sèche pour l'aubergine (A) et le poivron (B) au cours du développement du fruit133
Figure 37	: Annotation des groupes des Figures 36 A-B sur une carte simplifiée du métabolisme central pour l'aubergine (A) et le poivron (B)
Figure 38	: Visualisation de la trajectoire de développement de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) basée sur les variables du métabolome et de l'activome à l'aide d'une ACP

Figure 39	: Visualisation des différences entre les deux Solanacées (aubergine en violet et poivron en vert) pour les variables du métabolome et de l'activome au cours du développement à l'aide d'une ANOVA-ACP136
Figure 40	: Visualisation des différences communes entre les stades de développement basée sur les variables du métabolome et de l'activome pour l'aubergine (violet) et le poivron (vert) à l'aide d'une ANOVA-ACP
Figure 41	: Mise en évidence des variables métaboliques présentant la plus forte corrélation avec le RGR pour les deux espèces138
Figure 42	: Visualisation des corrélations entre le métabolome et l'activome exprimés par unité de MF pour l'aubergine (A) et le poivron (B)
Figure 43	: Classification des vitesses d'accumulation des métabolites par fruit et des capacités enzymatiques pour l'aubergine (A) et le poivron (B) au cours du développement
Figure 44	: Illustration des corrélations entre le métabolome et l'activome pour l'aubergine (A) et le poivron (B)143
Figure 45	: Description de la croissance du fruit de tomate145
Figure 46	: Evolution du volume des cellules et des compartiments subcellulaires du péricarpe au cours du développement du fruit de tomate146
Figure 47	: Classement des capacités enzymatiques exprimées par matière sèche pour la tomate au cours du développement du fruit150

Liste des tableaux

Fableau I : Evolution de la production mondiale de quelques exemples de fruits et de légumes en millions de tonnes (Mt) de 1996 à 201616
Tableau II : Teneurs en vitamines de différentes espèces fruitières
Fableau III : Teneurs en éléments minéraux majeurs et en fibres de différentes espèces de fruits
Fableau IV : Ensemble des données concernant les espèces étudiées et leur conduite de culture
Tableau V : Données d'échantillonnage des espèces fruitières
Fableau VI : Volume d'extrait utilisé pour la quantification des métabolites, des protéines solubles et de l'amidon pour chaque espèce fruitière
Fableau VII : Données de croissance et de développement de huit espèces de fruits charnus
Fableau VIII : Récapitulatif des stades de croissance sélectionnés et des JAA correspondants pour la comparaison entre espèces fruitières
Fableau IX : Scores des 10 variables ayant des VIP supérieures à 1 pour les analyses OSC2- PLS-DA et PLS-DA présentées Figure 24104

Liste des annexes

- Annexe 1: Fruit salad in the lab: Comparing botanical species to help deciphering fruit primary metabolism
- Annexe 2: Tableau des dilutions utilisées pour la mesure des capacités enzymatiques pour l'aubergine et le poivron
- Annexe 3 : Tableau récapitulatif des paramètres d'acquisition RMN
- Annexe 4 : Liste des composés intermédiaires phosphorylés et des paramètres de la méthode d'analyse LC-MS/MS
- Annexe 5 : Gradient d'élution utilisé pour la chromatographie liquide pour l'analyse des composés intermédiaires du métabolisme central par LC-MS/MS.
- Annexe 6 : Tableaux des déplacements chimiques proton des métabolites primaires majeurs pour l'annotation des spectres RMN 1D de huit espèces de fruit
- Annexe 7 : Tableau des moyennes des teneurs des composés quantifiés dans les huit espèces de fruit pour cinq stades de développement sélectionnés (µmol.g-1.MS)
- Annexe 8 : Evolution des concentrations des métabolites au cours du développement des fruits (µmol/g MF)
- Annexe 9 : Evolution des quantités de métabolites par fruit au cours du développement des fruits (µmol/fruit)
- Annexe 10 : Evolution des monomères des parois au cours du développement des fruits en (μmol/g MF) et (μmol/fruit)
- Annexe 11 : Evolution des intermédiaires du métabolisme central au cours du développement des fruits en μmol/g MF
- Annexe 12 : Evolution des intermédiaires du métabolisme central au cours du développement des fruits en µmol/fruit
- Annexe 13 : Evolution des capacités enzymatiques au cours du développement du fruit en nmol/min/g MF

Liste des abréviations

1,3BPG :	1,3-bisphosphoglycérate
2PGA :	2-phophoglycérate
3PGA :	3-phophoglycérate
6PG :	6 phosphogluconolactone
ABA :	Acide abscissique
ACP :	Analyse en composantes principales
ADH :	Alcool déshydrogénase
ADPG :	Adénosine-diphosphate-glucose
AGPase :	ADP-glucose pyrophosphorylase
AI :	Invertase acide
AlaAT :	Alanine aminotransférase
ANOVA :	Analyse de variance
Ald :	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
AspAT :	Aspartate aminotransférase
ATP :	Adénosine triphosphate
ATP-PFK :	ATP-phosphofructokinase
BSA :	Albumine de sérum bovin
Ca :	Calcium
cFBPase :	Fructose-1, 6-bisphosphatase
CL :	Citrate lyase
CoA :	Coenzyme A
COSY :	COrelated SpectroscopY
CP:	Composante principale
CPMG :	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CS :	Citrate synthase
DAP :	Dihydroxyacétone phosphate
DEPT135 :	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135
DO :	Densité optique
dPG :	Bisphosphoglycérate
DTNB :	Acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque)
DTT:	Dithiothréitol
E4P :	Erythrose-4-phosphate
EDTA :	Éthylènediaminetétraacétique
EGTA :	Acide egtazique
EMS :	Ethyl méthane sulphonate
EtOH :	Ethanol
F1,6BP :	Fructose-1,6-bisphosphate
F6P :	Fructose-6-phosphate
FADH ₂ :	Flavine adénine dinucléotide
FAMEs :	Esters méthyliques d'acides gras

Fe :	Fer
FID :	Free Induction Decay
FK:	Fructokinase
FRIMOUSS :	Fruit Integrative MOdelling for a Unified Selection System
G1,6Bp :	Glucose-1,6-bisphosphate
G1P :	Glucose-1-phosphate
Gly-3P :	Glycérol-3-phosphate
G6P :	Glucose-6-phosphate
G6PDH :	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GA :	Gibbérelline
GABA :	Acide-γ-aminobutyrique
Gal1P :	Galactose-1-phophsate
GAP :	Glycéraldehyde-3-phosphate
GAPDH :	Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
GDH :	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GK :	Glucokinase
GluDH :	Glutamate déshydrogénase
GPOX :	Glycérol-3-phosphate oxidase
H ₂ SO ₄ :	Acide sulfurique
H ₃ PO ₄ :	Acide phosphorique
HCI :	Acide chlorhydrique
HCL :	Hierarchical clustering
HG :	Homogalacturonane
НК :	Hexokinase
HMBC :	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPEA-PAD :	Chromatographie échangeuse d'anion à haute performance couplée
	à la détection par ampérométrique pulsée
HSQC :	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IAA :	Acide-indole-3-acétique
IC-Qtrap MS :	Chromatographie ionique couplée à un spectromètre de masse triple
	quadripôle piège à ions linéaire
IDH :	Isocitrate déshydrogénase
JAA :	Jours après anthèse
JRES :	J-résolue
К:	Potassium
KCI :	Chlorure de potatium
KMC :	K-means clustering
KOH :	Hydroxyde de potassium
LED :	Diode électoluminescente
LDH :	Lactate déshydrogénase
Na :	Sodium
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAD-GAPDH :	NAD-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
NAD(P)-IDH :	Isocitrate déshydrogénase à NAD(P)

NAD(P)-MDH :	Malate déshydrogénase à NAD(P)
NAD(P)-ME :	Enzyme malique à NAD(P)
NADP :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAHCO ₃ :	Bicarbonate de sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NI :	Invertase neutre
NIPALS :	Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares
Man6P :	Mannos-6-phosphate
ME :	Enzyme malique
MDH :	Malate déshydrogénase
Mg :	Magnésium
MgCl2 :	Chlorure de magnésium
Mt :	Million de tonnes
MTT :	Diméthylthiazol diphényltétrazolium
NEM :	N-éthylmaléimide
NI :	Invertase neutre
OAA :	Oxaloacétate
OSC :	Correction du signal orthogonal
Ρ:	Phosphore
Pentoses5P :	Pentose-5-phosphate
PEP:	Phospho <i>énol</i> pyruvate
PEPC :	Phospho <i>énol</i> pyruvate carboxylase
PEPCK :	Phospho <i>énol</i> pyruvate carboxykinase
PES :	Phénazine éthiosulfate
pFBPase :	Fructose-1, 6-bisphosphatase plastidiale
PFK :	Phosphofructokinase
PFP:	Pyrophosphate phosphofructokinase
PG :	Pyrogalacturonase
PGA :	Phosphoglycérate
PGI :	Phosophoglucoisomérase
PGK :	Phosphoglycérokinase
PGM :	Phosphoglucomutase
РК:	Pyruvate kinase
PLS-DA :	Analyse discriminante par les moindres carrés partiels
PME :	Pectine méthyl-estérase
PPi :	Pyrophosphate
PVP:	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Loci de caractère quantitatif
RAE :	Equivalent en activité rétinol
RIA :	Résidu insoluble dans l'alcool
RG :	Rhamnogalacturonane
RGR :	Taux de croissance relatif
RMSE :	Racine de la moyenne des carrées de erreurs
RMSEP :	Erreur quadratique moyenne de prédiction

RNA-seq :	Séquençage de l'acide ribonucléique
ROS :	Dérivés réactifs à l'oxygène
S6Pase :	Saccharose phosphatase
S7P :	Sedoheptulose-7-phosphate
SDH :	Sorbitol déshydrogénase
SPA :	Sugar partition-affecting
SPP:	Saccharose-phosphate phosphatase
SPS :	Saccharose phosphate synthase
Suc6P :	Sucrose-6-phosphate
Succinyl-CoA :	Succinyl-coenzyme-A
Succ-CoA ligase :	Succinyl-coenzyme-A ligase
SUSY :	Saccharose synthase
TFA :	Acide Trifluoroacétique
TILLING :	Targeting Induced Local Lesion In Genomes
TOCSY :	Total COrrelation SpectroscopY
TPI :	Triose phosphate isomérase
ISP :	Acide triméthylsilylpropanoïque
UDPG :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose
UDPG : UDPGal :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose UDP-galactose
UDPG : UDPGal : UGPase :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose UDP-galactose UDP-glucose pyrophophorylase
UDPG : UDPGal : UGPase : VIP :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose UDP-galactose UDP-glucose pyrophophorylase Variables d'importance dans la projection
UDPG : UDPGal : UGPase : VIP : XET :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose UDP-galactose UDP-glucose pyrophophorylase Variables d'importance dans la projection Xyloglucanes endotransglycosylases
UDPG : UDPGal : UGPase : VIP : XET : Zn :	Acide triméthylsilylpropanoïque Uridine diphosphate glucose UDP-galactose UDP-glucose pyrophophorylase Variables d'importance dans la projection Xyloglucanes endotransglycosylases Zinc

Chapitre I :

Introduction



- I. Contexte économique, sociétal et agronomique
 - 1. Production mondiale et importance économique des fruits charnus

Les fruits sont essentiels à la nutrition humaine car ils sont notre principale source de vitamines et d'antioxydants. De nos jours, leur production à travers le monde (Tableau I) ne cesse d'augmenter (FAOSTAT, 2018). Ainsi, en l'espace de 20 ans, la production de tomate a quasiment doublé, passant de 93 millions de tonnes (Mt) produites à 177 Mt. Celle du concombre a quasiment triplé passant de 26 Mt à 81 Mt, et celle du kiwi a quadruplé passant de 1 Mt à 4,3 Mt produites. Ce marché mondial de fruits et légumes représente des centaines de milliards d'euros générés par an pour une production totale de 1,9 milliards de tonnes en 2016.

Tableau I : Evolution de la production mondiale de quelques exemples de fruits et de légumesen millions de tonnes (Mt) de 1996 à 2016.

	Tomate	Piment + Poivron vert	Aubergine	Pomme	Pêche + Nectarine	Kiwi
1996	93 Mt	16 Mt	20 Mt	54 Mt	12 Mt	1 Mt
2006	130 Mt	27 Mt	33 Mt	63 Mt	18 Mt	2.5 Mt
2016	177 Mt	34 Mt	51 Mt	89 Mt	25 Mt	4,3 Mt

(FAOSTAT, 2018).

	Concombre + Cornichon	Raisin	Orange	Fruits totaux	Légumes totaux
1996	26 Mt	59 Mt	61 Mt	497 Mt	543 Mt
2006	50 Mt	67 Mt	65 Mt	687 Mt	809 Mt
2016	81 Mt	77 Mt	73 Mt	866 Mt	1075 Mt

La France est le 3^{ème} pays producteur de fruits en Europe, devancée par l'Espagne et l'Italie. Sa production (Figure 1) est évaluée à 9,3 Mt en 2016 (FAOSTAT, 2018). Les produits dérivés tels que le vin représentent 16% de la production mondiale, la France étant le deuxième producteur mondial derrière l'Italie avec 3,7 milliards de litres produits et 8,7 milliards d'euros de chiffre d'affaire à l'export en 2017 (Vin & Société, 2017).

Cette production de fruits frais et de produits transformés issus de fruits est soumise à différentes contraintes telles que des stress environnementaux comme des changements climatiques continus ou encore des pathogènes ou ravageurs. Elle est également soumise à des exigences de la part des consommateurs en termes de qualité organoleptique telle que des fruits riches en goût, en arôme, avec une forme et une texture attrayantes, et en terme de qualité nutritionnelle telle que des fruits riches en composés antioxydants et/ou en vitamines.



Figure 1 : Classement des 10 premiers pays producteurs de fruits d'Europe en 2016 La production est exprimée en tonnes (FAOSTAT, 2018).

Toutes ces exigences et contraintes entrainent, pour les producteurs, un effort de renouvellement constant des variétés et avec l'objectif de conserver, ou mieux, d'améliorer le rendement et la qualité du fruit.

2. Valeur nutritionnelle des fruits

La qualité du fruit peut se traduire par des valeurs nutritives et/ou des propriétés antioxydantes. On sait, depuis de nombreuses années que les fruits et légumes sont bénéfiques pour la santé humaine et sont utiles dans la prévention de nombreuses maladies. En effet, des études ont démontré qu'une consommation accrue de fruit, en particulier de baies et de légumes à feuilles vertes, réduirait les risques de développement de diabète de type 2 (Wang *et al.* 2016). Cette consommation réduirait également les risques de maladies cardiovasculaires et de cancer (Aune *et al.* 2017). Ces diminutions des risques sont directement liées à leur composition riche en vitamines, acides gras polyinsaturés, caroténoïdes, polyphénols et stérols végétaux.

Les vitamines, des micronutriments particuliers, sont divisées en deux catégories, les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) stockables dans les graisses et qui ne nécessitent pas d'apport continu, et les vitamines hydrosolubles (vitamines B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12 et C) absorbées directement dans le sang mais qui nécessitent une prise régulière (Padayachee *et al.* 2017). Une carence de ces vitamines chez l'homme peut entrainer des maladies telles que le béribéri (B1), la pellagre (B3), le scorbut (C), le rachitisme (D) et des problèmes d'hémorragie (K). *A contrario*, un apport régulier peut être bénéfique, comme pour la vitamine C qui pourrait prévenir des maladies cardiaques, inflammatoires chroniques et neurodégénératives par son rôle dans la protection des cellules contre les stress oxydatifs (Poiroux-Gonord *et al.* 2010). Cette vitamine est notamment présente en grande quantité

dans la goyave, le poivron, le cassis et le kiwi (Tableau II). Par ailleurs, on retrouve des teneurs élevées en d'autres vitamines comme la vitamine B1 chez les agrumes et l'ananas, la vitamine E chez le kiwi, le poivron et l'avocat, ou encore des précurseurs de la vitamine A chez l'abricot, le poivron, la mangue et la papaye (USDA Food Composition Databases). Ces derniers composés cruciaux pour l'alimentation humaine, les caroténoïdes ou provitamine A sont présents dans de nombreux autres fruits (Yuan *et al.* 2015). Ainsi le lycopène se trouve dans la tomate, la β -cryptoxanthine dans les agrumes, le β -carotène dans le melon cantaloup et la capsanthine dans les poivrons rouges. Un régime alimentaire riche en ces composés serait corrélé à une réduction significative du risque de certains cancers et de plusieurs maladies dégénératives (Poiroux-Gonord *et al.* 2010).

Les fruits sont également de riches sources de polyphénols qui sont pour la plupart des antioxydants capables de neutraliser les espèces réactives oxygénées (ROS) et les radicaux libres toxiques, ce qui aurait pour effet de réduire les risques de maladies cardiovasculaires, le cancer et l'obésité. Par exemple, les anthocyanes, un sous-ensemble des flavonoïdes contribuant à la couleur du fruit, possèdent un pouvoir antioxydant particulièrement élevé et des effets bénéfiques pour la santé. L'épicatéchine, un autre flavonoïde, qui se trouve en grande quantité dans le raisin, la myrtille et la canneberge pourraient prévenir le développement de cancers et de maladies cardiovasculaires (Seymour *et al.* 2013). Enfin, les dérivés de l'acide hydroxycinnamique, comme l'acide chlorogénique, l'acide caféique ou encore l'acide sinapique, possèdent également un fort pourvoir antioxydant et limitent l'oxydation des lipides en éliminant les ROS (Poiroux-Gonord *et al.* 2010). L'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique et de l'acide quinique avec plusieurs isomères possibles) est le composé phénolique majeur chez la tomate et l'aubergine et sa consommation pourrait limiter l'absorption du glucose et ainsi réduire les risques d'obésité (Thom 2007).

Certains fruits sont riches en fibres, des polysaccharides non amidonnés majoritairement issus de la paroi cellulaire des fruits. Il a été démontré que ces composés affectent le microbiote intestinal (Tuohy *et al.* 2012), abaissent l'indice glycémique des aliments et ont des effets bénéfiques sur le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et l'obésité (Khaw et Barrett-Connor 1987; Seymour *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016). Des teneurs en fibres totales élevées caractérisent les baies de goji, l'avocat et la framboise ; en revanche, des teneurs faibles sont présentes chez le concombre, la pastèque et le raisin (USDA Food Composition Databases).

Tableau II : Teneurs en vitamines de différentes espèces fruitières.

Les teneurs du fruit sont exprimées en mg/100 g pour les vitamines C, B1, B2, B3, B6, B9, E et µg/100g pour les provitamines A équivalent en activité rétinol (RAE) et K. Surlignées en jaune les teneurs majeures chez les fruits tempérés et en vert les teneurs majeures chez les fruits tropicaux (USDA Food Composition Databases)

Vitamine,	Vitamines hydrosolubles						Vitamines liposolubles				
teneur pour 100 g de fruit frais	C (mg)	B1 (mg)	B2 (mg)	B3 (mg)	B6 (mg)	B9 (μg)	E (mg)	Α (RAE) (μg)	K (µg)		
Fruits tempérés											
Abricot	10,0	0,03	0,04	0,60	0,05	9	0,89	<mark>96</mark>	3,3		
Aubergine	2,2	0,04	0,04	0,65	0,08	22	0,30	1	3,5		
Cassis	<mark>181,0</mark>	0,05	0,05	0,30	0,07		1,00	12			
Cerise	7,0	0,03	0,03	0,15	0,05	4	0,07	3	2,1		
Citron	53,0	0,04	0,02	0,10	0,08	11	0,15	1	0		
Clémentine	48,8	<mark>0,09</mark>	0,03	0,64	0,08	24	0,20		0		
Concombre	3,2	0,03	0,03	0,04	0,05	14	0,03	4	7,2		
Figue	2,0	0,06	0,05	0,40	0,11	6	0,11	7	4,7		
Fraise	58,8	0,02	0,02	0,39	0,05	24	0,29	1	2,2		
Framboise	26,2	0,03	0,04	0,60	0,06	21	0,87	2	7,8		
Kiwi	<mark>92,7</mark>	0,03	0,03	0,34	0,06	25	<mark>1,46</mark>	4	<mark>40,3</mark>		
Mûre	21,0	0,02	0,03	0,65	0,03	25	1,17	11	19,8		
Myrtille	9,7	0,04	0,04	0,42	0,05	6	0,57	3	19,3		
Orange	53,2	<mark>0,09</mark>	0,04	0,28	0,06	<mark>30</mark>	0,18	11	0,0		
Pêche jaune	6,6	0,02	0,03	<mark>0,81</mark>	0,03	4	0,73	16	2,6		
Poire	4,3	0,01	0,03	0,16	0,03	7	0,12	1	4,4		
Poivron rouge	<mark>127,7</mark>	0,05	<mark>0,09</mark>	<mark>0,98</mark>	<mark>0,29</mark>	<mark>46</mark>	<mark>1,58</mark>	<mark>157</mark>	4,9		
Pomme	4,6	0,02	0,03	0,09	0,04	3	0,18	3	2,2		
Prune	9,5	0,03	0,03	0,42	0,03	5	0,26	17	6,4		
Raisin	3,2	0,07	<mark>0,07</mark>	0,19	0,09	2	0,79	3	14,6		
Tomate	13,7	0,04	0,02	0,59	0,08	15	0,54	42	7,9		
	Fruits tropicaux										
Ananas	47,8	<mark>0,08</mark>	0,03	0,50	0,11	18	0,02	3	0,7		
Avocat	10,0	0,07	<mark>0,13</mark>	<mark>1,74</mark>	0,26	<mark>81</mark>	<mark>2,07</mark>	7	<mark>21,0</mark>		
Banane	8,7	0,03	0,07	0,67	<mark>0,37</mark>	20	0,1	3	0,5		
Goyave	<mark>228,3</mark>	0,07	0,04	<mark>1,08</mark>	0,11	49	0,73	31	2,6		
Mangue	36,4	0,03	0,04	0,67	0,12	43	0,9	<mark>54</mark>	4,2		
Papaye	60,9	0,02	0,03	0,36	0,04	37	0,3	<mark>47</mark>	2,6		
Pastèque	8,1	0,03	0,02	0,18	0,05	3	0,05	28	0,1		

Les fruits sont également une source d'éléments minéraux qui sont essentiels au maintien de l'équilibre électrolytique de l'organisme humain (Tableau III). Les principaux minéraux sont le calcium, le phosphore, le potassium, le soufre, le sodium, le chlorure et le magnésium (USDA Food Composition Databases). Contrairement aux vitamines, ce sont des composés inorganiques qui ne sont pas dégradés, de plus ils sont facilement absorbés dans le sang et sont impliqués dans différents processus comme la croissance osseuse, la

fonctionnalité des muscles et des nerfs (Padayachee *et al.* 2017). Parmi ces minéraux, le potassium est l'élément minéral majeur chez l'avocat, la banane, la goyave, le cassis et le kiwi (312 à 485 mg/100 g). Le sodium et le calcium sont les deux éléments minéraux majeurs dans la baie de goji (USDA Food Composition Databases).

Tableau III : Teneurs en éléments minéraux majeurs et en fibres de différentes espèces de fruits. (USDA Food Composition Databases). Calcium (Ca), magnésium (Mg), phosphore (P), potassium (K), fer (Fe), sodium (Na), zinc (Zn). Surlignées en jaune les teneurs majeures chez les fruits tempérés, en vert les teneurs majeures chez les fruits tropicaux

Elément minéral ou fibres	Ca (mg)	Mg (mg)	P (mg)	K (mg)	Fe (mg)	Na (mg)	Zn (mg)	Fibres (g)	
teneur/100 g				4					
Fruits temperes									
Abricot	13	10	23	259	0,39	1	0,20	2,0	
Aubergine	9	14	24	229	0,23	2	0,16	3,0	
Baie de Goji	<mark>190</mark>				<mark>6,80</mark>	<mark>298</mark>		<mark>13,0</mark>	
Cassis	55	<mark>24</mark>	<mark>59</mark>	<mark>322</mark>	1,54	2	0,27		
Cerise	13	11	21	222	0,36	0	0,07	2,1	
Citron	26	8	16	138	0,60	2	0,06	2,8	
Clémentine	30	10	21	177	0,14	1	0,06	1,7	
Concombre	14	12	21	136	0,22	2	0,17	0,7	
Figue	<mark>35</mark>	17	14	232	0,37	1	0,15	2,9	
Fraise	16	13	24	153	0,41	1	0,14	2,0	
Framboise	25	<mark>22</mark>	<mark>29</mark>	151	<mark>0,69</mark>	1	<mark>0,42</mark>	<mark>6,5</mark>	
Kiwi	<mark>34</mark>	17	<mark>34</mark>	<mark>312</mark>	0,31	3	0,14	3,0	
Mûre	29	<mark>20</mark>	22	162	<mark>0,62</mark>	1	<mark>0,53</mark>	<mark>5,3</mark>	
Myrtille	6	6	12	77	0,28	1	0,16	2,4	
Orange	<mark>40</mark>	10	14	181	0,1	0	0,07	2,4	
Pêche jaune	6	9	20	190	0,25	0	0,17	1,5	
Poire	9	7	12	116	0,18	1	0,10	3,1	
Poivron rouge	7	12	26	211	0,43	<mark>4</mark>	0,25	2,1	
Pomme	6	5	11	107	0,12	1	0,04	2,4	
Prune	6	7	16	157	0,17	0	0,10	1,4	
Raisin (rouge ou blanc)	10	7	20	191	0,36	2	0,07	0,9	
Tomate	10	11	24	237	0,27	<mark>5</mark>	0,17	1,2	
Fruits tropicaux									
Ananas	13	12	8	109	0,29	1	0,12	1,4	
Avocat	12	<mark>29</mark>	<mark>52</mark>	<mark>485</mark>	0,55	7	<mark>0,64</mark>	<mark>6,7</mark>	
Banane	5	<mark>27</mark>	22	<mark>358</mark>	0,26	1	0,15	2,6	
Goyave	18	22	<mark>40</mark>	<mark>417</mark>	0,26	2	0,23	<mark>5,4</mark>	
Mangue	11	10	14	168	0,16	1	0,09	1,6	
Рарауе	20	21	10	182	0,25	<mark>8</mark>	0,08	1,7	
Pastèque	7	10	11	112	0,24	1	<mark>0,10</mark>	0,4	

Les fruits sont donc des sources naturelles de vitamines, antioxydants, fibres et minéraux essentiels pour la santé humaine. D'autres composés comme les sucres solubles et les acides organiques contribuent à la qualité organoleptique des fruits comme leur goût sucré ou acide et sont importants en termes énergétiques pour la nutrition humaine. La teneur de chacun de ces composés évolue au cours du développement du fruit.

- II. Les fruits charnus et leur développement
 - 1. Structure et classement des fruits charnus

Le fruit est issu du développement de l'ovaire suite à la fécondation de l'ovule. Après pollinisation, la paroi des carpelles qui formeront le péricarpe s'épaissit et l'ovule se transforme en graine (Nabors 2008a). Le fruit joue le rôle d'organe protecteur durant le développement des graines, puis, lorsqu'il est attractif, va permettre leur dissémination par le biais des animaux qui le consomment. Une fois la maturité physiologique atteinte, les fruits peuvent être soit charnus (*e.g.* tomate, pomme, concombre), soit secs (*e.g.* noix, amande). La différentiation se fait lors du mûrissement. Pour les fruits charnus, une ou plusieurs couches du péricarpe se chargent en eau et en composés organiques tandis que pour les fruits secs le péricarpe se lignifie. Le péricarpe du fruit peut être découpé en trois parties, l'exocarpe ou épicarpe qui constitue l'épiderme externe, le mésocarpe qui est généralement la partie juteuse et charnue du fruit et l'endocarpe qui forme l'épiderme interne. Les fruits charnus sont regroupés principalement en deux catégories (Figure 2) (Coombe 1976) (Biologie et Multimédia, 2012):

- Les baies (tomate, raisin) dont le péricarpe est composé d'un épicarpe fin, d'un mésocarpe et d'un endocarpe charnus qui se ramollit lorsque que le fruit mûrit et pour lesquelles les graines sont libres dans la chair.
- Les drupes (prune, cerise pêche, pomme) dont le mésocarpe est charnu et l'endocarpe qui forme le noyau dans lequel sont incluse(s) la/les graine(s) ou « amande(s) » est lignifié.





(a) Baie de tomate dont le péricarpe est entièrement charnu. (b) Drupe de pêche dont la partie médiane du péricarpe (mésocarpe) est charnue et la partie interne (endocarpe) est lignifiée et forme un noyau dans lequel se trouve une ou plusieurs graines (Biologie et Multimédia, 2012)

Des classes intermédiaires semblables à des baies existent, comme les hespérides chez la famille des agrumes, ou les péponides chez la famille des cucurbitacées. Le fruit des hespérides possède un épicarpe épais qui contient des glandes à essence, un mésocarpe blanc avec une consistance spongieuse et un endocarpe membraneux entourant les loges carpellaires gorgées de jus. Le fruit des péponides possède un épicarpe cortiqué (à pelure dure) et leur endocarpe n'est souvent pas distinct de leur mésocarpe (Nabors 2008a).

De plus, un classement des fruits charnus peut être réalisé en fonction de leur mode de développement. Les fruits simples résultent de la transformation de l'ovaire d'une fleur unique comme pour la tomate, le raisin et l'orange et dont le péricarpe dérive essentiellement de la paroi de l'ovaire. La formation des fruits complexes fait intervenir d'autres tissus que la paroi de l'ovaire, comme le conceptacle, c'est le cas de la pomme, la fraise, la banane ou encore le melon. Pour les fruits composés, le développement se fait à partir d'une inflorescence comme pour la figue ou l'ananas. Enfin pour les fruits multiples, la fleur possède plusieurs carpelles libres qui après fécondation vont fusionner et évoluer en fruit. C'est le cas de la mûre et de la framboise. Ces différentiations dérivent principalement de l'ovaire et de sa conformation. Il existe deux grands types d'ovaires définis selon leur position et leur insertion sur les pièces florales (Ulrich 1952) (Figure 3) :

- <u>L'ovaire supère</u> dont les pièces florales se situent sous l'ovaire (Figure 3a) et dont le développement conduira à un fruit simple comme la tomate ou le raisin ou à des fruits complexes ou multiples lorsque les carpelles sont libres comme pour la fraise et la mûre.
- <u>L'ovaire infère</u> dont les pièces florales se situent au-dessus de l'ovaire (Figure 3b-c).
 Pour ce cas il existe deux sous-groupes, l'ovaire infère adhérent pour lequel la paroi du conceptacle est soudée à l'ovaire et celui-ci se développera en fruit complexe (pomme, banane, melon) et l'ovaire infère non adhérent qui est libre dans le conceptacle et donnera des fruits simples (pêche, cerise).





(Biologie et Multimédia, 2012)

Une autre classification des fruits peut être faite basée sur l'orchestration de leur mûrissement (Giovannoni 2001; Cherian *et al.* 2014). Pour certains fruits, dits « climactériques » comme la tomate, la pêche ou le kiwi, le murissement est associé à l'émission d'un gaz, l'éthylène (considéré comme une phytohormone qui est perçue au niveau moléculaire et induit une cascade de signalisation complexe) et à un pic respiratoire des tissus cellulaires (crise climactérique). Pour les fruits non climactériques comme la fraise, l'orange et le concombre, la maturation est indépendante de la signalisation éthylène mais fait intervenir d'autres phytohormones, et n'est pas associée à une augmentation de la respiration des tissus.

Un classement des fruits charnus peut être réalisé suivant ces différents critères du fruit (Figure 4). Ils peuvent être simples, complexes, multiples ou composés, sous forme de baie ou drupe, ils peuvent dériver d'un ovaire supère ou infère et peuvent être sujets à la crise climactérique ou non. De plus, leurs compositions finales qui résultent de modifications biochimiques s'opérant tout au long du développement peuvent être différents. Parmi les espèces fruitières, certaines sont des herbacées annuelles comme l'aubergine, le poivron ou le concombre qui ne présentent pas de tige ligneuse pérenne mais une tige souple légèrement lignifiée. D'autres espèces sont des espèces ligneuses arbustives comme la pomme ou la pêche. Enfin, certaines espèces sont des plantes grimpantes ou vignes comme le raisin ou le kiwi. Ces deux dernières catégories arbres et vignes, font partie des espèces ligneuses pérennes.



Figure 4 : Schéma de classification des fruits charnus.

Classement fait en fonction de leur type et du développement de l'ovaire, avec en noir les fruits climactériques et en vert les fruits non climactériques. Figure adaptée de Biologie et Multimédia (2012) et Nabors (2008a).

2. Croissance et développement du fruit

Les courbes de croissance (exprimées en masse et/ou diamètre du fruit) des fruits charnus présentent différents profils d'évolution au cours du développement (Coombe 1976; Opara 1999). Certains fruits croissent suivant une simple sigmoïde comme la pomme, la poire, la tomate, le poivron, le melon, ou l'avocat. Au stade précoce, les fruits possèdent une phase de croissance exponentielle rapide jusqu'à atteindre un maximum. Puis s'ensuit une phase de croissance stable jusqu'à la maturité du fruit. D'autres fruits croissent suivant une double sigmoïde. C'est le cas pour la plupart des drupes (pêche, cerise, abricot) et des fruits composés comme l'ananas et la figue. Le raisin, le cassis et la framboise présentent également ce modèle de développement. Cette croissance tri phasique possède deux phases de croissance rapide séparées par une phase de croissance lente. De plus, les durées de développement du fruit peuvent être très variables, de trois semaines pour la fraise à 60 semaines pour l'orange, mais pour la plupart des fruits cette durée est d'environ 15 semaines. Les vitesses de croissance peuvent être calculées à partir d'un modèle mathématique adapté à chaque type de profil d'évolution. En physiologie végétale, la quantification de la vitesse de croissance d'une plante ou d'un organe comme le fruit est normalisée pour donner le taux relatif de croissance ou RGR (Lambers et Poorter 1992) exprimé le plus souvent en g.g⁻¹.jour⁻¹. Différentes études ont utilisé le RGR pour décrire la croissance du fruit de tomate (Monselise et al. 1978), pomme (Schechter et al. 1993) ou concombre (Marcelis 1992). Le RGR est intéressant pour la comparaison de la croissance entre espèces (Lambers et Poorter 1992), ou d'une espèce sous différentes conditions de culture ou stress, comme une limitation en eau chez le citron (Domingo et al. 1996), une limitation de la surface foliaire chez le raisin (Ollat et Gaudillère 1998) ou une modification de la relation source-puits durant le développement du pamplemousse (Bustan et al. 1996). Le RGR d'un fruit a également été utilisé pour établir des corrélations avec des activités biosynthétiques chez le poivron (Nielsen et al. 1991).

La croissance est liée au développement du fruit qui est divisé en trois phases caractérisées à l'aide d'observations cytologiques et qui parfois se superposent (Coombe 1976; Pabon-Mora et Litt 2011) :

- la phase de division cellulaire,
- la phase d'expansion cellulaire,
- la phase de maturation.

La phase de division cellulaire correspond à la période où les cellules se divisent rapidement dans le fruit après pollinisation (Figure 5). Cette période se limite en général de 7 à 10 jours après la fécondation (Gillaspy *et al.* 1993), sauf exception comme pour le péricarpe du raisin de Corinthe dans lequel il n'y a aucune division cellulaire et *a contrario* l'avocat pour lequel la division continue tout au long du développement (Coombe 1976). La division est principalement active dans le péricarpe et le tissu placentaire. Ces petites cellules sont caractérisées par un volume cytoplasmique important et possèdent de petites vacuoles. Au cours de la phase d'expansion cellulaire, la taille des vacuoles augmente particulièrement et le volume cytoplasmique diminu. Ce phénomène est induit par une accumulation des sucres

et acides organiques dans la cellule permettant alors une entrée d'eau qui va exercer une pression dite de turgescence sur les parois. Les cellules convertissent la pression de turgescence en croissance en régulant le dépôt et la modification des composants de la paroi cellulaire (Braidwood *et al.* 2014). Lors de l'expansion cellulaire du kiwi, la teneur en malate et citrate augmente alors que la plupart des métabolites solubles sont dilués par la croissance, ce qui confirme l'implication de ces acides organiques dans la régulation osmotique de l'expansion du fruit (Nardozza *et al.* 2013).

Pour certaines espèces de fruit, l'augmentation du contenu en ADN au sein des cellules par endoréduplication (processus au cours duquel la cellule réplique l'ADN de son noyau mais ne se divise pas), permettrait également d'augmenter leur volume (Morot-Gaudry *et al.* 2017a). La taille finale du fruit est principalement régie par trois composantes, le nombre de cellules, la densité cellulaire et le volume cellulaire. Cependant, différents facteurs peuvent influencer l'ampleur de l'expansion des cellules comme le comportement des parois cellulaires, notamment le degré de développement et l'extensibilité de la paroi secondaire et la turgescence (Coombe 1976). Cette période d'expansion cellulaire peut durer plusieurs semaines comme chez la tomate (Pabon-Mora et Litt 2011) et peut également se superposer à la phase de maturation comme chez le raisin, où elle débute au moment de la véraison (lorsque la baie commence à changer de couleur) mais n'a pas encore atteint sa taille finale (Ollat *et al.* 2002; Deluc *et al.* 2007).



Figure 5 : Section transversale de fruit de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) à différents jours après anthèse (JAA).

Coupes de péricarpe observées en microscopie photonique illustrant les phases de division cellulaire de 2 JAA à 10 JAA et d'expansion cellulaire de 7 JAA à 30 JAA. Figure adaptée de Pabon-Mora et Litt (2011)

La maturation est caractérisée pour la majorité des fruits par un ramollissement des tissus, une modification de couleur et un changement dans la composition en composés nonvolatils et volatils qui rendent le fruit attractif et savoureux pour les animaux. La coloration est induite par une dégradation des chlorophylles associée à une accumulation de caroténoïdes comme le lycopène pour la tomate, ou d'anthocyanes comme la pélargonidine-3-glucoside pour la fraise. Les activités de certaines protéines interviennent dans la modification des parois cellulaires et donc dans la texture du fruit. La pectine méthyl-estérase (PME) déméthyle les pectines et facilite ainsi l'action de la polygalacturonase (PG) qui dépolymérise et solubilise les pectines. L'action d'autres enzymes comme la β -galactosidase et les β -galactanases provoque la porosité des parois. En clivant les résidus galactose des pectines elles augmentent la porosité et donc facilitent l'accès à d'autres enzymes comme la PME et la PG. Enfin les xyloglucanes endotransglycosylases (XET) contribuent au relâchement des parois en intervenant dans le clivage du réseau cellulose/hémicellulose (Morot-Gaudry *et al.* 2017a).

Enfin, le goût savoureux des fruits est généralement associé à une diminution des teneurs en acides organiques comme le malate et le citrate et une augmentation de celles des composés aromatiques et des sucres (glucose, fructose et saccharose) majoritairement importés depuis les feuilles et/ou issus de la dégradation de l'amidon. D'autres composés solubles s'accumulent dans le fruit mûr (Coombe 1976), comme des sucres-alcools (inositol), des acides aminés, des esters, des composés phénoliques, des vitamines, des glycoalcaloïdes, des terpènes et des ions minéraux (principalement K⁺, Cl⁻, SO4²⁻, phosphate, Ca²⁺ et Mg²⁺). En plus des parois mentionnées plus haut, des lipides et des protéines contribuent à la structure et au fonctionnement des cellules.

L'ensemble des processus impliqués dans le développement du fruit, de la division cellulaire à la maturation, sont sous le contrôle de différents facteurs hormonaux et génétiques.

3. Régulation hormonale du développement du fruit

La mise à fruit est généralement associée à l'action de trois types d'hormones, les auxines, les gibbérellines (GA) et les cytokinines (Figure 6A). En effet, chez de nombreuses espèces l'application exogène de ces hormones peut entrainer la parthénocarpie (Joldersma et Liu 2018). La teneur de cytokinines augmente dans l'ovaire dès la pollinisation. Ces hormones jouent un rôle dans la stimulation de la division cellulaire et favorisent la synthèse de l'auxine (McAtee et al. 2013; Beauvoit et al. 2018). L'auxine est synthétisée dans les ovules lors de la fécondation, et est ensuite transportée dans le péricarpe où elle induit l'activation de la biosynthèse des GA et entraine ainsi la croissance du fruit via l'expansion cellulaire. Elle contrôle également la division cellulaire lors de la mise à fruit. De plus, des travaux anciens suggèrent que l'acide indole-3-acétique, une auxine, serait impliqué dans la synthèse de l'invertase acide soluble qui peut induire la croissance du fruit d'aubergine (Lee et al. 1997). Tandis que les taux d'auxines, de cytokinines et de GA augmentent pendant cette période, les niveaux d'éthylène et d'acide abscissique (ABA) diminuent. Ces constatations concordent avec une analyse transcriptomique sur les ovaires de tomate qui montre qu'après pollinisation, les niveaux d'ARNm de plusieurs gènes de biosynthèse de l'ABA diminuent alors que l'expression des gènes de dégradation de l'ABA augmente (Vriezen et al. 2008).

L'expansion cellulaire dépend de la pression de turgescence au niveau de la vacuole qui exerce une pression sur la paroi, mais également du relâchement de la paroi cellulaire. Les auxines joueraient un rôle avec les GA pendant la phase de croissance en influençant l'expansion cellulaire (Figure 6A). En effet, certains gènes appartenant aux familles des expansines, des XET et des pectate lyases, des enzymes impliquées dans l'expansion des cellules via leur action au sein des parois cellulaires, sont régulés par les auxines et les GA (de Jong et al. 2011; Carrera et al. 2012). En parallèle, des études fonctionnelles ont permis de montrer que le facteur de réponse à l'auxine de la tomate (SIARF7) contrôlait en partie la signalisation de l'auxine et de la GA pendant la mise à fruit et le développement de la tomate. En effet, lorsque celui-ci subit une mutation, il provoque le développement de fruits parthénocarpiques dont l'aspect morphologique est similaire à celui des fruits induits par la GA et les auxines pendant la croissance du fruit (de Jong et al. 2009, 2011; Azzi et al. 2015). De plus, le mutant de tomate de grande taille procera, portant une mutation ponctuelle dans un gène codant la protéine DELLA qui est un répresseur de la voie des GA, présente un phénotype de réponse constitutive des GA imitant les plants sauvages traités de manière exogène aux GA. L'analyse du transcriptome suggère que la parthénocarpie associée à ce mutant serait principalement due à des changements dans les niveaux d'ARNm des gènes impliqués dans les voies GA et auxines, y compris SIARF7 (Carrera et al. 2012). Enfin l'ABA serait également impliqué dans la phase d'expansion de la tomate (Gillaspy et al. 1993) ainsi que les brassinostéroïdes (Shahnejat-Bushehri et al. 2017).

L'initiation de la maturation du fruit, à savoir le moment où le fruit est prêt à subir le processus de mûrissement, serait principalement contrôlé par deux types d'hormones, les auxines et les cytokinines. En effet, l'étude du mutant inhibiteur de la maturation de la tomate (*rin*) pour lequel les fruits ne mûrissent pas, présente des niveaux plus élevés d'auxine et de cytokinines dans les stades de début de coloration du fruit (Davey et Van Staden 1978; McAtee *et al.* 2013). Chez le pommier, une concentration élevée d'auxines a pu être maintenue lors de la maturation grâce à la suppression d'un gène MADS-box de type *rin-like* ce qui a eu pour conséquence l'inhibition de la maturation des fruits (Schaffer *et al.* 2013). De plus, le retrait des achènes chez la fraise a provoqué la maturation précoce du réceptacle avec accumulation accélérée d'anthocyanes mais cette maturation peut être stoppée par l'ajout d'auxine exogène (Given *et al.* 1988).

Le mûrissement des fruits et les changements biochimiques et physiologiques qui l'accompagnent semblent être principalement influencés par l'ABA et l'éthylène (Figure 6A). Le mûrissement chez les fruits climactériques comme la tomate, la banane ou la pomme est généralement associé à la production d'un pic d'éthylène et de respiration (Figure 6B). Les études sur le mutant de tomate *rin*, qui présente un défaut de maturation, ont permis d'observer un déficit de production d'éthylène ainsi qu'une réponse diminuée à l'application endogène de celui-ci. Ce déficit bloquerait également l'accumulation des caroténoïdes et le ramollissement du fruit (Morot-Gaudry *et al.* 2017a). Un autre mutant de tomate, *cnr*, est caractérisé par des fruits mûrs mais avec un péricarpe incolore corrélé à une perte d'adhérence cellulaire. L'expression et l'activité d'enzymes dégradant la paroi cellulaire ont été altérées lors du développement et de la maturation. La production d'éthylène est également fortement réduite chez ce mutant (Thompson *et al.* 1999; Carrari et Fernie 2006). Dans trois mutants liés à la signalisation ou la perception de l'éthylène, *nor*, *rin* et *Nr*, en plus du métabolisme des parois, les teneurs de certains métabolites majeurs sont modifiées

(Osorio *et al.* 2011). La teneur en monomères issus des polysaccharides des parois cellulaires n'augmente pas de manière substantielle pendant la maturation chez ces trois mutants comme chez la tomate témoin, en accord avec une inhibition de la dégradation des parois. La teneur en glucose et fructose est réduite pour les stades de développement et de maturation du fruit pour *rin* et *nor*. Celle de saccharose est réduite pendant la maturation pour les trois mutants. De plus, la phénylalanine s'accumule moins pendant la maturation pour les trois mutants. Toutefois, l'action de l'éthylène nécessite également un faible niveau d'auxine et une augmentation préalable de l'ABA. De plus, sa production est parfois accompagnée d'une augmentation de l'acide-indole-3 acétique (IAA) notamment observée dans la pêche et la tomate (McAtee *et al.* 2013; Morot-Gaudry *et al.* 2017a).

Pour les fruits non climactériques comme le raisin, la teneur en éthylène est constante mais très faible, c'est l'ABA qui jouera alors un rôle important dans le contrôle de la maturation du fruit et qui en sera le déclencheur (Coombe 1976; Fortes *et al.* 2015) (Figure 6B). L'ensemble de ces hormones, auxine, éthylène et ABA est nécessaire à la maturation des fruits climactériques et non climactériques en interaction avec de nombreux facteurs de transcription dont *rin* et *nor* et avec des modifications épigénétiques (Giovannoni *et al.* 2017). Pour les fruits climactériques, différentes voies évolutives des réseaux de régulations de la maturation des fruits naturation des fruits climactériques not été décrites récemment (Lü *et al.* 2018).



Figure 6 : Evolution des hormones dans le fruit au cours de son développement.

(A) Changements hormonaux qui s'opèrent dans le fruit au cours de la croissance et de la maturation.(B) Spectre des dépendances de la maturation à l'ABA et à l'éthylène pour différentes espèces fruitières.Figure adaptée de McAtee *et al.* (2013)

Les liens entre les changements hormonaux et les modifications du métabolisme primaire au cours du développement du fruit ont été re-étudiés récemment à l'aide d'une collection de mutants de diverses voies hormonales chez la tomate (Li et al. 2019). Ces travaux montrent que l'éthylène et surtout l'ABA auraient un effet important sur la régulation du métabolisme primaire de la tomate. En effet, l'éthylène jouerait un rôle important pour la transition entre les métabolismes primaire et spécialisé et sur le métabolisme des hexoses lors de la maturation du fruit. Dans les fruits du mutant epi surproducteur d'éthylène, les teneurs en sucres sont réduites et une forte augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs notamment du pyruvate et de la majorité des acides aminés au cours de la maturation est observée. Ces résultats suggèrent que l'éthylène joue un rôle dans la promotion du métabolisme des hexoses afin de fournir du pyruvate pour le cycle de Krebs et ainsi les substrats respiratoires qui sont associés à la maturation climactérique. Dans les mutants not déficitaires en ABA, les teneurs en sucres, sucres alcools et acides organiques étaient plus faibles tout au long du développement, et la capacité enzymatique de la fructokinase (FK) était réduite suggérant un rôle potentiel de régulateur de l'ABA sur cette enzyme. La régulation du métabolisme des tissus est donc coordonnée avec le développement du fruit avec des tendances particulières, notamment hormonales, à chaque grande phase de développement, mise à fruit, division, grandissement cellulaire et maturation.

- III. Rôle du métabolisme chez les fruits
 - 1. Le métabolisme, définition

Le métabolisme, qui regroupe l'ensemble des réactions chimiques et biochimiques se produisant au sein des cellules d'un organisme est constitué de deux composantes, le catabolisme qui regroupe les réactions de dégradation de molécules et qui va générer de l'énergie par la production de plus petites molécules, et l'anabolisme qui regroupe les réactions chimiques et biochimiques de synthèse des molécules qui sont nécessaires pour la constitution de nouveaux tissus. Chez les plantes, le métabolisme peut être subdivisé en deux sous-groupes, le métabolisme primaire et le métabolisme spécialisé (Pichersky et Lewinsohn 2011). Le métabolisme primaire est commun à la plupart des espèces et organes et concerne les familles des acides nucléiques, des protéines, des lipides mais également des glucides, des sucres phosphorylés, des acides organiques, et des acides aminés. C'est lui qui va fournir les précurseurs et l'énergie nécessaires pour soutenir la croissance et la maturation du fruit (Morot-Gaudry *et al.* 2017b). Le métabolisme spécialisé est espèce et organe dépendant, réceptif aux changements environnementaux et joue un rôle dans protection contre les pathogènes et les ravageurs dont les herbivores. Il regroupe notamment les familles des flavonoïdes, des alcaloïdes et des terpènes.

2. Structure, régulation et implication dans le développement du métabolisme primaire des fruits

Le métabolisme central du carbone comprend différentes voies métaboliques, les voies du saccharose, de l'amidon, des acides organiques et la respiration qui fournit l'énergie et les précurseurs biosynthétiques pour soutenir la croissance et la maturation du fruit. (Figure 7). Il est également directement impliqué dans les qualités organoleptiques du fruit puisque notamment les sucres et les acides organiques en sont des intermédiaires ou des produits finaux.

Abréviations Figure 7: 1,3BPG, glycérate-1,3- bisphosphate; 2PGA, 2-phopho-glycérate; 3PGA, 3-phophoglycérate; 6P-glucono-δ-lactone, 6-phosphogluconolactone; AGPase, ADP-glucose-pyrophosphorylase; AI, invertase acide; AlaAT, alanine aminotransférase; AspAT, aspartate aminotransférase; cFBPase, fructose-1, 6bisphosphatase cytosolique; cMDH, malate déshydrogénase cytosolique; CS, citrate synthase; cwINV, invertase pariétale; DAP, dihydroxyacétone phosphate; Erythrose-4P, érythrose-4-phosphate; F1, 6BP, fructose-1,6bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FK, fructokinase; G1P, glucose-1-phosphate; G6P, glucose-6phosphate; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate; NAD-GAPDH, glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase à NAD; GK, glucokinase; GluDH, glutamate déshydrogénase; NAD-IDH, isocitrate déshydrogénase à NAD; NAD-ME, enzyme malique à NAD; NADP-IDH, isocitrate déshydrogénase à NADP; NADP-ME, enzyme malique à NADP; NI, invertase neutre; MDH, malate déshydrogénase; OAA, oxaloacétate; Pentose-P, pentose phosphate; PEP, phosphoénolpyruvate; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; PEPCK, phosphoéno/pyruvate carboxykinase; pFBpase, fructose-1, 6-bisphosphatase plastidiale; PFK, phosphofructokinase; PFP, pyrophosphate phosphofructokinase; PGI, phosphoglucoisomérase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; S6Pase, saccharose phosphatase; SDH, sorbitol déshydrogénase; SPS, saccharose phosphate synthase; Succinyl-CoA, succinyl-coenzyme-A; Succ-CoA ligase, succinyl-coenzyme-A ligase; Suc-6P, saccharose-6-phosphate; SUSY, saccharose synthase; TPI, triose-phosphate isomérase; UDPG, UDP-glucose; UGPase, UDP-glucose-pyrophosphorylase.



Figure 7 : Représentation schématique du métabolisme primaire chez les fruits. Les principales voies du métabolisme primaire et les composés majeurs de la biomasse du fruit sont représentés. Pour une lecture facilitée la compartimentation subcellulaire n'est pas représentée.
a. Description des voies du métabolisme central

Le saccharose est la source majeure de carbone pour les fruits chez la plupart des espèces. Il est importé dans le fruit depuis le phloème par la voie symplastique ou apoplastique (Annexe 1). Pour la voie symplastique, il est hydrolysé en glucose et fructose dans le cytosol par l'invertase neutre (NI) ou en fructose et uridine-diphosphate-glucose (UDPG) par la saccharose synthase (SUSY), ou par l'invertase acide après importation ultérieure dans la vacuole. Pour la voie apoplastique, il est hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase acide pariétale puis ces deux hexoses sont importés dans les cellules du fruit. Le glucose et le fructose résultant de ces hydrolyses sont phosphorylés par les activités glucokinase (GK) et fructokinase (FK) en glucose-6-phosphate (G6P) et fructose-6-phosphate (F6P), respectivement. La phosphoglucoisomérase (PGI), la phosphoglucomutase (PGM) et l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) catalysent les interconversions entre F6P, G6P, glucose-1phosphate (G1P) et (UDPG) (Figure 7). A partir du G1P, l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) forme de l'adénosine-diphosphate-glucose (ADPG) qui sert de substrat pour la synthèse de l'amidon. L'UDPG sert à la synthèse des polysaccharides pariétaux. Le F6P peut être combiné à l'UDPG pour re-synthétiser du saccharose via les réactions catalysées par la saccharose phosphate synthase (SPS) puis la saccharose phosphatase. Les sucres solubles qui n'ont pas été métabolisés dans le cytoplasme sont transportés dans la vacuole par des protéines de transport situées dans le tonoplaste et le saccharose peut également y être hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase acide (AI) vacuolaire (Biais et al. 2014; M Li et al. 2016; Wang et al. 2017). L'étape suivante de la glycolyse est la phosphorylation du F6P en fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP). Globalement, la glycolyse qui commence par l'entrée d'une molécule de glucose ou de fructose et se finalise par deux molécules de pyruvate, génère de l'énergie (ATP), du pouvoir réducteur (NADH) et des intermédiaires pour d'autres réactions. En effet la glycolyse fournit des squelettes carbonés pour la synthèse des acides nucléiques, de certains acides aminés, de polysaccharides pour les parois et celle de glycérol pour la synthèse des lipides. Les enzymes de la glycolyse connectent le métabolisme des sucres avec celui des acides organiques. La mitochondrie de plante, de par la diversité en transporteurs membranaires dont elle est équipée, a la faculté de prendre en charge aussi bien le pyruvate, que les acides dicarboxyliques (OAA, malate, succinate, 2-OG ...) et tricarboxyliques (citrate, isocitrate). Ces acides peuvent tout aussi participer à alimenter le cycle de Krebs ou bien participer à des biosynthèses.

En présence d'oxygène le pyruvate et les acides dicarboxyliques (OAA, malate, 2-OG ...) provenant de la PEPC et MDH cytosoliques peuvent entrer dans la mitochondrie. Le pyruvate y subit une décarboxylation oxydative suivie d'une acétylation donnant l'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) qui servira de précurseur pour la synthèse des acides gras dans le plaste ou pour le cycle de Krebs. Le groupement acétyle de l'acétyl-CoA est alors transféré sur l'oxaloacétate pour former du citrate par la citrate synthase (CS). Un tour complet du cycle de Krebs, génère une molécule d'ATP, des transporteurs d'électrons NADH et flavine adénine dinucléotide (FADH₂) par tour (Nabors 2008b). Il est à noter que chez les plantes le cycle de Krebs n'oxyde pas complètement son substrat (Sweetlove *et al.* 2010). Il fournit en effet les squelettes carbonés nécessaires à la synthèse de certains acides aminés (2-oxoglutarate (2-OG) pour le glutamate, l'OAA pour l'aspartate...), ce qui implique qu'il doit être réalimenté par du carbone *via* une réaction dite anaplérotique.

Chez les plantes le pyruvate est un des principaux produits de la glycolyse synthétisé par l'action de la pyruvate kinase (PK) sur le phosph*oénol*pyruvate cytosolique (PEP). Le pyruvate peut être, soit directement importé du cytosol, soit synthétisé par l'action de l'enzyme malique à NAD (NAD-ME) mitochondriale sur le malate du cycle de Krebs (Sweetlove *et al.* 2010). Cependant les cellules végétales peuvent également produire du malate à partir du PEP. En effet, l'action de la phosph*oénol*pyruvate carboxylase (PEPC) cytosolique sur le PEP génère de l'oxaloacétate cytosolique (OAA) qui est converti en malate par la malate déshydrogénase cytosolique (MDH). Ce dernier va alors pouvoir alimenter l'enzyme malique NADP dépendante (NADP-ME) et reformer du pyruvate (Sweetman *et al.* 2009; Sweetlove *et al.* 2010) (Figure 7).

Enfin, la néoglucogenèse a été suggérée comme voie alternative pour la synthèse du saccharose notamment chez le raisin, la tomate et certains petits fruits *via* la dégradation du malate (Halinska et Frenkel 1991; Famiani *et al.* 2005; Sweetman *et al.* 2009; Wang *et al.* 2017) pendant la maturation. Le malate est converti en PEP par l'action des activités de la MDH et de la phosph*oénol*pyruvate carboxykinase (PEPCK) puis l'action conjuguée d'enzymes de la glycolyse et de la FBPase ou de la PFK-PPi dépendante (PFP) permet de synthétiser des hexoses-P, précurseurs du saccharose.

En fonction des espèces fruitières et du stade de développement du fruit la topologie de ce réseau métabolique reste la même, mais la régulation de ses voies varie influençant ainsi la composition finale du fruit. Cette variation peut se faire au niveau du métabolisme des sucres mais également au niveau de celui des acides organiques, principaux facteurs de la qualité organoleptique des fruits.

b. Métabolisme des sucres et de l'amidon chez les fruits en développement

Le métabolisme des sucres et de l'amidon a été largement étudié chez de nombreuses espèces fruitières, notamment par l'observation de variations de la composition en sucres et amidon et des activités enzymatiques associées au cours du développement. En revanche peu d'études visent à comparer l'ensemble de ces espèces. Ces résultats d'études indépendantes et isolées suggèrent une grande variabilité inter espèces mais également des points communs.

L'amidon s'accumule de manière plus ou moins transitoire lors du développement du fruit de certaines espèces ou est très peu présent chez d'autres. Chez la tomate, l'amidon est accumulé durant la phase dite d'expansion cellulaire (Biais *et al.* 2014). Cette accumulation s'accompagne d'une forte activité de l'AGPase qui reste élevée jusqu'au stade vert-mûr puis diminue fortement au cours du mûrissement. Dans un génotype de kiwi à haute teneur en

amidon, il a été montré qu'une activité AGPase accrue au début du développement du fruit ainsi que son maintien dans le temps contribuent à ce phénotype (Nardozza *et al.* 2013). En revanche cette activité enzymatique n'a pas été détectée ou était très faible dans la fraise en développement, en accord avec le fait que ce fruit n'accumule pas d'amidon après le stade vert et n'en possède pas dans le fruit mûr (Basson *et al.* 2010). Il a été rapporté que la dégradation de l'amidon conduit vraisemblablement au G1P, via le maltose sans nécessairement passer par le glucose dans la feuille (Zeeman *et al.* 2007). Dans une étude sur le fruit de tomate, les activités GK et FK diminuent (exprimées sur la base des protéines totales) lors du développement et de la maturation alors que la teneur de G1P (exprimée par fruit) augmente, suggérant que la dégradation de l'amidon peut être une alternative pour la synthèse d'hexoses-P utilisés pour la respiration (Biais *et al.* 2014).

Le métabolisme de l'amidon est étroitement lié à celui du saccharose qui lui fournit les précurseurs nécessaires, mais pas de la même manière chez tous les fruits. Chez les très jeunes fruits de tomate, la SUSY présente une forte activité et pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'importation du saccharose dans le fruit et donc dans la disponibilité de substrats pour l'accumulation d'amidon et la synthèse de cellulose ou de composants pour la paroi cellulaire (Wang et al. 1993). Chez la pomme, l'accumulation du glucose durant la phase de stockage des sucres précède celle de l'amidon. Lorsque le glucose cesse de s'accumuler, la teneur en amidon continue à augmenter (Berüter 1985). Alors que dans les baies de raisin, l'ADPG augmente à partir de la véraison lorsque l'amidon diminue, il a été suggéré que la diminution de l'amidon ne résultait pas d'une limitation en substrat mais plutôt d'une diminution des activités des enzymes impliquées dans sa synthèse (Dai et al. 2013). Lors de la division cellulaire chez le kiwi, le glucose s'accumule alors que la teneur en amidon et saccharose diminue. Cette accumulation est concomitante d'une augmentation de l'activité de la NI. De plus, les transcrits FK4 et HK3 qui codent une fructokinase et une hexokinase, respectivement, sont élevés de même que les activités de HK et FK, ce qui suggère leur implication dans la phosphorylation du fructose et du glucose, produits de la NI. Lors de l'expansion cellulaire, l'amidon et le saccharose se sont accumulés et l'activité de la SPS a augmenté. A contrario, la teneur en glucose ainsi que l'activité de la NI ont diminué. Au moment de l'initiation de la maturation du kiwi, la teneur en amidon atteint son maximum puis se stabilise, alors que le saccharose et les hexoses commencent à s'accumuler. L'activité de la SPS est plus élevée dans les génotypes à haute teneur en amidon suggérant qu'elle contribue à la synthèse de l'amidon. Alors que l'activité NI et AI et la teneur en glucose augmentent à maturité, l'activité SUSY et les transcrits SUS1 diminuent pendant l'accumulation de l'amidon et demeurent faibles dans les fruits mûrs, ce qui suggère un rôle plus critique pour l'invertase dans le métabolisme des sucres du kiwi (Nardozza et al. 2013).

Le stockage des sucres n'implique pas non plus les mêmes mécanismes chez tous les fruits. Chez la pomme lors de la nouaison, l'activité de l'AI est très forte et la teneur en saccharose est très faible, suggérant qu'il est la principale source de carbone pour les jeunes fruits. Par la suite, la diminution forte de l'activité de l'AI jusqu'à sa disparition n'est suivie

d'une accumulation du saccharose dans les fruits qu'après un délai d'un mois (Berüter 1985). L'enzyme ne serait donc pas impliquée dans le stockage des hexoses dans cette espèce qui importe aussi du sorbitol et accumule du fructose pendant la maturation. Des analyses biochimiques réalisées au cours du développement de la fraise n'ont pas permis de détecter d'activité SUSY mais ont montré que l'activité de la NI était élevée à tous les stades. Cette différence suggère que SUSY ne joue pas un rôle significatif dans la détermination de la force de puits ou dans la répartition du carbone (Basson et al. 2010). Dans la pêche, la teneur en saccharose augmente graduellement au cours du développement jusqu'à la maturité du fruit. Entre la première phase de croissance exponentielle et le plateau, cette augmentation s'accompagne d'une forte augmentation des activités de l'Al et de l'invertase neutre (NI) ce qui suggère qu'elles sont régulées de manière post-traductionnelle (Lombardo et al. 2011). Dans des génotypes de pêche présentant une faible teneur en fructose (Desnoues et al. 2014), seules les teneurs en F6P et saccharose sont plus élevées par rapport à un génotype standard. Bien que l'activité NI soit légèrement plus faible, elle ne suffit pas à expliquer la différence de teneur en saccharose d'autant plus que les activités des autres enzymes, SUSY, SPS, SDH et Al ne sont pas affectées. En revanche l'activité FK est plus élevée, ce qui indiquerait un flux de phosphorylation du fructose plus élevé, en accord avec l'augmentation de la teneur en F6P et la faible teneur en fructose des génotypes (Desnoues et al. 2014). A elles seules les activités enzymatiques ne permettent cependant pas d'expliquer la différence de composition en sucres du phénotype mais suggèrent un ajustement du réseau métabolique.

L'étude du métabolisme des sucres du poivron a permis de mettre en évidence trois phases de développement (Nielsen et al. 1991). La phase initiale est caractérisée par un taux de croissance élevé et une accumulation d'hexoses, la deuxième par un taux décroissant et une accumulation de saccharose et d'amidon. Enfin, la phase de maturation est caractérisée par une accumulation d'hexoses et une dégradation du saccharose et de l'amidon. L'activité de l'AI diminue dans les jeunes fruits alors que la teneur en saccharose augmente et celle de la SPS n'augmente pas. Puis lors de la maturation, l'activité de l'Al augmente et la teneur en saccharose diminue, cette augmentation de l'AI est également associée à l'augmentation des concentrations en glucose et fructose et à la dégradation de l'amidon en plus du saccharose. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de saccharose est probablement causée par la diminution de l'activité de l'AI plutôt que par l'augmentation de celle de la SPS. L'activité de l'AI serait déterminante dans l'accumulation d'assimilats chez les jeunes fruits et participerait aussi à l'accumulation des hexoses au cours de la maturation. De plus, avant la maturation, l'activité de la SUSY augmente et est plus importante que celle de l'AI, ce qui suggère que celle-ci est transitoirement responsable de la synthèse du saccharose dans le fruit (Nielsen et al. 1991).

Le croisement d'une espèce de tomate sauvage *Lycopersicon chmielewskii* accumulant du saccharose, et d'une espèce domestiquée *Lycopersicon esculentum* accumulant des hexoses (Yelle *et al.* 1991), a permis de transférer le caractère d'accumulation du saccharose de façon stable. Les analyses biochimiques ont montré que ce trait phénotypique est associé à des niveaux réduit de l'activité de l'invertase mais des niveaux de SUSY normaux. Chez les individus de la descendance accumulant du saccharose, l'activité de l'invertase est faible et diminue au moment de la maturation du fruit, alors que dans les individus de la descendance accumulant des hexoses, l'activité de l'invertase est forte et elle augmente au moment de l'accumulation des hexoses. L'activité SUSY dans les deux cas augmente jusqu'à 14 DPA puis diminue, ce qui n'était pas attendu car aucune activité SUSY n'a été détectée dans le parent sauvage. Ces résultats suggèrent que cette invertase acide soluble est une enzyme critique pour l'accumulation du saccharose et non la SUSY (Yelle *et al.* 1991).

Chez le raisin, de nombreux changements métaboliques se produisent durant la véraison, notamment avec une augmentation des teneurs en saccharose, fructose et glucose (Dai *et al.* 2013). L'étude d'activités enzymatiques au cours du développement a montré que l'accumulation rapide des sucres dans la baie est précédée par une augmentation de l'activité de l'AI, et qu'au moment où la teneur en sucre commence à augmenter, les activités de la SUSY et de la SPS augmentent également (Hawker 1969). Dans une variété où l'accumulation des sucres diffère, la teneur en glucose augmente jusqu'à la véraison puis diminue lors de la maturation contrairement à celle du fructose qui continue d'augmenter. Cet écart peut être expliqué par le fait que l'invertase diminue alors que la SUSY augmente (Wang *et al.* 2017). Pour le raisin, le saccharose peut également être synthétisé à partir du malate par la voie néoglucogénique pendant la maturation (Dai *et al.* 2013; Wang *et al.* 2017).

Chez certaines rosacées fruitières ligneuses, le sorbitol en plus du saccharose est importé via le phloème (Annexe 1). Chez la pomme, le sorbitol serait le principal substrat pour la synthèse du fructose. En effet sa teneur diminue au début du développement et est inversement corrélée à la teneur en fructose qui augmente ainsi que l'activité de la sorbitol déshydrogénase (SDH) qui catalyse la réaction (Berüter 1985). En revanche, l'augmentation du sorbitol au cours de la croissance de la pêche n'est pas accompagnée de changement dans les niveaux de transcrits de SHD (Lombardo *et al.* 2011), ni de l'activité de la SHD qui reste constante (Desnoues *et al.* 2014).

Chez les Cucurbitacées, le stachyose en plus du saccharose est importé *via* le phloème (Annexe 1). Ceci implique les activités α-galactosidase et galactokinase (Dai *et al.* 2011).

c. Glycolyse, métabolisme des acides organiques et respiration chez les fruits en développement

La régulation des voies de la respiration et du métabolisme des acides organiques diffère également lors du développement et selon les espèces de fruits. Les enzymes de la glycolyse ont été étudiées en détail sur la tomate par Biais *et al.* (2014). Chez la tomate lors de la division cellulaire, des activités élevées de la GK, la FK, la pyruvate kinase (PK) et des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs ont été observées ainsi qu'une teneur plus élevée en G6P. La production d'ATP semble donc une priorité à ce stade de développement, ce que rend possible un flux élevé de la glycolyse. Un processus anaplérotique a été suggéré par ces auteurs lors de l'expansion cellulaire précoce pour compenser la perte de carbone due à

l'expansion cellulaire car cette période était caractérisée par des activités élevées d'enzymes de la glycolyse comme la NAD-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (NAD-GAPDH), la phosphoglycérokinase (PGK), l'énolase et la phospho*énol*pyruvate carboxylase (PEPC). De plus, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) a montré un pic d'activité qui pourrait refléter une activation de la voie des pentoses phosphates. Plusieurs enzymes dont PGI, phosphofructokinase (PFK) et UGPase ont montré un pic d'activité avant la maturation, ce qui suggère l'anticipation de celle-ci et leur implication dans le recyclage des hexoses phosphates libérés par la dégradation de l'amidon. La maturation de la tomate est caractérisée par une augmentation de l'activité de nombreuses enzymes du métabolisme primaire, un maintien de la teneur en protéines et une accumulation d'hexoses dans la vacuole (Biais *et al.* 2014), des processus coûteux en énergie. Cela est corroboré par l'augmentation d'activités enzymatiques impliquées dans la glycolyse comme l'aldolase et la PK et dans le cycle de Krebs comme la citrate synthase (CS) et la succinyl CoA ligase. L'accumulation de citrate a également été observée durant la maturation et correspond à une activité élevée de la CS et une accumulation du glutamate (Biais *et al.* 2014).

Une étude métabolomique par LC-MS de la baie de raisin (Dai *et al.* 2013) a montré qu'avant la véraison les teneurs en hexoses phosphates (G1P, G6P, F6P) diminuent puis se stabilisent. Lors de la véraison, la plupart des intermédiaires du cycle de Krebs (citrate, malate, aconitate, isocitrate et 2-OG) ont présenté un pic d'accumulation puis leurs teneurs ont diminué lors de la maturation. Cette diminution s'est accompagnée de celle des intermédiaires glycolytiques (PEP, 3-PGA, F1,6BP). Une autre étude avec une approche protéomique (Wang *et al.* 2017) a montré que l'abondance de la plupart des enzymes glycolytiques comme la PFP, l'énolase et la PK augmente après la véraison, seule la PGK diminuant. Les enzymes du cycle de Krebs comme la PDC et l'IDH présentent une plus forte abondance pendant la phase de croissance et au cours de la maturation, et une plus faible abondance pendant le plateau, ce qui correspond à une forte demande en énergie et substrats pendant la phase de croissance. L'abondance de la MDH et la ME augmentent progressivement lors de la maturation et pourraient contribuer au déclin de la teneur en malate après véraison (Wang *et al.* 2017).

Dans la pêche, la teneur en citrate a augmenté alors que celles en quinate et en malate n'ont pas montré de changement durant le développement et le murissement du fruit (Lombardo *et al.* 2011). Ces auteurs ont également mesuré des activités et des expressions d'enzymes du métabolisme central. L'activité NADP-ME et les niveaux de transcrits de phospho*énol*pyruvate carboxykinase (PEPCK) ont également augmenté au cours du développement et du mûrissement. Il a été suggéré que la NADP-ME et la PEPCK, qui fonctionnent comme des enzymes décarboxylantes, pourraient être impliquées dans le catabolisme des acides organiques aux premiers stades de développement, et par conséquent empêcher l'accumulation de malate. Les stades précoces présentent des niveaux élevés de protéines totales qui diminuent au cours du développement. A la fin de la phase de latence, une forte accumulation d'acides aminés a été observée, plus importante que celle enregistrée dans les très jeunes fruits. Il est fort probable que ces acides aminés proviennent des protéines stockées dans les fruits immatures précoces (Lombardo *et al.* 2011). Dans le réceptacle de la fraise, les teneurs en hexoses phosphates, G6P, F6P et glycérol-P ont diminué au cours du développement alors que la maturation moyenne à tardive a été caractérisée par une augmentation des teneurs de plusieurs acides aminés et de tous les intermédiaires du cycle de Krebs à l'exception du 2-OG (Fait *et al.* 2008). De plus, lors de la maturation de la fraise, trois enzymes ont montré une augmentation des niveaux de leurs transcrits, l'enzyme malique, la fructose-bisphosphate aldolase (FBPase) et la PK. L'enzyme malique réalise la décarboxylation réductrice du malate en pyruvate et permet ainsi d'introduire du carbone dans le cycle de Krebs sans passer par la production de pyruvate par la glycolyse. L'augmentation des niveaux de transcrits codant l'enzyme malique pourrait conduire à une consommation du malate par la respiration du pyruvate formé et donc une diminution de l'acidité pendant la maturation (Aharoni et O'Connell 2002).

Chez les agrumes, le citrate s'accumule dans le fruit avant de décliner lors de la phase de maturation. Le rôle d'une NADP-IDH cytosolique dans le catabolisme de l'acide citrique dans la pulpe du citron a été proposé (Sadka *et al.* 2000). Pour la tomate, l'activité de cette enzyme augmente au stade avancé de la maturation et a été associée à l'accumulation du glutamate dans le fruit *via* son produit de synthèse, le 2OG (Gallardo *et al.* 1995; Biais *et al.* 2014).

Le métabolisme primaire est étroitement lié à celui des parois cellulaires notamment *via* l'UDPG qui sert de substrat pour la synthèse des composants de la paroi.

3. Les parois cellulaires

Le métabolisme des parois cellulaires peut être considéré comme partie intégrante du métabolisme primaire car celles-ci jouent un rôle majeur dans la formation, la protection et la croissance des cellules. Elles contribuent en outre largement aux caractéristiques de la texture du fruit. La composition des parois peut varier entre les espèces mais les principaux constituants sont les pectines, l'hémicellulose, la cellulose, la lignine et des protéines structurelles (Dheilly *et al.* 2016) (Figure 8). La paroi cellulaire peut être divisée en trois parties :

- La lamelle moyenne qui est une couche pectique mitoyenne entre deux cellules et qui se forme lors de la division cellulaire. Elle servira de base sur laquelle viendront se déposer la paroi primaire puis la paroi secondaire et permettra les échanges intercellulaires (Carpita *et al.* 2015),
- La paroi primaire située sous la lamelle moyenne et qui est composée d'hémicellulose, de pectines et de cellulose sous forme d'un réseau de microfibrilles souples qui donne à la paroi sa flexibilité et sa capacité d'extensibilité. La paroi primaire agit alors comme un régulateur critique de l'allongement et de l'expansion des cellules (Nakano *et al.* 2015),

 La paroi secondaire, plus épaisse que la paroi primaire, située en-dessous de celle-ci et qui est composée d'hémicellulose, de cellulose et de lignine. Ici les microfibrilles sont ordonnées en strates et confèrent une rigidité à la paroi qui l'empêchera de croître lors de la maturation du fruit (Nakano *et al.* 2015).

La cellulose est l'un des polysaccharides les plus abondants dans la paroi cellulaire végétale, elle est composée de chaînes $(1\rightarrow 4)\beta$ -D-glucane assemblées par des liaisons hydrogène en microfibrilles (Carpita et al. 2015). L'hémicellulose sert de lien par liaisons hydrogène entre les microfibrilles pour former un réseau. La paroi primaire est constituée de deux glycanes majeurs formant l'hémicellulose : le xyloglucane et le glucuroarabinoxylane (Carpita et al. 2015). Le xylane est le composant majoritaire de la paroi secondaire (Nakano et al. 2015). Les pectines qui sont les principaux constituants de la lamelle moyenne déterminent la porosité des parois cellulaires et fournissent des surfaces chargées qui modulent le pH et l'équilibre ionique des parois. Ce sont des polysaccharides caractérisés par un squelette d'acide galacturonique et ses deux constituants majeurs sont l'homogalacturonane (HG) et le rhamnogalacturonane I (RG I) (Carpita et al. 2015). Les protéines structurelles de la paroi sont régulées par le développement de la plante ; leurs quantités varient selon les tissus ou l'espèce. Elles sont représentées par trois grandes classes, les glycoprotéines riches en hydroxyproline, les protéines riches en proline et les protéines riches en glycine. Enfin, les lignines qui sont des constituants majeurs de certaines parois secondaires renforcent la paroi. Ce sont des réseaux complexes de composés aromatiques, les phénylpropanoïdes, dont les trois monomères majeurs sont l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Carpita et al. 2015).





Lors de la croissance, les parois cellulaires jouent un rôle majeur dans le façonnage et la protection du fruit. Ensuite leur dégradation partielle *via* la solubilisation des pectines est en

grande partie responsable de l'assouplissement et des changements de texture lors du mûrissement du fruit (Paragraphe II.2) (Brummell et Harpster 2001).

Pour chaque espèce fruitière, les modifications de la paroi qui s'opèrent lors du développement du fruit sont différentes. La dégradation et la dissolution de la lamelle moyenne, riche en pectines, commence au début du murissement chez un fruit mou comme la tomate, mais à des stades bien plus avancés chez un fruit croquant comme la pomme (Ben-Arie *et al.* 1979).

Pour la tomate cette dissolution est corrélée avec l'apparition d'une pectine dépolymérase, qui lors de son application sur des tissus de fruits verts a reproduit les mêmes modifications de structure de la paroi. (Crookes et Grierson 1983). D'autres études portent sur les mutants affectés pour la maturation, notamment rin, qui présentent peu de ramollissement et montrent une faible activité de la PG (Seymour et al. 1987). De la même manière une augmentation de l'expression des gènes polygalacturonase et pectate lyase liés à la dégradation de la paroi cellulaire pendant la maturation a été observé chez la tomate, mais pas aux stades de développement équivalents dans les mutants de maturation nor et rin (Osorio et al. 2011). Chez la pêche, aucune activité de la PG n'a été détectée dans les fruits non mûrs mais l'activité PG apparait et augmente durant la maturation du fruit et son apparition coïncide avec la formation de pectines hydrosolubles (Pressey et al. 1971). Cependant, le processus de diminution de la fermeté des fruits a commencé avant la détection de l'activité PG puis s'est accélérée. Ces résultats suggèrent que la PG jouerait un rôle dans la solubilisation des pectines pendant la maturation des pêches. Chez la poire, le ramollissement est aussi associé à la dissolution de la lamelle moyenne mais également à une désintégration de la matière fibrillaire (Ben-Arie et al. 1979). Ces travaux précurseurs ont aussi montré que l'application de PG et de cellulase sur des tissus de poire ferme entraine les mêmes changements structuraux que lors du mûrissement naturel, alors que pour les tissus de pomme, l'application de la PG à elle seule est suffisante pour dissoudre la lamelle moyenne.

Les structures des polysaccharides de même que leur composition en sucres neutres varient également au cours de la maturation ainsi qu'entre les différentes espèces fruitières (Gross et Sams 1984). Le sucre neutre majeur des polysaccharides de la paroi des Cucurbitacées et des Solanacées est le galactose, celui des petits fruits comme la fraise et la framboise est le xylose, ceux des drupes comme la pêche ou la prune sont le galactose et l'arabinose et celui des fruits à pépins comme la pomme et la poire est l'arabinose. Cependant une perte de sucres neutres est observée au moment du murissement chez la plupart des espèces étudiées (Gross et Sams 1984). Lors du murissement de la tomate par exemple, une diminution de la teneur en galactose, arabinose mais également en acide galacturonique a été observée (Gross et Wallner 1979). Cependant le déclin de l'arabinose et du galactose ne semble pas être lié à la solubilisation des polyuronides car cette perte se produisait également dans les fruits non murissants des mutants *rin* après la récolte des fruits en l'absence de PG et de solubilisation des polyuronides. Chez le concombre les rapport acide galacturonique sur rhamnose et acide galacturonique sur arabinose (chaîne latérale de RG I et HG) augmentent

lors du murissement, ce qui suggère des changements dans la structure de la pectine (McFeeters et Lovdal 1987). Pour le raisin, la teneur en arabinogalactane I (AG I), un composant majeur des chaînes latérales neutres des polysaccharides peptiques, commence à diminuer avant le début du ramollissement, ce qui suggère que la perte de l'AG I pourrait être associée à une étape cruciale du début de maturation (Nunan et al. 1998). De plus, la teneur en galacturonane augmente et il devient de plus en plus soluble au fur et à mesure que la maturation progresse alors qu'aucun changement n'a été observé pour le xyloglucane (hémicellulose) et la cellulose du raisin. De la même manière, les modifications des polysaccharides lors de la maturation du kiwi après récolte se sont surtout opérées au niveau des chaines latérales des pectines alors que des changements mineurs ont été observés pour l'hémicellulose et les homogalacturonanes qui eux ne sont dégradés que lors de la phase de surmaturité du kiwi (Mack et al. 2017). A contrario une étude transcriptomique et biochimique au cours du développement de la pomme a montré que les gènes du développement précoce étaient principalement liés à la biosynthèse et à la dégradation des parois et particulièrement les hémicelluloses (Dheilly et al. 2016). En revanche, peu de gènes liés au métabolisme des pectines étaient exprimés dans les fruits mûrs.

Selon une étude réalisée sur des baies de raisin présentant différents niveau de fermeté, le métabolisme des sucres pourrait influencer la dynamique de la paroi cellulaire et jouerait un rôle dans la fermeté du raisin (Zepeda et al. 2018). En effet les baies « molles » accumulent plus de sucres solubles (notamment le glucose, le fructose, le saccharose, l'arabinose et le rhamnose) à la véraison, alors que les baies « fermes » accumulent ces mêmes sucres lors de la récolte mais avec une plus grande quantité du monomère de glucose pariétal qui pourrait provenir de la dégradation de la cellulose ou de l'hémicellulose qui participe à la résistance et à la rigidité de la paroi. De plus, la teneur en acide uronique ne diffère que très peu entre les deux types de baies et ne peut donc expliquer cette variation de fermeté. Il apparait également que la diminution de l'UDPG au cours du développement chez le raisin (Dai et al. 2013) est corrélée avec une diminution des parois cellulaires (Nunan et al. 1998), confirmant ainsi le lien entre les deux métabolismes. Le métabolisme des parois est aussi relié à celui de l'ascorbate. Chez les fraises mûres, lors de la dégradation de la paroi cellulaire, le recyclage de l'acide D-galacturonique, un des composants principaux des pectines contribue en partie à l'augmentation de la teneur en ascorbate dans le fruit (Agius et al. 2003). De la même manière pendant la maturation des fruits de tomate Micro-Tom l'augmentation de la teneur en ascorbate est inversement corrélée à l'expression d'ARNm des gènes dans la voie Dmannose/L-galactose (Badejo et al. 2012).

4. Métabolisme rédox

L'état de réduction-oxydation (rédox) est un intégrateur majeur du métabolisme subcellulaire et extracellulaire végétal et est simultanément lui-même régulé par des processus métaboliques. Il domine le métabolisme cellulaire en raison de l'importance des couples NAD(H) et NADP(H) dans de nombreuses réactions notamment du métabolisme central, mais il agit aussi comme un signal efficace qui informe la cellule des conditions environnementales (Geigenberger et Fernie 2014). La signalisation rédox fait intervenir des antioxydants cellulaires puissants permettant de protéger la cellule notamment au cours des processus développementaux qui produisent un stress oxydatif dont la maturation du fruit (Jimenez *et al.* 2002). Ces antioxydants cellulaires sont le NAD, le glutathion et l'ascorbate (Gakière *et al.* 2018). Les réactions rédox du métabolisme et leur contrôle sont des processus biochimiques complexes très étudiés dans la feuille mais moins dans le fruit. Cependant plusieurs travaux ont caractérisé la biosynthèse de l'ascorbate dans le fruit de tomate avec notamment le rôle des enzymes GDP-D-mannose épimérase, GDP-galactose phosphorylase et galactono-1,4-lactone déshydrogénase (Alhagdow *et al.* 2007; Gilbert *et al.* 2009; Bulley *et al.* 2012). En lien avec une augmentation possible du stress oxydatif mentionnée par Jimenez et al. (2002), une augmentation significative de la plupart des composants du cycle ascorbate-glutathion a été observée entre le stade « breaker » et le stade rouge du fruit de tomate (López-Vidal *et al.* 2016).

Le métabolisme de l'ascorbate est aussi connecté directement ou indirectement à plusieurs voies métaboliques importantes pour la croissance du fruit. Il est relié au métabolisme des parois cellulaires (Azzi et al. 2015; Mounet-Gilbert et al. 2016) via la GDPmannose épimérase. Cette enzyme produit du GDP-L-galactose (précurseur de polysaccharides) à partir du GDP-mannose et est donc un carrefour entre la biosynthèse de l'ascorbate et celle des polysaccharides pariétaux. Il y aurait un rapport entre la fermeté des fruits et la teneur en ascorbate qui provient du partage de l'épimérase du GDP-D-mannose entre la paroi cellulaire et la voie de biosynthèse de l'ascorbate (Mounet-Gilbert et al. 2016). Le métabolisme de l'ascorbate est également connecté à la mitochondrie et à la respiration. Par exemple, la dernière enzyme de la synthèse de l'ascorbate est localisée dans la membrane interne mitochondriale en connexion avec l'activité de la chaîne respiratoire (Alhagdow et al. 2007). L'ascorbate est également un précurseur de molécules comme les acides organiques, tartrate (important dans la baie de raisin, (Cholet et al. 2016), oxalate et thréonate (Truffault et al. 2017). De plus, une étude de modélisation métabolique vient de montrer que le statut rédox est un facteur métabolique qui contribue à l'accumulation de métabolites spécialisés, les anthocyanes, dans des cellules de baie de raisin cultivées in vitro (Soubeyrand et al. 2018).

Bien que les fruits soient une source d'antioxydants majeure pour la nutrition humaine, leur domestication tend à diminuer les teneurs en vitamine C (ascorbate plus déshydroascorbate). Ainsi les teneurs en ascorbate dans les fruits de tomates sauvages *Solanum pennellii* sont cinq fois plus élevées que dans les fruits domestiqués *Solanum lycopersicum*, alors qu'elles le sont vingt fois plus pour le kiwi sauvage (Gest *et al.* 2012; Beauvoit *et al.* 2018). Ces observations suggèrent qu'il existe un compromis entre la productivité et la qualité des fruits. Une étude récente sur la tomate suggère que la domestication vers des lignées à fruit plus gros a modifié l'importance de la monodéshydroascorbate réductase, une enzyme du cycle ascorbate-glutathion, pour la maintien du rendement (Truffault *et al.* 2018).

IV. Amélioration de la qualité du fruit par différentes pratiques

La qualité du fruit liée au métabolisme central peut être modifiée par différentes stratégies, notamment d'amélioration variétale classique et de manipulation génétique, ou par des approches environnementales dont les pratiques culturales (Beauvoit *et al.* 2018). De nombreuses études ont utilisé la génétique quantitative ou la transformation génétique pour générer des informations sur le contrôle génétique de la qualité du fruit.

1. Différentes approches génétiques pour l'amélioration du rendement et de la qualité du fruit

La sélection génétique, notamment à l'aide de marqueurs moléculaires, a été largement utilisée dans l'amélioration du rendement et de la qualité et notamment des plantes fruitières (Janick 2005). Afin de continuer d'améliorer le rendement et la qualité des fruits, plusieurs stratégies complémentaires de génétique classique ou inverse ont été développées.

Des travaux de cartographie génétique portants sur les *loci* de caractères quantitatifs ou QTL (un QTL est une région du génome pouvant correspondre à plusieurs gènes qui contribue au contrôle d'un caractère quantitatif), initiés sur la tomate par Paterson (1988), ont permis de localiser des QTL contrôlant la masse du fruit, la concentration en composés solubles totaux, le pH puis la teneur en métabolites individuels (mQTL). Les cartographies de QTL et de gènes potentiellement impliqués dans la taille et la composition du fruit à l'aide de lignées d'introgression générées à partir d'une espèce sauvage (L. pennellii) et d'une variété cultivée de tomate ont permis de localiser des gènes du métabolisme du carbone notamment les gènes codant des enzymes impliquées dans la glycolyse, le cycle de Krebs, le métabolisme des sucres et de l'amidon (Causse et al. 2004). En analysant leur co-localisation avec des QTL, plusieurs gènes candidats ont été trouvés comme contribuant potentiellement au contrôle de la variation de teneur en sucres (dont deux invertases et une fructokinase) et en acides organiques (dont une phosphoénolpyruvate carboxylase et une enzyme malique). Le gène Lin5, identifié par clonage positionnel à partir d'un QTL majeur contrôlant le poids et la teneur en hexoses des fruits de tomate, code une invertase pariétale (Fridman et al. 2000; Azzi et al. 2015). Il a été retrouvé par Causse et al. (2004). D'autres études utilisant le phénotypage biochimique de lignées d'introgression ou d'autres ressources génétiques (Schauer et al. 2006; Bauchet et al. 2017) ont permis d'identifier de nombreux mQTL. Cette stratégie combine la génétique (e. g. des milliers de polymorphismes d'un seul nucléotide, ou « single nucleotide polymorphism », SNPs), le profilage-métabolique (e. g. des centaines de composés quantifiés), et la génétique d'association à l'échelle du génome pour identifier les gènes impliqués (Sauvage et al. 2014). Elle permet de mieux comprendre les mécanismes qui relient le métabolisme aux caractères phénotypiques déterminants dans la qualité et le rendement du fruit de tomate.

D'autres espèces fruitières que la tomate ont été investiguées par ces approches QTL. Une étude sur la pêche a notamment permis la détection de QTL dynamiques (*i.e.* au cours du développement du fruit) pour le poids frais, les teneurs en sucres, acides et les activités enzymatiques liées au métabolisme des sucres (Desnoues *et al.* 2016). Cette étude a été complétée par l'identification de gènes annotés sur le génome en tant qu'enzymes liées au métabolisme ou transport de sucres avec la mise en évidence de co-localisations. Six QTL pour les sucres co-localisés directement avec des gènes d'enzymes impliquées dans leur transport, leur synthèse ou leur dégradation ont été mis en évidence. Pour une autre Rosacée fruitière, la pomme, l'identification par cartographie et BAS-seq (« bulked-segregant analysis sequencing ») de quatre QTL contrôlant l'acidité du fruit a permis de démontrer que les variations de trois gènes épistatiques hiérarchiques dont un associé au transporteur de malate vacuolaire, peuvent influencer la teneur en malate dans le fruit (Jia *et al.* 2018). L'approche QTL reste d'actualité comme le montre une autre étude récente avec une approche RNA-seq sur des lignées recombinantes de melon combinant QTL et QTL d'expression génique (eQTL) pour identifier plusieurs facteurs de qualité du fruit (Galpaz *et al.* 2018)

Ces études portant sur les QTL sont validées par des approches transgéniques voire plus récemment d'édition du génome. Ces approches permettent de générer des connaissances pour la génomique fonctionnelle mais sont également utilisées pour l'amélioration génétique. La plupart des études sont réalisées sur le fruit modèle, la tomate. Par exemple, les fruits de tomate dont l'expression de LIN5 a été inhibée par une technologie d'interférence ARN (RNAi) présentaient un rendement ainsi qu'une taille de fruit diminués confirmant ainsi le rôle du QTL Lin5 discuté précédemment (Zanor et al. 2009). Le profilage métabolique a montré que les changements s'opéraient principalement dans le métabolisme des sucres et que la teneur en hexoses diminuait dans les fruits verts. Cela complète une étude sur des tomates transgéniques exprimant un gène antisens d'invertase acide intracellulaire qui présente également une diminution de la teneur en hexoses et une augmentation de celle en saccharose (Klann et al. 1996). Les lignées présentant une teneur élevée en saccharose, liée à une activité très faible de l'invertase acide soluble dans les fruits mûrs, présentaient aussi des fruits plus petits suggérant que l'invertase acide soluble contrôlerait la composition en sucres dans le fruit de tomate avec un impact sur la taille des fruits. Pour une autre enzyme du métabolisme central, l'hexokinase, la surexpression du gène hexokinase 1 d'Arabidopsis (AtHXK1) à l'aide d'un promoteur 35S dans les plants de tomate a permis d'obtenir des lignées présentant des changements phénotypiques et biochimiques en corrélation avec une forte activité hexokinase (Menu et al. 2004). La taille des fruits transgéniques était réduite en raison d'une diminution de l'expansion cellulaire, l'approvisionnement en carbone était plus faible au cours du développement en raison d'une diminution de la photosynthèse et les fruits transgéniques présentaient une teneur moindre en amidon à 16 JAA par rapport aux fruits sauvages suggérant que le saccharose serait utilisé préférentiellement comme carburant pour le métabolisme au détriment du stockage de l'amidon. Une étude dans laquelle la fructose 1,6-bisphosphatase chloroplastique (cp-FBPase), une enzyme importante dans le contrôle du cycle de Calvin dans le fruit, était spécifiquement réprimée par des techniques antisens a montré des croissances et des taille des fruits fortement réduites mais peu de changement dans le métabolisme des glucides (Obiadalla-Ali *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent que le cycle de Calvin fournit une fraction du carbone nécessaire à la croissance de ce fruit. L'utilisation de lignées d'introgression a permis de démontrer que l'activité de l'ADP-glucose-pyrophosphorylase aux premiers stades de développement du fruit par l'introduction d'une sous-unité régulatrice induisait l'accumulation d'amidon aux premiers stades de développement et augmentait aussi les teneurs en composés solubles au stade mûr (Schaffer *et al.* 2000).

En revanche la mise sous silence de la L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (Gal-LDH) par RNAi, qui convertit la L-galactono-lactone en ascorbate réduit la croissance des plants et la taille des fruits en raison de la diminution de l'expansion cellulaire (Alhagdow *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent qu'en plus de la synthèse de l'ascorbate, l'enzyme jouerait un rôle dans la régulation des processus liés à la croissance cellulaire. De même, l'utilisation d'un système CRISPR/Cas9 multiplexe (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »), qui cible plusieurs gènes clés, a permis de manipuler la teneur en acide-γaminobutyrique (GABA) dans les feuilles et les fruits de tomate (Li *et al.* 2018). A côté de l'utilisation de transformants, des mutants peuvent aussi contribuer à la compréhension du contrôle de l'acidité des fruits comme cela a été fait pour les citrus et l'accumulation d'acide citrique (Li *et al.* 2016).

Les techniques de transgénèse et d'édition du génome restent efficaces pour l'amélioration du fruit mais sont sujettes à des contraintes réglementaires et éthiques de la part des consommateurs et restent souvent restreintes au domaine de la recherche. D'autres stratégies restent donc nécessaires pour continuer d'améliorer la qualité du fruit. L'utilisation d'une approche de génétique inverse comme le « Targeting Induced Local Lesions In Genomes » (TILLinG) qui génère de nombreuses nouvelles mutations par l'action d'un agent mutagène chimique, le méthane sulfonate d'éthyle (MSE), a permis de développer des collections de mutants MSE chez plusieurs espèces fruitières comme le concombre (Boualem et al. 2014), la tomate (Rothan et al. 2016) et le melon (González et al. 2011). La mise en place de ces plateformes TILLinG avait pour but de cibler des gènes candidats potentiellement impliqués dans les résistances aux maladies et la qualité du fruit et d'identifier des mutants d'intérêt pour l'amélioration des cultures. Cette approche de « TILLinG by sequencing », intéressante pour les sélectionneurs dans le cadre de la réglementation européenne puisqu'elle ne fait pas appel à la transgénèse, implique parfois des partenariats entre la recherche publique sélectionneur et un privé (http://wwwurgv.versailles.inra.fr/tilling/projects.htm).

Ces études démontrent l'importance du contrôle génétique sur le métabolisme du fruit. Il y a aussi une possibilité de contrôle épigénétique du métabolisme. Par exemple, des variations épigénétiques peuvent influer sur le mûrissement de la tomate. En effet, l'une des mutations épigénétique naturelle et héréditaire bien caractérisée est la mutation Cnr (« Colourless non-ripening »). L'expression génétique est supprimée par des niveaux de méthylation élevés dans la région du promoteur LeSPL-CNR (Seymour *et al.* 2008). La génétique peut utiliser des épiallèles pour contrôler la régulation de QTL métaboliques comme la teneur en vitamine E dans le fruit de tomate (Quadrana *et al.* 2014).

Toutefois, il existe aussi d'autres alternatives pour la compréhension et l'amélioration de la qualité du fruit notamment la mise à profit de différentes conduites de cultures.

2. Amélioration de la qualité du fruit par des pratiques culturales

Les stratégies agronomiques ont souvent été mises à profit afin d'améliorer les rendements et la résistance du fruit à certains pathogènes ou ravageurs. Nous ne parlerons pas ici de la nutrition minérale. Mais de nos jours, ces pratiques agronomiques sont de plus en plus exploitées pour manipuler la qualité du fruit notamment en augmentant les teneurs de composés impliqués dans la saveur, ou bénéfiques pour la santé humaine comme les vitamines et certains composés spécialisés (Poiroux-Gonord *et al.* 2010). La difficulté majeure de ces approches réside dans la diversité des réponses qui n'est pas toujours en adéquation avec notre compréhension actuelle du métabolisme du fruit et de sa régulation au cours du développement. Plusieurs études sur différentes conduites de culture comme l'application de stress hydrique ou salin, la modification de l'intensité lumineuse ou de la température, la limitation en carbone, l'application de paillis, l'application de fertilisants sur les plants ou encore l'utilisation de porte-greffe ou d'organismes collaborateurs ont été réalisées. Elles nous renseignent sur les teneurs en sucres solubles, en acides, en composés phénoliques, vitamines et caroténoïdes en réponse aux différents traitements et démontrent une possible application pour l'amélioration de la qualité du fruit.

En ce qui concerne l'application de stress salin sur des plants de concombre (Huang et al. 2009) ou d'une limitation en eau chez des arbres fruitiers comme le pommier (Mills et al. 1996) et le mandarinier (Yakushiji et Morinaga 1998), il a été démontré que ceux-ci peuvent modifier le rendement ainsi que la composition du fruit. En effet le calibre des fruits est diminué à mesure que l'intensité du traitement augmente. En revanche ce stress permet d'améliorer la qualité du fruit en augmentant la concentration en sucres solubles ainsi que l'acidité titrable dans les fruits. La teneur en matière sèche du concombre se voit également augmentée. L'effet est d'autant plus important que le stress est appliqué dès le début du développement du fruit. D'autre part, l'effet de la sécheresse au moment du mûrissement des fruits aurait un impact positif sur la concentration en sucres chez différents fruits charnus comme le raisin, la tomate et la fraise avec en général un effet positif sur les teneurs en vitamine C (Ripoll et al. 2014). Les pratiques culturales telles que l'irrigation déficitaire contrôlée se basent sur l'induction d'un léger stress hydrique qui arrête la croissance végétative mais permet de maintenir ou même d'augmenter le rendement tout en économisant l'eau (Johnson et Handley 2000; Ripoll et al. 2014; Rahmati et al. 2018). La combinaison d'une limitation en eau et d'une lourde charge fruitière chez le pêcher (Berman et DeJong 1996), lui diminuant ses ressource en carbone, a considérablement réduit le poids sec des fruits. On retrouve ce lien chez deux génotypes de tomate présentant des profils d'accumulation de sucres différents et pour lesquels un éclaircissage des fleurs plus ou moins important a été effectué lors de l'anthèse (Massot *et al.* 2010). La réduction de la charge fruitière a permis d'augmenter la taille des fruits ainsi que la teneur en hexoses. Cependant aucun changement n'a été observé en ce qui concerne la vitamine C. On peut supposer que les sucres, précurseurs de la synthèse de la vitamine C, ne sont donc pas un facteur limitant pour celle-ci. De plus, une limitation en carbone par une défoliation a montré une diminution du poids du fruit de clémentine et a induit un retard dans sa maturation (Pantin *et al.* 2013). La teneur en sucres solubles, notamment en saccharose se trouve fortement diminuée chez les fruits des plants défoliés. La croissance du fruit serait alors positivement corrélée à la disponibilité en carbone comme nous l'indique le rapport feuille/fruit et son impact sur la croissance et les teneurs en sucres. L'éclaircissage du pommier a permis l'obtention de fruits plus gros avec des teneurs en glucose considérablement plus basses. Les teneurs en fructose et saccharose étaient cependant plus élevées ce qui pourrait être interprété comme preuve d'une abondance d'assimilats dans le fruit (Berüter 1985).

D'autres traitements, comme la variation de la température ou de l'intensité lumineuse au cours du développement du fruit et lors de sa maturation jouent également un rôle important sur la composition finale. Chez la tomate, l'exposition du fruit à des températures élevées induit une diminution de la vitamine C et du lycopène et une augmentation de la rutine et des dérivés de l'acide caféique (Gautier et al. 2008). Cette tendance est retrouvée chez la tomate cerise, avec de plus un effet bénéfique sur la teneur en hexoses qui augmente lorsque la charge fruitière est modérée (Gautier et al. 2005). L'application de températures élevées sur des vignes de kiwi à différentes phases de développement a également été réalisée (Richardson et al. 2004). Une diminution de la teneur en ascorbate a été observée lorsque l'élévation de température était appliquée pendant la phase d'accumulation de l'amidon, mais était accompagnée d'une diminution de celles des glucides solubles. Lorsque les kiwis sont placés à haute température (+12 ou +14°C par rapport à la température contrôle de 28 et 20°C respectivement du cycle jour/nuit) au moment de la maturation, la dégradation de l'amidon est retardée ainsi que la maturation du fruit. Enfin, alors que la température ne semble pas avoir d'effet sur la teneur en citrate, elle semble agir sur celles du quinate et du malate. La teneur en malate double lorsque le traitement (+2 ou +6°C par rapport à la température contrôle de 28 et 20°C respectivement du cycle jour/nuit) est appliqué pendant la division cellulaire mais l'effet s'estompe lorsque le développement se poursuit. En revanche, chez le raisin, l'exposition de fruits mûrissants à de hautes températures entraine une réduction de la teneur en malate (Sweetman et al. 2009).

A contrario, une augmentation de l'intensité lumineuse sur le fruit de tomate entraine une augmentation des teneurs en ascorbate, lycopène et β -carotène et une diminution de celles en ascorbate oxydé et chlorophylle (Gautier *et al.* 2008). De la même manière, l'utilisation de diodes électroluminescentes (LED) au niveau des feuilles inférieures d'un plant de tomate a permis une augmentation du rendement en hiver, et de la teneur en solides solubles et en ascorbate du fruit (Tewolde *et al.* 2016). Chez le raisin, une diminution de l'intensité lumineuse sur la vigne retarde la croissance du fruit ainsi que son ramollissement et sa coloration (Dokoozlian et Kliewer 1996), elle réduit également les teneurs en hexoses, anthocyanes et composés phénoliques.

L'utilisation de paillis permet d'augmenter l'intensité lumineuse ou la température des sols selon la couleur. Dans le but d'améliorer le rendement et la qualité de l'aubergine (Boo *et al.* 2010), l'utilisation d'un paillis réfléchissant, a induit un taux plus élevé de photosynthèse, et permis une augmentation de la teneur en sucres totaux dans le fruit. L'analyse des capacités des enzymes associées, SPS et SUSY a également montré une activité plus forte dans les fruits avec l'utilisation du paillis. Enfin, les augmentations de la teneurs en hexoses et amidon en corrélation avec l'augmentation de l'activité de la sucrose synthase et diminuent la teneur en saccharose (Rosales *et al.* 2007). Peu de variations sont observées pour les activités des invertases acide et neutre. Ceci est en accord avec une autre étude qui démontre que les profils temporels des activités enzymatiques des fruits de tomate répondent peu à la diminution de l'intensité lumineuse ou à une limitation en eau modérée (Biais *et al.* 2014).

Les fertilisants et/ou biostimulants sont des facteurs clés des conduites de cultures, notamment grâce à de nouvelles approches (Serrano *et al.* 2010). L'utilisation d'un mélange de composés phénoliques NPLs (para et ortho nitrophénolate de sodium et nitrogaïacol de sodium) sur le poivron a permis d'augmenter le poids du fruit sans affecter le processus de maturation, la couleur et la teneur en caroténoïdes. En revanche, les teneurs en glucose, fructose, ascorbate, citrate, composés phénoliques et activité antioxydante totale ont été améliorées par le traitement. La pulvérisation foliaire de biostimulants naturels, la phytohormone brassinolide (« Milagrow ») provenant de grains de pollen de *Brassica napus* et d'extrait de levures (*Saccharomyces cervisiae*) sur les arbres fruitiers tels que l'oranger (El-Boray *et al.* 2015) permet d'augmenter le rendement et de diminuer la chute des fruits. En effet, ces substances présentent de nombreux avantages liés à leur teneur en nutriments, en certains acides aminés et en régulateurs de croissance naturels. Elles permettent entre autre de réduire les teneurs en acidité dans le fruit et ainsi d'en améliorer la qualité.

L'utilisation de porte-greffe qui sert parfois à limiter la vigueur des espèces fruitières ligneuses pérennes, permet de conférer aux fruits et aux plantes annuelles des propriétés de résistance à certains stress. Cette utilisation a induit une augmentation du rendement, de la biomasse et de la qualité du fruit chez la tomate cerise sous stress hydrique (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2012) ou encore chez le concombre sous stress salin (Huang *et al.* 2009). La mise à profit de la collaboration entre les végétaux et de nombreux organismes du sol est également l'une des stratégies utilisées pour l'amélioration du rendement et de la qualité des fruits. En effet, l'inoculation de certaines plantes réceptives par des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA) permet d'améliorer l'apport en nutriments et en eau par une extension de leur système racinaire. Cette inoculation a notamment permis d'augmenter le rendement et la teneur en acide ascorbique chez le piment vert (Bagyaraj et Sreeramulu 1982). L'inoculation de plants de tomates a permis d'augmenter la teneur en glucose, fructose et malate dans le fruit et donc sa qualité gustative (Copetta *et al.* 2011).

Nous avons vu que les limitations en carbone et autres ressources pouvaient affecter directement la croissance du fruit et sa composition, mais également que les deux métabolismes primaire et spécialisé répondaient aux différents traitements. En fonction des valeurs choisies pour chacun des paramètres de conduite de culture comme la limitation en eau, le stress salin, la charge en fruit, la température, l'intensité lumineuse et les biostimulants, ceux-ci, peuvent avoir un impact bénéfique sur le rendement et la qualité des fruits. De plus, la réponse à l'environnement peut impliquer des régulations épigénétiques.

La plupart des études décrites dans les paragraphes précédents se focalisent sur une seule espèce et les comparaisons se limitent à différentes variétés ou génotypes. Pourtant des différences existent entre les espèces en termes de composition en sucres, en acides organiques ou acides aminés ou encore en termes de stratégie de transport et de stockage des métabolites. De nouvelles stratégies émergent pour comparer plusieurs espèces afin de mieux comprendre la régulation du métabolisme (Annexe 1).

V. Objectifs des travaux de thèse

Nous avons vu que les fruits charnus font l'objet d'une recherche intense et que de nombreux mécanismes impliquant le métabolisme ont été proposés et certains démontrés. Nous avons également vu que la tomate, devenue l'espèce modèle des fruits charnus, monopolise toujours plus l'attention des chercheurs. La transposition des outils et des résultats obtenus à d'autres espèces n'est pas forcément évidente, notamment en raison d'une très probable non-interopérabilité des données. Il semblait donc pertinent de mener des études qui permettraient de directement comparer plusieurs espèces possédant des caractères contrastés, afin de dégager des principes généraux qui pourraient mener à une meilleure compréhension du métabolisme des fruits, la manière dont il est programmé, et à terme de nouvelles pistes pour l'amélioration des fruits.

Ce projet de thèse vise à décrire le métabolisme primaire et sa régulation au cours du développement de huit espèces de fruit contrastées en termes de goût (sucrosité, acidité..), de qualités nutritionnelles (pouvoir antioxydant, vitamines...), de durée de croissance et sujettes ou non à une crise respiratoire au début de la maturation.

- Le premier objectif de ces travaux est la récolte des fruits au cours du développement et la préparation de l'ensemble des échantillons dans des conditions cryogéniques sur les huit espèces fruitières, ainsi que la collecte d'informations relatives à la croissance de l'ensemble des fruits. Nous verrons par la suite que l'ensemble de ces données a été utilisé à des fins de comparaison inter-espèces ainsi que pour la modélisation de la croissance puis le calcul du taux relatif de croissance.
- Le deuxième objectif est l'adaptation de l'ensemble des méthodes d'analyses qualitatives et quantitatives de composés et d'activités enzymatiques mise au point

sur la tomate à d'autres espèces fruitières. Des mises au point pour l'ensemble des espèces ont dû être réalisées avant l'analyse de l'ensemble des échantillons ou d'un choix d'espèces.

- Le troisième objectif est de réaliser une comparaison inter-espèces sur la base de la composition de la biomasse du tissu charnu du fruit. Pour cela, une standardisation des stades de développement basée sur la croissance est proposée afin d'affiner les comparaisons. C'est à travers un panel d'analyses statistiques que les profils de composition pour chaque espèce sont investigués. Nous chercherons alors à savoir si, sur cette simple base de composition de biomasse, il est possible de séparer des groupes d'espèces, comme les espèces arbustives des herbacées, ou encore les fruits climactériques des fruits non climactériques. De la même manière nous chercherons à dégager des principes généraux qui relient la croissance du fruit et sa composition.
- Enfin, le quatrième objectif de cette thèse est de réaliser la comparaison de la régulation du métabolisme entre les fruits de deux Solanacées, le poivron et l'aubergine. Nous chercherons alors à valider ou invalider les connaissances sur la régulation du métabolisme au cours du développement du fruit déjà acquises sur la tomate considérée comme un modèle pour les fruits charnus.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

- I. Conduite de culture des espèces et plan expérimental
- 1. Fruits et variétés sélectionnées et leur conduite de culture

L'étude a été réalisée sur 9 espèces de fruits, la tomate (Solanum lypcoercicum L. cv Moneymaker), le poivron (Capsicum annuum L. cv Gonto Clause), l'aubergine (Solanum melongena L. cv Monarca RZ), la pêche (Prunus persica L. cv Nectarlove), la pomme (Malus x domestica Borkh. cv Golden), le concombre (Cucumis sativus L. cv Aljona), le kiwi (Actinidia deliciosa Chev. cv Hayward), le raisin (Vitis vinifera L. cv Cabernet Sauvignon) et la clémentine (Citrus clementing hort. cv SRA 63). Une variété a été choisie par espèce, la plupart étant d'intérêt économique ou des modèles pour la recherche (e.q. pêche). Les cultures ont été réalisées en France, dans le Centre d'essais INVENIO à Sainte Livrade (Lot-et-Garonne) pour la tomate, l'aubergine, le poivron et dans un verger commercial proche de ce Centre pour le kiwi, à l'INRA de Valence (Drôme) pour la pomme, à l'INRA d'Avignon (Vaucluse) pour la pêche, au CTIFL à Carquefou (Loire Atlantique) pour le concombre, à l'INRA de Bordeaux dans la serre de l'EGFV (Gironde) pour le raisin et à l'INRA de Corse pour la clémentine (Figure 9). Les fruits ont été récoltés en 2016, excepté pour la tomate, issue d'une précédente expérience menée en 2010. Les modes de culture utilisés sont les plus courants au niveau de la production sauf pour le concombre où le système de culture est en cours d'adaptation et le raisin où des systèmes expérimentaux (boutures fructifères) sont utilisés. Les données concernant la conduite de culture de l'ensemble des fruits sont regroupées dans le Tableau IV.



Figure 9 : Photographie de six cultures réalisées au cours de l'année 2016.

En serre pour l'aubergine, le raisin et le concombre (INVENIO, INRA de Bordeaux EGFV, CTIFL), en tunnel pour le poivron (INVENIO), et en verger (proche d'INVENIO et INRA de Corse) pour le kiwi et la clémentine au cours de l'année 2016

2. Plan d'expérience, échantillonnage des fruits et conservation

Afin de réaliser l'étude de la composition et de la régulation du métabolisme primaire chez les fruits, au moins neuf stades de développement ont été prélevés pour chaque espèce depuis l'anthèse, moment de la fécondation des ovules (aubergine, poivron, concombre et kiwi) ou de très jeunes stades après floraison (pomme, pêche, raisin et clémentine), à la maturité physiologique c'est-à-dire au moment où le développement du fruit arrive à son terme, excepté pour le concombre (maturité commerciale). Pour chaque stade, cinq réplicas biologiques (excepté pour les premiers stades de la pêche) ont été collectés avec un minimum de quatre fruits par réplica (excepté pour le concombre). Les données concernant l'échantillonnage et les tissus récoltés sont regroupées dans le Tableau V. Un total de 455 échantillons a été obtenu pour l'ensemble des espèces. Avant la découpe des fruits et la congélation dans l'azote liquide, les fruits ont rapidement été mesurés et pesés afin de suivre le développement de chaque espèce. L'opération de mesure et de découpe s'est faite très rapidement afin de rester au plus proche de métabolisme du fruit sur le plant. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C.

Tableau IV : Ensemble des données concernant les espèces étudiées et leur conduite de culture

Espèce	Variété	Site	Type de serre (verre/plasti que)/ verger	Densité	Age des arbres	Date de plantation	Date de floraison	Type de sol/ Substrat	Irrigation	Fertilisation
Aubergine	Monarca RZ	INVENIO Ste Livrade	Serre plastique double paroi	1,2 plant/m ²	-	10/03/2016 (semis 80 j avant-greffe) greffée sur PG KNVF	05/04/2016	Fibre de coco	Goutte à goutte: déclenchement cyclique (toutes les 60 à 80 min de 8h30 à 17h30 environ) et par solarimètre (qui rajoute des irrigations si fort rayonnement et cycle peut descendre à 25 min si faible rayonnement) durée d'irrigation de 6 à 7 min avec débit goutteurs de 2 l/h et 5 goutteurs/ 3 plants	Dans le circuit d'irrigation conductivité EC de 2,5 mS/cm en début de culture et de 2 mS en pleine récolte
Clémentine	SRA 63	INRA Corse	Verger	6m x 4m	35 ans	19/03/1981 porte-greffe Poncirus trifoliata	03/05/2016	Sol fersialitique à texture sablo-limoneuse	Arrosage par aspersion sous feuillage selon les pratiques culturales commerciales en utilisant le bilan hydrique. 397 mm fournis entre le 30/05/2016 et le 13/09/2016, espacés d'environ 2 semaines, 20 mm à 47 mm chacun	Ammonitrate 33% Avril : 270 kg Juillet : 140 kg Août : 140 kg
Concombre	Aljona	CTIFL Nantes	Serre en verre chauffée	1.25 plant/m ²	-	15/06/2016	Ssemaine 27 en 2016	Laine de roche	Irrigation goutte à goutte sur le contrôle du solarimètre	
Kiwi	Hayward	INVENIO Ste Livrade	Verger	500 arbres /ha (5 m entre lignes et 4 m entre les arbres sur la ligne)	18 ans	2000	Semaines 20-21 de 2016	Sol limono-sableux	Aspersion sur frondaison pour lutte anti-gel si besoin - Brumiseurs sous frondaison pour irrigation : pilotage par sondes enterrées	Février : 2 t/ha engrais organique (2-0,5- 1) Courant printemps/été : 6 apports de 50 kg/ha/semaine de nitrate de potasse (13-0-46) par ferti-irrigation

Espèce	Variété	Site	Type de serre (verre/plasti que)/ verger	Densité	Age des arbres	Date de plantation	Date de floraison	Type de sol/ Substrat	Irrigation	Fertilisation
Pêche	Nectar love	INRA Avignon	Verger	571 arbres/ha (distance de plantation 5 m x 3.5 m)	4 ans	plantation en 2013 de scions avec bourgeon à œil dormant, porte-greffe GF677	15/03/2016	Sol homogène, limon argilo-sableux. Profondeur d'enracinement d'environ 75-90 cm	0, 1 ou 2 par semaine au printemps et 3 fois par semaine en été, irrigation pendant 6 à 7 h au printemps et 4 h en été	120 kg d'azote/ha; 22,5 kg de P ₂ O ₅ /ha et 45 kg de K ₂ O/ha
Poivron	Gonto Clause	INVENIO Ste Livrade	Tunnel plastique 8 m	1,8 plant/m ²	-	20/04/16 (semis 70 j avant)	15/05/2016	Sol limono-sableux	Goutte à goutte 2 à 3 irrigations par j de 15-20 min avec débit de 4,5 mm/h/m ²	en fond + en goutte à goutte (90 U d'N)
Pomme	Golden	INRA Valence	Verger	1000 arbres /ha (distance de plantation 5 m x 2 m)	11 ans	plantation en janvier 2005 de scions âgés d'un an	18/04/2016	Sol homogène, sablo- limoneux, peu profond et caillouteux provenant d'anciens sédiments érodés. Profondeur d'enracinement d'environ 40 cm	Système d'irrigation : micro- aspersion	45 kg d'azote/ha; 50 kg de P2Os/ha et 65 kg de K2O/ha
Raisin	Cabernet Sauvignon	EGFV INRA Bordeaux	Serre en verre	10 cm x 10 cm	-	09/02/2016	05/05/2016	Sable : perlite : vermiculite (1:1:1 ; v:v:v)	5 fois par j pendant 2 min, pleinement irrigué	solution nutritive (en mM ; 1,20 N, 0,57 P, 1,75 K, 1,23 Ca, 0,69 Mg, 1,27 Cl, 0,99 S, plus les micronutriments standards)
Tomate	Moneymak er	INVENIO Ste Livrade	Serre en verre	2 plant/m ²	-	30/04/10 (germination) (transfert des semis le 4 juin 2010)		Laine de roche	volume d'eau adapté au climat	solutions nutritives distribuées par un système goutte à goutte.

Tableau V : Données d'échantillonnage des espèces fruitières.

Avec la durée de développement en jours après anthèse (JAA), les stades sélectionnés, le nombre de fruits par réplica et le tissu échantillonné. (ND : non dénombré, > ou = 4 selon les stades pour le raisin)

Espèce		Poivron (Capsicum annuum)			Aubergine (Solanum melongena)			Pêche (Prunus persica)			Pomme (Malus domestica)		
Famille	è			Solanace	eae						Rosaceae		
Durée de développement (JAA)		75			80			135			160		
		Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés
	1	0	60	Fruit entier	0	20	Fruit entier Mésocarpe sans peau	22 (3 réplicas)	100	Fruit entier	2	100	Fruit entier
	2	5	30		4	12		24 (2 réplicas)	50		16	40	Fruit entier sans peau
	3	9	7		7	5		41	20	Fruit entier sans peau	32	10	
	4	10	5		10	5		56	10	Mésocarpe sans peau, sans noyau : mésocarpe	45	5	Péricarpe sans peau
	5	15	4	Péricarpe	15	5		70	5		63	5	
Stades	6	20	4		18	5		86	5		80	5	
sélectionnées	7	30	4		21	5		98	5		94	5	
	8	40	4		25	4		106	5		108	5	
	9	63	4		30	4		122	5		122	5	
	10	76	4		40	4		133	5		136	5	
	11				59	5					147	5	
	12										157	5	

Espèce		Raisin (Vitis vinifera)			Clémentine (Citrus clementina)			Kiwi (Actinidia deliciosa)			Concombre (Cucumis sativus)		
Famille	•		Vitaceae			Rutaceae	2		Actinidiaced	ae		Cucurbita	ceae
Durée de développement (JAA)		110			255		220			30			
		Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés	Stade (JAA)	Nombre de fruits	Tissus analysés
	1	4	ND		23	10	Fruit entier	0	15		0	10	
	2	8	ND	Fruit entier Mésocarpe sans peau, sans pépin : mésocarpe	30	10	Fruits pelés	13	6	Fruit entier	2	8	
	3	14	ND		50	15	Endocarpe sans peau avec albedo Endocarpe sans peau sans albedo, sans pépin Vésicules de jus	26	5	Mésocarpe sans peau sans graine	5	4	
	4	21	ND		63	5		39	5		8	3	
	5	28	ND		77	15		55	5		12	3	Péricarpe sans peau
	6	35	ND		97	10		76	5		14	3	
	7	42	ND		119	10		95	5		18	5	
Stades	8	49	ND		139	5		118	5		25	3	
sélectionnées	9	56	ND		160	5		147	5		29	2	
	10	63	ND		190	5		179	5				
	11	69	ND		218	5		206	5				
	12	77	ND		253	5		222	5				
	13	84	ND										
	14	91	ND										
	15	98	ND										
	16	105	ND										

3. Broyage des échantillons

Chaque échantillon contenu dans un tube à scintillation (Polyvials V, Natural high density polyethylene, 20 ml) a été broyé en conditions cryogéniques (N₂ liquide) à l'aide de la station Genogrinder 2010 Mixer Mill à 30 Hz pendant 45 s. L'opération a été répétée 2 à 3 fois en fonction des échantillons. Avant broyage, trois billes acier/inox de 5 mm de diamètre ont été insérées dans chaque tube à scintillation. Les poudres ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses ciblées ou des mesures d'activités enzymatiques ou la lyophilisation.

4. Lyophilisation des échantillons

Les poudres ont été lyophilisées sous vide suivant des paliers de température pendant une durée de cinq jours. Le premier jour entre 1 et 2.5 g de poudre de chaque échantillon sont placés dans le lyophilisateur (FTS Systems Dura Stop/Dura Dry MP Freeze Dryer) à -30°C, le deuxième jour la température est augmentée à -20°C, le troisième à -10°C, le quatrième à 0°C et le dernier à 22°C. . Les poudres lyophilisées ont ensuite été placées à l'abri de la lumière et de l'humidité à -20°C avant la réalisation des analyses des composés solubles par RMN et de celles des sucres des parois par chromatographie échangeuse d'anion à haute performance couplée à une détection ampérométrique pulsée.

- II. Analyses biochimiques ciblées de composés par spectrophotométrie UV-visible
 - 1. Extraction des composés pour dosage ciblé par spectrophotométrie UV-visible
 - a. Fractionnement éthanolique pour l'analyse de composés ciblés à haut débit

Pour la quantification absolue du glucose, du fructose, du saccharose, du sorbitol, du citrate, du malate, de la proline, des acides aminées totaux, de l'amidon et des protéines solubles des aliquotes de 20 mg de matière fraîche ont été extraits en adaptant un protocole de fractionnement éthanolique (Sonnewald *et al.* 1991). Ils ont été pesés dans des conditions cryogéniques, randomisés sur des roboracks (Micronic, 1,1 ml) et extraits de manière robotisée (station de pipetage Star 96 ML 6649 Hamilton).

Les échantillons ont tout d'abord été extraits dans une solution de tampon HEPES/KOH à 10 mM pH 6 contenant 80% d'éthanol (EtOH, 80:20, v/v) pendant 20 min à 80 °C. Les extraits ont ensuite été centrifugés 5 min à 2916 *g* (Centrifuges 5810R, Eppendorf), le premier surnageant (S1) a été transféré dans un nouveau tube Micronic et stocké à 4 °C à l'abri de la lumière. La seconde extraction a été réalisée sur le culot en ajoutant 150 μ l de la même solution, l'extrait a été incubé à 80°C pendant 20 min. Après centrifugation, le second surnageant (S2) a été ajouté à S1 et conservé à 4°C à l'abri de la lumière. Une troisième et dernière extraction a été réalisée sur le culot par ajout de 250 μ l d'une solution de tampon HEPES/KOH pH 6 contenant 50% d'EtOH (50:50, v/v), l'extrait a été incubé à 80 °C pendant 20 min. Après centrifugation le troisième surnageant (S3) a été ajouté aux deux autres (S1 + S2). Les surnageants (S1+S2+S3) ainsi que les culots ont été stockés à -20 °C en attendant l'analyse des métabolites, de l'amidon et des protéines solubles.

b. Extraction acide pour l'analyse de l'ascorbate total et réduit

Pour l'analyse de l'ascorbate (Gillespie et Ainsworth 2007), des aliquotes de 20 mg de matière fraîche pour le poivron, le kiwi et la clémentine, 50 mg de matière fraîche pour l'aubergine, la pomme, la pêche et le raisin, et 100 mg de matière fraîche pour le concombre ont été pesées dans des tubes Micronic et extraites dans 400 μ l d'acide phosphorique à 5% (H₃PO₄, 5:95, v/v). Les échantillons ont été mélangés à l'aide du broyeur Tissue Lyser II et centrifugés pendant 25 min à 2916 *g* (Centrifugeuse 5810R, Eppendorf) à 4°C. Les surnageants ont été utilisées immédiatement pour le dosage de l'ascorbate.

2. Dosage ciblé des métabolites, amidon et protéines solubles par spectrophotométrie UV-visible

Après optimisation des dosages des métabolites, des protéines totales solubles et de l'amidon, les dilutions pour chacun ont été déterminées et les volumes prélevés pour chaque dosage sont retranscrits dans le Tableau VI ci-dessous.

Volume d'extrait (μl)	Glucose	Fructose	Saccharose	Sorbitol	Citrate	Malate
Aubergine	10	10	10	-	30	10
Poivron	5	5	5	-	50	20
Pomme	1	1	1	5	50	2
Pêche	1	1	1	5	30	5
Kiwi	5	5	5	-	10	5
Concombre	10	10	10	-	50	10
Clémentine	5	5	1	-	15	10
Raisin	0.5	0.5	0.5	-	50	1

Tableau VI : Volume d'extrait utilisé pour la quantification des métabolites, des protéines solubles et de l'amidon pour chaque espèce fruitière.

Volume d'extrait (μl)	Proline	Acides aminés libres totaux	Protéines solubles	Amidon	Ascorbate
Aubergine	-	4	15	10	30
Poivron	-	4	15	10	20
Pomme	-	2	10	10	30
Pêche	-	4	10	10	50
Kiwi	-	4	10	10	20
Concombre	-	2	15	20	20
Clémentine	100	4	10	10	20
Raisin	100	2	15	40	50

a. Dosages des hexoses

Les sucres solubles (Figure 10) (glucose, fructose et saccharose) (Stitt *et al.* 1989) ont été mesurés par le couplage des réactions enzymatiques hexokinase (HK), phosphoglucose isomérase (PGI), invertase et glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et l'apparition associée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH).



Figure 10 : Principe du dosage des hexoses.

Dans un premier temps, le glucose est mesuré *via* les réactions catalysées par l'HK et la G6PDH qui conduisent à la formation de NADPH détectable à 340 nm. La PGI est ensuite ajoutée dans le mélange pour la mesure du fructose. Enfin, l'invertase est ajoutée dans le mélange pour la mesure du saccharose.

En microplaque, entre 0,5 et 10 μ l d'extrait éthanolique, selon les fruits (Tableau VI), ont été ajoutés à un mélange contenant 0,1 M d'une solution de tampon HEPES/KOH à pH 7 avec 3 mM de chlorure de magnésium (MgCl2), 3 μ M d'adénosine triphosphate (ATP), 1,4 μ M de NADP⁺, 3,4 u/ml de G6PDH grade II et 1% de polyvinylpyrrolidone (PVP) (m/v). Une première mesure du blanc réactionnel a été effectuée à 340 nm, ensuite 1 μ l d'HK à 900 u/ml a été ajouté au mélange pour la mesure du glucose, puis 1 μ l de PGI à 1050 u/ml pour la mesure du fructose, enfin 1 μ l d'invertase à 1000 u/ml pour la mesure du saccharose. Avant chaque ajout d'enzyme, le plateau de la densité optique (DO) doit être atteint et la différence de DO entre deux plateaux consécutifs (Δ DO) est calculée. Enfin, pour calculer la quantité de NADPH dans chaque puits la formule suivante est utilisée :

$$NADPH \ (\mu mol) = \frac{\Delta OD_{340nm}}{l' \times \varepsilon}$$

avec ε , le coefficient d'extinction de NADPH à 340 nm, ε = 6,22 mmol.l⁻¹.cm⁻¹ et « l' » la longueur du chemin optique dans un puits, l'= 2850 cm.l⁻¹.

b. Dosage du sorbitol

Le sorbitol a été mesuré en utilisant une sorbitol déshydrogénase (SDH) et l'apparition associée de NADH (Figure 11).



Figure 11 : Principe du dosage du sorbitol.

Le sorbitol est mesuré *via* la réaction catalysée par SDH associée à la formation de NADH détectable à 340 nm.

En microplaque, cinq μ l d'extrait éthanolique (Tableau VI) ont été ajouté à un mélange contenant 0,1 M de tampon Tris à pH 9,5, 1 mM de NAD et 1% de PVP (m/v). Une première mesure du blanc réactionnel a été effectuée à 340 nm, ensuite 1 μ l de SDH à 100 u/ml a été ajouté au mélange pour la mesure du sorbitol. Le Δ DO entre les deux plateaux a été calculée. La même formule que pour le NADPH (Part. II.2.a) a été utilisée pour calculer la quantité de NADH dans le puits.

c. Dosage du malate

Le malate a été mesuré en utilisant la malate déshydrogénase (MDH). En présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), le malate est oxydé en oxaloacétate dans une réaction catalysée par la MDH avec production de NADH (Mollering 1985) (Figure 12).

Entre 1 et 20 µl d'extrait éthanolique, (Tableau VI) ont été dilués sur microplaques dans un mélange contenant 0,1 M d'une solution de tampon Tricine/KOH à pH 9, 3 mM de NAD, 0,6% de triton X100 (v/v), 0,3 mM d'acétyl-CoA, 1 u/ml de CS et 1% de PVP (m/v). Une première mesure du blanc réactionnel a été effectuée à 340 nm, ensuite 1 µl de MDH à 6000 u/ml a été ajouté au mélange pour la mesure du malate. Le Δ DO entre les deux plateaux a été calculée. La même formule que pour le NADPH (Part. II.2.a) a été utilisée pour calculer la quantité de NADH dans le puits.



Figure 12 : Principe du dosage du malate

Le malate est mesuré *via* la réaction catalysée par la MDH qui conduit à la formation de NADH détectable à 340 nm. Cette réaction est couplée à la catalyse de l'oxaloacétate par la CS pour former du citrate et du coenzyme A (CoA) afin de déplacer l'équilibre de la première réaction

d. Dosage du citrate

Le citrate a été mesuré par le couplage des réactions entre la citrate lyase (CL), la MDH, la lactate déshydrogénase (LDH) et la disparition associée de NADH (Tompkins et Toffaletti 1982) (Figure 13).

Entre 10 et 50 µl d'extrait éthanolique (Tableau VI), ont été dilués sur microplaques dans un mélange contenant 0,05 M d'une solution de tampon Tricine/KOH à pH 8, 0,5 mM de NADH, 0,1 mM de sulfate de zinc (ZnSO₄), 9 u/ml de MDH, 0,4 u/ml de LDH et 1% de PVP (m/v). Une première mesure du blanc réactionnel a été effectuée à 340 nm, ensuite 1 µl de CL à 14 u/ml a été ajouté au mélange pour la mesure du citrate. Le Δ DO entre les deux plateaux a été calculée et la quantité de NADH dans le puits déterminée à partir de la formule détaillée dans le paragraphe II.2.a.



Figure 13 : Principe du dosage du citrate

Le citrate est transformé en oxaloacétate par la réaction catalysée par la citrate lyase et est mesuré par le couplage entre le NADH et la MDH et la LDH associé à la disparition de NADH détectable à 340 nm.

e. Dosage de la proline

A pH acide, la ninhydrine, un révélateur d'acides aminés, réagit presque spécifiquement avec la proline en donnant un chromogène rouge. Pour mesurer la quantité de proline (Carillo et Gibon 2016), 100 μ l d'extrait éthanolique (Tableau VI) ont été mélangés avec 100 μ l de réactif ninhydrine qui se compose d'un mélange de 1% (m/v) de ninhydrine dans l'acide acétique à 60% (v/v) et 20 % d'éthanol (v/v). Le mélange a été chauffé à 95 °C pendant 20 min à l'abri de la lumière, refroidi, centrifugé et transféré sur microplaque pour une lecture immédiate à 520 nm. La quantité de proline a été calculée grâce à une courbe de calibration allant de 0 à 200 nmol/puits.

f. Dosage des acides aminés libres totaux

Pour mesurer la quantité d'acides aminés libres totaux (Udenfriend *et al.* 1972), entre 2 et 4 μ l d'extrait éthanolique en microplaque (Tableau VI), ont été ajoutés à un mélange contenant 7,5 mM d'une solution de tampon borate de sodium à pH 8 et 0,045 % de fluorescamine dilué dans l'acétonitrile (m/v). Après 5 min d'incubation à température ambiante la fluorescence a été mesurée avec une excitation à 405 nm et une émission à 485 nm. La quantité d'acides aminés totaux a été calculée grâce à une courbe de calibration du glutamate allant de 0 à 5 nmol/puits.

g. Dosage des protéines totales solubles

La teneur en protéines solubles a été mesurée à l'aide du bleu de Coomassie (Bradford 1976). Dans un premier temps, les protéines ont été extraites à partir du culot de l'extraction éthanolique. Pour ce faire, 400 μ l d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 0,1 M ont été ajoutés, les tubes ont été vigoureusement mélangés et chauffés à 95°C pendant 30 min. Ils ont ensuite été refroidis et centrifugés à 2916 g (Centrifuges 5810R, Eppendorf) pendant 5 min. Enfin, 10 à 15 μ l de surnageant (Tableau VI) ont été ajoutés à 180 μ l d'un mélange de Bradford dilué 5 fois (Sigma-Aldrich). Après 5 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la DO a été lue à 595 nm. La quantité de protéines solubles totale a été calculée grâce à une courbe de calibration d'albumine de sérum bovin (BSA) allant de 1 à 10 μ g/puits.

h. Dosage de l'amidon

L'amidon a été mesuré à partir du culot de l'extraction éthanolique repris dans une solution de NaOH 0,1 M (Hendriks 2003). Entre 10 et 40 μ l de surnageant (Tableau VI) ont été ajoutés à un mélange d'acide chlorhydrique (HCl) 0,5 M, d'acétate de sodium à 0,1 M ajusté à pH 4,9 (à l'aide d'une solution de NaOH), de l' α -amylase à 100 u/ml et de l'amyloglucosidase à 140 u/ml. L'extrait a été incubé à 37°C pendant 16 h. Le dosage du glucose a ensuite été réalisé de la même manière que décrit dans le paragraphe II.2.a.

i. Dosage de l'ascorbate

Pour la mesure de l'ascorbate total et réduit (Gillespie et Ainsworth 2007), entre 20 et 50 µl d'extrait acide (Tableau VI) ont été dilués dans 20 µl de dithiothréitol (DTT) à 5 mM pour l'ascorbate réduit et dans 20 µl de tampon phosphate pH 7,4 à 0,4 M pour l'ascorbate total. Après 20 min d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière, 10 µl de N-éthylmaléimide (NEM) à 0,5% (m/v) ont été ajoutés pour l'ascorbate réduit et 10 µl de tampon phosphate pH 7,4 à 0,4 M pour l'ascorbate pH 7,4 à 0,4 M pour l'ascorbate total. Après 1 min d'incubation à l'abri de la lumière, 80 µl d'un mélange contenant de l'acide phosphorique à 15% (m/v), du chlorure ferrique à 0,6% (m/v) et du 2,2-bipyridyl à 4% (m/v) ont été ajoutés. Les échantillons ont été incubés pendant 40 min à 37°C puis la lecture a été faite à 545 nm. La quantité d'ascorbate a été calculée grâce à une courbe de calibration allant de 0 à 70 nmol/puits.

- 3. Extraction robotisée et détermination des capacités enzymatiques
 - a. Extraction des enzymes solubles

L'extraction des enzymes solubles a été réalisée à partir de 20 mg de matière fraiche (Biais *et al.* 2014; Bénard et Gibon 2016) d'aubergine et de poivron. A cette masse, a été ajoutée une spatule de PVPP (environ 20 mg)pour neutraliser les polyphénols qui pourraient inactiver certaines enzymes, 500 μ L d'un mélange contenant 20% de glycérol (v/v) qui favorise les interactions protéines-protéines et participe à la stabilité des enzymes, 0.25% de BSA (v/v) qui joue le rôle de protecteur et évite les interactions d'enzymes d'intérêts avec d'autres composés, 1 % de triton (v/v), un détergent non ionique utilisé pour solubiliser les protéines membranaires, 50 mM d'une solution tampon HEPES/KOH à pH 7,5, 10 mM de MgCl₂ utilisé pour maintenir une force ionique proche de celle *in vivo*, 1 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), 1 mM d'acide egtazique (EGTA) qui jouent le rôle de

d'inhibiteurs de métalloprotéase en chélatant les ions métalliques, des inhibiteurs de protéases (1 mM d'acide ε -aminocapronique, 1 mM de benzamidine, 10 mM de leupeptine) et 0,5 mM de DTT. Après un mélange bref mais vigoureux, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 2916 *g* (centrifugeuse 5810R, Eppendorf) à 4°C. Pour extraire l'invertase acide pariétale, 500 µl du même tampon d'extraction avec 250 mM de sorbitol ont été ajoutés au culot, les extraits ont été vigoureusement mélangés et centrifugés comme précédemment. Les invertases acide et neutre nécessitent une étape de « dessalage » de l'extrait au préalable. Celui-ci a été réalisé sur des colonnes de résine Sephadex G-25 préalablement conditionnées avec une solution de tampon contenant 50 mM d'HEPES/KOH pH 7,5 et 0,1% (v/v) de triton. Quatre-vingt µl d'extrait ont été ajoutés sur la microplaque, centrifugés pendant 1 min à 117 *g* (centrifugeuse 5810R, Eppendorf) et récupérés. L'ensemble des surnageants contenant les enzymes ont alors été dilués et conservés dans la glace avant la mesure soit directe soit indirecte des enzymes (Annexe 2).

b. Détermination des capacités enzymatiques : dosage direct

Un dosage continu (Biais *et al.* 2014; Bénard et Gibon 2016) a été utilisé pour mesurer les capacités enzymatiques des enzymes suivantes : CS (EC 2.3.3.1), G6PDH (EC 1.1.1.49), NAD-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (EC 1.2.1.12), NADP-isocitrate déshydrogénase (IDH) (EC 1.1.1.41), NAD/NADP-MDH (EC 1.1.1.37; EC 1.1.1.82), NADP-enzyme malique (ME) (EC 1.1.1.38), invertase neutre (NI) (EC 3.2.1.26), phosphoé*nol*pyruvate carboxylase (PEPC) (EC 4.1.1.31), PGI (EC 5.3.1.9), phosphoglycérokinase (PGK) (EC 2.7.2.3), PGM (EC 5.4.2.2), pyruvate kinase (PK) (EC 2.7.1.40), triose phosphate isomérase (TPI) (EC 5.3.1.1) et UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) (EC 2.7.7.9), à partir de 5 µl d'extrait introduits dans différents mélanges avec un volume final de 100 µl. L'absorbance a été mesurée à 340 nm excepté pour la CS qui a été mesurée à 418 nm. Le principe des dosages est explicité Figure 14.

Pour mesurer l'activité de la CS, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8,5, contenant 0,4 mM d'oxaloacétate pour l'activité totale et 0,1 mM d'acide 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoïque) (DTNB) pour l'isoforme mitochondriale. Après une incubation de 5 min, 0,1 mM de DTNB a été ajouté pour l'activité totale et 0,2 mM d'oxaloacétate pour l'isoforme mitochondriale. La réaction a été démarrée par l'ajout d'acétyl-CoA à 0,4 mM.

Pour mesurer l'activité de la G6PDH, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8,5, contenant 10 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,5 mM de NADP. La réaction a été démarrée par l'ajout de glucose-6-phosphate (G6P) à 25 mM.

Pour mesurer l'activité de la NAD-GAPDH, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 30 mM de MgCl₂, 20 mM de chlorure de potassium (KCl), 2 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,6 mM de NADH, 5 mM d'ATP, 0,5 mM de DTT, 10

u/ml de PGK et 1 u/ml de PGI. La réaction a été démarrée par l'ajout de 3-phosphoglycérate (3PGA) à 4 mM.

Pour mesurer l'activité de la NADP-IDH, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 8 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de triton X100 et 10 mM de NADP. La réaction a été démarrée par l'ajout d'isocitrate à 10 mM.

Pour mesurer l'activité de la NADP-MDH, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 180 mM de KCl, 0,5% (v/v) de triton X100 et 150 mM de DTT. Après une incubation de 120 min, 0,1 mM d'EDTA et 0,5 mM de NADPH ont été ajouté. La réaction a été démarrée par l'ajout d'oxaloacétate 1,2 mM.

Pour mesurer l'activité de la NAD-MDH, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 0,1 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton et 1,2 mM de NADH. La réaction a été démarrée par l'ajout d'oxaloacétate à 1,2 mM.

Pour mesurer l'activité de la NADP-ME, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon HEPES/KOH 50 mM pH 7,5, contenant 3 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de triton X100, 2 mM de NAPD⁺, 5 mM de DTT et 0,1mM de CoASH. La réaction a été démarrée par l'ajout de malate 2 mM.

Pour mesurer l'activité de l'invertase neutre, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon HEPES/KOH 50 mM pH 7,5, contenant 2 mM de MgCl₂, 2 mM d'ATP, 0,4 mM de NADP⁺, 1 u/ml de G6PDH, 1 u/ml d'HK et 1 u/ml de PGI. La réaction a été démarrée par l'ajout de saccharose 20 mM.

Pour mesurer l'activité de la PEPC, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 20 mM de MgCl₂, 10 mM de bicarbonate de sodium (NaHCO₃), 0,05% (v/v) de triton X100, 0,6 mM de NADH et 10 u/ml de MDH. La réaction a été démarrée par l'ajout de phosphé*nol*pyruvate (PEP) 2 mM.

Pour mesurer l'activité de la PGI, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH pH 8 100 mM, contenant 100 mM de MgCl₂, 2 mM d'EDTA, 0,5% (v/v) de BSA, 0,05% (v/v) de triton X100, 1,2 mM de NADP et 1 u/ml de G6PDH. La réaction a été démarrée par l'ajout de fructose-6-phosphate (F6P) 2.25 mM.

Pour mesurer l'activité de la PGK, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 20 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 2 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,6 mM de NADH, 4 mM de 3PGA, 5 mM de DTT et 1 u/ml de NAD-GAPDH. La réaction a été démarrée par l'ajout d'ATP 5 mM.

Pour mesurer l'activité de la PGM, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant 10 mM de MgCl₂, 2 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 1,2 mM de NADP⁺, 1 μ M glucose-1,6-bisphosphate (G1,6Bp) et 1 u/ml de G6PDH. La réaction a été démarrée par l'ajout de glucose-1-phosphate (G1P) 3,2 mM.



Figure 14 : Principe des dosages continus des activités enzymatiques

Encadré en rouge les capacités enzymatiques mesurées. Encadrement jaune, détection à 340 nm de la disparation ou apparition du NADH; encadrement bleu, détection à 418 nm du TNB formé. 1,3BPG, glycérate-1,3-bisphosphate; 3PGA, 3-phopho-glycérate; Abréviations: 6P-G. 6phosphogluconolactone; CS, citrate synthase; DAP, dihydroxyacétone phosphate; DTNB, acide 5,5dithio-bis-(2-nitrobenzoïque); F1,6BP, fructose-1, 6-bisphosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FK, fructokinase; G1P, glucose-1-phosphate; Gly-3P, Glycérol-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; G6PDH, G-1,6-P, glucose-1,6-bisphosphate; glucose-6-phosphate déshydrogénase; GAP, glycéraldéhyde-3-phosphate; GAPDH-NAD, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à NAD; GDH : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; HK, hexokinase; NADP-IDH, isocitrate déshydrogénase à NADP; LDH, Lactate déshydrogénase; NADP-ME, enzyme malique à NADP; MDH, malate déshydrogénase; OAA, oxaloacétate; Pentose-P, pentose phosphate; PEP, phosphoénolpyruvate; PEPC, phosphoénolpyruvate carboxylase; phosphofructokinase; PGI, phosphoglucoisomérase; PGK, Phosphoglycérokinase; PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; PPi, pyrophosphate; TPI, triose-phosphate isomérase; UGPase, UDP-glucose-pyrophosphorylase
Pour mesurer l'activité de la PK, l'extrait a été introduit dans une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant100 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 0,4 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,6 mM de NADH, 1 mM d'ATP et 1 u/ml de LDH. La réaction a été démarrée par l'ajout de PEP 5 mM.

Pour mesurer l'activité de la TPI, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon HEPES/KOH 100 mM pH 7,5, contenant 5 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,6 mM de NADH, 1 u/ml de glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) et 1 u/ml de PGM. La réaction a été démarrée par l'ajout de glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP) 2,25 mM.

Pour mesurer l'activité de l'UGPase, l'extrait a été ajouté à une solution de tampon tricine/KOH 100 mM pH 8, contenant10 mM de MgCl₂, 2 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 1,2 mM de NADP⁺, 1 mM d'uridine diphosphate glucose (UDPG), 1 u/ml de G6PDH, 1 u/ml de PGM. La réaction a été démarrée par l'ajout de pyrophosphate (PPi) 2,25 mM.

c. Détermination des capacités enzymatiques : dosage indirect

Un dosage discontinu (Gibon *et al.* 2004) a été utilisé pour mesurer les capacités enzymatiques des enzymes suivantes : fructose-1,6-bisphosphate aldolase (Ald) (EC 4.1.2.13), NAD-GAPDH, ATP-phosphofructokinase (ATP-PFK) (EC 2.7.1.11), glucokinase (GK) (EC 2.7.1.1), fructokinase (FK) (EC 2.7.1.3) et PEPC à partir de 2 µl d'extrait qui ont été introduits dans un premier mélange de 20 µl au total. Après incubation, l'arrêt et la reprise de la réaction par changement de pH, un second mélange de 50 µl a été introduit. Le principe des dosages est explicité Figure 15.

Pour la mesure des capacités de Ald, NAD-GAPDH et ATP-PFK (Figure 15A), les protocoles suivants ont été utilisés.

Pour mesurer l'activité de l'Ald, l'extrait a été introduit dans un mélange contenant 100 mM de solution de tampon tricine/KOH pH 8,5, 5 mM de MgCl₂, 1 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 5 mM de fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP) (substrat saturé), 0,3 mM de NADH, 2 u/ml de GDH et 1 u/ml de TPI.

Pour mesurer l'activité de la NAD-GAPDH, l'extrait a été introduit dans un mélange contenant 100 mM d'une solution de tampon tricine/KOH pH 8, 30 mM de MgCl₂, 20 mM de KCl, 2 mM d'EDTA, 0,05% (v/v) de triton X100, 5 mM d'ATP, 0,5 mM de NADH et de DTT, 4 mM de 3PGA (substrat saturé), 10 u/ml de PK et 1 u/ml de TPI. Pour l'ATP-PFK, l'extrait a été introduit dans un mélange contenant 100 mM de tampon tricine/KOH pH 8, 5 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de triton X100, 5 mM de T6P, 0,25 mM de NADH, 1 mM d'ATP (substrat saturé), 2 u/ml d'Ald, 2 u/ml de GDH et 1u/ml de TPI. Après une incubation de 20 min à 25°C, les réactions ont été stoppées par l'ajout de 20 µl d'une solution HCl 0.5 M/ Tricine/KOH 100 mM pH 9. Après neutralisation par l'ajout de 20 µl de NaOH 0,5 M, 50 µl d'une solution contenant 100 mM de tricine/KOH pH 8, 1,2 mM de NADH, 2 u/ml de GDH, 5 u/ml de glycérol-3-phosphate oxydase (GPOX), 4 mM de MgCl₂, et uniquement pour Ald 1 u/ml de TPI ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 25°C à 340 nm. Les quantités de GAP synthétisés sont

d'abord calculées pour V_{sat} (pente mesurée en présence du substrat saturé) et pour V_0 (pente mesurée en l'absence de substrat saturé) puis la différence entre V_{sat} et V_0 donne la capacité.

Pour mesurer l'activité de GK et FK (Figure 15B), l'extrait a été introduit dans un mélange de 100 mM de solution de tampon tricine/KOH pH 8, 5 mM de MgCl₂, 0,05% (v/v) de triton X100, 2 mM de glucose pour GK et fructose pour FK, 0,5 mM de NADP⁺, 0,8 mM d'ATP (substrat saturé), 1 u/ml de G6PDH et 1 u/ml de PGI pour FK uniquement. Après une incubation de 20 min à 25°C, les réactions ont été stoppées par l'ajout de 20 µl de NaOH 0,5 M. Après neutralisation par l'ajout de 20 µl d'un mélange HCl 0,5 M/ Tricine/KOH 100 mM pH 9, 50 µl d'un mélange contenant 100 mM de tricine/KOH pH 9, 2 mM de diméthylthiazol diphényltétrazolium (MTT), 16 mM d'EDTA, 10 mM de G6P, 0,4 mM de phénazine éthiosulfate PES et 5 u/ml de G6PDH. L'absorbance a été mesurée à 570 nm. Les quantités de G6P synthétisés sont d'abord calculées pour V_{sat} (pente mesurée en présence du substrat saturé) et pour V₀ (pente mesurée en l'absence de substrat saturé) puis la différence entre V_{sat} et V₀ donne la capacité.

Pour mesurer l'activité de la PEPC (Figure 15C), l'extrait a été introduit dans un mélange de 100 mM de solution de tampon tricine/KOH pH 8, 20 mM de MgCl₂, 10 mM de NaHCO₃, 0,05% (v/v) de triton X100, 0,1 mM de NADH, 2 mM de PEP (substrat saturé) et 10 u/ml de MDH. Après une incubation de 20 min à 25°C, les réactions ont été stoppées par l'ajout de 20 µl d'un mélange HCl 0,5 M/ Tricine/KOH 100 mM pH 9. Après neutralisation par l'ajout de 20 µl de NaOH 0,5 M, 50 µl d'un mélange contenant 100 mM de solution de tampon tricine/KOH pH 9, 2 mM de MTT, 16 mM d'EDTA, 2% (v/v) d'EtOH, 0,4 mM de PES et 40 u/ml d'alcool déshydrogénase (ADH). L'absorbance a été mesurée à 570 nm. La teneur en oxaloacétate synthétisé a été calculée à partir de la différence de pente entre V_{sat} et V₀.

L'activité de l'invertase acide (EC 3.2.1.26) a été mesurée à partir du taux de dégradation du glucose (Gibon *et al.* 2004). Pour cela 5 µl d'extrait ont été ajoutés dans un mélange de tampon d'acétate /KOH 50 mM pH 5, 20 mM de saccharose et 0,03%(v/v) de triton X100, avec 50 µl de volume final. Après incubation à température ambiante à 5 et 40 min, la réaction a été stoppée par l'ajout de 30 µl d'imidazole 4 M pH 7,6. Après une seconde incubation de 10 min à 98°C un mélange de 100 µl contenant 100 mM d'une solution de tampon HEPES/KOH pH 7, 3 mM de MgCl₂, 3 mM d'ATP, 0,6 mM de NADP⁺ et 0,25 u/ml de G6PDH a été ajouté. Une première mesure du blanc réactionnel a été effectuée à 340 nm, ensuite 1 µl de PGI et HK à 1000 u/mL et 900 u/ml, respectivement, ont été ajoutés au mélange. Le taux de dégradation du glucose a été calculé à partir de la différence entre les deux incubations divisée par l'intervalle de temps d'incubation.



Figure 15 : Principe du dosage discontinu des activités Ald, NAD-GAPDH, ATP-PFK, HK, FK et PEPC.

En rouge les capacités enzymatiques mesurées. Encadrement jaune, détection à 340 nm de la disparition du NADH; encadrement bleu, détection à 570 nm du MTT réduit formé.

- III. Analyses qualitative et quantitative des métabolites polaires d'extraits de fruits par RMN du proton
 - 1. Extraction hydro-alcoolique des « mix » et des séries développementales

Deux expériences RMN ont été réalisées, une première sur des échantillons « mix » qui sont des mélanges de l'ensemble des stades de développement pour chaque fruit (poivron, aubergine, pomme, pêche, kiwi, concombre, clémentine et raisin) pour l'identification des métabolites majeurs grâce à l'annotation des spectres et la quantification des métabolites. Une deuxième sur les séries développementales de trois des espèces, l'aubergine (55 échantillons, 11 stades de développement et 5 réplicas par stade), du poivron (50 échantillons, 10 stades de développement et 5 réplicas par stade) et du kiwi (60 échantillons, 12 stades de développement et 5 réplicas par stade) au cours du développement du fruit.

Pour les « mix », 20 et 50 ± 1 mg de poudre lyophilisée ont été extraits et 25 mg ± 1 mg pour les séries développementales (Deborde et al. 2009). L'extraction des métabolites polaires a été réalisée grâce à trois extractions successives EtOH/eau 80 :20, 50 :50, 0 :100 (v/v). Des blancs d'extraction (échantillons qui subissent le processus d'extraction et de préparation mais qui ne contiennent pas de poudre végétale) ont été introduits afin de pouvoir repérer les contaminants éventuels lors des analyses RMN. Pour les deux premières extractions, 2 ml de solvant ont été utilisés et 3 ml pour la dernière. Entre chaque extraction, les extraits ont été incubés à 80°C pendant 15 min, mélangés à l'agitateur vibrant (vortex) puis centrifugés (centrifugeuse Sorvall RC5B+) pendant 10 min à 30 000 g. Les trois surnageants additionnés ont été séchés à l'évaporateur rotatif sous vide (Speed-vac, Thermo Scientific). Les extraits secs ont été repris dans 500 µl d'une solution deutérée de tampon phosphate (K₂HPO₄ et KH₂PO₄) à 200 mM, EDTA 2 mM non deutéré pour la série aubergine, deutéré pour la série poivron (pour chélater les cations paramagnétiques) et ajustés à un pH apparent 6,00 \pm 0,02 à l'aide d'un robot de titration (BTpH, Bruker Biospin, Rheinstetten, Allemagne) et de solutions deutérées de KOD (1 M) et DCl (1 M). Afin de réaliser la quantification absolue des métabolites, deux gammes étalons à 5 ou 6 points de concentration contenant respectivement un sucre et un acide aminé en concentrations inverses ont été réalisées, couvrant la gamme de 0 à 100 mM pour les sucres et 0 à 60 mM pour les acides aminés :

- gamme glutamate/fructose qui a servi pour la quantification du glutamate et du fructose.
- gamme glutamine/glucose qui a servi pour la quantification de la glutamine, du glucose et de l'ensemble des autres métabolites.

Un standard glucose de concentration connue (30 mM) a également été préparé, afin de vérifier la qualité des mesures. Les extraits avec un pH ajusté ont ensuite été congelés dans l'azote liquide et lyophilisés pendant une nuit. Avant l'analyse RMN, les extraits avec un pH ajusté ont été lyophilisés puis remis en solution dans 500 µL de D₂O et 5 µL de solution de triméthylsilylpropanoate-*2,2,3,3-d4* (TSP) de sodium à 1% (m/v, soit 0,58 mM) pour la calibration de l'échelle des déplacements chimiques à 0 ppm. Après centrifugation, les extraits avec TSP ont été transférés dans des tubes RMN de 5 mm (Wilmad 507-PP7, Vineland, NJ, USA).

2. Acquisitions des spectres RMN ¹H 1D

Les analyses RMN ont été effectuées sur un spectromètre RMN Bruker Avance III, à 500 MHz pour le proton (11,7 Tesla) équipé d'une sonde inverse ATMA BBI de 5 mm à gradient-z, sous flux d'azote, et d'un passeur d'échantillons automatique BACS-120 (à température ambiante) en utilisant le logiciel TopSpin 3.0. La température d'analyse était de 300 K et le délai d'attente de mise en température de l'échantillon dans la sonde avant les réglages de l'accord d'antenne (Automatic Tuning et Matching), des shims (TopShim) et la détermination du pulse 90° était de 180 s. Pour l'acquisition des spectres proton (¹H), la séquence monodimensionnelle (1D) « zg » a été utilisée. Les spectres ont été acquis dans des conditions

quantitatives avec les paramètres suivants : 64 scans, un temps d'acquisition de 2,73 s, un pulse de 90° en 8,2 à 9,7 μ s en fonction des espèces déterminé pour chaque échantillon, un temps de relaxation de 25 s et un gain du récepteur fixe au sein d'une série d'acquisition (receiver gain, rg fixé 28,5 ou 90,5 selon les espèces). L'acquisition RMN ¹H 1D pour chaque échantillon durait environ 30 min.

3. Traitement des spectres RMN ¹H 1D pour l'analyse des profils métabolomiques

Après acquisition des spectres RMN ¹H, les spectres de chaque série développementale ont été traités séparément avec le logiciel NMRProcFlow (<u>https://nmrprocflow.org</u>) (Jacob *et al.* 2017). La transformée de Fourier du signal de précession libre (Free Induction Decay, FID a été appliquée après apodisation (multiplication exponentielle LB 0,3)) et zero-filling (X2) ainsi que les corrections de phase à l'ordre 0 et 1 ont été réalisés. Puis l'échelle des déplacements chimiques a été calibrée à 0 grâce au signal du TSP et les lignes de base globales ont été corrigées.

Les annotations des signaux RMN ont été réalisées en comparant les déplacements chimiques, la forme des massifs et les ratios d'intensité observés avec ceux de bases de données (MeRy-B 2011, http://bit.ly/meryb ; HMDB, http://www.hmdb.ca/), ou de la littérature, avec des spectres de composés de référence enregistrés dans les mêmes conditions (solvant, pH, champ magnétique ; base de données du laboratoire) et/ou en réalisant un ajout du composé suspecté au tube analysé (spiking).

Afin de réaliser la quantification, pour chaque métabolite identifié (cf. paragraphe III.4), une région du spectre (« bucket ») contenant une ou des résonances de ce métabolite a été sélectionnée. Cette région spectrale a été choisie en fonction de l'intensité de la ou les résonances et de la ou leur « pureté », c'est-à-dire ne présentant pas de superposition avec des résonances provenant d'autres métabolites. Ces régions sur l'ensemble des spectres ont alors été alignées et les lignes de bases locales corrigées. Les valeurs des aires des « buckets » mesurées a servi aux quantifications réalisées grâce aux coefficients directeurs des courbes d'étalonnage et au nombre de protons correspondants à chaque région spectrale sélectionnée. Au final, 29 métabolites ont pu être quantifiés pour l'aubergine, 23 pour le poivron et 20 pour le kiwi.

4. Analyses RMN complémentaires pour l'identification des métabolites

Afin de compléter et/ou confirmer les annotations des spectres 1D proton, des analyses 2D en proton (COrelated SpectroscopY [COSY] et J-résolue [JRES]), carbone 13 (Heteronuclear Single-Quantum Correlation [HSQC] et Heteronuclear Multiple Bond Correlation [HMBC]) et phosphore (HMBC) ont été réalisées ainsi que des analyses 1D complémentaires en proton (séquence de Carr-Purcell-Meiboom-Gill [CPMG], Total COrrelation SpectroscopY [TOCSY] sélective) et carbone (RMN ¹³C et Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135

[DEPT135]). Le récapitulatif des paramètres d'acquisition et de l'intérêt de chaque séquence sont présentés dans les Annexes 3A et 3B.

- IV. Analyse de la composition de la paroi cellulaire du péricarpe de fruit
 - 1. Préparation des résidus insolubles dans l'alcool (RIA) pour l'analyse des composants de la paroi cellulaire

Pour isoler les RIA, 50 mg de poudre lyophilisée pesée dans un tube (Micro tube, 2 ml PP) ont été lavés successivement dans un premier temps par 1,5 ml d'EtOH 70 % (v/v) puis 1,5 ml de chloroforme/méthanol (1 :1 ; v/v) quatre fois, et enfin par 500 μ l d'acétone. Après chaque lavage les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un agitateur vibrant (vortex) puis centrifugés à 16 000 g (Biofuge fresco, Heraeus) pendant 5 min, puis les surnageant ont été retirés. Lors de la dernière étape, les culots ont été séchés par un flux d'air à 30°C. Les RIA ont ensuite été stockés dans un dessiccateur jusqu'à l'analyse des polysaccharides des parois cellulaires et de la cellulose.

2. Analyse de la composition des polysaccharides des parois dans les fruits

L'extraction et l'hydrolyse ont été réalisées sur 2 mg de RIA par l'ajout de 250 μ l d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M (Jablonowski *et al.* 2017). Les extraits ont été incubés pendant 90 min à 121 °C puis centrifugés à 16 000 *g* (Biofuge fresco, Heraeus) pendant 5 min. Cent μ l ont ensuite été collectés et évaporés sous flux d'air à température ambiante. Le culot a été repris dans 400 μ l d'eau MiliiQ avant d'être dilué au dixième et pour chaque échantillon 2 μ l de standard interne à 2 mM, le 2-déoxy-D-glucose, a été ajouté pour un volume final de 152 μ l, il a servi à la normalisation des monosaccharides. Une courbe de calibration pour chaque sucre mesuré allant de 5 à 200 μ mol/l a été réalisée.

Afin de quantifier les monosaccharides, 10 µl d'hydrolysat de RIA ont injectés dans un système de chromatographie échangeuse d'anion à haute performance couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD). Les monosaccharides ont été séparés sur une colonne Dionex Carbopac PA20 avec un débit de 0,5 ml/min. Les sucres neutres ont été élués avec 2 mM de NaOH pendant 29 min puis 550 mM de NaOH ont été utilisés pendant 10 min pour éluer les acides uroniques. Enfin la colonne a été rincée avec 800 mM de NaOH pendant 5 min. Les aires des pics des monosaccharides ont été normalisées grâce au standard interne 2-déoxy-D-glucose et les quantifications faites à partir des courbes de calibration de chaque monosaccharide et calculées à l'aide de la formule suivante :

$$x = \frac{\mathsf{C} \times \mathsf{M}}{m} \times 1000 \times D$$

avec x la teneur en monosaccharide en mg/g, C la concentration dans la goutte d'injection (pmol/goutte), M la masse molaire du monosaccharide, m la masse pesée de l'échantillon de RIA et D le facteur de dilution.

3. Analyse de la teneur en cellulose cristalline dans les fruits

La cellulose cristalline a été déterminée à partir de 2 mg d'hydrolysat de RAI dans un tube (safeSeal tube 1.5 ml) après le retrait de la cellulose non cristalline grâce à l'ajout de 1 ml de réactif d'Updegraff (Updegraff 1969) contenant un mélange d'acide acétique 100%, d'acide nitrique 100% et d'eau (8 :1 :2 , v/v). Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à 100°C dans un agitateur chauffant (Thermomixer confort, Eppendorf), l'échantillon a été mélangé à l'agitateur vibrant (Vortex) puis centrifugé à 16000 g (Biofuge fresco, Heraeus) pendant 15 min, le surnageant a été retiré délicatement et le culot lavé 3 fois avec 1,5 ml d'eau pure puis séché sous flux d'air à 30 °C. Ensuite, la cellulose cristalline résiduelle a été hydrolysée par l'ajout de 175 μ l d'acide sulfurique 72 % (v/v) avec une incubation de 45 min. Enfin, après centrifugation de 10 min 16 000 g, 875 µl d'eau ont été ajoutés aux échantillons. Les échantillons ont alors été dilués au dixième (volume final 400 μl) et 800 μl de réactif à l'anthrone (2 mg d'anthrone /ml d'acide sulfurique 72 % (v/v)) ont été ajoutés, puis incubés pendant 30 min à 80°C dans un agitateur chauffant (Thermomixer confort, Eppendorf), mélangés à l'agitateur vibrant (Vortex) puis centrifugés à 9500 g (Biofuge fresco, Heraeus). L'analyse a été réalisée sur microplaques avec une lecture à 625 nm avec 3 réplicas techniques par échantillon de cellulose cristalline. La quantification a été faite à partir d'une courbe de calibration du glucose introduite sur chaque microplaque et du calcul suivant :

$$x = \frac{\mathrm{DO} - \mathrm{b}}{a} \times D \times \frac{1}{m}$$

avec x la teneur en cellulose en μg/mg, DO la densité optique mesurée, « b » l'interception, « a » la pente, D le facteur de dilution et m la masse de cellulose cristalline pesée.

- V. Quantification des métabolites intermédiaires du métabolisme central
 - 1. Extraction des intermédiaires du métabolisme

L'extraction des intermédiaires du métabolisme a été réalisée à partir de 20 mg de matériel cryobroyé auxquels ont été ajoutés 1 ml d'eau MilliQ à 100°C (Cocuron and Alonso 2014) dans un tube (Micro tube, 2 ml PP, Sarstedt). Après une incubation à 100°C pendant 10 min, les extraits ont été refroidis dans la glace et centrifugés à 4°C à 16000 *g* (Centrifugeuse 5415R, Eppendorf) pendant 5 min. Les surnageants ont ensuite été prélevés à l'aide de seringues (Seringue 1 ml, Terumo) et filtrés (Millex-GV, PVFD 0,22 μ m, Millipore). Une seconde extraction a été réalisée sur les culots par l'ajout de 1 ml d'eau à 0°C. Les échantillons ont été

mélangés à l'agitateur vibrant (Vortex) puis centrifugés à 16000 *g* pendant 5 min. Le deuxième surnageant a été prélevé, filtré et ajouté au premier surnageant puis les seringues et les filtres ont été rincés avec 1 ml d'eau glacée qui ont été ajoutés aux deux autres surnageants. Le volume total d'extrait était de 3 ml. Les extraits ont ensuite été lyophilisés pendant une nuit, repris dans 400 µl d'eau pure glacée puis filtrés sur des microplaques (Multiscreen filter plates, 0.22 µm hydrophilic low protein binding, Durapore membrane, Millipore) à 1640 *g* (Centrifugeuse 5810R, Eppendorf) pendant 1 min pour le poivron et filtrés sur des filtres à tube (Amicon Ultra 0,5 ml, Ultracel 3K, Merck Millipore) puis centrifugés à 16000 *g* pendant 45 min pour l'aubergine. Un volume de 180 µl d'extrait a ensuite été transféré dans des flacons HPLC avec insert en verre de 300 µl, non dilué ou après dilution au dixième et au quarantième (uniquement pour les jeunes stades), et 20 µL d'un mélange de 15 composés uniformément marqués au ¹³C du commerce (isotope-dilution MS, IDMS), ont été introduits dans chaque extrait aqueux pour un volume final de 200 µl. Une gamme d'étalonnage pour chaque composé a été préparée à partir d'un mélange des 17 composés standards à 500 ng/ml contenant 10% (v/v) d'IDMS également pour la quantification.

a. Analyse et quantification d'intermédiaires du métabolisme par chromatographie ionique couplée à un spectromètre de masse hybride (IC-QTRAP-MS)

Les intermédiaires mesurés sont présentés dans l'Annexe 4. Les extraits aqueux ont été injectés dans un système de chromatographie (Système 1290 Infinity II, Agilent) couplé à un spectromètre de masse hybride quadripôle - piège à ions linéaire (QTRAP 5500, Sciex). Les intermédiaires phosphorylés ont été séparés sur une colonne Dionex IonPac AS11 (2x250 mm) munie d'une précolonne Dionex IonPac AG11 (2X 50 mm) suivant le gradient d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,05 mM à 75 mM décrit en Annexe 5. Le volume d'injection a été de 5µL. Les composés ont été ionisés par une source Turbo spray en mode négatif (-4500 V). Les gaz de nébulisation et de désolvatation étaient à une pression de 4,82 bar, la température de la source de 700°C, le gaz de collision à un débit moyen et le gaz rideau à une pression de 2,76 bar. Les échantillons ont été maintenus à une température de 4°C dans le passeur automatique. Les échantillons ont été injectés avec un ordre aléatoire. Un échantillon (« mix ») de référence qui est le mélange de l'ensemble des stades de développement de chaque fruit, a été injecté tous les dix échantillons afin de vérifier puis valider la stabilité des mesures.

Les spectres de masse ont été acquis avec le logiciel Analyst 1.6 (Sciex) en mode suivi de réactions multiples (multiple reaction monitoring, MRM), les paramètres d'acquisition de ce mode sont présentés dans l'Annexe 4. Les données IC-MS ont ensuite été traitées avec le logiciel MultiQuant (Sciex). Les aires des pics chromatographiques ont été intégrées, puis le rapport entre l'aire du signal de l'analyte et celle du standard interne marqué correspondant a permis de déduire le rapport de quantité. Enfin les quantifications ont été réalisées grâce aux courbes de calibrations de chaque composé.

VI. Analyse des acides gras totaux

La quantité totale de lipides des échantillons de fruit a été estimée à l'aide du dosage de l'ensemble des acides gras majeurs après leur trans-estérification. Afin de réaliser la trans-estérification des acides gras en esters méthyliques d'acides gras (FAMEs), 1 ml d'un mélange contenant du méthanol, 2,5 % d'acide sulfurique (H_2SO_4) et un étalon interne d'acide heptadécanoïque (C17:0, à 1 mg/ml) ont été ajoutés à 20 mg de poudre de fruit fraîche dans un tube de verre de 8 ml. Des extraits « blancs » ont également été préparés pour chaque série d'extraction. Les extraits ont ensuite été incubés à 85°C pendant une nuit puis refroidis. Puis 400 µl d'hexane et 600 µl de chlorure de sodium (NaCl) à 2,5 % ont été ajoutés afin de séparer les FAMEs des autres composés à l'aide d'un partage de phases. Les extraits ont été mélangés à l'agitateur vibrant (Vortex) puis centrifugés à 16 000 rpm (Hettich EBA 20) pendant 2 min. Enfin 300 µl de la phase apolaire (hexane) ont été prélevés.

Afin de quantifier les FAMEs, 1 µl d'extrait apolaire ont été injectés dans un système de chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), Agilent, Santa Clara, United States). Les FAMEs ont été séparés sur une colonne DB 23 (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm) (Agilent, Santa Clara, United States) avec un débit de 1,9 ml/min. Le gradient de température de la chromatographie était le suivant : 50°C pendant 1 min, augmentation jusqu'à 175°C à 25°C/min, puis jusqu'à 230°C à 2°C/min. Les FAMEs ont été identifiés en comparant leur temps de rétention avec des standards commerciaux d'acides gras (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La quantification de chaque FAMEs a été réalisée grâce au standard interne par le calcul suivant :

$$x (\mu g/g) = \frac{(Air_{ech} - Air_{blc}) \times Qte \ EI \ ajout\acute{e}}{Air_{El}} \times \frac{1}{m}$$

avec pour un FAME donné : Air_{ech} l'aire de l'échantillon ; Air_{blc} l'air du blanc, Air_{El} l'air de l'étalon interne, Qte El ajouté la quantité d'étalon interne ajoutée en μg , et m la masse de poudre pesée en g.

VII. Analyses cytologiques

Des analyses cytologiques ont été réalisées pour l'aubergine et le poivron. Trois fruits ont été récoltés par stade, pour quatre stades pour l'aubergine (3, 15, 29 et 59 JAA) et six stades pour le poivron (anthèse, 5, 13, 18, 30 et 40 JAA). Des fragments de 1 à 2 mm d'épaisseur ont été coupés transversalement dans la zone équatoriale du péricarpe. Ils ont été fixés à 4°C pendant quatre heures dans un mélange de glutaraldéhyde (2.5% v/v) et d'une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2). Placés dans une cloche à vide, une dépression de 800 à 200 mbar

a été appliquée la première heure. Les échantillons rincés trois fois avec une solution de tampon phosphate ont ensuite été incubés deux h à 4°C dans une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH7,2) contenant du tétroxyde d'osmium (1% m/v). Pour terminer, ils ont été placés 30 min à température ambiante dans une solution d'acide tannique (1% m/v) dans l'eau) puis rincés 3 fois dans l'eau.

Les échantillons ont été déshydratés par bains successifs à 4°C dans un mélange acétone/eau (concentration croissante en acétone : 50, 70 et 100%). Après leur imprégnation en résine (Epon 812) la polymérisation s'est faite à 60 °C durant 27 h. Des coupes de 1 µm, réalisées à l'aide de couteaux de verre ou de diamant ont été colorées au bleu de toluidine à 0,04 % (m/v), observées au microscope optique Zeiss Axiophot et photographiées à l'aide de la caméra numérique Spot RTKE. Les longueurs et les surfaces des cellules et des vacuoles ont été mesurées sur les images à l'aide du logiciel Image-J, soit par seuillage automatique, soit par dessin manuel ou semi-automatique.

Les volumes subcellulaires ont été calculés en supposant que la cellule, la vacuole et le cytoplasme sont des ellipses sphéroïdes de rayon a, b, et c (avec a > b = c). La paroi cellulaire a été considérée comme délimitée par deux sphéroïdes prolates concentriques. La cellule moyenne du péricarpe de fruit a été assimilée à un ellipsoïde sphéroïde dont le volume V est V = 4/3 π ab². La vacuole dans ce modèle occupe le centre de l'ellipsoïde. La paroi et le cytoplasme occupent des anneaux concentriques à la vacuole.

- VIII. Modélisation des données de croissance des fruits, de croissance des cellules et calcul de la vitesse et du taux relatif de croissance (RGR)
 - 1. Modélisation des données de croissance et de composition

Afin de pouvoir modéliser les courbes de croissance des fruits et d'en déduire la vitesse de croissance et le taux de croissance relatif (relative growth rate, RGR), les données de poids frais des fruits ont été utilisées. Plusieurs modèles de croissance, Verhulst, Log-logistique, logistique généralisée, Gompertz, Chapman Richards, Weibull, simple et double sigmoïde et sigmoïde avec dénaturation ont été testés sur chaque courbe à l'aide du logiciel XLSTAT. Pour chaque modèle, les paramètres d'équation ont été calculés. Les coefficients de détermination R² et la racine de la moyenne des carrées de erreurs (RMCE) ont été comparés entre les modèles. Le choix des modèles sigmoïde simple/double pour décrire la croissance de ces espèces a été fait car celui-ci présentait des R² proches de 1 et des RMCE les plus petites dans l'ensemble des espèces. La comparaison des espèces a ensuite été faite sur la base d'une même équation. Grâce à cela les courbe de croissance ont pu être modélisées (y) et les vitesses de croissance (y') calculées ainsi que les taux relatifs de croissance grâce aux calculs suivants :

Simple sigmoïde :
$$y(x) = d + \frac{a}{1 + e^{-b(x-c)}}$$

Dérivée simple sigmoïde : $y'(x) = \frac{abe^{-b(x-c)}}{(1+e^{-b(x-c)})^2}$

Double sigmoïde :
$$y(x) = d + \frac{a}{1+e^{-b(x-c)}} + \frac{f}{1+e^{-g(x-h)}}$$

Dérivée double sigmoïde :
$$y'(x) = \frac{abe^{-b(x-c)}}{(1+e^{-b(x-c)})^2} + \frac{fge^{-g(x-h)}}{(1+e^{-g(x-h)})^2}$$

Calcul du RGR : $RGR = \frac{y'(x)}{y(x)}$

Les stades de développement ont ensuite été sélectionnés suivant des vitesses de croissance correspondantes. Ces vitesses sont classées à partir de la vitesse maximum (Vit_{max}) en la divisant par deux, quatre, dix et 25 (Figure 16). Les stades récoltés correspondant à ces valeurs ou très proches ont ensuite été retenus pour la comparaison.







Les flèches désignent les stades sélectionnés suivant la courbe.

2. Modélisation des données de croissance des cellules et des volumes subcellulaires

Afin de pouvoir modéliser les courbes de croissance cellulaires et des proportions subcellulaires et d'en déduire la vitesse de croissance des cellules, les données des volumes cellulaires des fruits d'aubergine et de poivron ont été utilisées. Le choix du modèle Gompertz pour décrire la croissance de ces espèces a été fait car celui-ci présentait des R² proches de 1 et des RMCE faibles. Grâce à l'équation suivante, les courbes de croissance des cellules ont pu

être modélisées (y) et les vitesses de croissance (y') calculées à partir des différences de pente :

Gomperzt :
$$y(x) = ae^{ln\frac{b}{a}} \times e^{-cx}$$

3. Calcul des vitesses d'accumulation des composés

Les vitesses d'accumulation des composés ou de somme de composés d'une même famille biochimique ont été calculées à partir des concentrations exprimées en µmol.fruit⁻¹. L'outil EasyReg (<u>https://sprigent.shinyapps.io/regshiny/</u>) a été utilisé pour la modélisation des concentrations par des polynômes de degré 2, 3 ou 4. Avant modélisation, les données ont été transformées sur base d*e logarithme népérien ou sur la base d'une racine carrée. Les valeurs des dérivées converties ont été extraites. La simple sigmoïde (Part. VIII.1) a été utilisée sur les données non transformées lorsque les polynômes ne décrivaient pas l'accumulation de manière pertinente.

4. Modèles linéaires généralisés pour la prédiction du RGR à partir des concentrations en métabolites

Le but de cette modélisation est de pouvoir créer des modèles permettant de prédire le RGR de chaque fruit uniquement à partir des concentrations des composés mesurés grâce aux techniques analytiques décrites précédemment. Ces données comportent les métabolites primaires, les composés de la paroi cellulaire, l'amidon, les protéines et les lipides.

Les modèles ont été générés à partir du logiciel R et le package glmnet (Friedman *et al.* 2010) a été utilisé. Le RGR prédit est calculé suivant la formule suivante :

$$RGR = a \times m$$
étabolite $A + b \times m$ étabolite $B + c \times m$ étabolite $C + ... + cst$

avec a, b, c et la constante (cst), les paramètres que le modèle va estimer pour décrire au mieux le RGR. Trois type de modèles ont été construits (Lasso, elastic net et ridge) (Friedman *et al.* 2010) en faisant varier la valeur de pénalité d'elastic net α . Cette valeur définira le nombre de facteurs (ici les concentrations en métabolites) utilisés par le modèle parmi ceux disponibles (tous ne sont pas obligatoirement utilisés). Le nombre d'individus étant relativement faible, seul la validation croisée interne a été utilisée pour la création et le test du modèle. Cela peut être envisagé dans notre cas car le nombre de variables pour construire le modèle est également limité et donc le risque de sur-ajustement reste faible bien qu'il soit existant.

Le package glmnet utilise deux métriques différentes autour de l'erreur quadratique moyenne pour permettre de valider ou non un modèle. Le premier, « min » qui se base sur la

valeur minimum donnera de bonnes prédictions mais le risque de sur-ajustement sera plus élevé. Le deuxième, « 1se » crée des modèles normalement plus parcimonieux dont les prédictions restent dans une erreur standard du modèle « min ». Nous aurons alors de moins bonnes prédictions mais le risque de sur-ajustement est plus faible. Comme mentionné précédemment, nous possédons peu d'individus pour la prédiction du modèle et le risque de sur-ajustement reste faible, nous avons donc travaillé sur les modèles « min ».

Ces modèles génèrent des valeurs de facteur d'importance pour chaque métabolite, c'està-dire la représentation de l'importance du métabolite sur la prédiction des RGR à partir des concentrations. Les concentrations des métabolites n'étant pas centrés réduites avant l'analyse, ces facteurs ont été corrigés par la suite en multipliant leur valeur par les concentrations pour chaque échantillon et la moyenne de l'ensemble des échantillons a été calculée, ainsi l'importance des facteurs associés aux métabolites de faible ou forte concentration ne sera pas biaisée par cette valeur.

Deux modèles différents ont été réalisés, l'un pour l'ensemble des fruits et des stades de développement et l'autre pour la séparation des trois phases de croissance du fruit.

IX. Analyse statistique des données

Plusieurs analyses statistiques ont été sélectionnées afin de pouvoir explorer le jeu de données et visualiser les changements métaboliques au cours du développement de chaque fruit. Ces analyses permettent également de visualiser les différences et les ressemblances entre les espèces à certains stades donnés de leur développement.

1. Analyses statistiques multivariées

L'analyse en composante principal (ACP) est une analyse statistique multivariée non supervisée, c'est-à-dire sans *a priori* sur la séparation des échantillons en différents groupes. L'ACP réalise une projection des individus (ou échantillons) sur le graphique des « scores » et du poids des variables sur le graphique des « loadings » dans un sous-espace de plus petite dimension et qui permet d'avoir une vision globale de la variabilité. La première composante principale (CP1) se trouve dans la direction de la variance maximale depuis l'origine, elle explique la plus grande proportion de la variabilité. La seconde composante principale (CP2), orthogonale à la première, décrit le maximum de la croissance résiduelle (Jansen *et al.* 2010). Chaque ACP a été réalisée sur des données normalisées en les rapportant à une moyenne nulle et un écart type de 1 (données centrées réduites) afin de donner le même poids à chaque variable de départ à l'aide de l'outil web BioStatFlow (http://biostatflow.org). Avant chaque analyse par ACP, les données manquantes ont été imputées par l'algorithme itératif NIPALS (Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares).

Les analyses supervisées comme l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) sont utilisées pour la recherche d'un ensemble optimal de données de variables latentes qui permettent de séparer des groupes d'échantillons (Scheel *et al.* 2016). Elles utilisent un ensemble de variables de prédiction X (la matrice de données) et un vecteur des catégories définies au départ (Y) qui sont les variables à expliquer. L'algorithme de correction du signal orthogonal (OSC) est un traitement utilisé pour éliminer l'information non liée aux variables cibles à partir d'une analyse en composantes principales restreintes. Son principal avantage lorsqu'il est utilisé comme filtre dans une PLS-DA, soit une OSC-PLS-DA, est sa capacité à séparer les variations prédictives des variations non prédictives (orthogonales).

L'OSC²-PLS-DA a été réalisée sur les différentes espèces de fruits et 5 stades de développement, soit un ensemble de 39 échantillons et 28 variables pour la discrimination de deux groupes, les fruits climactériques et les non climactériques, sur des données de composition en métabolites et polymères centrées réduites, à l'aide de l'outil web BioStatFlow (http://biostatflow.org). Une validation croisée a été appliquée avec 200 permutations et l'erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP) qui mesure l'erreur de prédiction a été calculée pour la validation du modèle. Le Q² a été utilisé pour mesurer la qualité de la prédiction. Les scores de l'importance des variables dans la projection (VIP) ont été calculés et utilisés pour sélectionner les variables ayant un effet pertinent sur la séparation des groupes d'échantillons. Le score, qui est une somme pondérée des carrés des poids de la PLS, calculé à partir de la valeur des variances Y de chaque composante PLS, reflète l'importance de chaque variable.

2. Analyses statistiques univariées

L'analyse de variance (ANOVA) est une analyse univariée qui permet d'étudier les variables une par une et de déterminer si les tendances observées sont significatives ou pas pour un ou plusieurs facteurs. Une ANOVA à deux facteurs (stade et espèce) a ici été utilisée pour chaque composé commun aux différentes espèces (p-value < 0,5). Elle a été exécutée sur l'outil web Biostatflow (http://biostatflow.org). Une correction FDR (False Discovery Rate) (Vinaixa *et al.* 2012) a été appliquée pour le contrôle du risque des faux positifs.

3. Combinaison des analyses univariées et multivariées

L'ANOVA-ACP peut être utilisée pour la détection de biomarqueurs dans des grandes séries de données notamment en protéomique (Harrington *et al.* 2005). Elle utilise le modèle ANOVA pour décomposer la matrice de données d'origine en un ensemble de matrices à effets de même taille qui contiennent les moyennes des niveaux des facteurs expérimentaux (par exemple deux facteurs) et leurs interactions ainsi qu'une matrice avec des résidus qui ne sont pas expliqués par le modèle. L'ACP sert alors à extraire la variation systématique des variables mesurées et à analyser chaque matrice d'effet. L'ANOVA-ACP ajoute la matrice résiduelle aux matrices des moyennes des effets avant l'ACP. Puis l'ACP est appliquée aux matrices afin

d'évaluer si les différents effets sont forts par rapport à l'erreur résiduelle. Un graphique des scores obtenus par ANOVA-ACP montrent donc immédiatement le regroupement des points de données pour les différents niveaux des facteurs indépendants. Une approche ANOVA-ACP a été utilisée pour mettre en évidence les différences entre deux espèces et les similitudes d'évolution au cours du développement de ces deux espèces fruitières. Elle a été exécutée avec l'outil web Biostatflow (http://biostatflow.org). Avant analyse, les données manquantes ont été imputées par l'algorithme itératif NIPALS (Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares).

4. Matrice de corrélation

Afin d'évaluer la dépendance entre plusieurs variables phénotypiques simultanément et de mettre en évidence les variables les plus corrélées entre elles, une matrice de corrélation a été calculée et les coefficients de corrélation sont représentés par un corrélogramme. La matrice a été générée par le logiciel R à l'aide du package « corrplot » et la méthode de test de corrélation de Pearson et les *P*-values ont été extraites.

5. Classification hiérarchique et carte de chaleur

Afin de répartir plusieurs variables quantitatives évoluant au cours du développement du fruit dans un certain nombre de classes et de visualiser les variables les plus corrélées entre elles, des classifications hiérarchiques HCL (Hierarchical clustering) ont été appliquées sur les moyennes centrées réduites en utilisant les corrélations de Pearson et les regroupements de liens moyens. Les classifications hiérarchiques et les cartes de chaleur mettant en évidence ces classes et les patrons d'évolution correspondants ont été réalisées à l'aide de l'outil MeV version 4.9.0.

La méthode de k-means clustering (KMC) qui vise à partitionner n variables en k classes en se basant sur les moyennes les plus proches a été utilisée. Cette méthode est utile lorsqu'un *a priori* sur le nombre de classes après une analyse HCL est établi. Une analyse KMC a été réalisée avec l'outil MeV version 4.9.0 sur les moyennes centrées réduites des teneurs des métabolites et des capacités enzymatiques exprimées par unité de matière fraîche avec les corrélations de Pearson comme distance et la réalisation de 200 itérations.

Chapitre III : Comparaison multi-espèces pour étudier les relations entre croissance et composition du fruit



Les huit espèces de fruits charnus comprenant trois espèces herbacées, l'aubergine, le poivron et le concombre, trois espèces arbustives, la pomme, la pêche et la clémentine, et deux lianes, le kiwi et le raisin, seront ici étudiées de manière séparée et de manière combinée afin de souligner leurs différences et leurs similitudes au cours du développement du fruit.

Tout d'abord, les résultats concernant les données de la croissance des fruits et son évolution pour chaque espèce seront détaillés et comparés. Les teneurs en matière sèche ainsi que leurs évolutions au cours du développement seront exploités, puis, après leur identification, les constituants majeurs de la biomasse des huit espèces de fruits charnus seront décrits et comparés. Les résultats précédents seront combinés pour la comparaison inter-espèces au cours du développement à l'aide d'analyses statistiques et notamment de modèles linéaires généralisés, puis discutés.

I. Description de la croissance et du développement du fruit chez huit espèces de fruits charnus

L'ensemble des mesures réalisées sur les fruits durant les récoltes ainsi que l'estimation de la matière sèche ont été faites suivant les méthodes décrites précédemment (Chapitre 2). Ces données ont été utilisées pour la description de l'évolution de la croissance du fruit et le calcul de sa vitesse de croissance et de son taux de croissance relatif (RGR).

- 1. Caractérisation des profils de croissance et du développement de fruits charnus
 - a. Description des évolutions de la croissance du fruit

Le poids frais des fruits présente trois types d'évolution au cours du développement (Figure 17). Le premier profil d'évolution du poids frais observé chez l'aubergine (Figure 17A), le poivron (Figure 17B), la pomme (Figure 17C) et le concombre (Figure 17D) est une simple sigmoïde. L'aubergine et le poivron montrent une augmentation plus précoce du poids frais alors que la pomme et le concombre montrent une augmentation plus tardive. Le deuxième profil décrit la croissance de la clémentine (Figure 17F). Bien que ce profil soit similaire au précédent avec une augmentation de poids frais lente et précédemment décrit dans la littérature comme une simple sigmoïde (Coombe 1976), une décroissance est observée à la fin du développement dans notre expérimentation. L'équation la plus pertinente pour la description d'une croissance suivie d'une décroissance du fruit est une double sigmoïde. Enfin le troisième profil, caractérisé par une reprise de croissance à la fin du développement, est aussi décrit par une double sigmoïde ; il se retrouve chez la pêche (Figure 17E), le kiwi (Figure 17G) et le raisin (Figure 17H).

Les vitesses de croissance calculées à partir des équations des courbes de croissance évoluent suivant deux profils (Figure 17). Le premier se retrouve chez l'aubergine (Figure 17A), le poivron (Figure 17B), la pomme (Figure 17C), le concombre (Figure 17D) et la clémentine (Figure 17F), avec une augmentation de la vitesse puis une diminution au cours de la

croissance. Le second qui caractérise la pêche (Figure 17E), le kiwi (Figure 17G) et le raisin (Figure 17H) présente une seconde augmentation suivie d'une diminution, en accord avec les résultats précédents obtenus pour l'évolution du poids des fruits. La vitesse de croissance maximale est atteinte plus ou moins rapidement selon les espèces. Ainsi, le concombre et le raisin atteignent ce maximum en un temps relativement court, environ 20 jours, l'aubergine, le kiwi et le poivron en un temps intermédiaire, entre 25 et 36 jours, et la pomme, la pêche et la clémentine en un temps relativement long, entre 95 et 165 jours. Les fruits d'espèces arbustives mettent plus de temps à atteindre leur vitesse de croissance maximale. Il est intéressant de noter que la vitesse maximale pour la pêche est atteinte lors de la seconde phase d'augmentation et non lors de la première comme pour le raisin et le kiwi. La durée maximale de croissance est enregistrée pour la clémentine avec 165 jours et la durée minimale pour le concombre avec 17 jours.

Les tailles et les vitesses de croissance de fruit variant entre les espèces fruitières, nous avons utilisé le taux de croissance relatif afin de pouvoir les comparer de manière standardisée. Le RGR présente deux profils d'évolution (Figure 17). Le premier regroupe l'aubergine (Figure 17A), le poivron (Figure 17B), la pomme (Figure 17C), le concombre (Figure 17D) et la clémentine (Figure 17F). Il présente une augmentation puis une diminution du RGR au cours du développement. Le second profil d'évolution concerne la pêche (Figure 17E), le kiwi (Figure 17G) et le raisin (Figure 17H). Il présente une seconde augmentation suivie d'une diminution au cours du développement qui correspond à une reprise de croissance des fruits. Le RGR maximum est atteint plus ou moins rapidement selon les espèces. Le concombre, l'aubergine et le poivron atteignent ce maximum en un temps relativement cours, environ 10 jours. Le kiwi, la pomme et le raisin l'atteignent en un temps intermédiaire, entre 13 et 23 jours. Enfin, la pêche et la clémentine l'atteignent en un temps plus long entre 43 et 84 jours. Le délai maximal est donc observé pour la clémentine avec 84 jours sur une durée de développement totale d'environ 250 jours, et le délai minimum pour l'aubergine avec 7 jours sur environ 80 jours. Une différenciation semble à nouveau s'établir entre les fruits des espèces herbacées qui atteignent leur RGR maximum relativement rapidement, et ceux des lianes de manière intermédiaire et ceux des arbres avec un temps plus long.





Evolution du poids frais du fruit (**noir**) exprimée en g, de sa vitesse de croissance (**rouge**) en g.Jour⁻¹ et du RGR (**vert**) en mg.g⁻¹.Jour⁻¹. Le poids du fruit est la moyenne calculée à partir de mesures réalisées sur un minimum de 50 fruits pour les stades précoces et 10 fruits pour les trois derniers stades de développement. La barre verticale représente l'écart-type. La courbe de la vitesse de croissance a été modélisée à partir des données de poids des fruits suivant la méthode décrite dans le chapitre 2. Le RGR est calculé à partir du poids du fruit et de sa vitesse de croissance modélisée.

b. Diversité de la caractérisation phénotypique de la croissance entre les espèces fruitières

Les durées de développement de l'anthèse au fruit mûr sont très variables entre les espèces (Tableau VII). La durée minimale est observée pour le concombre, environ 30 jours, ce qui correspond dans notre cas à la maturité commerciale et non physiologique. Environ 80 jours sont nécessaires pour atteindre la maturité physiologique chez l'aubergine et le poivron, entre 110 et 160 jours pour le raisin, la pomme et la pêche, et entre 220 et 250 jours chez la clémentine et le kiwi avec un maximum enregistré pour la clémentine.

La durée de la maturation représente moins de 25% de la durée totale de développement pour la pomme, la pêche, le concombre et la clémentine (Tableau VII), mais peut atteindre 40% ou plus pour l'aubergine, le kiwi, le poivron et le raisin avec un maximum de 63% enregistré pour l'aubergine.

Les valeurs maximales du poids frais du fruit sont également très variables (Tableau VII), avec des valeurs moyennes proches du kilogramme pour l'aubergine et le concombre, de 200 à 300 g pour le poivron, la pomme, la pêche, d'environ 100 g pour la clémentine et le kiwi qui sont les espèces présentant la durée de développement la plus longue, et de seulement 1,5 g pour la baie de raisin.

Tableau VII : Données de croissance et de développement de huit espèces de fruits charnus
Durée de développement de l'anthèse au fruit mûr, durée de croissance, durée de maturation, poids
moyen maximum, valeurs maximales de la vitesse de croissance et du RGR issues des données de
croissance de la Figure 1.

	Aubergine	Poivron	Pomme	Pêche	Concombre	Clémentine	Kiwi	Raisin
Durée de développement (JAA)	80	76	157	133	29	253	222	110
Durée de croissance (JAA)	40	40	136	133	25	218	147	77
Durée de maturation (% de la durée totale du développement)	63	46	24	22	17	24	46	38
Poids moyen maximum (g)	1135,5	231,9	218,4	276,0	864,1	87,3	106,1	1,5
Vitesse de croissance maximum (g.Jour ⁻ ¹)	53,13	12,09	3,08	6,30	71,38	1,10	1,93	0,05
RGR maximum (g.g ⁻¹ .Jour ⁻¹)	0,21	0,21	0,05	0,18	0,31	0,04	0,10	0,21

La vitesse maximale de croissance atteint les valeurs les plus élevées pour l'aubergine et le concombre, espèces présentant les plus gros fruits avec un maximum pour le concombre (71,3 g.Jour⁻¹). Des valeurs intermédiaires comprises entre 3 et 12 g.Jour⁻¹ sont observées pour le poivron, la pomme et la pêche. Des valeurs comprises entre 0,05 et 1,10 g.Jour⁻¹

caractérisent le raisin, la clémentine et le kiwi avec la valeur la plus basse (0,05 g.Jour⁻¹) enregistrée pour le raisin, espèce présentant le poids de fruit le plus faible.

Enfin, le RGR maximum calculé présente les valeurs les plus élevées pour le concombre (0,31 g.g⁻¹.Jour⁻¹). L'aubergine, le poivron et le raisin présentent des valeurs intermédiaires de 0,21 g.g⁻¹.Jour⁻¹. La pêche et le kiwi présentent des valeurs comprises entre 0,10 et 0,18 g.g⁻¹.Jour⁻¹ et la clémentine et la pomme de faibles valeurs d'environ 0,05 g.g⁻¹.Jour⁻¹. Les fruits des trois espèces herbacées montrent donc les valeurs de RGR les plus élevées et ceux des vignes et des arbres des valeurs intermédiaires ou faibles, ce qui est à relier aux temps cours et plus ou moins longs mis par le fruit pour atteindre ces valeurs maximales.



Figure 18 : Matrice des corrélations entre les données phénotypiques.

Tableau regroupant les coefficients de corrélation R de Pearson entre les valeurs maximales du poids frais (Pmax), de la vitesse de croissance (Vitmax), du RGR (RGRmax), et les durées de croissance (D_C) ou de maturation (D_M) de chaque espèce. (* *P*-value<0,05 ***P*-value<0,01;*** *P*-value<0,001).

Les relations entre les différentes données phénotypiques concernant la croissance des fruits ont été analysées en utilisant leurs corrélations (Figure 18). Une corrélation positive hautement significative est observée entre le poids moyen maximum du fruit et la vitesse maximale de croissance (R = 0.93). Une corrélation négative hautement significative est également observée entre le RGR maximum et la durée de croissance du fruit (R= -0.88). Enfin une corrélation significative positive est observée (R= 0.72) entre la vitesse maximale de croissance et le RGR maximum.

2. Mise à profit des données de croissance pour la comparaison inter-espèces

La sélection des stades de développement des fruits pour la comparaison inter-espèces a été réalisée à partir des vitesses de croissance des fruits de chaque espèce fruitière et plus

particulièrement à partir de leur vitesse de croissance maximale (Vit_{max}). Le premier stade sélectionné est le stade d'initiation de la croissance (Init) identifié avec une vitesse de croissance inférieure à Vit_{max}/25 (Détaillé chapitre 2). Le deuxième stade sélectionné est celui où la vitesse de croissance atteint la moitié de sa valeur maximale (Vit_{max}/2). Le troisième stade sélectionné est celui ou la vitesse de croissance atteint son maximum (Vit_{max}). Pour chaque vitesse sélectionnée, un stade récolté présentait une valeur de vitesse proche de celle recherchée. Le quatrième stade qui marque le début de la maturation (Mat) a été sélectionné suivant des caractères phénotypiques et biochimiques. Pour l'aubergine, la clémentine et la pêche, il est défini suivant le changement de couleur de la peau du fruit qui se produit peu de temps avant la fin de la croissance. Pour le poivron, il correspond à la maturité commerciale lorsque le fruit a atteint sa taille maximale juste avant le changement de couleur. Pour le concombre, il correspond au moment du ralentissement de la croissance, et pour le raisin au moment de la véraison. Enfin pour la pomme et le kiwi, il se base sur le ralentissement de la croissance et le début de la dégradation de l'amidon. Le cinquième stade sélectionné est le dernier récolté (Mûr) qui présente soit une maturité physiologique (aubergine, poivron, pomme, pêche, kiwi, raisin et clémentine), soit une maturité commerciale (concombre). L'ensemble des stades sélectionnés et les JAA correspondants sont présentés dans le Tableau VIII. Cette sélection sera utilisée pour certaines analyses statistiques.

Tableau VIII : Récapitulatif des stades de croissance sélectionnés et des JAA correspondants
pour la comparaison entre espèces fruitières

JAA	Init	Vit _{max} /2	Vit _{max}	Mat	Mûr
Aubergine	4	18	25	30	59
Poivron	5	20	30	40	76
Pomme	2	63	94	122	157
Pêche	22	86	98	106	133
Concombre	2	12	18	25	29
Clémentine	30	119	160	190	253
Kiwi		26	39	118	222
Raisin	4	14	21	63	105

Données issues des vitesses de croissance de la Figure 1 et d'autres données phénotypiques et biochimiques.

3. Evolution de la teneur en matière sèche des huit fruits charnus



Figure 19 : Evolution de la teneur en matière sèche dans le tissu charnu de huit espèces de fruit au cours du développement

% : Données exprimées en pourcentage de la matière fraiche. Représentation de la moyenne \pm écart type (n=5, sauf pour la pêche à 98 et 106 JAA où n=4).

La teneur en matière sèche (MS) de la partie charnue du fruit dépend de l'espèce et du stade de développement. Elle présente deux profils d'évolution au cours du développement (Figure 19). Le premier regroupe l'aubergine (Figure 19A), le concombre (Figure 19D) et la clémentine (Figure 19F) avec une teneur maximale en MS au stade précoce suivie d'une diminution progressive de la teneur au cours du développement puis d'un plateau à la fin du développement. Les valeurs diminuent de 6,4% à 3 % pour le concombre, de 12% à 5,5% pour l'aubergine et de 31% à 11,7% pour la clémentine. Le second profil d'évolution regroupe le poivron (Figure 19B), la pomme (Figure 19C), la pêche (Figure 19E), le kiwi (Figure 19F) et le raisin (Figure 19H). Il présente une diminution puis une nouvelle augmentation de la teneur en matière sèche au cours du développement avec deux groupes. Le premier qui comprend les fruits des deux vignes, le kiwi et le raisin, est caractérisé par une teneur en matière sèche au stade précoce inférieure à celle du stade mûr. La teneur en matière sèche varie de 14% à 7% puis augmente jusqu'à 16% pour le kiwi, et elle varie de 11% à 6% puis augmente jusqu'à 24,5% pour le raisin. Le second qui comprend le poivron, la pomme et la pêche est caractérisé par une teneur en matière sèche au stade précoce (14 à 24%) supérieure à celle au stade mûr (11 à 12%). La teneur en matière sèche au stade précoce la plus élevée est observée chez la clémentine (31%) et la plus faible chez le concombre (6,4%). La teneur en matière sèche au stade mûr la plus élevée est relevée chez le raisin (24,5 %) et la plus faible chez le concombre (3%). Pour prendre en compte ces différences entre espèces, la composition des fruits a ensuite été exprimée dans certains cas par unité de matière sèche.

- II. Caractérisation de la composition de huit espèces de fruits charnus
 - 1. Identification des métabolites polaires majeurs chez huit espèces de fruits charnus

La composition qualitative en métabolites polaires solubles a été déterminée grâce à l'annotation du spectre RMN d'un extrait polaire issu d'un mélange des stades de développement pour chaque espèce. L'annotation des spectres (Figure 20) a été réalisée grâce aux données de composition publiées (Ritota *et al.* 2010; Capitani *et al.* 2010, 2013; Mulas *et al.* 2011; de Oliveira *et al.* 2014; Tomita *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2017), aux bases de données spectrales (HMDB et BMRB), à la superposition de spectres d'extrait avec les spectres de composés de référence préparés et acquis dans les mêmes conditions, ainsi qu'à des expérimentations de RMN 2D décrites au chapitre 2. Un total de 42 composés ont été identifiés, dont sept sucres et un sucre-alcool, huit acides organiques, 24 acides aminés et composés azotés, un composé phosphorylé et deux composés phénoliques. Les tableaux regroupant les composés et les déplacements chimiques proton correspondant pour chaque espèce fruitière sont consultables en Annexe 6.

Les sucres et les sucres-alcools sont des composés majeurs pour l'ensemble des espèces. En effet, le glucose, le fructose, le saccharose et l'inositol sont détectés dans l'ensemble des espèces. La pêche et la clémentine présentent de fortes teneurs en saccharose par rapport aux autres espèces. L'inositol semble être le sucre-alcool majeur chez le kiwi et l'aubergine (Figure 20). Le galactose est détecté dans le concombre, la pêche et le kiwi, le xylose est détecté dans le kiwi, la pomme et la pêche. Le sorbitol n'a pas pu être détecté par RMN 1D à cause des recouvrements de pics dans la zone des sucres mais il a été dosé par spectrophotométrie UV-visible car c'est le sucre-alcool majeur dans la pomme et la pêche. Enfin, le kiwi se démarque par la présence de raffinose (Annexe 6).

En ce qui concerne les acides organiques, le citrate ainsi que le malate sont communs à toutes les espèces. La très faible quantité de citrate dans le concombre contraste avec sa forte présence dans la clémentine (Figure 20). Le quinate, détecté chez toutes les espèces excepté le concombre et le raisin, est un acide organique majeur chez le kiwi, l'aubergine, le poivron et la pêche (Figure 20). Le fumarate et le succinate sont détectés chez toutes les espèces, excepté la clémentine et le kiwi. Le shikimate est détecté chez l'aubergine, le raisin et le kiwi, et le chlorogénate chez la pomme et l'aubergine où il est fortement présent (Annexe 6). Enfin le kiwi se démarque par la présence d'isocitrate (Annexe 6) et le raisin par l'abondance de tartrate.

Enfin, concernant les acides aminés et les composés azotés, de nombreuses différences entre les espèces sont observées. L'une des premières différences marquantes est la détection de nombreux acides aminés et composés azotés chez l'aubergine, le poivron, la clémentine et le raisin (entre 12 et 19) et d'un plus faible nombre détecté (inférieur à 10) chez la pêche, la pomme et le kiwi (Annexe 6). Parmi ces composées, l'alanine, la valine et l'aspartate sont détectés pour l'ensemble des espèces. L'asparagine est détectée chez toutes les espèces sauf le raisin et semble être un acide aminé majeur chez la pomme et la pêche, tout comme la glutamine qui a été détectée chez plusieurs espèces mais semble être un acide aminé majeur du concombre (Figure 20). Certains composés semblent spécifiques de quelques espèces comme l'acétyl-choline qui est détectée seulement chez l'aubergine, le concombre et la clémentine, le pyroglutamate présent chez l'aubergine et le concombre, ou encore la proline, acide aminé majeur du raisin et de la clémentine (Figure 20). Enfin des composés spécifiques d'une espèce sont l'histamine pour l'aubergine, la citrulline pour le concombre (Figure 20), la tyramine, la diméthyle proline (DMP) et la synéphrine qui est une amine aromatique, pour la clémentine (Figure 20et Annexe 6). Cette description qualitative montre tous les composés majeurs présents au-dessus du seuil de détection de la RMN du proton estimé à environ 5-9 µg dans les extraits (Moing *et al.* 2004) mais variant selon la structure de chaque métabolite.



Figure 20 : Représentation qualitative et quantitative des composés polaires majeurs dans les extraits de tissus charnus de huit espèces fruitières analysées par RMN 1H.

Analyses réalisées sur l'extrait polaire d'un mélange homogène de l'ensemble des stades de développement de chaque fruit à partir de la méthode décrite au chapitre 2. Portion de spectre entre 1,8 ppm et 4,7 ppm partiellement annotée, zone correspondant à une majorité des métabolites primaires majeurs de fruit. Axe des x : déplacement chimique (ppm) ; Axe des y : intensités (unités arbitraires) ; DMP, diméthyl-proline.

Ces annotations des spectres ont fourni des informations sur la composition et permis de révéler des composés majeurs solubles communs à toutes les espèces comme les trois sucres solubles, glucose, fructose et saccharose, et les deux acides organiques majeurs, le citrate et le malate. L'ensemble de ces composés communs a été dosé sur microplaque ainsi que le sorbitol qui n'était pas quantifiable par RMN ¹H pour la pomme et la pêche, et les acides aminés libres totaux et l'ascorbate. De plus, l'analyse des spectres RMN a révélé que pour certaines espèces des composés primaires autres que ceux mentionnés ci-dessus présentaient de fortes concentrations comme le quinate et l'inositol pour le kiwi (Figure 20), ou le shikimate, l'histamine, le chlorogénate pour l'aubergine (Annexe 6). Les séries développementales de l'aubergine et du kiwi ont donc été analysées par RMN ¹H. Un total de 29 métabolites pour l'aubergine, 23 pour le poivron et 20 pour kiwi a alors pu être quantifié de manière absolue par RMN ¹H.

2. Polymères et autres composés non solubles dans le fruit

La partie charnue des fruits est également composée de protéines, estimées à l'aide du dosage des protéines totales, et de lipides. Ces derniers sont dosés à partir des acides gras majeurs des FAMES (chapitre 2). Le palmitate (C16:0), le stéarate (C18:0), l'oléate (C18:1 cis-9), le linoléate (C18:2 cis-9,12), le linolénate (C18:3 cis-9, 12,15), l'arachidate (C20:0) et le lignocérate (C24:0) sont présents chez l'ensemble des espèces. Les fruits sont également composés de polymères de sucres comme l'amidon, la cellulose ainsi que d'autres polysaccharides formant les parois cellulaires. Ces derniers sont composés de différents monosaccharides tels que le fucose, le xylose, l'arabinose, le galactose, le mannose, le rhamnose, le glucose et d'acides uroniques comme le galacturonate et le glucuronate présents chez toutes les espèces. Afin de compléter les données de biomasse, l'ensemble de ces composés a été dosés suivant les méthodes décrites dans le chapitre 2.

3. Explication de la matière sèche par la composition

La part de la matière sèche expliquée par l'ensemble des composés mesurés, à savoir les sucres solubles et sucres-alcools comprenant en plus le raffinose pour le kiwi et l'inositol pour le kiwi et l'aubergine, les acides organiques comprenant en plus le quinate pour le kiwi et l'aubergine et l'isocitrate pour le kiwi, les acides aminés, les protéines, l'amidon, les polysaccharides pariétaux et les lipides varie suivant les stades de développement (Figure 21). L'ensemble de ces composés expliquent en moyenne 54 % de la matière sèche pour les stades précoces (Init et 13 JAA pour le kiwi), et 99% de celle-ci pour les stades mûrs.



Figure 21 : Evolution du pourcentage de matière sèche expliquée par les composés mesurés dans les tissus charnus des fruits

Moyennes (n=5) des teneurs en sucres plus sucres-alcools et acides organiques majeurs, acides aminés libres totaux, protéines totales, amidon, cellulose cristalline et autres polysaccharides pariétaux et lipides pour 5 stades de développement sélectionnés : Init, (sauf pour kiwi), Vit_{max}/2, Vit_{max}, Mat, M \hat{u} r.

La comparaison des profils métaboliques obtenus met en évidence des similitudes entre les huit fruits charnus (Figure 21). Pour la plupart des espèces, les teneurs en sucres/sucresalcools et polysaccharides pariétaux augmentent de manière forte entre le stade « Init » et le stade « Vit_{max}/2 » puis restent constantes ou augmentent légèrement jusqu'à ce que le fruit atteigne sa maturité. L'augmentation des glucides solubles majeurs se fait plus tardivement au cours du développement chez le raisin et la clémentine. A *contrario,* la plupart des espèces présentent une diminution de la teneur en acides aminés libres totaux (sauf le concombre), lipides et protéines totales dès le stade « Init ». Pour la plupart des espèces et particulièrement les espèces ligneuses et les vignes, la teneur en acides organiques a tendance à augmenter lors des phases de croissance rapides puis diminuer lors de la maturation.

Cependant des différences majeures apparaissent également (Figure 21). Elles sont notables chez le kiwi dont les teneurs en sucres, sucres-alcools et composés pariétaux ne suivent pas les mêmes évolutions que chez les autres espèces fruitières. En effet, une teneur de ces composés est constante jusqu'à « Vit_{max} » puis une diminution lors de la maturation suivie d'une nouvelle augmentation de la teneur au stade mûr est observée. De plus, entre les stades « Vit_{max} » et « Mat » la teneur en amidon augmente fortement tandis que chez la pomme, cette teneur augmente progressivement au cours du développement, puis elle diminue lors de la maturation pour ces deux espèces fruitières. Chez la pêche, l'amidon présente sa teneur la plus élevée lors du premier pic de vitesse de croissance (Figure 17 et Figure 21). La teneur en acides aminés totaux augmente au cours du développement chez l'aubergine et de manière encore plus nette chez le concombre, mais varie peu chez la clémentine de même que la proline, l'un des acides aminés majeur de ce fruit. Contrairement aux autres espèces, une diminution puis une augmentation de la teneur en lipides totaux dans le poivron est observée. Le profil de la somme des acides organiques majeurs est très variable suivant l'espèce herbacée, avec une diminution au cours du développement pour l'aubergine et une diminution jusque « Vitmax/2 » puis augmentation pour le concombre, alors qu'elle reste constante pour le poivron.

III. Comparaison intra et inter espèces au cours du développement

Les résultats précédents sur les teneurs en matière sèche chez les huit espèces de fruit charnu ont mis en évidence de fortes variations entre espèces et au cours du développent. Par conséquent, les données de composition seront exprimées en fonction de la MS pour les comparaisons. L'ensemble des analyses statistiques présentées dans cette partie a été réalisé à partir des données converties en µmol.g⁻¹ MS.

1. Evolution de la composition au cours du développement pour chaque fruit

Afin de pouvoir visualiser globalement l'évolution de la composition au cours du développement de chaque fruit, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur les données quantitatives de composition (21 à 25 composés) de chaque espèce pour tous les stades récoltés (Figure 22). Pour chaque espèce, les réplicas d'un même stade sont proches



et la variabilité totale expliquée par les deux premières composantes principales (CP) est supérieure à 60%.



Figure 22 : Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour chacune des huit espèces fruitières à l'aide d'ACP.

Selon les espèces, 21 à 25 variables et 9 à 12 stades de développement (entre 45 et 60 échantillons) sont analysés. Graphiques des « scores » sur les deux premières CP à gauche. Graphique des « loadings » sur les deux premières CP à droite. L'évolution des stades de développement est indiquée sur les graphiques des « scores » à l'aide d'une flèche noire des stades précoces (couleur claire) vers les stades maturation puis mûr (couleur foncée des symboles).

L'évolution de la composition entre deux stades consécutifs est progressive sur CP1 et souvent plus tranchée sur CP2. Pour tous les fruits sauf le kiwi, les stades précoces présentent des coordonnées négatives, et les stades « début de maturation » ou « mûr » des coordonnées positives sur CP1. Pour tous les fruits sauf la pomme, le stade mûr présente des coordonnées négatives sur CP2. Le kiwi présente une évolution de composition originale avec un aller-retour au niveau des trois premiers stades : les stades précoces ont des coordonnées positives sur CP2 et proches de 0 sur CP1, puis l'évolution se poursuit avec des coordonnées négatives sur CP2 avant de retourner vers des coordonnées positives sur CP1, peut-être liée à l'évolution de la teneur en isocitrate.

La comparaison du graphique des « scores » avec celui des « loadings » pour chaque espèce montre quelques rares tendances partagées comme l'augmentation de teneur en glucose et fructose au cours de développement, ou les teneurs plus élevées en protéines totales ainsi qu'en l'ascorbate total lors de la croissance accélérée et exponentielle du fruit (selon les espèces) sauf pour le poivron. L'évolution de la composition et surtout les composés contribuant à discriminer les stades dépendent de l'espèce. Il semble alors préférable pour identifier les grandes tendances de travailler sur les moyennes des teneurs des composés communs ou par famille biochimique des réplicas, et ceci pour des stades standardisés en termes de croissance et développement afin de comparer de manière judicieuse les espèces entre elles.

2. Comparaison inter-espèce et évolution des grandes tendances de composition au cours du développement

Afin de visualiser globalement l'évolution de la répartition de la composition de la biomasse au cours du développement du fruit pour les familles de composés, une ACP a été réalisée sur les teneurs globales des sucres et sucres-alcools, des acides organiques, des acides aminés, l'ascorbate total, les protéines totales, l'amidon, les composants de la paroi cellulaire et les lipides totaux. L'observation du graphique des « scores » (Figure 23A) montre que les deux premières CP, qui expliquent 58% de la variabilité totale, séparent le stade « Init » du stade « mûr ». On note une l'évolution progressive de la composition du stade « Init » vers le stade « Mûr » sur la CP1 pour chaque espèce. La majorité des stades « Init », caractérisés par des coordonnées négatives sur les CP1 et CP2, se détache distinctement des autres stades alors que les stades « Mûr » présentent des coordonnées positives sur CP1 et se regroupent avec les stades « Mat » pour la plupart des espèces. Le stade Vit_{max}/2 semble le plus variable entre les espèces. La comparaison du graphique des « scores » (Figure 23A) et du graphique des « loadings » (Figure 23B) montre les variables susceptibles d'expliquer ces différences. Les jeunes stades « Init » sont caractérisés par des teneurs plus élevées en lipides totaux et en protéines totales. Les stades « Mûr » sont caractérisés par des concentrations plus élevées en sucre et en polysaccharides pariétaux.



Figure 23 : Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour les huit espèces fruitières à l'aide d'une ACP sur 8 variables représentant des familles de composés.

ACP de 39 échantillons de tissus charnus pour 5 stades de développement et 8 espèces de fruits. A. Graphiques des « scores » sur les deux premières CP. Les échantillons sont colorés suivant leur espèce. B. Graphique des « loadings » sur les deux premières CP. Les ellipses indiquent les stades de développement. Les variables sont les sommes des teneurs en métabolites ou composés qui définissent ou représentent chacune une famille de composés. Les sucres et sucres-alcools comprennent glucose, fructose, saccharose pour l'ensemble des fruits, avec raffinose pour le kiwi, sorbitol pour la pêche et la pomme et inositol pour l'aubergine et le kiwi. Les acides organiques comprennent citrate et malate pour l'ensemble des espèces, avec quinate pour le kiwi et l'aubergine, isocitrate pour le kiwi et tartrate pour le raisin. Les autres variables sont les teneurs en acides aminés totaux, ascorbate total, protéines totales, amidon, polysaccharides pariétaux (cellulose cristalline et autres polysaccharides) et lipides totaux.

Cette première analyse montre les grandes tendances du changement de composition au cours du développement avec des généralités pour l'ensemble des fruits aux stades « Init » et aux stades « Mûr ». En revanche la variabilité entre les espèces semble prédominer sur celle entre stades de développement pour les stades intermédiaires.

 Comparaison inter-espèce et évolution de la composition au cours du développement

Après cette première analyse sur les familles de composés, une analyse plus fine a été réalisée avec les 28 variables communes aux huit espèces et pour les cinq stades de développement standardisés.

L'observation du graphique des « scores » (Figure 24A) montre que les deux premières CP qui expliquent 46% de la variabilité totale séparent clairement le stade « Init » des autres stades de développement. Une évolution progressive de la composition du stade « Init » vers le stade « Mûr » est à nouveau notée sur la CP1. La majorité des stades « Init » sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP1 et positives sur CP2 et se détache distinctement des autres stades. En revanche les autres stades de développement ne se différencient pas clairement entre eux. Cependant, les différentes espèces ont tendance à se regrouper au début du développement et à se différencier au cours de celui-ci en formant trois groupes. Le premier groupe caractérisé par des coordonnées positives sur CP2 comprend les fruits des 3 espèces arbustives ainsi qu'une vigne, le raisin. Le deuxième groupe caractérisé par des coordonnées négatives sur CP2 comprend les fruits des trois espèces herbacées. Le troisième groupe s'étalant sur les CP1 et CP2 des côtés positif et négatif comprend le fruit de l'autre vigne, le kiwi.



Figure 24 : Visualisation de l'évolution de la composition du fruit au cours du développement pour les huit espèces fruitières à l'aide d'une ACP de 28 composés individuels.

ACP de 39 échantillons avec 5 stades de développement standardisés. A. Graphique des « scores » sur les deux premières CP. Les échantillons sont colorés suivant leur espèce. Le stade « Init » est mis en évidence par l'ellipse noire. B. Graphique des « loadings » sur les deux premières CP. Les composés sont colorés suivant leur famille biochimique.

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 24A) et de celui des « loadings » (Figure 24B) montre que les jeunes stades « Init » sont caractérisés par des teneurs plus élevées en acides gras estérifiés et en protéines totales, en accord avec la Figure 23 sur les familles de composés. Les fruits d'espèces arbustives et le raisin ont tendance à présenter des teneurs plus élevées en arabinose et fucose des parois et en saccharose pour les stades en début de maturation et mûrs. Les fruits d'espèces herbacées ont tendance à présenter des teneurs plus élevées en mannose, xylose et galactose des parois et cellulose cristalline, et en glucose à ce même stade, avec également des teneurs plus élevées en acides aminés aux stades intermédiaires. Les espèces climactériques (aubergine, pomme, pêche et kiwi) ne se distinguent pas des espèces non climactériques (poivron, concombre, clémentine et raisin) sur le plan des deux premières CP.

Cette analyse multivariée sur la composition montre clairement qu'un effet stade commun entre les espèces est visible lors des premiers stades de développement du fruit puis s'efface au moment où la croissance du fruit s'accélère. La distinction des fruits des espèces ligneuses et herbacées s'accentue lors de la période de croissance. L'évolution de la composition durant le développement est donc espèce dépendant. Ces tendances observées sur l'ACP ont été confirmées par des analyses univariées (ANOVA à deux facteurs avec correction FDR, *P*-value< 0,05). L'ensemble des teneurs des 28 composés individuels s'est révélé significativement affecté par le stade et l'espèce, mais aussi par l'interaction stade espèce.

4. Comparaison de différents groupes d'espèces fruitières par analyse multivariée discriminante

Des analyses multivariées avec *a priori* (OCS2-PLS-DA) ont été réalisées sur l'ensemble des fruits et les cinq stades de développement sélectionnés, sur les teneurs des 28 composés communs. La première PLS tente de discriminer deux groupes d'espèces, les fruits climactériques (pomme, pêche et kiwi) et les non climactériques (aubergine, poivron, concombre, clémentine et raisin) (Figure 25A-B). La deuxième tente de discriminer les fruits des trois groupes d'espèces, les espèces herbacées (aubergine, poivron, concombre), les vignes (raisin et kiwi) et les espèces arbustives (clémentine, pomme, pêche) (Figure 25C-D). La troisième tente de séparer les fruits des Solanacées (aubergine et poivron) et des Rosacées (pomme et pêche) (Figure 25E-F).

Pour la première et la deuxième analyse PLS, la séparation des groupes se fait difficilement car deux filtrations OSC ont été nécessaires pour que celle-ci soit claire. Pour la troisième analyse, il n'a pas été nécessaire d'utiliser de filtre OSC pour séparer clairement les deux groupes. Cependant pour chacune des trois analyses, une seule composante (ou variable latente) a permis d'élaborer un modèle de classification. L'erreur prédite pour la première analyse RMSEP est de 0,23, pour la deuxième de 0,26 et pour la troisième de 0,23. La qualité de prédiction du modèle (Q²) calculée par validation croisée est de 0,90 pour la première analyse, 0,92 pour la deuxième et 0,96 pour la troisième (chapitre II).

Sur le graphique des « scores » de la première analyse PLS (Figure 25A), la première composante (C1) explique 85 % de la variance de Y (caractère climactérique ou nonclimactérique) et 15% de la variance de la matrice X des teneurs des 28 composés. Elle permet de distinguer les échantillons des fruits non climactériques du côté positif, de ceux des fruits climactériques du côté négatif pour tous les stades. Sur le graphique des « scores » de la deuxième analyse (Figure 25C), C1 explique 94 % de la variance de Y (espèce arbustive, vigne ou herbacée) et 24% de la variance de la matrice X des teneurs des 28 composés. Elle permet de distinguer les échantillons des espèces arbustives du côté négatif, des vignes au centre et des herbacées du côté positif pour tous les stades. Sur le graphique des « scores » de la troisième analyse (Figure 25E), C1 explique 89 % de la variance de Y (famille des Solanacées ou Rosacées) et 29% de la variance de la matrice X des teneurs des 28 composés. Elle permet de distinguer les échantillons de la famille des Solanacées du côté positif, de ceux de la famille des Solanacées du côté négatif pour tous les stades.



Figure 25 : Analyse discriminante des espèces climactériques et non climactériques par OSC-PLS-DA de 28 variables mesurées dans 39 échantillons correspondant à 5 stades de développement et 8 espèces de fruits charnus.

A, C et E. Graphiques des « scores » sur les deux premières composantes. Les échantillons sont colorés suivant leur espèce. A. L'ellipse bleue regroupe les fruits climactériques et l'ellipse rouge les fruits non climactériques, les espèces climatériques sont en gras. C. L'ellipse brune regroupe les espèces arbustives, l'ellipse jaune les vignes et l'ellipse verte les herbacées. E. L'ellipse orange regroupe les Rosacées et l'ellipse violette les Solanacées. B, D et F. Graphique des « loadings » sur les deux premières composantes. Les composés sont colorés suivant leur famille biochimique. Paramètres des modèles B. OSC2-PLS-DA : R²Y= 85.4% et Q²=0,90. D. OSC2-PLS-DA : R²Y= 94.1% et Q²=0,92. F PLS-DA : R²Y= 89.1% et Q²=0,96
Dix composés présentant des scores de l'importance de chaque variable dans la prédiction du modèle (« Variable Importance into the Projection », VIP) avec des valeurs supérieures à 1 pour les analyses OSC-PLS-DA et PLS-DA sont répertoriés dans le Tableau IX.

Le score VIP le plus élevé pour la PLS sur le caractère climactérique est de 1,80 pour le glucose pariétal qui d'après les graphiques des « scores » et « loadings » (Figure 25A-B), présente une teneur qui tend à être plus élevée pour les fruits climactériques. Les deux autres scores VIP les plus importants (≥ 1,6) concernent des variables qui présentent également une teneur qui tend à être plus élevée pour les fruits climactériques et font partie des composants des polymères de la paroi cellulaire (fucose) ou d'un autre polymère, l'amidon. Les acides gras lignocérate et stéarate, les protéines totales, l'ascorbate oxydé, les acides aminés et le glucose libre présentent des scores VIP compris entre 1,6 et 1,2 et présentent une teneur qui tend à être plus élevée pour les fruits non climactériques.

Le score VIP le plus élevé pour l'analyse PLS pour le caractère herbacée/vigne/arbre est de 1,99 pour l'arabinose qui d'après les graphiques des « scores » et « loadings » (Figure 25C-D) présente une teneur qui tend à être plus élevée pour les fruits d'espèces arbustives. Les trois scores VIP les plus élevés dont celui de l'arabinose (>1,6) concernent des variables qui présentent une teneur qui tend à être plus élevée pour les fruits d'espèces arbustives, dont deux font partie des composants des polymères de la paroi cellulaire (arabinose et fucose), la troisième est un sucre libre, le saccharose. L'acide gras stéarate, l'ascorbate oxydé, les acides aminés et le glucose présentent des scores VIP compris entre 1,6 et 1,2 et sont caractérisés par des teneurs qui tendent à être plus élevées pour les fruits d'espèces herbacées.

Climactériques/Non climactériques		Arbres/Vignes/Herbacées		Rosacées/Solanacées	
Composé	VIP Score	Composé	VIP Score	Composé	VIP Score
Glucose (Paroi)	1,80	Arabinose	1,99	Fucose	1,59
Fucose	1,75	Fucose	1,92	Stéarate	1,54
Amidon	1,62	Saccharose	1,66	Arabinose	1,37
Lignocérate	1,55	Stéarate	1,47	Acides aminés totaux	1,35
Ascorbate oxydé	1,49	Ascorbate oxydé	1,44	Lignocérate	1,34
Protéines	1,44	Glucose	1,39	Protéines	1,29
Glucose	1,40	Acides aminés totaux	1,35	Rhamnose	1,22
Acides aminés	1,29	Protéines	1,16	Malate	1,20
Stéarate	1,21	Lignocérate	1,15	Glucose	1,17
Arabinose	1,19	Mannose	1,05	Amidon	1,14

Tableau IX : Scores des 10 variables ayant des VIP supérieures à 1 pour les analyses OSC2-PLS-DA et PLS-DA présentées Figure 24 Discrimination des espèces climactériques (en bleu) et non climactériques (en rouge), des espèces

arbustives (en brun) des vignes et des herbacées (en vert), des espèces appartenant à la famille des

Solanacées (violet) de celles de la famille des Rosacées (Orange)

Le score VIP le plus élevé pour la troisième analyse PLS concernant les deux familles botaniques est de 1,59 pour le fucose qui d'après les graphiques des « scores » et « loadings »

Chapitre III

(Figure 25E-F) présente une teneur qui tend à être plus élevée pour les Rosacées. Les trois scores VIP les plus importants (>1,35) correspondent à deux variables caractérisées par des coordonnées négatives sur C1, le fucose et l'arabinose des polymères de la paroi cellulaire, et une variable avec coordonnée positive sur C1, le stéarate . Un autre acide gras, le lignocérate, les acides aminés totaux, les protéines totales, le rhamnose et le malate présentent des scores VIP compris entre 1,6 et 1,2. Ces derniers composés sont tous caractérisées par des coordonnées positives sur C1 (sauf pour le malate) donc présentent une teneur qui tend à être plus élevée pour la famille des Solanacées.

 IV. Prédiction du taux relatif de croissance par la composition au cours du développement du fruit

Afin de rechercher un lien entre la composition du fruit et sa vitesse de croissance, nous avons utilisé une approche de modélisation combinant des données de croissance avec celles de la composition du fruit sur l'ensemble des fruits et des stades de développement. L'utilisation de modèles linéaires généralisées (Friedman *et al.* 2010) a été choisie afin de prédire le RGR à partir des teneurs en métabolites et autres composés dans un premier temps pour l'ensemble des fruits et des stades de développement, et dans un deuxième temps par grande phase de croissance et développement du fruit (phase d'accélération de la croissance, phase de croissance exponentielle e et phase de maturation) pour toutes les espèces.

1. Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR chez l'ensemble des fruits

Les espèces fruitières ont été considérés toutes ensemble. Le modèle linéaire généralisé, détaillé dans le chapitre 2, a été appliqué sur l'ensemble des espèces et les résultats de prédiction du modèle ainsi que l'importance des variables dans la réalisation du modèle sont présentés Figure 26.

Le modèle qui regroupe l'ensemble des fruits et des stades de développement possède une qualité de prédiction correcte (Figure 26A) avec un coefficient de détermination R² égal à 0,86. Concernant l'importance de chaque composé (Figure 26B) dans le modèle, ce sont les composés de la paroi, les lipides et les protéines qui ressortent le plus du modèle, contrairement aux composés solubles. De manière plus précise, le galactose, les protéines et le lignocérate sont des variables importantes associées à la hausse du RGR alors que le galacturonate est une variable importante associée à la baisse du RGR.



Figure 26 : Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR à partir des teneurs des composés pour l'ensemble des espèces fruitières.

Graphique de corrélation entre les valeurs de RGR mesurées et prédites par le modèle pour l'ensemble des fruits à partir des concentrations exprimées par g de matière sèche (A). Importance de la contribution des variables classées par famille biochimique pour le modèle (B).

2. Modèle linéaire généralisé pour la prédiction du RGR pour différentes phases de croissance des fruits

Afin d'affiner la modélisation de la croissance de l'ensemble des espèces, les fruits ont été classés suivant trois phase de développement, la phase I est la phase d'accélération de la croissance et qui regroupe l'ensemble des stades toutes espèces confondues ayant une vitesse de croissance inférieure à Vit_{max}/10. La phase II est caractérisée comme une phase de croissance exponentielle et regroupe les stades de développement compris entre Vit_{max}/10 et le stade « Mat » non inclus. La dernière phase est la phase de maturation du fruit qui regroupe tous les stades compris entre le stade « Mat » inclus et le dernier stade récolté. Ces différentes phases de développement du fruit sont représentées sur la Figure 27.



Figure 27 : Représentation des trois phases de développement sélectionnées pour la modélisation de la croissance, exemple du poivron.

Le modèle linéaire généralisé, détaillé dans le chapitre 2, a été appliqué à chaque phase de développement du fruit et les résultats de prédiction du modèle ainsi que l'importance des

variables dans la réalisation du modèle sont présentés Figure 28. La qualité de prédiction pour chaque modèle est bonne et similaire pour les trois modèles avec des valeurs de R² proches de 0,95 (Figure 28A-B-C). Concernant l'importance de chaque composé (Figure 28D), pour la phase I, le mannose, le galacturonate, les protéines et le lignocérate, sont des variables importantes associées à la hausse du RGR, et l'arabinose une variable importante associée à une baisse du RGR. Lors de cette première phase (Figure 28A), les espèces herbacées sont regroupées (valeurs hautes du RGR sur le graphique), les vignes sont regroupées (valeurs intermédiaires du graphique) et les espèces arbustives également (valeurs basses du graphique). Pour la phase II, le palmitate, le linolénate, les protéines et les acides aminés totaux sont des variables importantes associées à hausse du RGR, et aucun composé n'est associé à la baisse du RGR. Pour la phase III, aucun composé ne contribue fortement à la hausse du RGR et le rhamnose est fortement associé à la baisse du RGR.



Figure 28 : Modèles linéaires généralisés pour la prédiction du RGR à partir des teneurs des composés pour trois phases de développement du fruit.

Graphiques de corrélation entre les valeurs mesurées et prédites de RGR pour la phase I (A), la phase II (B), et la phase III (C), à partir des teneurs exprimées par matière sèche. Importance de la contribution des variables classées par famille biochimique pour les trois modèles (D).

V. Discussion

Notre étude vise à comparer un grand nombre d'espèces au cours de leur développement au travers d'analyses quantitatives de la composition du fruit. A notre connaissance, de nombreuses études ont été réalisées sur la composition des fruits au cours de leur développement ou de leur maturation mais de manière individuelle (Nielsen *et al.* 1991; Marsh *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2010; Lombardo *et al.* 2011; Dai *et al.* 2013; Nardozza *et al.* 2013; Biais *et al.* 2014). En revanche, peu d'études comparatives des espèces ont été mises en lumière ces dernières années (Annexe 1). En effet, la première difficulté rencontrée pour la comparaison est l'hétérogénéité des résultats obtenus pour un même métabolite à travers différents laboratoires, modes opératoires ou instrumentations (Quentin *et al.* 2015). Le principal avantage de notre étude est la réalisation de toutes les récoltes de fruits la même année (2016) et de l'ensemble des analyses quantitatives dans le même lapse de temps (2017-2018) en utilisant les mêmes méthodes d'extraction, d'analyse et la même instrumentation de mesure. Tout cela permet une comparaison plus affinée entre les espèces.

1. Croissance et développement des fruits : classification basées sur les données phénotypiques

Les durées de développement du fruit à partir de l'anthèse varient entre les huit espèces mais nos données de développement et de croissance du fruit sont globalement en accord avec la littérature. Le concombre, d'un poids élevé à maturité commerciale parmi les huit espèces étudiées, nécessite la plus courte période pour l'atteindre. Nos données sur le poids final et la durée de développement du concombre concordent avec celles de la littérature (Davies et Kempton 1976; Marcelis 1992). Le concombre fait partie de la famille des Cucurbitacées, le chargement de son phloème se fait par un mécanisme symplastique actif (Fu et al. 2011). Chez les chargeurs symplastiques actifs, le saccharose (diholoside) diffuse dans les cellules compagnes par l'intermédiaire de plasmodesmes et se transforme en oligomères de sucres (raffinose, triholoside et stachyose, tétraholoside). Ces derniers, d'encombrement stérique plus grand, ne peuvent pas diffuser vers le parenchyme du phloème, formant ainsi un mécanisme polymère piégeant le saccharose (Annexe 1). Les plantes herbacées possèdent un charge phloémienne active qui leur permet de maintenir de faibles stocks de glucides non structuraux dans les feuilles. Cela permet de maximiser l'efficacité de l'utilisation du carbone et ainsi, de considérablement augmenter le potentiel de croissance (Rennie et Turgeon 2009; Fu et al. 2011)

En ce qui concerne les deux espèces de Solanacées, il faut environ 80 jours pour que leur fruit atteigne sa maturité physiologique, alors que ces deux fruits présentent des poids différents. Cette valeur est connue pour le poivron (Nielsen *et al.* 1991), mais peu de données publiées existent quant à la maturité physiologique de l'aubergine chez laquelle le poids du fruit peut atteindre le kilo de matière fraîche. La tomate met moins de temps pour atteindre sa maturité physiologique : environ 50 jours (Monselise *et al.* 1978).

Les fruits des espèces ligneuses présentent ici un temps de développement plus long que ceux des espèces herbacées étudiées pour atteindre leur taille finale ainsi que leur maturité physiologique comme observé dans d'autres études sur ces fruits (Okuse et Ryugo 1981; Bustan *et al.* 1996; Ollat et Gaudillère 1998; Lo Bianco *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2010). Les durées de maturation des fruits des espèces arbustives étudiées, sont plus courtes que celles des vignes et des espèces herbacées ayant atteint leur maturité physiologique par rapport à la durée totale de développement. Cette tendance ne peut pas être généralisée puisque la cerise, fruit d'une espèce ligneuse, présente une durée totale de développement d'environ 30 jours (Carrington et King 2002), cependant sa période de maturation est également courte par rapport à la durée totale de développement.

Pour affiner les comparaisons de durée de développement entre espèces, une expression de cette durée en degrés-jours de croissance au lieu de jours (Went 1953) a été envisagée. Cependant, cela s'est avérée complexe à mettre en œuvre en raison de la variabilité des seuils de température de croissance à utiliser dont certains ne sont pas publiés comme cela existe pour la tomate (Boote *et al.* 2012). Pour pallier ce problème, nous avons réalisé une caractérisation fine de l'évolution de la croissance de chaque espèce fruitière.

Les profils d'évolution du poids du fruit sont en accord avec les données publiées pour l'aubergine, le poivron, le concombre et la pomme qui présentent une simple sigmoïde (Nielsen et al. 1991; Esteban et al. 1992; Percy et al. 1996; Davies et Kempton 1976). De la même manière, les évolutions du RGR (augmentation suivie d'une diminution au cours du développement) ont été observées chez la pomme (Schechter et al. 1993), le poivron (Nielsen et al. 1991), le concombre (Marcelis 1992) et la clémentine (Bustan et al. 1996). Le profil en double sigmoïde observé pour le poids frais ou encore le diamètre des fruits pour la pêche, le kiwi et le raisin a également été décrit précédemment (Moing et al. 1998; Okuse et Ryugo 1981; Ollat et Gaudillère 1998; Coombe 1976). De plus, pour la pêche et le raisin, la reprise de croissance relative des fruits est bien connue (Ollat et Gaudillère 1998; Lo Bianco et al. 1999). Cependant le kiwi pourrait présenter dans certains cas une courbe de croissance en triple sigmoïde (Coombe 1976). Cette observation a également été faite pour le RGR de ce fruit qui semble varier avec une seconde évolution discrète ou double selon les travaux publiés (Moscatello et al. 2011; Sorce et al. 2017). Le profil de la clémentine décrit dans la littérature comme une simple sigmoïde (Coombe 1976), présente ici une décroissance à la fin du développement probablement due à un effet environnemental car elle n'est pas toujours observée (Marsh et al. 1999; Cercós et al. 2006).

Le délai court pour atteindre le RGR maximum pour les fruits des herbacés a déjà été rapporté (Nielsen *et al.* 1991; Marcelis 1992). Le délai intermédiaire pour la pomme, le raisin et le kiwi est en accord avec des observations publiées (Schechter *et al.* 1993; Ollat et Gaudillère 1998; Sorce *et al.* 2017). Enfin, les délais relativement longs observés pour la pêche et pour la clémentine sont globalement en accord avec la littérature (Lo Bianco *et al.* 1999; Bustan *et al.* 1996). Notre choix d'espèces présente des valeurs de RGR maximum variées : elles sont plus grandes pour les fruits des trois herbacées, intermédiaires pour ceux des espèces à double sigmoïde et plus faibles pour ceux des espèces arbustives restantes.

Le défi des comparaisons multi-espèces réside dans le fait que les stades de développement des fruits des différentes espèces sont en général décalés les uns par rapport aux autres, ou encore que les phénotypes visuels diffèrent pour un stade donné comme par exemple pour certaines espèces de tomates sauvages qui présentent une couleur verte à maturité alors que les espèces cultivées sont rouges (Schauer *et al.* 2004). L'analyse fine des profils de croissance que nous avons réalisée a permis de classer et sélectionner des stades de développement des fruits en fonction des vitesses de croissance et des données phénotypiques, ce qui est rarement fait dans les comparaisons entre espèces fruitières. D'autres études multi-espèces ont proposé une version particulière d'analyse multivariée des données, l'ACP STATIS, qui repose sur l'intégration d'un ensemble de tableaux de données dans une moyenne pondérée optimale qui permet de saisir ce qui est commun à un ensemble ou sous ensemble de tableaux analysés et ainsi de faciliter les comparaisons (Klie *et al.* 2014).

L'étude des relations entre vitesse ou durée de croissance et taille du fruit a mis en évidence que les fruits possédant les RGR les plus élevées ont les périodes de développement les plus courtes. Le RGR du fruit dépend également des relations source-puits de la plante. Chez le raisin, une limitation de la surface foliaire appliquée lors des premiers stades de développement du fruit a effectivement affecté la taille finale de ce dernier (Ollat et Gaudillère 1998). Le premier RGR maximum a diminué de 40% par rapport au témoin, en revanche comme la surface foliaire s'est à nouveau développée ensuite, le second maximum, en accord avec nos données, n'a pas été modifié. Chez le pamplemousse, un éclaircissage des fruits a permis une augmentation de RGR des fruits pendant la majeure partie de leur développement (Bustan et al. 1996). L'étude a également démontré que chez cette espèce de citrus la demande en glucides par le fruit dépassait l'offre alors que chez la mandarine (Bustan et al. 1996) qui présente des ovaires de très petite taille, la limitation en carbone ne s'est produite que 120 jours après l'anthèse. Ces résultats suggèrent alors que la taille du fruit serait un facteur majeur dans l'interaction source-puits des fruits en développement. Dans notre étude, les fruits d'espèces herbacées atteignent leur poids maximum très rapidement et possèdent une valeur élevée de RGR maximum. A l'inverse, les fruits d'espèces ligneuses possèdent des RGR plus faibles et mettent plus de temps à croître, en particulier la clémentine qui possède le plus faible RGR maximum et la plus longue durée de croissance. La poire présente également ces caractéristiques pour le RGR avec un maximum faible et un temps long pour atteindre ce maximum (Shiratake et al. 1997), de même que le citron pour le délai intermédiaire (Domingo et al. 1996). Les tendances observées ici restent à vérifier sur un plus grand nombre d'espèces ligneuses et herbacées. Les herbacées se distingueraient par un RGR du fruit maximum élevé avec un court délai pour l'atteindre et une longue durée de maturation par rapport au temps total de développement, comme la tomate (Monselise et al. 1978). Les vignes présenteraient un RGR du fruit maximum intermédiaire, un délai également intermédiaire pour l'atteindre et une durée de maturation longue. Les arbres présenteraient un RGR du fruit maximum faible et des délais longs ou intermédiaires pour l'atteindre, avec un temps de maturation relativement court par rapport à la durée totale de développement du fruit.

On peut alors se demander si ces tendances peuvent s'expliquer par une compétition entre les puits qui serait plus forte chez les espèces ligneuses. De manière générale, les espèces présentant une croissance rapide produisent relativement plus de surface foliaire et moins de masse racinaire (Lambers et Poorter 1992). Un RGR élevé est lié à une vitesse de respiration plus forte (Lambers et Poorter 1992), ce qui implique des flux métaboliques plus importants dans le métabolisme primaire des fruits des herbacées. Pour les feuilles, une diminution de la surface foliaire spécifique (rapport surface sur masse sèche de la feuille) des espèces à croissance lente serait due au moins en partie à une teneur relativement élevée en paroi cellulaire et en composés spécialisés impliqués dans la protection contre les stress biotiques et abiotiques selon Lambers et Poorter (1992). De plus, les espèces à croissance lente comme les espèces arbustives investissent aussi de l'énergie dans la biomasse végétative foliaire et pérenne (tige, bois, ...) comme la pêche (Berman et Dejong 2003) ou l'orange (Kimball *et al.* 2007). Pour la pêche cette biomasse représente plus de 50 % dont environ 30% pour le bois (Berman et Dejong 2003).

2. Composition des fruits et évolution de la composition au cours du développement

La trajectoire des ACP individuelles est quasiment similaire pour l'ensemble des espèces avec la première composante qui définit principalement le temps de croissance et CP2, la transition entre les grandes étapes du développement à savoir les stades précoces, la phase de croissance exponentielle et la maturation du fruit. Pour quelques composés la composition des fruits mûrs se rapproche de celle des ovaires. On retrouve le même schéma chez la tomate (Biais *et al.* 2014).

Nous avons également relevé que l'ascorbate total était associé aux stades précoces de développement (sauf pour le poivron), à l'inflexion entre la phase I et la phase II du développement des fruits. Nous supposons alors que l'ascorbate est nécessaire lorsque que le fruit présente une forte activité métabolique afin d'interagir avec les dérivés réactifs à l'oxygène (ROS).

Les teneurs en matière sèche et leur évolution sont rarement rigoureusement comparables d'une étude à l'autre, les variétés et les mesures étant parfois différentes. Cependant certains profils sont globalement en accord avec d'autres études (Zaro *et al.* 2014; Davies et Kempton 1976; Marsh *et al.* 1999), et notamment pour le kiwi (Moscatello *et al.* 2011) et la pomme (Schechter *et al.* 1993).

La description qualitative de la composition à l'aide des analyses RMN a permis de retrouver les métabolites majeurs communs ou spécifiques de chaque espèce (Ritota *et al.* 2010; Capitani *et al.* 2010, 2013; Mulas *et al.* 2011; de Oliveira *et al.* 2014; Tomita *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2017). Les trois sucres majeurs, le glucose, le fructose et le saccharose ont été détectés dans l'ensemble des tissus charnus des fruits mais n'évoluent pas de la même manière chez toutes les espèces. Lors de la maturation des fruits, l'aubergine, le poivron, le kiwi et le raisin sont caractérisés par une augmentation concomitante du glucose et du fructose, alors que le fructose est majoritaire chez la pomme et le saccharose chez la

clémentine et la pêche. Ces teneurs ainsi que leurs évolutions sont en accord avec des études antérieures (Okuse et Ryugo 1981; Berüter 1985; Nielsen et al. 1991; Moing et al. 1998; Marsh et al. 1999; Hu et al. 2009; Boo et al. 2010; Dai et al. 2013). D'après les analyses RMN du proton, le galactose libre serait présent dans le concombre, la pêche et la pomme. Il a été confirmé par ajout dosé pour le kiwi et notre observation est en accord avec d'autres études (Capitani et al. 2010; Nardozza et al. 2013). Le xylose libre a été détecté dans la pomme, la pêche ainsi que dans le kiwi comme attendu (Capitani et al. 2010, 2013; Zhang et al. 2010; Nardozza et al. 2013). Le xylose n'a pas été détecté dans le concombre ou le poivron comme c'était le cas dans des études précédentes par GC-MS dans le concombre mûr (Zhao et al. 2017) ou dans le poivron (Aizat et al. 2014) en raison de la faible sensibilité de la RMN. Enfin le raffinose a été détecté dans le kiwi comme attendu (Nardozza et al. 2013) mais n'a pas été détecté dans le concombre en désaccord avec une précédente étude (Hu et al. 2009). Concernant les sucres-alcools, l'inositol a été détecté dans l'ensemble des tissus charnus et est le sucre-alcool majeur dans l'aubergine et le kiwi. Il représente ainsi 2% de la matière sèche pour les stades précoces de l'aubergine et les stades intermédiaires pour le kiwi. Pour une Actinidiacée, le kiwai, l'inositol dépasse même les concentrations des hexoses et du saccharose au début du développement où il est ainsi le glucide soluble majeur (Klages et al. 1998). Le sorbitol, qui est une source de carbone pour les fruits au même titre que le saccharose dans les Rosacées ligneuses, est généralement le sucre-alcool majeur dans ces fruits (Moing et al. 1998; Zhang et al. 2010) mais sa teneur notamment à maturité du fruit de pêche est très inférieure à celle du saccharose.

Les deux acides organiques majeurs, le citrate et le malate ont été détectés dans l'ensemble des fruits. A cela s'ajoutent le quinate, détecté dans la plupart des fruits et fortement concentré dans le kiwi et l'aubergine en particulier pour les jeunes stades de développement comme démontré précédemment (Okuse et Ryugo 1981), et le tartrate l'un des acides organiques majoritaires du raisin (Ollat et Gaudillère 1998). Cependant les profils d'évolution des acides organiques majeurs diffèrent selon les espèces (Annexe 7), en accord avec des études précédentes (McFeeters et al. 1982; Moing et al. 1998; Richardson et al. 2011; Osorio et al. 2012; Dai et al. 2013). Concernant les autres acides organiques et leurs dérivés, le fumarate et le succinate ont été détectés chez toutes les espèces, excepté chez la clémentine et le kiwi, ils n'apparaissent pas non plus dans une précédente étude RMN sur le kiwi (Capitani et al. 2010). Ils ont également été détectés dans le jus d'orange (de Oliveira et al. 2014) et dans d'autres fruits (Ali et al. 2011; Capitani et al. 2013; Zhao et al. 2017). Le succinate n'a pas été détecté par RMN sur le spectre du « mix » de la clémentine dans notre étude, son signal est probablement en dessous du seuil de détection (10 à 18 g.l⁻¹ selon les composés, Moing et al. 2004). En effet, Bermejo et Cano (2012) ont mesuré une faible teneur de cet acide qui variait de 0,54 à 1,5 g.l⁻¹ de jus suivant les cultivars et stades de maturation de la clémentine. L'isocitrate est détecté chez le kiwi et en particulier dans les jeunes stades. Le shikimate a été détecté chez l'aubergine, le raisin et le kiwi en accord avec d'autres études (Capitani et al. 2010; Dai et al. 2013), il a également été détecté chez la pêche (Capitani et al. 2013). Le chlorogénate a été détecté dans la pomme en accord avec une précédente étude (Tomita *et al.* 2015) et est fortement présent dans l'aubergine ; il est d'ailleurs le dérivé hydroxycinnamique majeur dans le fruit d'aubergine (Zaro *et al.* 2014). L'ascorbate a quant à lui été quantifié chez l'ensemble des espèces, sa teneur diminuant à un moment du développement du fruit chez toutes les espèces sauf le poivron où il augmente de façon continue. D'ailleurs, au stade mûr le poivron est le fruit le plus riche en ascorbate total, devant le kiwi pourtant connu pour sa haute teneur (Okuse et Ryugo 1981), en accord avec une précédente étude (Serrano *et al.* 2010).

De nombreux acides aminés ont été détectés chez les différentes espèces, parmi eux l'alanine, la valine, l'aspartate mais également l'asparagine qui est également un acide aminé majeur de la pomme (Zhang *et al.* 2010) et de la pêche (Moing *et al.* 1998), la glutamine qui est particulièrement abondante chez le concombre (Zhao *et al.* 2017) et la proline qui est un acide aminé majeur chez la clémentine et le raisin (Ali *et al.* 2011; de Oliveira *et al.* 2014). L'aubergine se démarque par la présence d'histamine qui est une amine. Le concombre se caractérise par des teneurs relativement élevées en citrulline, qui dérive de l'arginine (Joshi et Fernie 2017) et qui est retrouvée en forte teneur chez les Cucurbitacées (Fish et Bruton 2010) et notamment dans la pastèque qui accumule cet acide aminé non protéinogène. Enfin, la clémentine se caractérise par la présence d'une amine aromatique, la synéphrine (Wheaton et Stewart 1969), et d'un dérivé de la proline, la DMP, ces deux composés sont connus chez les agrumes (de Oliveira *et al.* 2014). Il a été rapporté que la DMP pourrait agir comme osmoprotecteur lorsqu'elle est accumulée dans le cytoplasme des cellules (Nolte et Hanson 1997).

3. Explication de la matière sèche par la composition

L'ensemble des métabolites et autres composés dosés permet d'expliquer la majorité de la matière sèche pour les stades tardifs. Pour le stade le plus précoce ce n'est pas le cas. Cependant, les références bibliographiques sur la composition détaillée des fruits très jeunes sont rares, ce qui complique la discussion de nos résultats et la recherche d'hypothèses. D'après nos mesures, les résidus insolubles représentent entre 60% et 80 % de la matière sèche pour les jeunes stades et nous ne mesurons qu'environ 30% de ces composés, de plus le pourcentage de la fraction soluble répond à nos quantifications de composés solubles majeurs. La majeure partie des composés manquants appartiendrait donc à la partie non soluble des tissus charnus. La plupart des études sur les polysaccharides des parois concernent les stades de maturation des fruits et non les stades précoces. En revanche nos résultats concernant la somme des parois pour les jeunes stades chez le concombre et le raisin sont du même ordre de grandeur que de rares études sur ce sujet (McFeeters et Lovdal, 1987; Barnavon et al., 2000). Pour les stades les plus jeunes, les acides nucléiques correspondent à environ 2% de la matière sèche du fruit de tomate (Colombie et al. 2015). Les minéraux ne représentent que 4 à 5 % de la matière sèche pour les jeunes fruits de mandarine et de concombre (Huang et al. 2009; Cronje et al. 2011). Les sucres neutres des parois ainsi que la cellulose ont été mesurés, mais la teneur de la cellulose non cristalline ou encore des lignines n'a pas encore été mesurée dans notre expérience mais n'est pas, à notre connaissance, décrite dans la littérature. De la même manière, les protéines solubles ont été quantifiées mais nous ignorons la part des protéines non solubles dans les jeunes fruits.

Les données quantitatives des pools constituant la matière sèche seront utilisées pour la modélisation du métabolisme primaire du fruit à l'aide de modèles stœchiométriques comme cela a été fait précédemment pour la tomate (Colombié *et al.* 2015).

4. Modélisation de la croissance à travers les données de composition

Les profils de croissance du fruit et les tailles de fruit étant contrastés entre les huit espèces, nous avons choisi d'utiliser le RGR et recherché ses relations avec la composition grâce à une approche de régression. La modélisation du RGR des fruits à partir des données de composition a également permis de mettre en évidence plusieurs faits notamment qu'il est possible de modéliser la croissance à partir des composés de la biomasse.

Nous avons caractérisé les différences entre les trois phases de développement des fruits. Les trois modèles réalisés donnent tous trois une bonne prédiction du RGR, cependant les variables explicatives diffèrent selon la phase. La phase I, qui est une phase d'accélération de la croissance des fruits est caractérisée par le mannose, le galacturonate, les protéines et le lignocérate, qui sont des variables importantes associées à la hausse du RGR, et l'arabinose une variable importante associée à la baisse du RGR. Les teneurs en protéines (exprimées sur base de MS) diminuent fortement chez l'ensemble des fruits lors de la phase I, en accord avec d'autres études (Davies et Kempton, 1976; Biais et al., 2014). La teneur en mannose, variable la plus importante du modèle, et en galacturonate augmentent de manière générale chez tous les fruits lors de la phase I contribuant ainsi à la hausse du RGR. Ces deux monomères font partie des polymères pariétaux. Le galacturonate est un acide uronique qui fait partie de la colonne vertébrale des pectines, l'homogalacturonane (HG) et le rhamnogalacturonane I (RG I). Sa teneur augmente légèrement chez les jeunes fruits du concombre (McFeeters et Lovdal, 1987) alors que dans nos fruits celle-ci augmente plus fortement chez les stades précoces. La teneur en arabinose est associée à la baisse du RGR lors de la phase I. Ce monomère compose les chaînes latérales de HG et est l'un des constituants majeurs du RG I (Dheilly et al. 2016).

La phase de croissance exponentielle (phase II) est caractérisée par la contribution importante des acides gras comme le palmitate et le linolénate au modèle. Ceux-ci diminuent fortement lors de cette phase mais également les protéines et les acides aminés. En revanche, aucune variable ne contribue à la baisse du RGR suggérant que l'évolution de la composition est co-régulée avec la croissance cellulaire et qu'aucun facteur ne vient l'inhiber. Il serait alors intéressant de réaliser ce type de modèle dans le cadre d'études où l'application d'un stress a entrainé une modification de la croissance et du RGR, comme pour le raisin ou le pamplemousse (Bustan et al., 1996; Ollat et Gaudillère, 1998), et de rechercher des composés qui seraient associés à la baisse du RGR.

Dans notre étude, une combinaison des teneurs en protéines totales, acides gras et certains monomères de la paroi cellulaire est associée à la hausse du RGR durant ces deux premières phases de croissance. Pour les protéines, les plus hautes teneurs sont enregistrées pour le concombre qui atteint sa taille maximale très rapidement, puis des Solanacées qui possèdent également une forte croissance rapide, puis des fruits qui présentent une reprise de croissance au cours de leur développement (raisin, kiwi et pêche). Elles pourraient alors par leur abondance fournir les catalyseurs nécessaires pour la croissance afin d'accélérer les réactions et donc de contribuer à l'accélération de la croissance relative du fruit. A notre connaissance, cette relation n'a jamais été montrée chez les plantes. Et parmi les rares références bibliographiques que l'on trouve pour les micro-organisme il y aurait une relation similaire (Acerenza et Graña, 2006). Une étude sur Arabidopsis a démontré un lien entre vitesse de croissance et protéines. Cependant, contrairement aux résultats obtenus ici avec des fruits, cette étude comparant des accessions d'Arabidopsis a démontré que la biomasse des rosettes à l'état végétatif était corrélée négativement avec la teneur en protéines totales et impliqué le coût énergétique du turn-over des protéines (Ishihara et al. 2017). L'hypothèse émise est que les accessions qui produisent le plus de biomasse foliaire ont une plus faible abondance de ribosomes, une plus faible synthèse protéique mais un faible taux de dégradation des protéines, ce qui augmenterait l'efficacité de la croissance et permettrait d'investir dans la machine photosynthétique. Il y aurait un compromis entre le renouvellement protéique et la maximisation du taux de croissance.

Enfin, aucune variable du modèle n'est fortement associée à la hausse du RGR lors de la phase de maturation du fruit, ce qui est en accord avec le fait que la plupart des fruits ont atteint leur taille maximum. En revanche, la teneur en rhamnose des polysaccharides est associée à la baisse du RGR lors de cette phase. Il est frappant de remarquer qu'ici seul le rhamnose contribue à la baisse du RGR et pas d'autres monomères des polysaccharides pariétaux. La plupart des études détaillées concernant la composition des parois de fruit portent sur le remodelage et la dégradation de la paroi au cours de la maturation du fruit ou après récolte (Gross et Sams, 1984; Nunan et al., 1998; Dheilly et al., 2016; Mack et al., 2017). Elles impliquent d'autres composants majeurs des polymères comme l'arabinose ou les acides uroniques. On se serait alors attendu à obtenir plus de variables d'importance de la famille des parois cellulaire pour modéliser la croissance lors de cette phase. Après la validation croisée réalisée lors de la construction de chaque modèle de régression, une deuxième étape de validation reste à faire en projetant les données d'autres fruits de chaque phase sur le modèle, par exemple la tomate et la fraise.

Lorsque qu'un modèle est construit pour l'ensemble des stades et des fruits, les teneurs en protéines, galactose et lignocérate sont les variables les plus fortement associées à un RGR fort, ce qui rejoint notre première observation lors des différentes phases de développement pour les teneurs en protéines et lignocérate. En revanche lorsque toutes les phases sont prises en compte, la teneur en galacturonate est une variable importante associée à la baisse du RGR alors qu'il avait une importance associée à la hausse du RGR lors de la phase I du fruit. Une autre observation a été réalisée, les mesures de plusieurs stades du concombre, de jeunes stades du raisin et l'un des stades de la pêche (41 JAA) semblent être particulièrement éloignés du modèle global. Celui-ci ayant été construit sur la base des composés communs, l'erreur de prédiction pourrait être due à un manque d'information sur la composition de certaines espèces. A 41 JAA, la pêche présente son RGR maximum, deux fois plus élevé que son deuxième RGR maximum, en accord avec une étude précédente (Lo Bianco *et al.* 1999). La valeur de RGR prédite pourrait être améliorée en ajoutant la teneur du sorbitol qui présente son maximum à ce stade, et celle du quinate, un acide organique majeur de ce fruit qui pourrait contribuer au potentiel osmotique. De la même manière, l'ajout du tartrate pourrait améliorer les prédictions du RGR du raisin. Comme ces composés n'ont pas été quantifiés dans toutes les autres espèces, il faudrait construire un modèle pour chaque espèce fruitière séparément, mais avec des expériences répétées sur plusieurs années ou diverses conduites de cultures par exemple pour avoir un nombre de points suffisant.

5. Différenciation des fruits climatériques et non climactériques

La différenciation entre les fruits climactériques et non climatériques se base généralement sur les processus de maturation qui incluent la respiration du fruit ainsi que sur la production d'éthylène (Paul *et al.* 2012). Une dernière étude a également permis de mettre en évidence trois types de circuits de rétroaction transcriptionnels contrôlant la maturation des fruits en fonction de l'éthylène (Lü *et al.* 2018). Cependant nous avons émis l'hypothèse que la composition permettait aussi, dans une certaine mesure, de séparer ces deux groupes de fruits.

En effet, notre modèle PLS-DA a séparé les deux groupes et montré que les fruits climactériques seraient plus riches en certains sucres neutres qui composent la paroi cellulaire et en amidon, tandis que les fruits non climactériques auraient des teneurs plus élevées en certains acides gras, protéines, acides aminés, glucose et ascorbate oxydé. Il est vrai que l'amidon est retrouvé en teneur plus élevée dans le kiwi, la pomme, la poire, la tomate ou encore la banane qui sont des fruits climactériques (Okuse et Ryugo, 1981; Berüter, 1985; Cordenunsi et Lajolo, 1995; Biais et al., 2014; Mesa et al., 2016) avant le début de la maturation et très peu chez l'aubergine (Makrogianni et al. 2017), le concombre (Davies and Kempton 1976) ou juste en début de développement pour la fraise (Moing et al. 2001). Les teneurs en glucose, arabinose et fucose pariétaux, qui caractérisent les fruits climactériques, sont généralement plus élevées que chez les fruits non climactériques, notamment chez la pomme et la pêche en accord avec une étude précédente (Gross et Sams, 1984). Seul le kiwi présente parfois des valeurs proches des fruits non climactériques mais ce fruit accumule également beaucoup d'amidon. De plus, pour la pomme et le kiwi, lorsque l'amidon augmente, les concentrations en sucres neutres et en cellulose diminuent puis ré-augmentent lorsque l'amidon commence à se dégrader. De plus, pour le kiwi les profils d'évolution des teneurs des composés exprimées par fruit, durant la période d'accumulation de l'amidon indiquent que le fruit n'accumule plus de polysaccharides pariétaux et de cellulose, alors que lorsque l'amidon commence à se dégrader les teneurs paroi et cellulose augmentent à nouveau. Ces deux observations laissent supposer l'existence d'un compromis ou « trade-off » entre la synthèse des polymères des parois cellulaires et celle de l'amidon pour soutenir la crise respiratoire des fruits.

Ces éléments suggèrent que les fruits climactériques se distinguent par une accumulation plus importante de certains types de polysaccharides des parois et d'amidon. Ces polymères sont ensuite dégradés massivement pendant le mûrissement, une partie de l'énergie libérée pouvant être dissipée *via* des oxydations non phosphorylantes (Colombié *et al.* 2017). Ces résultats indiquent que le caractère climactérique pourrait être lié à la nature des composés accumulés pendant la phase de croissance du fruit, et donc bien avant le déclenchement de la crise climactérique dont l'orchestration par l'éthylène est bien connue (Paul *et al.* 2012).

Les fruits non climactériques quant à eux présentent des concentrations en protéines bien plus élevées et ce tout au long du développement. Ils présentent aussi des concentrations en ascorbate oxydé plus importantes aux stades précoces. Comme l'ascorbate sert de tampon rédox pour minimiser les dégâts causés par les processus oxydatifs, ce résultat suggère un flux plus important de réactions entre l'ascorbate et les ROS. Il est donc possible que l'accumulation d'amidon ainsi que la synthèse de parois, plus marquées chez les fruits climactériques en croissance, constituent des puits énergétiques capables de minimiser la production de ROS. Rappelons que lors de la maturation, les fruits climactériques dissipent le trop plein énergétique lié à la dégradation de ces polymères (Colombié et al., 2017).

6. Différenciation des fruits des espèces herbacées, vignes et arbustives

Notre analyse PLS-DA pour différencier le caractère herbacée/vigne/arbre a suggéré un rôle particulier de l'arabinose et du fucose des parois et du saccharose pour les espèces ligneuses, et un rôle particulier du stéarate, de l'ascorbate oxydé, des acides aminés et du glucose pour les espèces herbacées. Ces tendances sont à vérifier pour un plus grand nombre d'espèces. Toutefois, pour le saccharose et le glucose, d'après les données de composition des fruits de (Annexe 1), celles-ci sont plus espèces dépendante que herbacées/vignes/arbustives dépendante. En effet le sucre majeur pour les fruits mûrs de clémentine et de pêche est bien le saccharose (Moing *et al.* 1998; Pantin *et al.* 2013) comme l'indiquent également nos données, en revanche chez le citron qui est également une espèces arbustive le sucre majeur peut être soit le glucose, soit le fructose, soit le saccharose selon la variété et l'acidité (Albertini *et al.* 2006), alors que chez la pomme et la poire c'est le fructose (Drake et Eisele, 1999)

La teneur plus élevée en ascorbate oxydé est à relier avec le RGR plus élevé observé chez les espèces herbacées. Ceci est en accord avec le fait qu'un métabolisme plus actif serait associé à un stress oxydatif plus élevé. Une revue récente mentionne qu'un niveau basal de ROS (sous-produits toxiques et/ou comme molécules de signalisation) est nécessaire pour les processus biologiques de base tels que la prolifération et la différenciation cellulaires (Mittler 2017). Les protéines enzymatiques les plus abondantes et les plus stables sont celle du métabolisme central (Belouah, Thèse Université de Bordeaux, 2017), nous avons montré dans ce chapitre que la combinaison des teneurs en protéines totales avec certains monomères de la paroi et les acides gras contribuait à la hausse du RGR. Le quatrième chapitre se focalisera alors sur les profils d'évolution de ces protéines enzymatiques et comparera les Solanacées, leur métabolisme et leur régulation au cours du développement.

Chapitre IV : Approche intégrative du métabolisme central au cours du développement de trois Solanacées



Ce chapitre s'intéresse à deux espèces de Solanacées non climactériques, l'aubergine et le poivron. Ces deux espèces présentent des caractères charnus différents ainsi que deux maturités qui présentent des teneurs en sucre et en acide organique différentes. L'analyse de la croissance des fruits sera complétée par une analyse au niveau tissulaire, avec une estimation des volumes cellulaires et subcellulaires. Le métabolisme primaire sera étudié plus précisément grâce à une approche détaillée du métabolisme central, qui regroupe les mesures de capacités enzymatiques, des profils métabolomiques obtenus par RMN quantitative du proton venant compléter ceux du chapitre précédent (dosages ciblés robotisés) et des données quantitatives d'intermédiaires du métabolisme central obtenus par LC-QTRAP-MS. Ces données seront combinées au cours du développement du fruit afin d'observer les différences et les similitudes entre les deux espèces. Les résultats seront ensuite comparés à ceux de la tomate, une Solanacée climactérique, et discutés.

- I. Description de la croissance et du développement des deux Solanacées
 - 1. Croissance des fruits

Le poids frais des fruits suit une simple sigmoïde pour les deux espèces (Figure 29A-B), avec une phase de croissance lente suivie d'une phase de croissance rapide et exponentielle et enfin un plateau où le fruit a atteint son poids maximum. Les vitesses de croissance et les taux relatifs de croissance ou RGR présentent des profils similaires pour les espèces (Figure 29A-B) avec une augmentation puis une diminution de la vitesse. Le temps de développement pour atteindre la maturité physiologique est approximativement le même pour les deux fruits, environ 80 jours dans nos conditions de culture (Chapitre 2). En fin de croissance, l'aubergine présente un poids moyen de 1,14 kg et le poivron de 231 g. La vitesse maximale de croissance est atteinte au même moment du développement (entre 25 et 30 JAA) chez les deux espèces, mais elle est plus élevée chez l'aubergine, avec 53 g par jour contre 12 chez le poivron. Enfin les RGR maxima présentent les mêmes valeurs pour les deux espèces (0,21 g/g/jour) et sont atteints à 7 JAA pour l'aubergine et 10 JAA pour le poivron. Dans les deux cas le RGR reste fort (RGR>0,205 g/g/jour) sur une période de 10 jours, de 2 à 12 JAA pour l'aubergine et de 5 à 15 JAA pour le poivron. Les Figure 29C et D illustrent le développement du fruit pour les différents tissus externes et internes de ces fruits. Le changement de couleur de l'épiderme de l'aubergine commence vers 30 JAA : l'épiderme commence par s'éclaircir pour devenir violetclair vers 40 JAA (Figure 29C), puis commence à brunir vers 50 JAA jusqu'à devenir brun-clair vers 65 JAA. L'épiderme et le péricarpe du poivron (Figure 29D) sont verts jusqu'à 40 JAA puis leur couleur commence à tourner au rouge jusqu'à la maturité physiologique à 76 JAA. Pour les deux fruits, l'apparition des loges carpellaires se fait dès l'anthèse. L'aubergine atteint sa maturité commerciale vers 25 JAA et sa maturité physiologique entre 60 et 80 JAA (Figure 29A, C). Le poivron atteint sa première maturité commerciale dite « verte » vers 40 JAA, et sa seconde dite « rouge » qui est également la maturité physiologique entre 70 et 80 JAA (Figure 29B, D). Pour ces deux fruits, le développement peut être divisé en trois phases, une phase

d'accélération de la croissance regroupant les ovaires et les stades précoces du fruit, allant de l'anthèse à 10 JAA, une phase de croissance exponentielle de 11 à 30 JAA pour l'aubergine et de 11 à 40 JAA pour le poivron, et enfin une phase de maturation qui se poursuit jusqu'à la maturité physiologique des fruits.



Figure 29 : Description de la croissance du fruit d'aubergine et de poivron.

Evolution pour l'aubergine (A) et le poivron (B) du poids frais du fruit (**noir**), de sa vitesse de croissance (**rouge**) et du taux relatif de croissance ou RGR (**vert**). Le poids du fruit est la moyenne calculée à partir de mesures réalisées sur un minimum de 50 fruits pour les stades précoces et 10 fruits pour les trois derniers stades de développement. La barre verticale représente l'écart-type. La vitesse de croissance a été modélisée à partir du poids du fruit et de sa vitesse de croissance modélisée. Les flèches noires indiquent les différentes maturités. Illustration de la croissance du stade ovaire à la maturité physiologique de l'aubergine (C) et du poivron (D) pour neuf stades de développement du fruit entier, en coupe transversale et en coupe longitudinale.

2. Evolution des volumes cellulaires et des proportions des compartiments cellulaires au cours du développement du fruit

Les volumes des cellules du mésocarpe et de leurs compartiments subcellulaires ont été estimés par une analyse morphométrique à partir de photographies de coupes observées en microscopie optique illustrées sur la Figure 30A pour l'aubergine et la Figure 30B pour le

poivron (calculs détaillés dans le chapitre 2). L'évolution des volumes cellulaires (Figure 31A) suit une simple sigmoïde pour les deux Solanacées. D'après la modélisation de la courbe, le volume maximum des cellules est de 1200 pl pour l'aubergine et de 1000 pl pour le poivron. La vitesse de croissance en volume des cellules augmente puis diminue au cours du développement. Cette vitesse de croissance présente un maximum pour les deux fruits vers 20 JAA avec une valeur supérieure pour le poivron, 51 pl/jour, contre 43 pl/jour pour l'aubergine. En superposant ces résultats cytologiques à ceux obtenus pour la croissance du fruit (Figure 29A-B), on note que durant la phase d'accélération de la croissance du fruit le volume cellulaire est faible et augmente en grande partie pendant la phase de croissance rapide du fruit, puis se stabilise pendant la phase de maturation.



Figure 30 : Grandissement cellulaire dans le péricarpe du fruit des deux Solanacées au cours du développement du fruit.

Sections transversale d'une coupe équatoriale de péricarpe, colorées au bleu de toluidine et observées en microscopie optique à lumière blanche, d'aubergine (A) et de poivron (B) à 6 stades de développement. Barre d'échelle : $50 \ \mu m$

Les profils d'évolution des proportions subcellulaires dans le mésocarpe pour la vacuole, le cytoplasme et les parois (Figure 31B) diffèrent suivant l'espèce entre l'anthèse et 59 JAA pour l'aubergine et entre l'anthèse et 40 JAA pour le poivron. La vacuole est toujours le compartiment le plus important des trois compartiments subcellulaires mesurés. Chez l'aubergine, la proportion de vacuole augmente peu au cours de développement, passant de 62% à l'anthèse à 67% à maturité, alors que chez le poivron elle passe de 42% à 75%. La proportion du cytoplasme diminue de 23 à 9% chez l'aubergine et de 36 à 15% chez le poivron. Enfin, entre l'anthèse et la maturité la proportion de paroi augmente de 15 à 24% chez l'aubergine, alors qu'elle diminue chez le poivron, passant de 21 à 9%.





Figure 31 : Evolution du volume des cellules et des compartiments subcellulaires du péricarpe au cours du développement du fruit.

(A) Evolution des volumes cellulaires (carrés) pour le poivron et l'aubergine. Les moyennes des volumes cellulaires pour trois échantillons sont représentées (ronds) ainsi que la vitesse de croissance des volumes cellulaires (triangles issus de la modélisation de la courbe de croissance à partir des points mesurés par le modèle de Gompertz (chapitre 2). (B) Estimation des volumes subcellulaires pour l'aubergine et le poivron, représentation des proportions de volumes de vacuole (jaune), cytoplasme (rouge) et parois (bleu). Symboles ouverts, moyennes des mesures réalisées ; symboles fermés, modélisation par le modèle de Gompertz à partir des points mesurés

Pendant le développement et la croissance des cellules du fruit, de nombreux changements s'opèrent au niveau de son métabolisme. Le fruit accumule certains composés et une reprogrammation se produit au niveau de l'activome.

II. Description du métabolome et de l'activome des fruits d'aubergine et de poivron au cours de leur développement

Le fruit contient une diversité de métabolites qui lui confèrent son goût, ses valeurs nutritionnelles et/ou sont utilisés pour son développement. Parmi eux se trouvent des métabolites non structuraux qui peuvent être accumulés en relativement grandes quantités, tels les sucres, les polymères de sucres, les acides organiques et les acides aminés, mais également des composés structuraux tels les parois, les protéines et les lipides. L'ensemble de ces composés est issu du métabolisme central. Afin de pouvoir visualiser globalement l'évolution de la composition de ces métabolites et des capacités enzymatiques au cours du développement dans les cellules du péricarpe, des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées. Les teneurs en métabolites structuraux ou non, et intermédiaires du métabolisme sont exprimés sur la base de la matière fraîche (MF).

- 1. Evolution des composés accumulés au cours du développement du fruit de l'aubergine et du poivron
 - a. Evolution des métabolites majeurs et de l'amidon au cours du développement

L'analyse quantitative par RMN du proton et spectrophotométrie UV-visible d'extraits de péricarpe ont permis de quantifier 29 métabolites pour l'aubergine et 27 pour le poivron, en plus de l'amidon, au cours du développement. L'évolution de la composition est visualisée à l'aide d'ACP (Figure 32). L'observation du graphique des « scores » (Figure 32A-B) montre que les deux premières composantes principales (CP), qui expliquent plus de 68% de la variabilité totale pour chaque espèce fruitière, séparent distinctement les différents stades de développement. Pour l'aubergine (Figure 32A) et le poivron (Figure 32B), les stades précoces sont caractérisés par des coordonnées négatives sur CP1 et positives ou proches de zéro sur CP2. Les stades de croissance exponentielle sont caractérisés par des coordonnées négatives sur CP1 et CP2. On note que l'évolution du murissement pour l'aubergine se fait exclusivement sur CP2.

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 32A) et de celui des « loadings » (Figure 32C) montre que l'ovaire d'aubergine est caractérisé par des teneurs plus élevées en la plupart des acides organiques et dérivés tels que le quinate, le shikimate, le chlorogénate, le malate, le fumarate et l'ascorbate, en saccharose, en inositol, en glutamate et en autres composés azotés tels que la choline, la trigonelline et l'histamine. Le glucose et le fructose caractérisent les stades de maturité commerciale, et l'acétyl-choline et l'acide γ-aminobutyrique (GABA), les fruits en fin de maturation physiologique. Pour le poivron (Figure 32B, D), les stades précoces sont caractérisés par des teneurs plus élevées en acides organiques (malate, fumarate) et dérivés (chlorogénate, quinate), en certains sucres et sucres alcool (xylose , galactose, inositol), et en acides aminés libres comme le glutamate et la glutamine. Le stade « breaker » à 63 JAA est caractérisé par des teneurs plus élevées en

saccharose, ascorbate, citrate et en certains acides aminés tels que l'isoleucine, l'alanine, et l'asparagine. Enfin, des teneurs élevées en glucose, fructose et phénylalanine caractérisent le stade mûr.



Figure 32 : Visualisation de l'évolution de la composition en métabolites et amidon de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'une ACP.

ACP réalisée sur 55 échantillons et 11 stades de développement pour l'aubergine, et 50 échantillons et 10 stades de développement pour le poivron. Les teneurs en métabolites sont exprimées en µmol.g⁻¹ MF, l'amidon en µmol.g⁻¹ MF d'équivalents glucose puis centrées et réduites. 30 variables pour l'aubergine et 28 variables pour le poivron sont analysées. (A-B) Graphiques des « scores » sur les deux premières CP. (C-D) Graphique des « loadings » sur les deux premières CP. L'évolution des stades de développement est indiquée dans chaque graphique des « scores » à l'aide d'une flèche noire, des stades précoces (symboles de couleur claire des) vers les stades en maturation puis mûrs (symboles de couleur foncée).

Abréviations : AA_tot, acides aminés totaux ; Ala, alanine ; Asa_ox, ascorbate oxydé ; Asa_tot, ascorbate total ; Asa_red, ascorbate réduit ; Asn, asparagine ; Asp, aspartate ; Fru, fructose ; GABA, acide γ-aminobutyrique ; Gal, galactose ; Glc, glucose ; Glu, glutamate ; Gln, glutamine ; Ile, isoleucine ; Leu, leucine ; Phe, phénylalanine ; Suc, saccharose ; Thr, thréonine ; Val, Valine ; Xyl, xylose.

b. Evolution des composés structuraux au cours du développement du fruit

Pour l'aubergine et le poivron observés séparément, l'évolution des teneurs de 17 composés structuraux appartenant aux parois cellulaires, de lipides et de protéines totales solubles est visualisée à l'aide d'une ACP (Figure 33). L'observation du graphique des « scores » (Figure 33A-B) montre que les deux premières CP, qui expliquent plus de 75% de la variabilité totale pour chaque espèce, séparent distinctement les différents stades de développement. Pour l'aubergine (Figure 33A), une évolution progressive de la composition des premiers stades de développement jusqu'à maturité physiologique du fruit se fait majoritairement sur la CP1, avec une évolution sur la CP2 entre certains stades et une variabilité intra-stade plus élevée le long de la CP2 aux stades tardifs de développement. Pour le poivron (Figure 33B), une évolution progressive de la composition de la composition des premiers stades de développement jusqu'au début de maturation se fait majoritairement sur la CP1, puis l'évolution de la composition des stades de maturation du fruit se poursuit sur la CP2.

La comparaison de chaque graphique des « scores » (Figure 33A-B) avec celui des « loadings » correspondants (Figure 33C-D) montre que chez les deux espèces les stades précoces sont caractérisés par des teneurs plus élevées en lipides totaux (quantifiés à l'aide des acides gras estérifiés majeurs), protéines totales et en certains monomères de la paroi comme le fucose, le rhamnose, l'arabinose et le glucuronate. Pour l'aubergine, les stades intermédiaires sont caractérisés par des teneurs plus élevées en monomères de glucose, mannose, galactose et xylose, et pour le poivron de galactose uniquement. Pour les deux fruits, les stades mûrs sont caractérisés par des teneurs plus élevées en cellulose et monomère de galacturonate. Des teneurs plus élevées en monomères de mannose et xylose caractérisent également le stade mûr du poivron.

Les patrons d'évolution de la composition en métabolites et en composés structuraux sont globalement proches pour les deux espèces. Ainsi, le poivron et l'aubergine présentent des similitudes pour la composition en métabolites et en composés structuraux aux stades précoces puis tendent à diverger lors de la maturation du fruit.



Figure 33 : Visualisation de l'évolution des composés structuraux de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'une ACP

ACP réalisée sur 55 échantillons et 11 stades de développement pour l'aubergine, et 50 échantillons et 10 stades de développement pour le poivron. Les teneurs en monomères des parois et en acides gras des lipides sont exprimées en µmol.g⁻¹ MF puis centrées et réduites. Dix-huit variables sont analysées. (A-B) Graphiques des « scores » sur les deux premières CP. (C-D) Graphique des « loadings » sur les deux premières CP. L'évolution des stades de développement est indiquée sur les graphiques des « scores » à l'aide d'une flèche noire, des stades précoces (symboles de couleur claire) vers les stades maturation puis mûr (symboles de couleur foncée).

Abréviations : Ara, arabinose; Fuc, fucose ; Gal, galactose; Gal_a, galacturonate ; Glc_a, glucuronate ; Glc, glucose Man, mannose; Rha, rhamnose ; Xyl, xylose.

- 2. Evolution des intermédiaires du métabolisme primaire et des capacités enzymatiques au cours du développement du fruit
 - a. Evolution des intermédiaires du métabolisme primaire au cours du développement du fruit

L'évolution globale des teneurs de 16 intermédiaires du métabolisme pour l'aubergine et 14 pour le poivron, impliqués dans les voies du métabolisme des sucres, celui des parois cellulaires, la glycolyse, le métabolisme des triglycérides ou encore la voie des pentoses

phosphates, est représentée à l'aide d'ACP (Figure 34). L'observation du graphique des « scores » (Figure 34A-B) montre que les deux premières CP, qui expliquent plus de 80% de la variabilité totale pour chaque espèce fruitière, séparent distinctement les différents stades de développement. Pour l'aubergine (Figure 34A) et le poivron (Figure 34B), les stades précoces sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP1 et positives sur la CP2. Les stades de croissance exponentielle sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP1 et positives sur la CP2 et les stades mûrs par des coordonnées positives sur les CP1 et CP2.



Figure 34 : Visualisation de l'évolution des intermédiaires du métabolisme primaire de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'ACP.

ACP réalisée sur 55 échantillons et 11 stades de développement pour l'aubergine, et 50 échantillons et 10 stades de développement pour le poivron. Les teneurs en métabolites sont exprimées en µmol.g⁻¹ MF puis centrées et réduites. Seize variables pour l'aubergine et 14 variables pour le poivron sont analysées. (A-B) Graphiques des « scores » sur les deux premières CP. (C-D) Graphiques des « loadings » sur les deux premières CP. L'évolution des stades de développement est indiquée sur les graphiques des « scores » à l'aide d'une flèche noire, des stades précoces (symboles de couleur claires) vers les stades maturation puis mûr (symboles de couleur foncées).

Abréviations : 6P-Gluc, 6-phosphogluconate ; dPG, bisphosphoglycérate ; F-1,6-bP, fructose-1,6-bisphosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; Gal1P, galactose-1-phosphate ; G1P, glucose-1-phosphate ; G6P, glucose-6-phosphate ; Gly-3P, glycérol-3-phosphate; Man6P, mannose-6-phosphate ; Pentoses5P, pentoses-5-phosphate; PGA, phosphoglycérate ; PPi, pyrophosphate ; S7P, sédoheptulose-7-phosphate ; Suc6P, saccharose-6-phosphate ; UDPGal, UDP-galactose ; UDPG, UDP-glucose

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 34A-B) avec celui des « loadings » correspondant (Figure 34C-D) montre que les ovaires d'aubergine sont caractérisés par des teneurs plus élevées en glycérol-3-phosphate (Gly-3P), glucose-1-phophate (G1P), galactose-1-phosphate (Gal1P), saccharose-6-phosphate (Suc6P) et frucose-1,6-bisphosphate (F-1,6-bP). Les stades précoces du fruit sont ensuite caractérisés par des teneurs plus élevées en pentoses-5-phosphate (Pentoses5P), glucose-6-phosphate (G6P), sédoheptulose-7-phophate (S7P), mannose-6-phosphate (Man6P), 6-phosphogluconate (6P-Gluc), fructose-6-phosphate (F6P) et phosphoglycérate (PGA). Les stades 7 et 10 JAA qui présentent un RGR maximum (Figure 29) sont caractérisés par des teneurs plus élevées en UDP-glucose (UDPG) et UDPgalactose (UDPGal). Le stade de fin de croissance exponentielle présente une teneur plus élevée en pyrophosphate (PPi). Le stade mûr se caractérise par des teneurs plus faibles pour plusieurs des composés intermédiaires analysés, mais une teneur plus élevée en diphosphoglycérate (dPG). Les ovaires du poivron sont caractérisés par des teneurs plus élevées en Suc6P comme l'aubergine, et en pyrophosphate. Les stades précoces du fruit de poivron sont caractérisés par des teneurs plus élevées de l'ensemble des autres intermédiaires mesurés, qui diminuent ensuite progressivement au cours des stades de croissance exponentielle puis de la maturation.

b. Evolution des capacités enzymatiques au cours du développement du fruit

Les évolutions de 21 capacités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des sucres, la glycolyse et le cycle de Krebs sont visualisées à l'aide d'ACP (Figure 35). L'observation du graphique des « scores » (Figure 35A-B) montre que les deux premières CP, qui expliquent plus de 70% de la variabilité totale pour chacune des espèces fruitières, séparent distinctement les différents stades de développement. Pour l'aubergine (Figure 35A) et le poivron (Figure 35B), les stades ovaire et précoces du fruit sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP1 et positives sur la CP2. Les 4^{ème} et 5^{ème} stades, qui correspondent à la phase de croissance exponentielle (Figure 29) sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP2 et les stades mûrs par des coordonnées positives sur les CP1 et CP2 pour l'aubergine, et proche de 0 sur CP1 et positives sur CP2 pour le poivron.

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 35A-B) avec celui des « loadings » correspondant (Figure 35C-D) montre que chez l'aubergine, l'ovaire et les deux stades précoces suivants sont caractérisés par des capacités (par unité de MF) plus élevées de la phosphogluco-isomérase (PGI), l'invertase acide (AI), la NAD-malate-déshydrogénase (NAD-MDH), la phosphoglycérokinase (PGK), la phospho*énol*pyruvate carboxylase (PEPC), la triose-phosphate-isomérase (TPI), la phosphoglucomutase (PGM), la NADP-malate-déshydrogénase (NADP-MDH), la NADP-isocitrate déshydrogénase (NADP-IDH), la fructokinase (FK) et l'invertase neutre (NI). Les 5^{èmes} et 6^{èmes} stades correspondant à la croissance exponentielle (Figure 29) sont caractérisés par des capacités plus élevées en glucokinase (GK), aldolase, ATP-phosphofructokinase (NAD-GAPDH), UDP-glucose-pyrophosphorylase (UGPase) et citrate

synthase mitochondriale (CS mit). Les capacités les plus élevées pour la citrate-synthase totale (CS tot) caractérisent le 7^{ème} stade qui correspond à la phase de croissance exponentielle. Les stades de maturation sont caractérisés par des capacités plus élevées en enzyme malique à NADP (NADP-ME). Pour le poivron, l'ovaire et le 1^{er} stade précoce du fruit sont caractérisés par des capacités plus élevées en NADP-IDH, NADP-ME, PEPC et G6PDH. Les 3^{ème} et 4^{ème} stades, qui présentent des RGR forts, sont caractérisés par des capacités plus élevées en NAD-GAPDH, UGPase, aldolase, invertase neutre et NADP-MDH. Comme pour les intermédiaires du métabolisme central, toutes les capacités enzymatiques des stades de maturation diminuent ensuite. On notera qu'avant de centrer et réduire les données pour l'analyse multivariée des données, les capacités enzymatiques les plus fortes au cours du développement des deux Solanacées sont enregistrées pour la NAD-MDH et la TPI.



Figure 35 : Visualisation de l'évolution des capacités enzymatiques du métabolisme central de l'aubergine (violet) et du poivron (vert) au cours du développement du fruit à l'aide d'ACP ACP réalisée sur 55 échantillons et 11 stades de développement pour l'aubergine, et 50 échantillons et 10 stades de développement pour le poivron. Les capacités sont exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF puis centrées et réduites. 21 variables pour l'aubergine et le poivron sont analysées. (A-B) Graphiques des « scores » sur les deux premières CP. (C-D) Graphique des « loadings » sur les deux premières CP. L'évolution des stades de développement est indiquée sur les graphiques des « scores » à l'aide d'une flèche, des stades précoces (symboles de couleur claire) vers les stades maturation puis mûr (symboles de couleur foncée).

Abréviations: AI, invertase acide; CS mit, citrate synthase mitochondriale ; CS tot, citrate synthase totale ; FK, fructokinase ; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase; NAD-GAPDH, NAD-glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase; GK, glucokinase ; NADP-IDH, NAD-isocitrate déshydrogénase ; NADP-ME, enzyme malique à NADP ; NI, invertase neutre; NAD(P)-MDH, malate déshydrogénase à NAD(P) ; PEPC, phospho*énol*pyruvate carboxylase; ATP-PFK, ATP-phosphofructokinase; PGI, phosphogluco-isomérase ; UGPase, UDP-glucose-PGM, phosphoglucomutase; PK, pyruvate kinase; TPI, triose-phosphate isomérase; UGPase, UDP-glucose-pyrophosphorylase.

Toutes les tendances d'évolution des teneurs des composés et capacités enzymatiques qui viennent d'être détaillées à l'aide d'analyses statistiques multivariées devront être vérifiées à l'aide d'analyses statistiques univariées. Cependant, l'évolution des profils de développement des fruits sur les graphiques des « loadings » (Figure 34A-B, Figure 35A-B) présente de fortes similitudes entre l'aubergine et le poivron. De plus, une majorité des évolutions des teneurs en intermédiaires du métabolisme et les capacités enzymatiques sont similaires pour les deux fruits. La comparaison des graphiques des « scores » entre les teneurs des intermédiaires du métabolisme et les capacités des enzymes pour l'aubergine (Figure 34C et Figure 35C) et pour le poivron (Figure 34D et Figure 35D) indique par exemple que les teneurs en hexoses-phosphates (G6P et F6P) d'une part et les capacités des enzymes qui les synthétisent (GK et FK) d'autre part présentent leurs valeurs les plus élevées aux mêmes stades de développement, c'est-à-dire les stades précoces de croissance du fruit. Un léger décalage est cependant observé entre les teneurs en hexoses-P et les capacités des deux enzymes : le pic de teneur en hexoses phosphates est atteint un peu plus tôt, plus particulièrement chez l'aubergine. Les coévolutions au cours du développement entre les capacités enzymatiques ont ensuite été analysées par classification hiérarchique, et visualisées à l'aide de cartes de chaleur.

3. Comparaison des profils d'évolution des enzymes au cours du développement du fruit

Les résultats précédents montrent que la majorité des enzymes présentent de plus fortes capacités pendant les stades précoces, pour diminuer ensuite alors que la teneur en eau augmente (Figure 19). Il semblait donc intéressant de regarder leurs évolutions au cours du développement en s'affranchissant de cet effet de dilution. De plus, les teneurs en MS diffèrent à maturité entre les deux espèces, avec une augmentation de la MS pour le poivron (10% de MS à maturité) et une diminution pour l'aubergine (5,5% de MS à maturité). C'est pourquoi, une expression par unité de matière sèche apparait judicieuse pour comparer les deux espèces. Pour cela, les capacités ont été exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ de MS. Afin de catégoriser les capacités en fonction de leur profil d'évolution au cours du développement du fruit, une classification hiérarchique basée sur les corrélations de Pearson de l'ensemble des moyennes par stade des capacités enzymatiques a été réalisée pour l'aubergine et le poivron séparément. Le résultat est présenté sous forme de carte de chaleur (Figure 36).

Pour l'aubergine, la classification hiérarchique (Figure 36A) permet de mettre en évidence l'association de groupes d'enzymes de différentes voies du métabolisme central à

trois phases du développement ainsi qu'au stade mûr (Figure 37A). Les stades précoces sont caractérisés par de fortes capacités d'enzymes de la glycolyse comme la pyruvate-kinase (PK), la PEP-carboxylase, la PGK et la TPI, d'enzymes du métabolisme des sucres avec la PGI, la PGM et l'AI, et du cycle de Krebs avec la NAPD-IDH et la NAD-MDH. Les stades de croissance exponentielle sont caractérisés par de fortes capacités en NI, GK, FK pour le métabolisme des sucres, en aldolase, NAD-GAPDH située dans la glycolyse, et NADP-MDH. Les stades de maturation sont caractérisés par de fortes capacités ATP-PFK, G6PDH, UGPase et CS, enfin le stade mûr présente une forte activité en NADP-ME.

Pour le poivron, la classification hiérarchique permet de mettre en évidence deux phases de développement impliquant des enzymes des différentes voies du métabolisme central (Figure 36B). Les stades précoces sont caractérisés par de plus fortes capacités enzymatiques des étapes finale de la glycolyse, PEPC, PK et PGK, et en NADP-IDH, NADP-ME et G6PDH. Les stades de croissance exponentielle sont caractérisés par de plus fortes capacités de l'ensemble des autres enzymes comme cité précédemment pour l'aubergine.

La comparaison des deux espèces montre des similitudes mais également des différences entre le poivron et l'aubergine. L'un des points communs frappants concerne les stades de développement précoces pour lesquels des capacités plus fortes de trois enzymes des étapes finales de la glycolyse, la PGK, la PK et la PEPC, sont retrouvées. *A contrario*, la NADP-ME présente de plus fortes capacités aux stades précoces et plus faibles pour le stade mûr chez le poivron, alors que l'inverse se produit chez l'aubergine. Une autre similitude se dégage pour les stades de croissance exponentielle qui regroupent FK, GK et NI pour les deux fruits ainsi que les premières étapes de la glycolyse avec la NAD-GA3PDH et l'aldolase. La comparaison des deux cartes du métabolisme central de l'aubergine (Figure 37A) et du poivron (Figure 37B) met en évidence les différences et notamment une reprogrammation du métabolisme de l'aubergine lors de la maturation qui n'est pas retrouvée chez le poivron.

Nous avons ensuite recherché d'autres différences et similitudes entre le poivron et l'aubergine en combinant l'ensemble des données.



Figure 36 : Classement des capacités enzymatiques exprimées par matière sèche pour l'aubergine (A) et le poivron (B) au cours du développement du fruit.

Analyse de classification hiérarchique réalisée sur les z- scores des moyennes (n=4 ou 5) par stade des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MS, avec comme distances les corrélations de Pearson. Les colonnes correspondent aux 11 stades de développement pour l'aubergine et 10 pour le poivron et les lignes correspondent aux 21 capacités enzymatiques mesurées. Les groupes principaux sont différenciés par une barre de couleur à droite avec les activités élevées aux stades précoces en vert, celles élevées aux stades en croissance exponentielle en jaune, celles élevées aux stades de maturation en orange et celle élevée à maturité en rouge. Pour chaque enzyme la couleur jaune correspond aux valeurs de capacités les plus fortes et la couleur bleue aux plus faibles.



Figure 37 : Annotation des groupes des Figures 36 A-B sur une carte simplifiée du métabolisme central pour l'aubergine (A) et le poivron (B).

Le code couleur correspond aux groupes mis en évidence Figure 36. En vert les activités sont plus fortes pour les stades précoces, en jaune pour les stades de croissance exponentielle, en orange pour les stades de maturation et en rouge pour le stade mûr.

III.Comparaison combinée de la composition et de la régulation du métabolisme des
deux Solanacées au cours du développement du fruit

Nous venons de décrire l'évolution au cours du développement de la composition en métabolites, composés structuraux, intermédiaires du métabolisme primaire et des capacités enzymatiques de manière séparée, et ceci pour chacune des deux Solanacées. Nous allons maintenant combiner l'ensemble de ces données afin de mettre en évidence ce qui différencie ou rapproche une espèce de l'autre et un stade d'un autre.

- Scores 1-2 12 10 8 6 4 (23%) ⁵ 2 CP2 0 -15 -10 -5 10 -2 -6 Aubergine Poivron -8 CP1 (44%)
- 1. Intégration de l'ensemble des données pour la comparaison inter-espèce



ACP réalisée sur les moyennes (n=5) des données de 10 stades de développement pour l'aubergine et le poivron. Les teneurs en composés sont exprimés en µmol.g⁻¹ MF, les capacités enzymatiques en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF et le RGR en g.g⁻¹.jour⁻¹. Les 76 variables pour l'aubergine et le poivron ont été centrées et réduites. Graphique des « scores » sur les deux premières CP. L'évolution des stades de développement (annotés de 1 pour l'ovaire à 10 pour le stade mûr) est indiquée sur le graphique à l'aide d'une flèche pour l'aubergine (violet) et pour le poivron (vert), des stades précoces vers les stades maturation puis mûr.

Afin de visualiser globalement l'évolution du métabolome et de l'activome pour les deux espèces, une ACP a été réalisée sur l'ensemble des donnés précédentes incluant, les teneurs en métabolites, en composés structuraux, en intermédiaires du métabolisme primaire, les capacités enzymatiques et le RGR. Les analyses ont été réalisées sur les données exprimées par MF. L'observation du graphique des « scores » (Figure 38) montre que les deux premières CP, qui expliquent 67% de la variabilité totale, séparent les différents stades de développement pour chaque espèce et séparent aussi distinctement les deux Solanacées. Une évolution progressive de la composition de l'ovaire vers le stade mûr suit la CP1 pour chaque espèce. Les stades précoces sont caractérisés par des coordonnées négatives sur la CP1 et les stades de fin de croissance et maturation par des coordonnées positives. La CP2 sépare les

deux espèces avec des coordonnées positives pour le poivron et négatives pour l'aubergine. L'évolution du fruit d'aubergine sur la CP2 est progressive tout au long du développement, alors qu'elle ne concerne que les stades 7 à 10 du poivron. Pour disséquer ces séparations mises en évidence globalement avec l'ACP, les analyses statistiques ont été affinées afin d'observer spécifiquement les effets de l'espèce et des stades séparément.

2. Analyse de la différence inter-espèce

Une ANOVA à deux facteurs a préalablement été réalisée sur l'ensemble des réplicas et sur les 75 variables communes du métabolome et de l'activome (*P* < 0,05 avec une correction FDR). Les résultats ont montré que les 75 variables étaient significativement affectées par le stade de développement, dont 73 variables significativement affectées par l'espèce, mais aussi que toutes les variables étaient significativement affectées par l'espèce. Afin de visualiser l'effet de l'espèce en s'affranchissant de l'effet du stade de développement, une ANOVA-PCA a ensuite été réalisée sur les données. Cette ANOVA-PCA a été réalisée sur les 10 stades de développement correspondant à des vitesses de croissance équivalentes pour l'aubergine et le poivron. L'observation du graphique des « scores » (Figure 39A) montre que la première CP, qui explique 72% de la variabilité totale de l'effet espèce, sépare les deux Solanacées avec le poivron du côté négatif et l'aubergine du côté positif.



Figure 39 : Visualisation des différences entre les deux Solanacées (aubergine en violet et poivron en vert) pour les variables du métabolome et de l'activome au cours du développement à l'aide d'une ANOVA-ACP.

ANOVA-ACP réalisée sur les échantillons (5 réplicas par stade) de 10 stades de développement pour l'aubergine et le poivron. Les 75 variables ont été calculées après une ANOVA à deux facteurs réalisées sur les données des teneurs des composés exprimées en µmol.g⁻¹ MF et des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF puis réduites et centrées. (A) Graphique des « scores » de l'effet espèce sur les deux premières CP. (B) Graphique des « loadings » sur les deux premières CP.

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 39A) avec celui des « loadings » (Figure 39B) montre que l'aubergine est caractérisée par des teneurs plus élevées en chlorogénate. Le poivron est caractérisé par des teneurs plus élevées en ascorbate total et

réduit, alanine, glucose pariétal, linoléate et linolénate des lipides totaux, PPi et F-1,6-bP et par des capacités enzymatiques plus élevées de NADP-MDH et d'aldolase.

3. Analyse de l'effet du développement du fruit commun aux deux espèces

Afin de visualiser l'effet du développement sur les deux espèces de Solanacées en s'affranchissant de l'effet de l'espèce, une ANOVA-ACP a été réalisée sur les données du métabolome et de l'activome sur 10 stades de développement correspondant aux mêmes vitesses de croissance pour l'aubergine et le poivron.

L'observation du graphique des « scores » (Figure 40A) montre que les deux premières CP, qui expliquent 73% de la variabilité totale, séparent les dix stades de développement pour les deux Solanacées. Les ovaires et le 2^{ème} stade précoce ont des coordonnées négatives sur CP1 et CP2, les 3^{ème} et 4^{ème} stades des coordonnées positives sur CP2 et négatives sur CP1, les stades en croissance exponentielle des coordonnées positives sur CP2 et CP1, et les stades de maturation des coordonnées positives sur CP1 et proches de 0 ou négatives sur CP2.



Figure 40 : Visualisation des différences communes entre les stades de développement basée sur les variables du métabolome et de l'activome pour l'aubergine (violet) et le poivron (vert) à l'aide d'une ANOVA-ACP.

ANOVA-ACP réalisée sur les échantillons (5 réplicas par stade) des données de 10 stades de développement pour l'aubergine et le poivron annotés de 1 à 10. Les 75 variables ont été calculées après une ANOVA à deux facteurs réalisées sur les teneurs des composés exprimées en µmol.g⁻¹ MF et des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF puis réduites et centrées. (A) Graphiques des « scores » de l'effet stade sur les deux premières CP. (B) Graphique des « loadings » sur les deux premières CP.

La comparaison du graphique des « scores » (Figure 40A) avec celui des « loadings » (Figure 40B) montre que de nombreuses teneurs en composés ou capacités d'enzymes évoluent jusqu'au début de la maturation. Les ovaires et le deuxième stade par exemple sont caractérisés par des teneurs plus élevés en stéarate, arachidate, aspartate et G1P. Les 3^{ème} et 4^{ème} stades correspondant aux stades précoces sont caractérisés par des valeurs plus élevées pour les teneurs en UDPG, F6P et 6P-gluc d'une part et pour les capacités de FK et TPI d'autre

part. Les premiers stades de croissance exponentielle (5^{ème} et 6^{ème} stades) sont caractérisés par des teneurs plus élevées en galactose pariétal et par des capacités élevées de NAD-GAPDH et UGPase, en particulier chez l'aubergine. Le dernier stade de maturation avant le fruit mûr est caractérisé par des teneurs plus élevées en galacturonate pariétal et cellulose. Le stade mûr est caractérisé par les valeurs les plus faibles pour la majorité des variables calculées. La teneur en citrate caractérise à la fois le premier et le dernier stade.

Les variables qui permettent de discriminer les stades de développement ne sont donc pas les mêmes que celles qui ont permis de différentier l'aubergine du poivron.



4. Corrélation entre le RGR et les données du métabolisme

Figure 41 : Mise en évidence des variables métaboliques présentant la plus forte corrélation avec le RGR pour les deux espèces.

Biplot entre le RGR et chacune des quatre variables sélectionnées (moyennes par stade) pour 11 stades de développement pour l'aubergine (violet) et 10 pour le poivron (vert). Les teneurs des composés sont exprimées en µmol.g⁻¹ MF, les capacités enzymatiques en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF et le RGR en g.g⁻¹.jour⁻¹

L'ANOVA-PCA qui nécessite l'utilisation de réplicas ne permet pas de visualiser les liens entre la croissance que nous avons modélisée (avec une seule valeur par stade) comme le RGR, et le métabolome ou l'activome. Afin de rechercher s'il existe un lien commun pour les deux espèces entre l'ensemble des données quantitatives concernant le métabolisme et les données de croissance, une approche par analyse de classification KMC a été réalisée (sur les données réduites et centrées). L'ensemble de ces variables (moyennes des réplicas ou RGR par stade) pour le poivron et l'aubergine ont été classées séparément en utilisant comme distance la corrélation de Pearson. Une classification hiérarchique préliminaire distinguait 5 groupes de variables. Pour chaque espèce, le RGR a été localisé dans un groupe de variables métaboliques donné et les 9 variables communes de ces deux groupes pour les deux espèces ont été relevées. Le RGR, est selon cette analyse fortement corrélé avec les teneurs en protéines, F6P, G6P et UDPG et avec les capacités enzymatiques de TPI, NAD-MDH, GK, FK, PGI et PGM pour le poivron et l'aubergine. Le calcul du coefficient de détermination R² pour chaque espèce a permis de sélectionner ensuite parmi ces 10 variables les quatre variables présentant les liens les plus forts avec le RGR, TPI, NAD-MDH, PGM et F6P, qui sont représentées sur la Figure 41.

Pour les quatre variables communes aux deux espèces, les teneurs et les capacités présentent des coefficients de détermination plus élevés pour l'aubergine que pour le poivron. La TPI présente le plus fort coefficient pour l'aubergine ($R^2 = 0.95$).

5. Corrélation entre le métabolome et l'activome

Pour visualiser les similarités et les différences pour les relations entre le métabolome et l'activome exprimés sur la base de la MF des deux espèces, des cartes de chaleur ont été réalisées à partir des matrices de corrélations (corrélation de Pearson) pour l'aubergine (Figure 42A) et le poivron (Figure 42B) séparément.

Pour l'aubergine (Figure 42A) une majorité des capacités enzymatiques sont corrélées positivement aux teneurs en métabolites, intermédiaires du métabolisme et composés structuraux mais il y a quelques exceptions. Ainsi les capacités de l'UGPase, G6PDH, ATP-PFK, NAD-GAPDH, NADP-ME et les CS sont négativement corrélées avec la plupart des teneurs en métabolites, à l'exception de la plupart de celles des monomères de la paroi et des hexoses. Il est intéressant de noter que lorsque ces capacités d'enzymes sont corrélées positivement avec les teneurs de ces métabolites, les autres capacités d'enzymes sont généralement corrélées négativement avec les teneurs de ces mêmes métabolites.

Pour le poivron (Figure 42B), la plupart des teneurs en métabolites, intermédiaires du métabolisme et composés structuraux sont corrélés positivement aux capacités d'enzymes mais il y a quelques exceptions comme les teneurs en glucose, fructose, asparagine, valine, alanine, isoleucine, galacturonate et cellulose. Les teneurs en saccharose, citrate, ascorbate total et réduit sont faiblement corrélés à l'activome contrairement à la teneur en ascorbate oxydé qui elle est fortement corrélée positivement avec la plupart des capacités des enzymes. Concernant celles de la NAD-GAPDH, l'aldolase, la NADP-MDH, la NI et l'UGPase semblent être les moins corrélées aux teneurs des métabolites.

L'accumulation ou la diminution de la teneur des métabolites à un stade donné résultant au moins en partie de l'activité des enzymes, il semble judicieux de comparer des vitesses d'accumulation de métabolites avec les capacités enzymatiques.


Parois cellulaires Lipides Sucres et sucres alcools Acides organiques et dérivés Acides aminés et composés azotés Intermédiaires du métabolisme Autre

Figure 42 : Visualisation des corrélations entre le métabolome et l'activome exprimés par unité de MF pour l'aubergine (A) et le poivron (B).

Carte de chaleur réalisée à partir des corrélations de Pearson sur les moyennes (n=4 ou 5) des teneurs des métabolites exprimées en µmol.g⁻¹ MF et des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF. Les colonnes correspondent aux 22 capacités enzymatiques et les lignes aux teneurs des 55 composés communs mesurés et au RGR. En bleu les corrélations négatives, en jaune, les corrélations positives. Echelle des corrélations : de -1 à 1.

IV. Analyse des vitesses d'accumulation des composés dans le fruit en corrélation avec les activités enzymatiques

Afin de combiner les données du métabolome et de l'activome de manière plus précise, les teneurs des métabolites, des composés structuraux et des intermédiaires du métabolisme ont été exprimées par fruit. Les évolutions de ces teneurs sont présentées dans les Annexes 8 à 12. Puis, chaque évolution au cours du temps pour les composés majeurs a été modélisée à l'aide de différentes équations : polynômes de degré 2 ou 3, ou simples sigmoïdes. Les données ont parfois été transformées sur la base de logarithme népérien ou sur la base d'une

racine carrée puis retransformées lorsque cela était nécessaire en amont et en aval de la modélisation.

1. Recherche des relations entre les vitesses d'accumulation des composés par fruit et les capacités enzymatiques au cours du développement du fruit

Afin de classifier en fonction de leur profil d'évolution au cours du développement du fruit le RGR, les vitesses d'accumulation des composés majeurs et les capacités enzymatiques, une classification hiérarchique basée sur les corrélations de Pearson a été réalisée pour l'aubergine et le poivron séparément. Le résultat est présenté sous forme de carte de chaleur (Figure 43).



Figure 43 : Classification des vitesses d'accumulation des métabolites par fruit et des capacités enzymatiques pour l'aubergine (A) et le poivron (B) au cours du développement.

Classification hiérarchique réalisée sur les z-scores des moyennes par stade des vitesses d'accumulation des métabolites en µmol.fruit¹.jour¹ et des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MS avec comme distance les corrélations de Pearson. Les colonnes correspondent aux 11 stades de développement pour l'aubergine et 10 pour le poivron et les lignes correspondent aux RGR, aux 23 vitesses d'accumulation et 21 capacités enzymatiques. Les groupes principaux sont différenciés par un bloc de couleur à droite avec vitesses d'accumulation et les capacités élevées aux stades précoces en vert, celles élevées aux stades en croissance exponentielle en jaune et celles élevées aux stades de maturation en orange. Pour chaque vitesse ou capacité pour une espèce, la couleur jaune correspond aux valeurs les plus fortes et la couleur bleue aux plus faibles.

Pour l'aubergine, la classification hiérarchique (Figure 43A) permet de mettre en évidence trois phases de développement. Les stades précoces sont caractérisés par des capacités enzymatiques plus élevées de la glycolyse comme la TPI, la PEPC, la PGK et la PK, du métabolisme des sucres comme l'AI, la PGM et la PGI, et du cycle de Krebs avec la NAPD-IDH, NADP-MDH et la NAD-MDH. Le RGR est associé à ces enzymes. Les stades de croissance exponentielle sont caractérisés par des vitesses d'accumulation plus élevées pour la plupart des métabolites et des intermédiaires du métabolisme central, quelques capacités enzymatiques du métabolisme des sucres comme la NI, la FK et du haut de la glycolyse comme l'ATP-PFK, la NAD-GAPDH et l'aldolase. Les stades de maturation et mûr sont caractérisés par une vitesse d'accumulation plus élevée en citrate accompagnée d'une capacité plus élevée de la CS et la NADP-ME.

Pour le poivron, le classement hiérarchique (Figure 43B) permet également de mettre en évidence trois phases du développement. Les stades précoces sont caractérisés par des valeurs plus élevées pour l'ensemble des capacités enzymatiques et le RGR. Les stades en croissance exponentielle sont caractérisés par des valeurs plus élevées pour l'ensemble des vitesses d'accumulation des intermédiaires et des métabolites exceptée pour celle du citrate qui caractérise les stades de maturation et particulièrement le stade « breaker » (63 DPA). On note un léger décalage entre les vitesses d'accumulation de la plupart des intermédiaires, Man6P, F6P, Gly-3P, UDPGal, UDPG, G6P, celle des protéines et du malate avec les autres membres de ce groupe : ces vitesses d'accumulation sont plus élevées entre 15 et 30 JAA alors que les maxima pour les autres composés apparaissent entre 30 et 40 JAA.

La comparaison des deux espèces montre des similitudes mais également des différences entre le poivron et l'aubergine. L'un de points communs frappants concerne les stades de développement précoces pour lesquels la majorité des capacités enzymatiques se regroupent avec le RGR et les stades en croissance exponentielle qui regroupent les vitesses d'accumulation de la plupart des intermédiaires du métabolisme et des métabolites. Dans les deux espèces le citrate s'accumule lors de la maturation du fruit, cependant pour le poivron, ceci n'est pas accompagné d'une augmentation de capacités enzymatiques.

2. Corrélation entre les vitesses d'accumulation des composés et les capacités enzymatiques du fruit à travers le développement du fruit.

Afin d'étudier plus précisément les corrélations entre les vitesses d'accumulation des composés et celles des capacités enzymatiques, des cartes de chaleur ont été réalisées à partir de matrices de corrélations basées sur les distances de Pearson. Elles illustrent les corrélations positives et négatives plus ou moins importantes pour l'aubergine (Figure 44A) et le poivron (Figure 44B).



Figure 44 : Illustration des corrélations entre le métabolome et l'activome pour l'aubergine (A) et le poivron (B).

Carte de chaleur réalisée à partir des corrélations de Pearson sur les moyennes (n=4 ou 5) des vitesses d'accumulation des composés exprimées en µmol.fruit⁻¹.Jour⁻¹ et des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MF. Les colonnes correspondent aux 21 capacités enzymatiques et les lignes correspondent aux 24 vitesses d'accumulation des composés dont le RGR. En bleu les corrélations négatives, en jaune, les corrélations positives. Echelle des corrélations : de -1 à 1

Pour l'aubergine (Figure 44A), la plupart des capacités enzymatiques sont corrélées positivement aux vitesses d'accumulation des métabolites, des intermédiaires du métabolisme, des composés structuraux et au RGR, excepté pour l'activité de la PEPC qui est corrélée négativement à la plupart des vitesses d'accumulation et les activités de la NADP-ME et des citrates synthases qui sont corrélées négativement au RGR. La vitesse d'accumulation du citrate est la seule vitesse corrélée négativement à une majorité de capacités enzymatiques, excepté avec la NADP-ME et les citrates synthase qui sont corrélées positivement, et avec les UGPase, G6PDH et ATP-PFK qui ne sont pas corrélées. Les enzymes présentant le coefficient de corrélation le plus élevé avec les vitesses d'accumulations des métabolites sont la GK, l'ATP-PFK, la NAD-GAPDH, l'aldolase et surtout la G6PDH. La vitesse d'accumulation du citrate est fortement corrélée négativement avec une majorité des enzymes ainsi qu'avec le RGR.

Pour le poivron (Figure 44B), les valeurs des coefficients de corrélations ont tendance à être plus faibles que pour l'aubergine. La plupart des capacités enzymatiques sont corrélées positivement ou non corrélées aux vitesses d'accumulation des métabolites, des intermédiaires du métabolisme, des composés structuraux et au RGR. La vitesse

d'accumulation du quinate présente les coefficients de corrélation les plus élevés avec la plupart des capacités enzymatiques. En revanche, comparé à l'aubergine, davantage de vitesses d'accumulation de métabolites sont corrélées négativement avec des capacités enzymatiques comme celles du fructose, du G1P, du citrate et des acides aminés. De plus, chez le poivron le RGR présente les plus fortes corrélations avec les capacités enzymatiques.

V. Discussion

L'aubergine et le poivron font partie de la famille des Solanacées au même titre que la tomate, le piment, la pomme de terre, la baie de Goji ou encore le tabac. Chez ces deux espèces, le fruit charnu dérive d'un ovaire supère conduisant à un fruit simple tout comme chez la tomate. Cependant nous avons vu que malgré leur appartenance à la même famille, le développement du fruit et la régulation de son métabolisme diffèrent en plusieurs points entre ces espèces.

- 1. Croissance du fruit, croissance cellulaire et développement des Solanacées
 - a. Croissance des Solanacées et comparaison avec celle de la tomate

Nos résultats montrent que le poivron et l'aubergine qui sont considérés comme des fruits non climactériques (Paul et al. 2012) se développent en 80 jours environ, de l'anthèse à la maturité physiologique en suivant une simple sigmoïde comme la tomate (Beauvoit et al. 2014). Les fruits finalisent leur croissance vers 40 JAA, possèdent un RGR maximum élevé mais présentent des calibres et des vitesses de croissance différentes avec des valeurs plus élevées pour l'aubergine. La durée de développement, le calibre ainsi que le RGR du poivron sont globalement en accord avec ceux trouvés dans la littérature (Nielsen et al. 1991), en revanche, peu de données concernant l'aubergine et son développement jusqu'à maturité physiologique ont été rapportées. Dans une étude portant sur les changements de composition du fruit au cours du développement et de la maturation sur différents cultivars de plus faible calibre (entre 200 g et 600 g à maturité) que notre variété, des mesures ont été faites jusqu'à 54 JAA (Esteban et al. 1992). Dans une autre étude menée avec la variété Monarca, des fruits ont été récoltés jusqu'à la maturité commerciale qui correspond à l'intervalle entre 20 et 25 JAA selon nos données, mais pas à maturité physiologique, c'est-à-dire au moment où le fruit brunit et où son calibre dépasse le kilogramme. En revanche une étude, focalisée sur les ovaires d'aubergine ainsi que les premiers jours de développement du fruit (Lee et al. 1997), montre un RGR fort durant les premiers jours de croissance.

En comparaison, le fruit de la tomate du type Moneymaker se développe en 55 environ jours, finalisant sa croissance en 45 jours environ pour atteindre environ 100 g et présentant un RGR plus faible qui atteint son maximum vers 9 JAA (Monselise *et al.* 1978; Biais *et al.* 2014). Ce fruit met donc moins de temps à atteindre sa maturité physiologique mais plus de temps à finaliser sa croissance. Les données relatives à la croissance obtenues par Biais et al., 2014 ont été modélisées à l'aide d'une simple sigmoïde, comme pour le poivron est l'aubergine afin de pouvoir comparer RGR et vitesse de croissance (Figure 45). On note que pour la tomate la vitesse maximum de croissance apparait vers 30 JAA, comme pour les autres Solanacées, et sa valeur est de 3,2 g.Jour⁻¹ soit quatre fois plus faible que celle du poivron et 16 fois plus faible que celle de l'aubergine. Cela suggère donc une étroite corrélation entre les vitesses de croissance et le calibre final des fruits comme discuté précédemment dans le chapitre 3. Concernant la vitesse de croissance relative, on note également un RGR maximum deux fois plus faible chez la tomate (0,10 g.g⁻¹.Jour⁻¹) enregistré à 10 JAA, et une période plus longue où le RGR est maintenu à son maximum (RGR > 0,095 g.g⁻¹.Jour⁻¹), de 15 jours contre 10 jours pour l'aubergine et le poivron en accord avec une autre étude (Nielsen *et al.* 1991). Les Solanacées ayant besoin de plus de temps pour croître, comme la tomate, nécessitent un maintien de RGR maximum plus long. Ces tendances sont retrouvées chez d'autres espèces comme la pomme qui croît sur une période de 150 jours environ et qui maintient son RGR à son maximum sur une vingtaine de jours (Schechter *et al.* 1993). Pour le concombre qui croît au contraire très rapidement (entre 20 et 30 jours), le RGR reste maximum sur une courte période (environ 7 jours) (Marcelis 1992).



Figure 45 : Description de la croissance du fruit de tomate.

Evolution pour la tomate du poids frais du fruit (**noir**) en g, de sa vitesse de croissance (**rouge**) en g.Jour⁻¹ et du taux relatif de croissance ou RGR (**vert**) en g.g⁻¹.Jour⁻¹. Le poids du fruit est la moyenne calculée à partir de mesures réalisées sur un minimum de 5 fruits par stade de développement. La barre verticale représente l'écart-type. La vitesse de croissance a été modélisée à partir des données de poids des fruits suivant la méthode décrite dans le chapitre 2. Le RGR est calculé à partir du poids du fruit et de sa vitesse de croissance modélisée. Graphique réalisé à partir des données de Biais *et al.* (2014)

b. Croissance cellulaire et évolution des compartimentations subcellulaires chez les Solanacées

Le développement des fruits est généralement divisé en trois phases caractéristiques. La phase de division cellulaire est une période très courte (entre 7 et 10 jours après l'anthèse) qui démarre après pollinisation (Gillaspy *et al.* 1993). Pendant la phase d'expansion cellulaire la taille des vacuoles augmente et les couches cytoplasmiques s'amincissent, ce qui contribue grandement à la taille finale du fruit (Coombe 1976; Beauvoit *et al.* 2014). Cette phase peut durer plusieurs semaines comme chez la tomate (Pabon-Mora et Litt, 2011) et peut pour

certains fruits se superposer à la phase de maturation comme chez le raisin (Deluc *et al.* 2007). La phase de maturation se caractérise par un ramollissement des tissus, une modification de la coloration et des changements dans la composition du fruit. Nous retrouvons cette superposition de phases pour l'aubergine, dont la coloration change avant que le fruit n'ait atteint sa taille finale. A *contrario*, le poivron finalise sa croissance avant de changer de couleur comme la tomate. Bien que la période de maturation soit assez facilement définie (changements physiologiques et de composition), l'identification précise des deux autres périodes nécessiterait des analyses cytologiques détaillées. Nos résultats actuels ne nous permettent pas de définir avec précision les débuts et fins des phases de division et d'expansion cellulaire chez l'aubergine et le poivron. Cependant on peut supposer que les premiers jours de croissance du fruit correspondent à la phase de division cellulaire alors que la période de fruit correspond à la phase d'expansion cellulaire, comme c'est le cas chez la tomate (Beauvoit *et al.* 2014).



Figure 46 : Evolution du volume des cellules et des compartiments subcellulaires du péricarpe au cours du développement du fruit de tomate.

(A) Evolution des volumes cellulaires (carrés) en pl pour la tomate MoneyMaker. Les moyennes des volumes cellulaires pour cinq échantillons sont représentées (ronds) ainsi que la vitesse de croissance des volumes cellulaires (triangles issus de la modélisation de la courbe de croissance à partir des points mesurés par le modèle Gompertz (chapitre 2) en pl.Jour⁻¹. (B) Estimation des volumes subcellulaires pour les tomates Alisa Craig (symbole ouvert) et Moneymaker (symbole fermé), représentation des proportions de volumes de vacuole (jaune), de cytoplasme (rouge) et de parois (bleu).Moyenne des proportions réalisée sur trois fruits. Beauvoit *et al.* (2014)

Une comparaison de nos résultats concernant les volumes cellulaires et subcellulaires de la tomate (Beauvoit *et al.* 2014) avec ceux obtenus ici (Figure 46), montre que l'évolution des volumes cellulaires (Figure 31A et Figure 46A suit le même profil que celui du poids frais des fruits (Figure 29A-B, Figure 45A), à savoir une simple sigmoïde. En revanche, les vitesses maximales de croissance et les tailles finales de cellules diffèrent fortement entre ces trois Solanacées. En effet, la tomate présente de grandes cellules (Cheniclet 2005) avec un volume de 4100 pl, alors que les volumes des cellules de l'aubergine et du poivron mesurés ici sont quatre fois plus petits. Le fait que les volumes de cellules de poivron obtenus ici soient plus faibles que précédemment rapporté (Rygol et Luttge 1983) pourrait être lié à la variété de

poivron et aux modalités de l'échantillonnage. Par exemple en lien avec le choix de la zone de découpe, les cellules du poivron présentent une grande diversité (Rygol et Luttge 1983). On notera que, l'aubergine qui possède la plus forte vitesse maximale de croissance du fruit possède la plus faible vitesse maximale de croissance des cellules, et inversement pour la tomate.

De la même manière, des différences importantes sont observées pour l'évolution des proportions des compartiments subcellulaires (Figure 31B et Figure 46B). Ainsi, à l'anthèse la vacuole occupe une beaucoup plus grande fraction de la cellule chez l'aubergine, mais la tendance s'inverse à maturité, la vacuole croissant nettement moins chez l'aubergine que chez le poivron ou la tomate. Pour le poivron et la tomate (Beauvoit et al. 2014), l'expansion de la vacuole se fait au détriment du cytoplasme pour les stades précoces et une partie des stades en croissance exponentielle (jusque 20 JAA), puis les croissances du cytoplasme et de la vacuole se poursuivent en parallèle. De plus, le RGR du fruit est maximum au moment où la croissance de la vacuole est la plus importante chez la tomate et le poivron. En revanche, chez l'aubergine le RGR reste à son maximum alors que la proportion du volume occupé par la vacuole n'augmente que très peu. Ainsi un RGR fort n'implique pas forcément une croissance vacuolaire forte. Chez la tomate, il a été proposé que la croissance de la vacuole est énergivore car sa vitesse de croissance est maximale au moment de l'existence d'un métabolisme « turbo » (Biais et al. 2014; Beauvoit et al. 2014). Cette croissance de vacuole est également maximale chez les jeunes stades de poivron pour lesquels les activités métaboliques sont fortes. On peut alors se demander quel est le coût énergétique de fabrication d'une vacuole pour les trois Solanacées, ainsi que celui de la paroi qui au début du développement du fruit augmente assez sensiblement chez l'aubergine. Les modélisations stœchiométrique et cinétique, qui pourront se faire avec les données de biomasse présentées dans le chapitre 3 ainsi que celles concernant les intermédiaires et les capacités enzymatiques, permettront de mieux cerner les besoins énergétiques (Beauvoit et al. 2014; Colombié et al. 2015).

Fait marquant avec ces données cytologiques, l'aubergine est la seule à présenter une augmentation de la proportion du volume cellulaire occupé par les parois, ce dernier diminuant chez le poivron et restant faible et constant chez la tomate. Ces variations de proportion, de même que la taille des cellules, pourraient être à l'origine des propriétés plus ou moins charnues du fruit mûr. La tomate qui présente une chair souple et juteuse possède de grandes cellules dont plus de 80% du volume est occupé par la vacuole alors que l'aubergine qui présente une chair ferme et spongieuse possède de petites cellules, avec une vacuole n'occupant que 67% de la cellule au profit des parois qui en occupent 24%.

De plus, d'après d'autres études, la croissance du péricarpe de la tomate s'accompagne d'endoréduplication, processus au cours duquel la cellule réplique l'ADN de son noyau mais ne se divise pas (Cheniclet 2005). Il a été proposé que la division, l'expansion cellulaire et l'endoréduplication sont déclenchées simultanément dans des couches cellulaires spécifiques par des signaux hormonaux similaires à ceux de la pollinisation accélérant ainsi la croissance cellulaire (Renaudin *et al.* 2017). La tomate possède de grandes cellules mais également le plus grand nombre de cycles d'endoréduplication, à savoir huit. Le poivron n'en possède que six et l'aubergine trois (Bourdon *et al.* 2010). De plus, comme mentionné précédemment, la proportion de la vacuole est multipliée par quatre dans le péricarpe de tomate alors que celle de poivron est seulement multipliée par deux, et celle d'aubergine augmente très peu lors du développement. L'ensemble de ces résultats permet de proposer l'hypothèse que la combinaison du nombre de cycles d'endoréduplication et de l'importance relative du volume vacuolaire (Bourdon *et al.* 2010), associé à nos données sur l'accumulation des métabolites et la régulation du métabolisme, pourrait avoir un impact fort sur la taille finale des cellules du fruit.

Divers travaux ont montré que pendant le développement et la croissance du fruit, de nombreux changements s'opèrent au niveau de son métabolisme avec en particulier une reprogrammation de l'activome qui se reflète au niveau du métabolome (Carrari et Fernie 2006; Biais *et al.* 2014). La comparaison de ces deux espèces avec la tomate permet de cerner les points de la programmation du développement du fruit de manière plus générale.

2. Evolution du métabolisme de l'amidon au cours du développement chez les Solanacées

D'après nos résultats obtenus avec l'ANOVA-ACP, les ovaires des deux espèces sont caractérisés par des concentrations plus élevées en G1P. Le G1P est un précurseur de l'ADPG via la réaction catalysée par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) qui sert de substrat pour la synthèse de l'amidon (Biais et al. 2014). Il est également le précurseur de l'UDPG, via la réaction catalysée par l'UGPase, précurseur des parois cellulaires (Reiter 2008), de l'ascorbate et du saccharose (Reiter et Vanzin 2001). Les profils individuels obtenus pour chaque métabolite (exprimés sur la base de la MF) indiquent que lorsque la teneur en G1P diminue, celle d'amidon diminue aussi chez le poivron, alors que la teneur de l'amidon demeure très faible et constante tout au long du développement de l'aubergine. Ces résultats suggèrent que des concentrations élevées de G1P ne sont pas associées à la synthèse d'amidon pour les stades précoces mais plutôt à la synthèse de parois ou d'ascorbate. Une augmentation puis une diminution de la teneur en G1P concomitantes à celle de l'amidon sont observées chez le poivron au moment du changement de couleur du fruit. Ces résultats concordent avec une précédente étude qui observait les mêmes évolutions pour l'amidon (Nielsen et al. 1991). Lors de la phase de maturation chez le poivron, le G1P semble associé à la synthèse de l'amidon, alors que le contraire a été observé chez la tomate (Biais et al. 2014). De plus, chez le poivron la corrélation entre G1P et amidon est forte (R=0,86 et P<0,01 pour les concentrations exprimées par MF), et les vitesses d'accumulation du G1P et de l'amidon atteignent leur maximum en même temps. Chez la tomate (Biais et al. 2014), la dégradation massive et rapide de l'amidon au début du mûrissement se traduit par une augmentation sensible de la teneur G1P et dans une moindre mesure de celles du G6P et F6P. Il a été suggéré que la dégradation de l'amidon via le maltose conduit au G1P (Zeeman et al. 2007), constituant donc une alternative pour la synthèse d'hexoses phosphates utilisés par la

glycolyse. En effet chez la tomate, les capacités de la GK et de la FK sont très faibles au cours de la maturation, alors que les autres enzymes de la glycolyse de même que les isomérases qui permettent les interconversions entre hexoses-phosphates (PGI et PGM) ont des capacités encore relativement élevées (Biais et al. 2014). Dans notre cas, les teneurs en G6P et F6P (exprimées sur la base du fruit) sont maintenues jusqu'au stade « breaker » pour le poivron alors que les capacités de HK et FK sont diminuées depuis 20 JAA. Bien qu'une dégradation d'amidon chez le poivron soit observée, elle ne s'accompagne pas d'une augmentation des teneurs en hexose-phosphates. Il faut cependant noter que la quantité d'amidon accumulée chez le poivron est bien plus faible que chez la tomate et que sa dégradation ne se fait qu'après le changement de couleur du fruit. Pour l'aubergine, les quantités par fruit en G1P, G6P, et F6P augmentent jusqu'au début de la maturation (30 JAA) puis diminuent suggérant alors une diminution de l'activité glycolytique lors de la phase de maturation. Pour l'aubergine et le poivron, le métabolisme de l'amidon n'est pas crucial pour l'import d'assimilats dans le fruit comme pour la tomate (Biais et al. 2014), car l'amidon ne présente jamais de forte accumulation qui pourrait alors servir de puits de réserves carbonées. Une faible accumulation d'amidon est également observée chez d'autres fruits non climactériques comme la fraise (Moing et al. 2001), ou encore le raisin où il a été suggéré que la diminution de la teneur en amidon ne résultait pas d'une limitation en substrat mais plutôt d'une diminution des activités enzymatiques impliquées dans sa synthèse (Dai et al. 2013).

D'après les ACP, le Suc6P est également présent en forte teneur dans les ovaires des deux Solanacées mais semble également présent dans le fruit mûr du poivron. Le Suc6P est hydrolysé en saccharose par la saccharose-phosphate phosphatase (SPP) (Chen et al. 2005). Dans une étude sur les feuilles de tabac (Chen et al. 2005), des plants transgéniques avec des niveaux réduits de SPP montraient une accumulation accrue d'amidon et de maltose et une baisse des teneurs en hexoses et saccharose dans les feuilles De plus, en parallèle de l'augmentation de teneur en Suc6P, les hexoses phosphates présentaient des teneurs moindres suggérant qu'aucun autre mécanisme d'exportation du carbone chez les feuilles n'est impliqué. Chez le raisin (Dai et al. 2013), la teneur de Suc6P augmente de la véraison à la maturité, ce qui indique qu'une biosynthèse de saccharose se produirait dans les baies en développement malgré le fait que celui-ci est abondamment importé à partir du phloème. Cela pourrait également indiquer que le cycle du sucrose ralentit (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001). Dans notre étude, lorsque le Suc6P est exprimé par fruit on note qu'il augmente puis se stabilise entre 40 et 59 JAA chez l'aubergine, de la même façon que les hexoses. Pour le poivron, le Suc6P continue de s'accumuler entre 20 et 76 JAA, là encore comme les hexoses. Dans les deux cas, l'intermédiaire Suc6P présente le même profil d'accumulation dans le fruit que les hexoses. De plus, la corrélation entre les teneurs de Suc6P et de saccharose (exprimées sur la base de MF) est forte (R=0,85) et significative (P<0,01) chez l'aubergine. Chez le poivron, le Suc6P est fortement corrélé (R=0,96, P<0,001) à l'amidon. De plus, la quantité de Suc6P, exprimée par fruit, augmente lorsque celle d'amidon diminue lors du changement de couleur du fruit. On suppose alors que la teneur de Suc6P augmente lorsque la demande en carbone est réduite reflétant ainsi un ralentissement du ou des cycle(s) du saccharose. Ce cycle futile peut être vu comme une soupape (Nguyen-Quoc et Foyer 2001) participant au contrôle du métabolisme en synthétisant des composés non structuraux comme le saccharose pour stockage ou le dégradant pour le réinjecter dans le cycle. En effet de faibles accumulations d'amidon et de saccharose sont observées dans notre étude chez le poivron au moment du stade « breaker ».



3. Régulation du métabolisme primaire chez les Solanacées



Analyse de classification hiérarchique réalisée sur les z-scores des moyennes (n=3) par stade des capacités enzymatiques exprimées en nmol.min⁻¹.g⁻¹ MS avec comme distances les corrélations de Pearson. Les colonnes correspondent aux 9 stades de développement et les lignes correspondent aux 19 capacités enzymatiques mesurées. Les groupes principaux sont différenciés par un cadre de couleur à droite avec les activités élevées aux stades précoces en vert, aux stades en croissance exponentielle en jaune, celles élevées aux stades de maturation en orange et celle élevée à maturité en rouge. Pour chaque enzyme la couleur jaune correspond aux valeurs de capacités les plus fortes et la couleur bleue aux plus faibles. Conversion et graphique réalisés d'après les données de Biais *et al.* (2014)

La comparaison des profils enzymatiques obtenus pour les fruits des trois Solanacées tomate (Biais *et al.* 2014), poivron et aubergine nous éclaire sur plusieurs points. Premièrement, chez les trois espèces la majorité des capacités enzymatiques mesurées sont maximales pendant les stades précoces et la phase de croissance exponentielle. Deuxièmement, quelques capacités enzymatiques augmentent ou ré-augmentent au moment de la maturation chez la tomate et dans une moindre mesure chez l'aubergine, ce qui suggère une reprogrammation de l'activome lors de cette phase pour l'aubergine, mais pas pour le poivron. Troisièmement, seule la vague initiale est observée chez le poivron. Alors qu'il existe peu de travaux décrivant

l'activome du fruit aux premiers stades de son développement, la reprogrammation associée à la maturation est retrouvée chez d'autres espèces. Ainsi, chez le kiwi les activités de la SPS et des invertases acides et neutres (exprimées sur base de MF) augmentent lors de la maturation du fruit (Nardozza *et al.* 2013). De la même manière, chez la fraise, certaines enzymes comme la PK (exprimée sur la base des protéines) augmentent au cours de la maturation (Basson *et al.* 2010). Un maintien de l'activité des invertases (exprimée sur la base des protéines) est observé dans la pêche (Lombardo *et al.* 2011) et les niveaux de transcription de l'enzyme malique augmentent pendant la maturation des baies de raisin (Wang *et al.* 2017).

a. Régulation du métabolisme des sucres lors du développement des Solanacées

Chez le poivron, les ovaires et les stades précoces du fruit sont caractérisés par de faibles teneurs exprimées sur la base de la MF en hexoses et par une teneur en saccharose élevée mais qui chute rapidement. Au même moment, les invertases acide et neutre restent constantes avec une valeur de capacité

intermédiaire. Vers 9 JAA, alors que le RGR est fort, une première augmentation de la teneur en hexoses est enregistrée, alors que celle en saccharose reste faible. Vers 20 à 40 JAA, lorsque le RGR diminue, un plateau est atteint pour la teneur en hexoses. A l'inverse, les capacités des invertases atteignent leur maximum à 9 JAA puis diminuent rapidement jusqu'à 40 JAA. Enfin, les hexoses recommencent à s'accumuler à partir de 40 JAA et les capacités des invertases augmentent de manière progressive, la teneur en saccharose augmente également jusqu'au stade « breaker » (63 JAA) avant de diminuer à nouveau. Ces résultats ont également été observés dans une précédente étude mais les ovaires n'avaient alors pas été mesurés (Nielsen et al. 1991). De la même manière nous retrouvons une forte corrélation positive et significative (R=0,87, R=0,76, P<0,05) entre le RGR et la capacité de l'invertase acide mais pas celle de l'invertase neutre. Nos résultats suggèrent que la première accumulation d'hexoses, qui est concomitante à l'augmentation des capacités de l'AI et de la NI à la première diminution de la teneur en saccharose, est majoritairement due à ces deux enzymes. Ainsi les invertases pourraient jouer un rôle essentiel dans la croissance. La seconde augmentation de la teneur en hexoses est à nouveau concomitante avec une augmentation des capacités des invertases bien que de plus faible amplitude. Il a été proposé que chez le poivron la SUSY dégrade le saccharose en hexoses car elle montrait une activité supérieure à celle des invertases lors de la phase de maturation (Nielsen et al. 1991). Nous suggérons que les invertases sont les principales enzymes de clivage du saccharose pour les stades précoces et qu'elles continuent de participer à ce clivage lors de la maturation.

Pour l'aubergine, la teneur en hexoses augmente jusque 20 JAA puis se stabilise alors que la teneur en saccharose et l'activité de l'invertase acide diminuent de manière progressive tout au long du développement. Celle de l'invertase neutre reste faible et constante jusqu'au début de la maturation puis diminue jusqu'à 40 JAA avant d'augmenter à nouveau. De la même manière, sur la base des quantités par fruit, les hexoses s'accumulent jusqu'à un plateau vers 30 JAA et le saccharose s'accumule jusque 30 JAA avant d'être métabolisé et de se stabiliser lors de la maturation du fruit. L'invertase acide exprimée sur la base de la MS présente quant à elle une capacité élevée en amont de la maturation. Ces résultats suggèrent que l'invertase acide est la principale enzyme de clivage du saccharose au début du développement chez l'aubergine. De plus, une étude réalisée sur le développement de l'ovaire a montré que l'activité de l'invertase acide soluble était beaucoup plus élevée que celle liée aux parois (Lee *et al.* 1997). En outre, les activités de l'invertase acide et de la SPS augmentaient pendant la nouaison du fruit alors que celle de la SUSY restait faible (Lee *et al.* 1997).

A l'inverse, pour la tomate, la SUSY a été proposée comme enzyme dominante dans le métabolisme du saccharose dans les premières phases de développement du fruit en fournissant également de l'UDPG pour des réactions biosynthétiques (Wang *et al.* 1993). Néanmoins, chez la tomate une forte augmentation des capacités des invertases a également été observée lors de la maturation du fruit (Figure 47) (Biais *et al.* 2014). Elle a également été proposée comme étant une enzyme critique pour l'accumulation des hexoses dans le fruit mûr de tomate (Yelle *et al.* 1988, 1991).

Notre étude a montré que la rapide accumulation d'hexoses dans le fruit observée juste après la pollinisation se retrouve chez les différentes espèces. Il est probable que cette accumulation participe à la croissance du fruit étant donné que les hexoses participent de façon non négligeable au potentiel osmotique car ils sont les métabolites les plus abondants dans le péricarpe au moment de la croissance (Biais *et al.* 2014). Leur accumulation dans la cellule pourrait permettre une entrée d'eau qui exercera une pression dite de turgescence sur les parois (Braidwood *et al.* 2014). Nos résultats suggèrent que cette accumulation pourrait être liée à l'augmentation des capacités des invertases.

b. Régulation des étapes finale de la glycolyse chez les Solanacées au cours du développement

D'après nos résultats obtenus avec les deux Solanacées, l'ovaire et les stades précoces présentent les capacités maximales (exprimées sur la base de la MS) de PK, PEPC, PGK et NADP-IDH, des enzymes qui sont au cœur de la fabrication de la biomasse car elles sont coordonnées pour alimenter continuellement le cycle de Krebs en carbone (Figure 47). Comme pour la tomate (Biais *et al.* 2014) sur la même base de MS, la PGK et la PK sont retrouvées avec des capacités plus élevées pour les stades en division cellulaire chez l'aubergine et le poivron, ainsi que la PEPC pour les stades précoces d'expansion cellulaire. En revanche, la NADP-IDH présente des capacités plus élevées pour les stades de maturation. Cependant l'étude réalisée chez la tomate ne comprenait pas l'ovaire.

Pour la tomate, lors des stades précoces de croissance du fruit, les enzymes impliquées dans la partie centrale de la glycolyse (NAD-GAPDH, PGK, énolase et PEPC) présentent de fortes capacités (Biais *et al.* 2014). Il a été suggéré que ces enzymes, fortement corrélées entre elles, agissent ensemble pour ajuster le niveau d'OAA disponible pour le cycle de Krebs. De

plus, un processus anaplérotique a été proposé pour compenser la perte de carbone engendrée par les synthèses nécessaires à l'expansion cellulaire en particulier l'accumulation des acides organiques et des acides aminés pour fournir l'impulsion osmotique. Nos résultats mettent également en évidence de fortes corrélations (R>0,94, R>0,89) entre PEPC, PGK, PK et NADP-IDH pour l'aubergine et le poivron appuyant ainsi l'hypothèse de la coordination de ces enzymes. De plus, chez la tomate cultivée (Steinhauser *et al.* 2010) une diminution générale de l'activité des enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs a été observée durant le développement du fruit, et notamment une très forte diminution de celle de la PEPC qui est nécessaire à la synthèse du malate. Chez la tomate sauvage S. *pennelli*, les activités des enzymes du cycle de Krebs ont de manière générale augmenté dans les derniers stades de développement (Steinhauser *et al.* 2010). Ces différences de profils enzymatiques entre tomates sauvage et cultivée pourraient expliquer les différences de composition des fruits y compris les teneurs plus élevées d'acides organiques, comme le malate, chez S. *pennelli*.

Il a été suggéré que la NADP-IDH est impliquée dans le catabolisme du citrate ainsi que dans la synthèse des acides aminés et des protéines (Sadka *et al.* 2000). En effet, cette enzyme localisée dans le cytosol et dans la mitochondrie est considérée comme principal fournisseur du 2OG, précurseur du glutamate (Sweetlove *et al.* 2010). Nous observons de fortes corrélations positives et significatives (*P*<0,001) chez l'aubergine (R=0,95) et le poivron (R=0,93), entre la capacité de cette enzyme et la quantité de glutamate exprimée par MF. Chez la tomate, l'accumulation massive de la teneur en glutamate observée au moment de la maturation du fruit fait écho à une augmentation de la capacité de la NADP-IDH (Biais *et al.* 2014). En revanche, pendant la maturation du poivron et de l'aubergine cette activité n'augmente pas et la teneur en glutamate demeure faible. Cette enzyme serait également impliquée dans le métabolisme des acides organiques en convertissant le citrate en 2-OG (Gallardo *et al.* 1995). Chez les agrumes, elle augmente également au cours du développement et particulièrement lors de la maturation du fruit, au moment où la teneur en citrate décline dans le fruit (Sadka *et al.* 2000) suggérant un rôle dans le catabolisme du citrate.

c. Métabolisme turbo pendant la phase de croissance exponentielle

Lors de la croissance exponentielle, les enzymes qui atteignent leur pic d'activité à la fois chez l'aubergine et le poivron sont la GK, la FK, la NAD-GAPDH, l'aldolase, la NADP-MDH et la NI. Chez la tomate (Biais *et al.* 2014), les capacités enzymatiques de NAD-GAPDH, GK et FK sont particulièrement élevées aux stades les plus jeunes auxquels on observe également une teneur élevée de G6P. Il a été suggéré que les cellules en division utilisait un métabolisme turbo pour assurer un flux glycolytique élevé (Teusink *et al.* 1998). Le métabolisme turbo consiste à augmenter la concentration en hexoses-P et réduire le rapport ATP/ADP via une forte augmentation des activités FK et/ou GK, ce qui résulte en une augmentation du flux glycolytique. Ceci était en accord avec une autre étude menée avec des disques de péricarpe qui montrait que le flux glycolytique était le plus élevé chez les jeunes fruits (Carrari *et al.* 2006). Pour l'aubergine et le poivron, les activités de GK et FK présentent des valeurs accrues

lors de la phase de croissance exponentielle, au cours de laquelle les divisions cellulaires ont vraisemblablement diminué, les cellules étant alors en pleine expansion. D'après les ACP les capacités les plus élevées en GK et FK sont associées aux plus fortes teneurs en G6P et F6P, en particulier chez le poivron. De plus, chez le poivron, les capacités de la GK et la FK sont fortement positivement corrélées (R>0,90 ; R>0,93 ; P<0,01) avec les teneurs en G6P et F6P. On notera que contrairement à la tomate, les capacités élevées de GK et FK et les fortes teneurs en hexoses phosphates ne peuvent pas être reliées à l'accumulation d'amidon qui survient lors de l'expansion cellulaire (Carrari et Fernie, 2006). Cette stratégie turbo a été décrite dans d'autres systèmes biologiques, notamment des microorganismes (Teusink *et al.* 1998; Bakker *et al.* 2000).

Les trois Solanacées semblent donc utiliser la même stratégie pour parvenir à une croissance rapide. Les travaux réalisés avec le poivron et l'aubergine suggèrent que c'est l'expansion et non la division cellulaire qui est la plus énergivore.

d. Différenciation de la régulation du métabolisme par la maturation

Parmi les différences entre le poivron et l'aubergine observées au cours de la maturation, les capacités de la CS, de l'ATP-PFK et de l'UGPase augmentent chez l'aubergine mais, à l'instar de toutes les capacités mesurées, diminuent chez le poivron. Ceci pourrait s'expliquer, du moins en partie, par le fait que contrairement au poivron l'aubergine commence sa maturation avant de finir sa croissance. Ainsi, il a été rapporté que chez S. pennellii, une tomate sauvage, la plupart des capacités enzymatiques, dont celles de SUSY, PGM, SPS, ATP-PFK et quelques enzymes du cycle de Krebs, sont stables voire augmentent au cours du développement du fruit (Steinhauser et al. 2010). Il a été proposé que le maintien de ces activités reflète le maintien de la croissance du fruit jusqu'à maturité. Cette hypothèse est également appuyée par le fait que les flux glycolytiques chez la tomate étaient maintenus jusqu'à 49 JAA (Carrari et al. 2006). Par ailleurs, l'absence de reprogrammation enzymatique au moment de la maturation du fruit de S. pennellii pourrait être liée à l'absence de crise climactérique chez cette espèce. On est alors tenté de voir la reprogrammation, certes peu spectaculaire de l'activome de l'aubergine, comme résultant de son caractère faiblement climactérique. En effet, dans la littérature, l'aubergine produit un peu d'éthylène au début de son développement (Rodriguez et al. 1999) mais les mesures n'ont pas été réalisées jusqu'à la maturité physiologique. Cette vue est renforcée par l'évolution de la NADP-ME.

e. NADP-ME une enzyme catabolique chez l'aubergine

La capacité de la NADP-ME augmente assez nettement lors de la maturation du fruit chez l'aubergine. De plus cette augmentation est précédée d'une forte activité des citrate synthases, et s'accompagne d'une augmentation de la teneur du citrate et d'une baisse de celle du malate lors de la maturation du fruit. L'enzyme malique catalyse la décarboxylation réductrice du malate en pyruvate, ce qui permet d'introduire du carbone provenant du malate dans le cycle de Krebs sans qu'il soit nécessaire de produire du pyruvate par la glycolyse (Sweetman et al. 2009; Sweetlove et al. 2010). Notre hypothèse est donc que chez l'aubergine la NADP-ME est utilisée pour remobiliser le malate, acide organique majeur de l'aubergine, afin de libérer de l'énergie nécessaire (via la phosphorylation oxydative du NADPH formé) aux ajustements métaboliques liés au mûrissement et au profit du citrate. Ainsi, chez la fraise (Aharoni et O'Connell, 2002), il a été proposé que l'augmentation des niveaux de transcription du gène codant l'enzyme malique pouvait entraîner la diminution de l'acidité du fruit pendant la maturation. Le métabolisme du pyruvate pourrait également générer un large éventail d'autres métabolites importants pour la maturation du fruit, tels que la méthionine, l'alanine, et la valine. Cette hypothèse est appuyée par une autre étude menée chez la tomate et la baie de raisin qui a montré que la NADP-ME participe à la respiration pendant la maturation, en fournissant du pyruvate et du NADPH comme substrats (Drincovich et al. 2001). Chez la pêche (Lombardo et al. 2011), il a été rapporté que la NADP-ME et la PEPCK pourraient être impliquées dans le catabolisme des acides organiques et ainsi empêcher l'accumulation du malate. Les capacités des enzymes maliques ont également augmenté pendant la maturation des baies de raisin, ce qui pourrait contribuer au déclin de la concentration de malate après la véraison (Deluc et al. 2007; Wang et al. 2017).

D'après nos derniers résultats, nous concluons que le poivron, fruit non climactérique, possède deux vagues de synthèse de protéines enzymatiques, au moment de l'accélération de la croissance et lors de la phase exponentielle, alors que la tomate, fruit climactérique, présente trois vagues distinctes avec une resynthèse de certaines enzymes comme les invertases, la citrate synthase et la NADP-IDH lors de la maturation du fruit. Enfin, l'aubergine aurait un comportement intermédiaire par la reprogrammation plus discrète de son métabolisme lors des derniers stades de maturation. Il sera sans doute pertinent de mesurer davantage d'activités enzymatiques voire d'utiliser une approche de protéomique pour rechercher d'autres enzymes reprogrammées pendant la maturation.

Chapitre V : Conclusions et Perspectives



Ces travaux étaient focalisés sur le métabolisme primaire du fruit car c'est lui qui fournit les briques et l'énergie nécessaires à la croissance et au développement, mais également les métabolites qui confèrent ses valeurs gustatives au fruit tels que les sucres et les acides organiques.

Le métabolisme primaire a été étudié chez huit espèces de fruits charnus qui diffèrent en termes de durée de développement, de taille du fruit, de famille botanique, de qualité gustative, et sont sujettes ou non à une crise respiratoire en début de maturation. Des données physiologiques et biochimiques ont été collectées tout au long du développement du fruit, de l'anthèse à la maturité physiologique. Afin d'améliorer la comparaison entre espèces, la croissance des fruits a été modélisée pour standardiser les stades de développement. La composition de la biomasse de la chair a été caractérisée qualitativement et quantitativement par des approches analytiques ciblées et des profils métabolomiques non-ciblés, mettant en évidence des similitudes et des différences de composition et d'évolution au cours du développement entre des espèces de fruits.

Ces images de la composition montrent dès à présent le rôle de certaines voies métaboliques ou de certains groupes de composés. Ainsi les protéines, la paroi cellulaire et les acides gras expliquent la croissance rapide des fruits ou encore la différence entre espèces climactériques et non climactériques voire entre herbacées et ligneuses. Grâce à des modèles linéaires généralisés combinant la composition et les données de croissance nous avons mis à jour un lien étroit entre les teneurs en protéines et certains monomères des parois cellulaires d'une part et le taux relatif de croissance d'autre part, suggérant que ces composés sont des acteurs incontournables de la croissance. Une étude sur la tomate a montré que les protéines enzymatiques du métabolisme central sont abondantes (Belouah 2017). La teneur en protéines plus élevée chez les fruits des espèces herbacées suggère donc que produire plus de catalyseurs conduit à des vitesses de croissance plus élevées.

De manière inattendue, en plus de l'amidon qui est un polymère facilement remobilisable, des composés structuraux (polysaccharides pariétaux et lipides), des protéines et l'ascorbate oxydé permettent de distinguer les fruits climactériques des non climactériques. D'une part, cela suggère qu'un processus de dégradation de certains composés des parois va être nécessaire pour soutenir la maturation du fruit lorsque la réserve d'amidon ne sera plus suffisante. D'autre part les concentrations en ascorbate oxydé observées chez les fruits non climactériques en croissance indique un flux plus important de réactions entre l'ascorbate réduit et les ROS. Cette différence suggère que la synthèse d'amidon et d'autres polymères (parois) constitue un puit énergétique capables de minimiser la production de ROS.

Ces premières constations devrons être appuyée par l'étude d'un plus grand nombre d'espèces pour conforter nos premières hypothèses.

Pour les deux Solanacées, des vitesses d'accumulation par fruit ont été calculées pour se rapprocher des flux nets de certains composés majeurs ou d'ensemble de composés. Ces données nous ont d'ores et déjà permis de mettre en lumière des similitudes et des différences entre les trois Solanacées notamment la mise en place d'un métabolisme turbo pour soutenir leur croissance. En effet, l'association de la FK et GK avec les concentrations élevées en G6P et F6P lors de la phase de croissance exponentielle chez l'aubergine et le poivron appuie cette hypothèse. Nous avons également démontré que des modules d'enzymes pouvaient être associés à différentes phases de développement chez les Solanacées, comme la PEPC, la PGK et la PK, des enzymes au cœur de la fabrication de la biomasse, associées aux stades précoces. Les différences observées concernent d'une part les invertases qui ne semblent pas jouer le même rôle au même stade de développement chez les Solanacées. En effet, elles semblent associées aux stades en croissance exponentielle pour les fruits non climactériques suggérant qu'elles pourraient jouer un rôle essentiel dans celleci alors que chez la tomate c'est lors de la maturation qu'elles entrent en jeu. D'autre part, la NADP-ME qui augmente lors de la maturation de l'aubergine semble agir comme une enzyme catabolique au moment du mûrissement. L'augmentation de la capacité de la NADP-ME associée à celles de CS démontre une certaine reprogrammation du métabolisme chez l'aubergine lors du mûrissement comme cela est observé alors chez la tomate, la plaçant ainsi entre une espèce climactérique et une non climactérique.

Les données de composition de la biomasse obtenues au cours de ce travail pourront rapidement être utilisées pour estimer les flux métaboliques par des approches de modélisation sous contrainte (Salon et al. 2017). Ces flux sont en effet particulièrement difficiles à mesurer chez les fruits à l'aide de marquages isotopiques, notamment à cause du stockage vacuolaire. Jusqu'à présent seuls des marquages in vitro de cultures cellulaires ou de lamelles de péricarpe de fruit de tomate ont pu être réalisés (Rontein et al. 2002). La composition détaillée de la biomasse servira pour la modélisation stæchiométrique comme cela a été fait pour la tomate (Colombié et al. 2015). Pour chaque espèce, les concentrations des principaux composants de la biomasse et des métabolites accumulés dans la chair du fruit seront utilisées afin de calculer par dérivation les flux externes correspondants. Pour limiter l'espace des flux, elles seront utilisées comme contraintes pour résoudre le modèle en choisissant une fonction objectif comme par exemple un critère de minimisation des flux internes. Ce modèle permettra de générer un espace de solutions pour les distributions de flux à l'état stable. Il pourrait également permettre l'optimisation de la production de certaines molécules d'intérêt pour améliorer la qualité ou le rendement des cultures. Une description plus détaillée des métabolites majeurs mais aussi des intermédiaires du métabolisme et de capacités enzymatiques a été réalisée sur le poivron et l'aubergine. Ces données plus détaillées de composition en métabolites et d'activités enzymatiques seront utilisées pour la modélisation cinétique du métabolisme central du fruit (Beauvoit et al. 2014). Cette modélisation basée sur les activités enzymatiques formalise l'ensemble d'équations décrivant les réactions d'un réseau métabolique. Comme pour la modélisation stœchiométrique, les données décrivant la biomasse (métabolites accumulés, parois, protéines, lipides...) permettront de contraindre les flux de sortie du modèle. Ensuite, les capacités des enzymes permettront de paramétrer le modèle et les concentrations des intermédiaires du métabolisme serviront à l'ajustement de paramètres du modèle inconnus ainsi que pour la validation du modèle (Dai *et al.* 2013; Beauvoit *et al.* 2018). Par la suite, ce modèle permettra notamment d'estimer les coefficients de contrôle des enzymes (Kacser *et al.* 1995), ce qui pourra conduire à la sélection d'enzymes candidates à la manipulation dans le but de modifier le métabolisme. Un modèle cinétique récemment adapté à la pêche (Desnoues *et al.* 2018) a ainsi fourni des informations sur les mécanismes qui sous-tendent des différences phénotypiques, proposant notamment la forte affinité de la fructokinase pour son substrat (le fructose) comme étant responsable du phénotype à faible rapport fructoseglucose chez une variété sauvage.

La caractérisation du métabolisme d'une espèce fruitière ou la comparaison de plusieurs types de fruits devrait également permettre de moduler la qualité des fruits dans le cadre **d'applications d'amélioration variétale ou de pratiques agronomiques** grâce à la modélisation intégrative des données métaboliques et des variables environnementales (Beauvoit *et al.* 2018).

La comparaison des données obtenues pour les deux Solanacées avec des données disponibles chez la tomate montre qu'au sein d'une même famille botanique la régulation du métabolisme diffère au cours du développement du fruit, notamment au niveau du métabolisme des sucres et de la glycolyse. Il semble donc important de ne pas se limiter à une espèce modèle de fruit. Notre étude était focalisée sur le métabolome et l'activome. D'autres approches omiques pourraient s'intégrer dans cette approche de biologie intégrative menée avec plusieurs espèces de fruits. Les profils métabolomiques pourraient être complétés par la quantification des métabolites spécialisés comme certains glycoalcaloïdes majeurs de l'aubergine ; l' α -solasonine et l' α -solamargine (Sánchez-Mata *et al.* 2010), ou encore par la quantification des composés phénoliques comme cela avait déjà été fait sur la tomate (Gómez-Romero et al. 2010) ou l'aubergine (García-Salas et al. 2014). Les quantifications de métabolites spécialisés pourraient être réalisées au cours du développement du poivron et de l'aubergine. La métabolomique quantitative, en utilisant des standards marqués au C¹³ comme fait pour les métabolites primaires (Li et al. 2014), pourrait être utilisée pour la quantification de certains métabolites spécialisés par LC-MS. Une quantification parallèle des métabolites primaires et spécialisés permettra d'étudier les interactions entre ces deux métabolismes et leur « trade offs » possibles (Caretto et al. 2015). Des profils hormonaux seraient également intéressants pour étudier la co-régulation des voies hormonales et du métabolisme primaire comme fait par exemple sur un fruit autre que le fruit « modèle » tomate, la poire (Oikawa et al. 2015). Comme les éléments minéraux peuvent être des inhibiteurs ou des activateurs d'enzymes ou jouer un rôle dans une cascade complexe de régulation, la quantification de l'ensemble des éléments minéraux (approche ionomique) serait intéressante, comme réalisé sur le fruit de melon (Moing et al. 2011). Dans un premier temps, la quantification des macroéléments devra être réalisée pour estimer leur contribution à la biomasse et au potentiel osmotique.

Pour élargir le nombre d'enzymes étudiées, une **approche protéomique** semble pertinente, à condition qu'elle soit quantitative. Ainsi une approche de protéomique « shotgun » a été réalisée sur le fruit de tomate en se basant sur la modélisation de l'intensité des peptides (Belouah 2017; Belouah *et al.* 2018). Ces données de protéomique viennent compléter le jeu de données de capacités enzymatiques qui avait déjà été obtenu pour des enzymes du métabolisme des sucres, de la glycolyse ou du cycle de Krebs. Ces travaux ont montré que la plupart des capacités enzymatiques sont bien corrélées avec les concentrations estimées grâce à la protéomique, ce qui permet d'envisager une approche protéomique pour élargir le nombre d'enzymes. La protéomique quantitative a déjà été utilisée dans plusieurs études, notamment chez la poire (Reuscher *et al.* 2016) où des processus biologiques ont été caractérisés à différents stades de développement, notamment l'implication de transporteurs dans l'accumulation des sucres. Des études similaires existent également sur la pomme (M Li *et al.* 2016) et le raisin (Wang *et al.* 2017) au cours de leur développement..

L'intégration de **profils transcriptionnels** avec des profils protéomiques et métabolomiques permettra de rechercher des gènes potentiellement impliqués dans la régulation du métabolisme dont des facteurs de transcription, comme montré sur la tomate pour le métabolisme primaire (Bastías *et al.* 2014). La reconstruction de modèles métaboliques à partir du génome, pourrait également être appliquée au fruit comme cela a été fait avec la feuille de tomate (Yuan *et al.* 2016) ou encore une algue brune (Prigent *et al.* 2014). Cela permettrait d'étudier la distribution des flux au cours du développement et donc de mieux comprendre l'évolution de la composition de la biomasse au cours du temps. En passant à une échelle génomique de tels modèles permettraient d'intégrer un ensemble de données métabolomiques et donc de ne pas se limiter à l'étude du métabolisme primaire.

A côté des approches omiques, une **approche cytologique** plus fine permettrait de caractériser plus finement la croissance des tissus. Une première analyse cytologique a été réalisée sur deux espèces. Cette analyse a montré de grandes différences entre l'aubergine, le poivron et la tomate au niveau du volume des cellules ainsi que des proportions subcellulaires. La combinaison de ces données laisse supposer un classement sur le caractère plus ou moins charnus des fruits. Ces résultats suggèrent également que la mise en place de la vacuole, qui se fait en parallèle de celle du cytoplasme, plus particulièrement chez l'aubergine, ne nécessite pas un RGR élevé. Il serait alors intéressant de modéliser cette croissance de vacuole chez les trois Solanacées afin de déterminer le besoin énergétique pour sa mise en place. Cette analyse pourrait également être utilisée pour une caractérisation précise des phases de croissance du fruit (division et expansion cellulaire).

Pour poursuivre l'étude du rôle de la vacuole dans la croissance des tissus du fruit, la compartimentation cellulaire pourrait être abordée. La mesure de la présence ou de la concentration de certains métabolites dans chaque **compartiment subcellulaire** pourrait être réalisée à certains stades de développement choisis, à partir d'expériences de fractionnement subcellulaire (Tiessen 2002), à l'aide d'une approche RMN *in vivo* (Rolin *et al.* 2000), ou à l'aide d'imagerie RMN (Srivastava *et al.* 2018) ou MS (Dong *et al.* 2016) pour localiser voire quantifier

certains métabolites. Les **transporteurs membranaires** jouent probablement un rôle essentiel dans la compartimentation subcellulaire des métabolites, notamment ceux du tonoplaste (Martinoia 2018), comme montré par exemple à l'aide d'un modèle cinétique du métabolisme du saccharose par Beauvoit *et al.* (2014) chez la tomate. Ces auteurs ont associé l'accumulation élevée de sucres solubles et d'acides organiques dans la vacuole à l'expansion cellulaire. Le stockage vacuolaire est aussi critique pour l'accumulation puis la remobilisation des acides organiques, par exemple chez les citrus (Hussain *et al.* 2017).

Ces travaux ont élargi la compréhension du fonctionnement du métabolisme primaire au cours du développement des fruits. Ils suggèrent que vitesse de croissance et composition de la biomasse sont fortement liées. Ils revisitent le caractère climactérique des fruits, le positionnant en amont du déclenchement de la crise respiratoire en suggérant que l'amidon et la composition des parois sont des acteurs essentiels. Plus généralement, ils permettent de mieux comprendre le métabolisme primaire au cours du développement du fruit, suggérant entre autres que des modules enzymatiques sont associés aux étapes du développement du fruit. La comparaison d'espèces apparait donc comme une approche pertinente et prometteuse pour mieux comprendre le métabolisme des fruits.

Sites internet :

FAOSTAT, 2018 : http://www.fao.org/faostat/en/#home

USDA Food Composition Databases, 2018 : <u>https://ndb.nal.usda.gov/ndb/</u>

Vin & Société, 2017 : http://www.vinetsociete.fr

Biologie et Multimédia - Sorbonne Université - UFR des Sciences de la Vie, 2012 : <u>http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/index.htm</u>

Bibliographie

Acerenza L, Graña M. 2006. On the Origins of a Crowded Cytoplasm. *Journal of Molecular Evolution* 63: 583–590.

Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177–181.

Aharoni A, O'Connell A. 2002. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2073–2087.

Aizat WM, Dias DA, Stangoulis JCR, Able JA, Roessner U, Able AJ. 2014. Metabolomics of capsicum ripening reveals modification of the ethylene related-pathway and carbon metabolism. *Postharvest Biology and Technology* **89**: 19–31.

Albertini M-V, Carcouet E, Pailly O, Gambotti C, Luro F, Berti L. 2006. Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8335–8339.

Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, et al. 2007. Silencing of the Mitochondrial Ascorbate Synthesizing Enzyme L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase Affects Plant and Fruit Development in Tomato. *Plant Physiology* **145**: 1408–1422.

Ali K, Maltese F, Fortes AM, Pais MS, Choi YH, Verpoorte R. 2011. Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry* 124: 1760–1769.

Aune D, Giovannucci E, Boffetta P, et al. 2017. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Epidemiology* **46**: 1029–1056.

Azzi L, Deluche C, Gévaudant F, *et al.* 2015. Fruit growth-related genes in tomato. *Journal of Experimental Botany* 66: 1075–1086.

Badejo AA, Wada K, Gao Y, et al. 2012. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany* **63**: 229–239.

Bagyaraj DJ, Sreeramulu KR. 1982. Preinoculation with VA mycorrhiza improves growth and yield of chilli transplanted in the field and saves phosphatic fertilizer. *Plant and Soil* **69**: 375–381.

Bakker BM, Mensonides FIC, Teusink B, van Hoek P, Michels PAM, Westerhoff HV. 2000. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 2087–2092.

Barnavon L, Doco T, Terrier N, Ageorges A, Romieu C, Pellerin P. **2000**. Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 289–300.

Basson CE, Groenewald J-H, Kossmann J, Cronjé C, Bauer R. 2010. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. *Food Chemistry* **121**: 1156–1162.

Bastías A, Yañez M, Osorio S, et al. 2014. The transcription factor AREB1 regulates primary metabolic pathways in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2351–2363.

Bauchet G, Grenier S, Samson N, et al. 2017. Identification of major loci and genomic regions controlling acid and volatile content in tomato fruit: implications for flavor improvement. *New Phytologist* **215**: 624–641.

Beauvoit B, Belouah I, Bertin N, et al. 2018. Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. *Annals of Botany* **122**: 1–21.

Beauvoit BP, Colombie S, Monier A, et al. 2014. Model-Assisted Analysis of Sugar Metabolism throughout Tomato Fruit Development Reveals Enzyme and Carrier Properties in Relation to Vacuole Expansion. *The Plant Cell* **26**: 3224–3242.

Belouah I. 2017. Integrative study of the proteome throughout tomato fruit development.

Belouah I, Blein-Nicolas M, Balliau T, Gibon Y, Zivy M, Colombié S. **2018**. Peptide filtering differently affects the performances of XIC-based quantification methods. *Journal of Proteomics* **In Press**.

Bénard C, Gibon Y. 2016. Measurement of Enzyme Activities and Optimization of Continuous and Discontinuous Assays. *Current Protocols in Plant Biology* **1**: 247–262.

Ben-Arie R, Kislev N, Frenkel C. **1979**. Ultrastructural Changes in the Cell Walls of Ripening Apple and Pear Fruit. *Plant Physiology* **64**: 197–202.

Berman ME, DeJong TM. **1996**. Water stress and crop load effects on fruit fresh and dry weights in peach (*Prunus persica*). *Tree Physiology* **16**: 859–864.

Berman ME, Dejong TM. **2003**. Seasonal patterns of vegetative growth and competition with reproductive sinks in peach (*Prunus persica*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**: 303–309.

Bermejo A, Cano A. **2012**. Analysis of Nutritional Constituents in Twenty Citrus Cultivars from the Mediterranean Area at Different Stages of Ripening. *Food and Nutrition Sciences* **3**: 639–650.

Berüter J. 1985. Sugar Accumulation and Changes in the Activities of Related Enzymes during Development of the Apple Fruit. *Journal of Plant Physiology* **121**: 331–341.

Biais B, Bénard C, Beauvoit B, et al. 2014. Remarkable Reproducibility of Enzyme Activity Profiles in Tomato Fruits Grown under Contrasting Environments Provides a Roadmap for Studies of Fruit Metabolism. *Plant Physiology* **164**: 1204–1221.

Boo H, Kim H, Lee H. **2010**. Changes in Sugar Content and Sucrose Synthase Enzymes during Fruit Growth in Eggplant (*Solanum melongena* L.) Grown on Different Polyethylene Mulches. *HortScience* **45**: 775–777.

Boote KJ, Rybak MR, Scholberg JMS, Jones JW. **2012**. Improving the CROPGRO-Tomato Model for Predicting Growth and Yield Response to Temperature. *Horticultural Science* **47**: 1038–1049.

Boualem A, Fleurier S, Troadec C, et al. 2014. Development of a *Cucumis sativus* TILLinG Platform for Forward and Reverse Genetics (MA Blazquez, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e97963.

Bourdon M, Frangne N, Mathieu-Rivet E, et al. 2010. Endoreduplication and Growth of Fleshy Fruits In: Lüttge U, Beyschlag W, Büdel B, Francis D, eds. *Progress in Botany 71*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 101–132.

Bradford MM. **1976**. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.

Braidwood L, Breuer C, Sugimoto K. **2014**. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist* **201**: 388–402.

Brummell DA, Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **47**: 311–340.

Bulley S, Wright M, Rommens C, et al. 2012. Enhancing ascorbate in fruits and tubers through overexpression of the l-galactose pathway gene GDP-l-galactose phosphorylase: Enhanced ascorbate in fruits and tubers. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 390–397.

Bustan A, Goldschmidt EE, Erner Y. **1996**. Carbohydrate supply and demand during fruit development in relation to productivity of of grapefruit and "Murcott" mandarin. *Acta Horticulturae* **416**: 81–88.

Capitani D, Mannina L, Proietti N, et al. 2010. Monitoring of metabolic profiling and water status of Hayward kiwifruits by nuclear magnetic resonance *. *Talanta* **82**: 1826–1838.

Capitani D, Sobolev AP, Tomassini A, *et al.* **2013**. Peach Fruit: Metabolic Comparative Analysis of Two Varieties with Different Resistances to Insect Attacks by NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 1718–1726.

Caretto S, Linsalata V, Colella G, Mita G, Lattanzio V. **2015**. Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 26378–26394.

Carillo P, Gibon Y. 2016. PROTOCOL: Extraction and determination of proline.

Carpita NC, Ralph J, McCann MC. **2015**. The Cell Wall In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.45–110.

Carrari F, Baxter C, Usadel B, *et al.* **2006**. Integrated Analysis of Metabolite and Transcript Levels Reveals the Metabolic Shifts That Underlie Tomato Fruit Development and Highlight Regulatory Aspects of Metabolic Network Behavior. *Plant Physiology* **142**: 1380–1396.

Carrari F, Fernie AR. **2006**. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1883–1897.

Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LEP, Atares A, Garcia-Martinez JL. **2012**. Characterization of the procera Tomato Mutant Shows Novel Functions of the SIDELLA Protein in the Control of Flower Morphology, Cell Division and Expansion, and the Auxin-Signaling Pathway during Fruit-Set and Development. *Plant Physiology* **160**: 1581–1596.

Carrington SCM, King GRA. **2002**. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* DC. *Scientia Horticulturae* **92**: 1–7.

Causse M, Duffé P, Gomez MC, et al. 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1671–1685.

Cercós M, Soler G, Iglesias DJ, Gadea J, Forment J, Talón M. 2006. Global Analysis of Gene Expression During Development and Ripening of Citrus Fruit Flesh. A Proposed Mechanism for Citric Acid Utilization. *Plant Molecular Biology* **62**: 513–527.

Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Börnke F. **2005**. Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* **221**: 479–492.

Cheniclet C. 2005. Cell Expansion and Endoreduplication Show a Large Genetic Variability in Pericarp and Contribute Strongly to Tomato Fruit Growth. *Plant Physiology* **139**: 1984–1994.

Cherian S, Figueroa CR, Nair H. **2014**. 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a crossdissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4705–4722.

Cholet C, Claverol S, Claisse O, et al. 2016. Tartaric acid pathways in *Vitis vinifera* L. (cv. Ugni blanc): a comparative study of two vintages with contrasted climatic conditions. *BMC Plant Biology* **16**: 1–18.

Cocuron J-C, Alonso AP. **2014**. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Measuring 13C-labeling in Intermediates of the Glycolysis and Pentose Phosphate Pathway In: Methods in Molecular Biology. *Plant Metabolic Flux Analysis : Methods ans Protocols*. humuna Press, .

Colombié S, Beauvoit B, Nazaret C, et al. 2017. Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist* **213**: 1726–1739.

Colombié S, Nazaret C, Bénard C, et al. 2015. Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicon* (tomato) fruit. *The Plant Journal* **81**: 24–39.

Coombe BG. **1976**. The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology* **27**: 207–228.

Copetta A, Bardi L, Bertolone E, Berta G. **2011**. Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Biosystems* **145**: 106–115.

Cordenunsi BR, Lajolo FM. **1995**. Starch Breakdown during Banana Ripening: Sucrose Synthase and Sucrose Phosphate Synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 347–351.

Cronje PJR, Barry GH, Huysamer M. **2011**. Fruiting position during development of 'Nules Clementine' mandarin affects the concentration of K, Mg and Ca in the flavedo. *Scientia Horticulturae* **130**: 829–837.

Crookes PR, Grierson D. 1983. Ultrastructure of Tomato Fruit Ripening and the Role of Polygalacturonase Isoenzymes in Cell Wall Degradation. *Plant Physiology* **72**: 1088–1093.

Dai N, Cohen S, Portnoy V, et al. 2011. Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Molecular Biology* **76**: 1–18.

Dai ZW, Léon C, Feil R, Lunn JE, Delrot S, Gomès E. **2013**. Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1345–1355.

Davey JE, Van Staden J. 1978. Endogenous cytokinins in the fruits of ripening and non-ripening tomatoes. *Plant Science Letters* **11**: 359–364.

Davies JN, Kempton RJ. 1976. Some changes in the composition of the fruit of the glasshouse cucumber (*Cucumis sativus*) during growth, maturation and senescence. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **27**: 413–418.

Deborde C, Maucourt M, Baldet P, et al. 2009. Proton NMR quantitative profiling for quality assessment of greenhouse-grown tomato fruit. *Metabolomics* **5**: 183–198.

Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, et al. 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* **8**: 1–42.

Desnoues E, Baldazzi V, Génard M, et al. 2016. Dynamic QTLs for sugars and enzyme activities provide an overview of genetic control of sugar metabolism during peach fruit development. *Journal of Experimental Botany* **67**: 3419–3431.

Desnoues E, Génard M, Quilot-Turion B, Baldazzi V. **2018**. A kinetic model of sugar metabolism in peach fruit reveals a functional hypothesis of a markedly low fructose-to-glucose ratio phenotype. *The Plant Journal* **94**: 685–698.

Desnoues E, Gibon Y, Baldazzi V, Signoret V, Génard M, Quilot-Turion B. **2014**. Profiling sugar metabolism during fruit development in a peach progeny with different fructose-to-glucose ratios. *BMC Plant Biology* **14**: 1–13.

Dheilly E, Gall SL, Guillou M-C, et al. 2016. Cell wall dynamics during apple development and storage involves hemicellulose modifications and related expressed genes. *BMC Plant Biology* **16**: 1–20.

Domingo R, Ruiz-Sánchez MC, Sánchez-Blanco MJ, Torrecillas A. **1996**. Water relations, growth and yield of Fino lemon trees under regulated deficit irrigation. *Irrigation Science* **16**: 115–123.

Dong Y, Li B, Aharoni A. **2016**. More than Pictures: When MS Imaging Meets Histology. *Trends in Plant Science* **21**: 686–698.

Drake SR, Eisele TA. **1999**. Carbohydrate and Acid Contents of Gala Apples and Bartlett Pears from Regular and Controlled Atmosphere Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3181–3184.

Drincovich MF, Casati P, Andreo CS. **2001**. NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Letters* **490**: 1–6.

EI-Boray MS, Mostafa MFM, Salem SE, EI-Sawwah OAO. **2015**. Improving yield and fruit quality of Washington navel orange using foliar applications of some natural biostimulants. *J. Plant Production* **6**: 1317–1332.

Esteban RM, Molla E, Villarroya MB, Lopez-Andreu FJ. 1992. Changes in the chemical composition of eggplant fruits during development and ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**: 998–1000.

Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, *et al.* **2008**. Reconfiguration of the Achene and Receptacle Metabolic Networks during Strawberry Fruit Development. *Plant Physiology* **148**: 730–750.

Famiani F, Cultrera NGM, Battistelli A, et al. 2005. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2959–2969.

Fish WW, Bruton BD. **2010**. Quantification of L-citrulline and other physiologic amino acids in watermelon and various cucurbits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **10**: 152–154.

Fortes A, Teixeira R, Agudelo-Romero P. 2015. Complex Interplay of Hormonal Signals during Grape Berry Ripening. *Molecules* **20**: 9326–9343.

Fridman E, Pleban T, Zamir D. **2000**. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4718–4723.

Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. **2010**. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software* **33**.

Fu Q, Cheng L, Guo Y, Turgeon R. **2011**. Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiology* **157**: 1518–1527.

Gakière B, Fernie AR, Pétriacq P. 2018. More to NAD+ than meets the eye: A regulator of metabolic pools and gene expression in Arabidopsis. *Free Radical Biology and Medicine* **122**: 86–95.

Gallardo F, Galvez S, Gadal P, Canovas F. **1995**. Changes in NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening: Characterization of the predominant cytosolic enzyme from green and ripe pericarp. *Planta* **196**: 148–154.

Galpaz N, Gonda I, Shem-Tov D, et al. 2018. Deciphering genetic factors that determine melon fruitquality traits using RNA-Seq-based high-resolution QTL and eQTL mapping. *The Plant Journal* **94**: 169–191.

García-Salas P, Gómez-Caravaca AM, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. **2014**. Identification and quantification of phenolic compounds in diverse cultivars of eggplant grown in different seasons by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray-quadrupole-time of flight-mass spectrometry. *Food Research International* **57**: 114–122.

Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, et al. 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. **2005**. 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.

Geigenberger P, Fernie AR. **2014**. Metabolic Control of Redox and Redox Control of Metabolism in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**: 1389–1421.

Gest N, Gautier H, Stevens R. **2012**. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**: 33–53.

Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, et al. 2004. A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* **16**: 3304–3325.

Gilbert L, Alhagdow M, Nunes-Nesi A, et al. 2009. GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *The Plant Journal* **60**: 499–508.

Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. **1993**. Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant Cell* **5**: 1439–1451.

Gillespie KM, Ainsworth EA. **2007**. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols* **2**: 871–874.

Giovannoni J. **2001**. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 725–749.

Giovannoni J, Nguyen C, Ampofo B, Zhong S, Fei Z. **2017**. The Epigenome and Transcriptional Dynamics of Fruit Ripening. *Annual Review of Plant Biology* **68**: 61–84.

Given NK, Venis MA, Gierson D. **1988**. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a nonclimacteric fruit. *Planta* **174**: 402–406.

Gómez-Romero M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. **2010**. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* **71**: 1848–1864.

González M, Xu M, Esteras C, et al. 2011. Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Research Notes* **4**: 289.

Gross KC, Sams CE. **1984**. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* **23**: 2457–2461.

Gross KC, Wallner SJ. 1979. Degradation of Cell Wall Polysaccharides during Tomato Fruit Ripening. *Plant Physiology* **63**: 117–120.

Halinska A, Frenkel C. 1991. Acetaldehyde Stimulation of Net Gluconeogenic Carbon Movement from Applied Malic Acid in Tomato Fruit Pericarp Tissue. *Plant Physiology* **95**: 954–960.

Harrington P de B, Vieira NE, Espinoza J, Nien JK, Romero R, Yergey AL. 2005. Analysis of variance– principal component analysis: A soft tool for proteomic discovery. *Analytica Chimica Acta* 544: 118– 127.

Hawker JS. **1969**. Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* **8**: 9–17.

Hendriks JHM. **2003**. ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of Arabidopsis and Other Plant Species. *Plant Physiology* **133**: 838–849.

Hu L-P, Meng F-Z, Wang S-H, *et al.* 2009. Changes in carbohydrate levels and their metabolic enzymes in leaves, phloem sap and mesocarp during cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit development. *Scientia Horticulturae* **121**: 131–137.

Huang Y, Tang R, Cao Q, Bie Z. **2009**. Improving the fruit yield and quality of cucumber by grafting onto the salt tolerant rootstock under NaCl stress. *Scientia Horticulturae* **122**: 26–31.

Hussain SB, Shi C-Y, Guo L-X, Kamran HM, Sadka A, Liu Y-Z. 2017. Recent advances in the regulation of citric Acid Metabolism in Citrus Fruit. *Critical Reviews in Plant Sciences* 36: 241–256.

Ishihara H, Moraes TA, Pyl E-T, et al. 2017. Growth rate correlates negatively with protein turnover in Arabidopsis accessions. *The Plant Journal* **91**: 416–429.

Jablonowski ND, Kollmann T, Nabel M, et al. 2017. Valorization of Sida (*Sida hermaphrodita*) biomass for multiple energy purposes. *GCB Bioenergy* **9**: 202–214.

Jacob D, Deborde C, Lefebvre M, Maucourt M, Moing A. 2017. NMRProcFlow: a graphical and interactive tool dedicated to 1D spectra processing for NMR-based metabolomics. *Metabolomics* 13: 1–5.

Janick J. 2005. The Origins of Fruits, Fruit Growing, and Fruit Breeding In: *Plant Breeding Reviews*.5–320.

Jansen JJ, Smit S, Hoefsloot HCJ, Smilde AK. 2010. The photographer and the greenhouse: how to analyse plant metabolomics data. *Phytochemical Analysis* **21**: 48–60.

Jia D, Shen F, Wang Y, et al. 2018. Apple fruit acidity is genetically diversified by natural variations in three hierarchical epistatic genes: *MdSAUR37*, *MdPP2CH* and *MdALMTII*. *The Plant Journal* **95**: 427–443.

Jimenez A, Creissen G, Kular B, *et al.* 2002. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 214: 751–758.

Johnson RS, Handley DF. **2000**. Using Water Stress to Control Vegetative Growth and Productivity of Temperate Fruit Trees. *HortScience* **35**: 1048–1050.

Joldersma D, Liu Z. 2018. The making of virgin fruit: the molecular and genetic basis of parthenocarpy. *Journal of Experimental Botany* 69: 955–962.

de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH. **2009**. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SI* ARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal* **57**: 160–170.

de Jong M, Wolters-Arts M, García-Martínez JL, Mariani C, Vriezen WH. **2011**. The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. *Journal of Experimental Botany* **62**: 617–626.

Joshi V, Fernie AR. 2017. Citrulline metabolism in plants. Amino acids 49: 1543–1539.

Kacser H, Burns JA, Kacser H, Fell DA. 1995. The control of flux. *Biochemical Society Transactions* 23: 341–366.

Khaw K-T, Barrett-Connor E. 1987. Dietary fiber and reduced ischemic heart disease mortality rates in men and women: a 12-year prospective study. *American Journal of Epidemiology* **126**: 1093–1102.

Kimball BA, Idso SB, Johnson S, Rillig MC. **2007**. Seventeen years of carbon dioxide enrichment of sour orange trees: final results. *Global Change Biology* **13**: 2171–2183.

Klages K, Donnison H, Boldingh H, MacRae E. **1998**. myo-Inositol is the major sugar in *Actinidia arguta* during early fruit development. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 61–67.

Klann EM, Hall B, Bennett AB. 1996. Antisense Acid Invertase (TIV1) Gene Alters Soluble Sugar Composition and Size in Transgenic Tomato Fruit'. *Plant Physiology* **112**: 1321–1330.

Klie S, Osorio S, Tohge T, *et al.* 2014. Conserved Changes in the Dynamics of Metabolic Processes during Fruit Development and Ripening across Species. *Plant Physiology* 164: 55–68.

Lambers H, Poorter H. **1992**. Inherent Variation in Growth Rate Between Higher Plants: A Search for Physiological Causes and Ecological Consequences. *Advances in Ecological Research* **23**: 187–261.

Lee T-H, Sugiyama A, Takeno K, Ohno H, Yamaki S. 1997. Changes in content of indole-3-acetic acid and in activities of sucrose-metabolizing enzymes during fruit growth in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Plant Physiology* **150**: 292–296.

Li M, Li D, Feng F, Zhang S, Ma F, Cheng L. 2016. Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit development and sugar and acid accumulation in apple. *Journal of Experimental Botany* 67: 5145–5157.

Li Rui, Li Ran, Li X, *et al.* **2018**. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γaminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal* **16**: 415–427.

Li Y, Lu Y, Li L, *et al.* 2019. Impairment of hormone pathways results in a general disturbance of fruit primary metabolism in tomato. *Food Chemistry* 274: 170–179.

Li K, Wang X, Pidatala VR, Chang C-P, Cao X. **2014**. Novel Quantitative Metabolomic Approach for the Study of Stress Responses of Plant Root Metabolism. *Journal of Proteome Research* **13**: 5879–5887.

Li S, Yin X, Xie X, *et al.* **2016**. The Citrus transcription factor, CitERF13, regulates citric acid accumulation via a protein-protein interaction with the vacuolar proton pump, CitVHA-c4. *Scientific Reports* **6**.

Lo Bianco R, Rieger M, Sung S-JS. **1999**. Carbohydrate metabolism of vegetative and reproductive sinks in the late-maturing peach cultivar "Encore." *Tree Physiology* **19**: 103–109.

Lombardo VA, Osorio S, Borsani J, et al. 2011. Metabolic Profiling during Peach Fruit Development and Ripening Reveals the Metabolic Networks That Underpin Each Developmental Stage. *Plant Physiology* **157**: 1696–1710.

López-Vidal O, Camejo D, Rivera-Cabrera F, et al. 2016. Mitochondrial ascorbate–glutathione cycle and proteomic analysis of carbonylated proteins during tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit ripening. *Food Chemistry* **194**: 1064–1072.

Lü P, Yu S, Zhu N, *et al.* 2018. Genome encode analyses reveal the basis of convergent evolution of fleshy fruit ripening. *Nature Plants* **4**: 784–791.

Mack C, Wefers D, Schuster P, et al. 2017. Untargeted multi-platform analysis of the metabolome and the non-starch polysaccharides of kiwifruit during postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology* **125**: 65–76.

Makrogianni DI, Tsistraki A, Karapanos IC, Passam HC. **2017**. Nutritional value and antioxidant content of seed-containing and seedless eggplant fruits of two cultivars grown under protected cultivation during autumn-winter and spring-summer: Properties of seed-containing and seedless eggplants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97**: 3752–3760.

Marcelis LFM. **1992**. Non-destructive measurements and growth analysis of the cucumber fruit. *Journal of Horticultural Science* **67**: 457–464.

Marsh KB, Richardson AC, Macrae EA. 1999. Early- and mid-season temperature effects on the growth and composition of satsuma mandarins. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **74**: 443–451.

Martinoia E. 2018. Vacuolar Transporters – Companions on a Longtime Journey. *Plant Physiology* 176: 1384–1407.

Massot C, Génard M, Stevens R, Gautier H. 2010. Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 751–757.

McAtee P, Karim S, Schaffer R, David K. **2013**. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–7.

McFeeters RF, Fleming HP, Thompson RL. 1982. Malic and Citric Acids in Pickling Cucumbers. *Journal of Food Science* **47**: 1859–1861.

McFeeters RF, Lovdal LA. **1987**. Sugar Composition of Cucumber Cell Walls During Fruit Development. *Journal of Food Science* **52**: 996–1001.

Menu T, Saglio P, Granot D, Dai N, Raymond P, Ricard B. 2004. High hexokinase activity in tomato fruit perturbs carbon and energy metabolism and reduces fruit and seed size. *Plant, Cell and Environment* 27: 89–98.

Mesa K, Serra S, Masia A, Gagliardi F, Bucci D, Musacchi S. **2016**. Seasonal trends of starch and soluble carbohydrates in fruits and leaves of 'Abbé Fétel' pear trees and their relationship to fruit quality parameters. *Scientia Horticulturae* **211**: 60–69.

Mills TM, Behboudian MH, Clothier BE. **1996**. Water Relations, Growth, and the Composition of "Braeburn" Apple Fruit under Deficit Irrigation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* **121**: 286–291.

Mittler R. 2017. ROS Are Good. Trends in Plant Science 22: 11–19.

Moing A, Aharoni A, Biais B, et al. 2011. Extensive metabolic cross-talk in melon fruit revealed by spatial and developmental combinatorial metabolomics. *New Phytologist* **190**: 683–696.

Moing A, Maucourt M, Renaud C, et al. 2004. Quantitative metabolic profiling by 1-dimensional ¹ H-NMR analyses: application to plant genetics and functional genomics. *Functional Plant Biology* **31**: 889–902. Moing A, Renaud C, Gaudillère M, Raymond P, Roudeillac P, Denoyes-Rothan B. 2001. Biochemical Changes during Fruit Development of Four Strawberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 394–403.

Moing A, Svanella L, Rolin D, Gaudillère J-P, Monet R. **1998**. Compositional Changes during the Fruit Development of Two Peach Cultivars Differing in Juice Acidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123**: 770–775.

Mollering. **1985**. L-malate In: *Méthodes d'Analyse Enzymatique vol 7, 3rd Edition*. Verlag-Chemie Weinheim/Bergstrasse: Bergmeyer ed, .

Monselise SP, Varga A, Bruinsma J. 1978. Growth Analysis of the Tomato Fruit, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Annals of Botany* **42**: 1245–1247.

Morot-Gaudry J-F, Prat R, Bohn-Courseau I, Gévaudant F, Jullien Marc. **2017a**. Le développement du fruit In: Science Sup, Dunod. *Biologie végétale : Croissance et développement-3e édition*. Paris, 189–205.

Morot-Gaudry J-F, Prat R, Bohn-Courseau I, Gévaudant F, Jullien Marc. **2017b**. Introduction à la biochimie végétale In: Science Sup, Dunod. *Biologie végétale : Croissance et développement-3e édition*. Paris, 144–167.

Moscatello S, Famiani F, Proietti S, Farinelli D, Battistelli A. **2011**. Sucrose synthase dominates carbohydrate metabolism and relative growth rate in growing kiwifruit (*Actinidia deliciosa*, cv Hayward). *Scientia Horticulturae* **128**: 197–205.

Mounet-Gilbert L, Dumont M, Ferrand C, et al. 2016. Two tomato GDP-D-mannose epimerase isoforms involved in ascorbate biosynthesis play specific roles in cell wall biosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **67**: 4767–4777.

Mulas G, Galaffu MG, Pretti L, et al. 2011. NMR Analysis of Seven Selections of Vermentino Grape Berry: Metabolites Composition and Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 793–802.

Nabors M. **2008a**. Structure des plantes In: *Biologie végétale: structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Paris: Pearson Education France, 23–142.

Nabors M. **2008b**. Fonction des plantes In: *Biologie végétale: structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies*. Paris: Pearson Education France, 143–250.

Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, Ohtani M. 2015. NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. *Frontiers in Plant Science* 6.

Nardozza S, Boldingh HL, Osorio S, *et al.* 2013. Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism. *Journal of Experimental Botany* 64: 5049–5063.

Nguyen-Quoc B, Foyer CH. **2001**. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**: 881–889.

Nielsen TH, Skjaerbae HC, Karlsen P. 1991. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiologia Plantarum* **82**: 311–319.

Nolte KD, Hanson AD. **1997**. Proline Accumulation and Methylation to Proline Betaine in *Citrus*: Implications for Genetic Engineering of Stress Resistance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**: 8–13.

Nunan KJ, Sims IM, Bacic A, Robinson SP, Fincher GB. 1998. Changes in Cell Wall Composition during Ripening of Grape Berries. *Plant Physiology* 118: 783–792.

Obiadalla-Ali H, Fernie A, Lytovchenko A, Kossmann J, Lloyd J. **2004**. Inhibition of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphatase in tomato fruits leads to decreased fruit size, but only small changes in carbohydrate metabolism. *Planta* **219**: 533–540.

Oikawa A, Otsuka T, Nakabayashi R, et al. 2015. Metabolic Profiling of Developing Pear Fruits Reveals Dynamic Variation in Primary and Secondary Metabolites, Including Plant Hormones (S Osorio-Algar, Ed.). *PLoS ONE* **10**: 1–18.

Okuse I, Ryugo K. **1981**. Compositional changes in the developing "Hayward" kiwi fruit in California. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **106**: 73–76.

de Oliveira CR, Carneiro RL, Ferreira AG. **2014**. Tracking the degradation of fresh orange juice and discrimination of orange varieties: An example of NMR in coordination with chemometrics analyses. *Food Chemistry* **164**: 446–453.

Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde J-P, Barrieu F, Gaudillère J-P, Moing A. **2002**. Grape berry development : A review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **36**: 109–131.

Ollat N, Gaudillère J-P. **1998**. The effect of limiting leaf area during stade I of berry growth on development and composition of berries of *Vitis vinifera* L.cv. Cabernet Sauvignon. *American Journal of enology and viticulture* **49**: 251–258.

Opara LU. **1999**. Fruit Growth Measurement and Analysis In: Janick J, ed. *Horticultural Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc., 373–431.

Osorio S, Alba R, Damasceno CMB, et al. 2011. Systems Biology of Tomato Fruit Development: Combined Transcript, Protein, and Metabolite Analysis of Tomato Transcription Factor (*nor, rin*) and Ethylene Receptor (*Nr*) Mutants Reveals Novel Regulatory Interactions. *Plant Physiology* **157**: 405– 425.

Osorio S, Alba R, Nikoloski Z, Kochevenko A, Fernie AR, Giovannoni JJ. 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.

Pabon-Mora N, Litt A. **2011**. Comparative anatomical and developmental analysis of dry and fleshy fruits of Solanaceae. *American Journal of Botany* **98**: 1415–1436.

Padayachee A, Day L, Howell K, Gidley MJ. 2017. Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**: 59–81.

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**: 1–11.

Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD. **1988**. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* **335**: 721–726.

Paul V, Pandey R, Srivastava GC. 2012. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene : An overview. *Journal of Food Science and Technology* **49**: 1–21.

Percy AE, O'Brien IEW, Jameson PE, Melton LD, MacRae EIA, Redgwell RJ. 1996. Xyloglucan endotransglycosylase activity during fruit development and ripening of apple and kiwifruit. *Physiologia Plantarum* **96**: 43–50.

Pichersky E, Lewinsohn E. 2011. Convergent Evolution in Plant Specialized Metabolism. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 549–566.

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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 12065–12082.

Pressey R, Hinton DM, Avants JK. **1971**. Development of polygalacturonase activity and solubilization of pectin in peach during ripening. *Journal of Food Science* **36**: 1070–1073.

Prigent S, Collet G, Dittami SM, et al. 2014. The genome-scale metabolic network of *Ectocarpus siliculosus* (EctoGEM): a resource to study brown algal physiology and beyond. *The Plant Journal* **80**: 367–381.

Quadrana L, Almeida J, Asís R, et al. 2014. Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nature Communications* **5**.

Quentin AG, Pinkard EA, Ryan MG, et al. 2015. Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories (M Mencuccini, Ed.). *Tree Physiology*: 1–20.

Rahmati M, Mirás-Avalos JM, Valsesia P, et al. 2018. Disentangling the Effects of Water Stress on Carbon Acquisition, Vegetative Growth, and Fruit Quality of Peach Trees by Means of the QualiTree Model. *Frontiers in Plant Science* **9**.

Reiter W. **2008**. Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 236–243.

Reiter W-D, Vanzin GF. 2001. Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants In: Carpita NC, Campbell M, Tierney M, eds. *Plant Cell Walls*. Dordrecht: Springer Netherlands, 95–113.

Renaudin J-P, Deluche C, Cheniclet C, Chevalier C, Frangne N. 2017. Cell layer-specific patterns of cell division and cell expansion during fruit set and fruit growth in tomato pericarp. *Journal of Experimental Botany* **68**: 1613–1623.

Rennie EA, Turgeon R. 2009. A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 14162–14167.
Reuscher S, Fukao Y, Morimoto R, et al. 2016. Quantitative Proteomics-Based Reconstruction and Identification of Metabolic Pathways and Membrane Transport Proteins Related to Sugar Accumulation in Developing Fruits of Pear (*Pyrus communis*). *Plant and Cell Physiology* **57**: 505–518.

Richardson AC, Boldingh HL, McAtee PA, et al. 2011. Fruit development of the diploid kiwifruit, *Actinidia chinensis* "Hort16A." *BMC Plant Biology* **11**: 182.

Richardson AC, Marsh KB, Boldingh HL, et al. 2004. High growing temperatures reduce fruit carbohydrate and vitamin C in kiwifruit. *Plant, Cell and Environment* **27**: 423–435.

Ripoll J, Urban L, Staudt M, Lopez-Lauri F, Bidel LPR, Bertin N. **2014**. Water shortage and quality of fleshy fruits—making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany* **65**: 4097–4117.

Ritota M, Marini F, Sequi P, Valentini M. **2010**. Metabolomic Characterization of Italian Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.) by Means of HRMAS-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 9675–9684.

Rodriguez S del C, López B, Chaves AR. **1999**. Changes in Polyamines and Ethylene during the Development and Ripening of Eggplant Fruits (*Solanum melongena*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 1431–1434.

Rolin D, Baldet P, Just D, Chevalier C, Biran M, Raymond P. **2000**. NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 61–69.

Rontein D, Dieuaide-Noubhani M, Dufourc EJ, Raymond P, Rolin D. 2002. The Metabolic Architecture of Plant Cells: stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 43948–43960.

Rosales MA, Rubio-Wilhelmi MM, Castellano R, Castilla N, Ruiz JM, Romero L. 2007. Sucrolytic activities in cherry tomato fruits in relation to temperature and solar radiation. *Scientia Horticulturae* **113**: 244–249.

Rothan C, Bres C, Garcia V. 2016. Tomato Resources for Functional Genomics. In: *The Tomato Genome*. Berlin, Heidelberg: Springer, 75–94.

Rygol J, Luttge U. **1983**. Water-relation parameters of giant and normal cells of *Capsicum annuum* pericarp. *Plant, Cell and Environment* **6**: 545–553.

Sadka A, Dahan E, Or E, Cohen L. 2000. NADP+-isocitrate dehydrogenase gene expression and isozyme activity during citrus fruit development. *Plant Science* **158**: 173–181.

Salon C, Avice J-C, Colombié S, et al. 2017. Fluxomics links cellular functional analyses to whole-plant phenotyping. *Journal of Experimental Botany* 68: 2083–2098.

Sánchez-Mata M-C, Yokoyama WE, Hong Y-J, Prohens J. 2010. α-Solasonine and α-Solamargine Contents of Gboma (*Solanum macrocarpon* L.) and Scarlet (*Solanum aethiopicum* L.) Eggplants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 5502–5508.

Sánchez-Rodríguez E, Leyva R, Constán-Aguilar C, Romero L, Ruiz JM. **2012**. Grafting under water stress in tomato cherry: improving the fruit yield and quality: Grafting and fruit quality. *Annals of Applied Biology* **161**: 302–312.

Sauvage C, Segura V, Bauchet G, *et al.* **2014**. Genome-Wide Association in Tomato Reveals 44 Candidate Loci for Fruit Metabolic Traits. *Plant Physiology* **165**: 1120–1132.

Schaffer RJ, Ireland HS, Ross JJ, Ling TJ, David KM. **2013**. SEPALLATA1/2-suppressed mature apples have low ethylene, high auxin and reduced transcription of ripening-related genes. *AoB PLANTS* **5**: 1–10.

Schaffer AA, Levin I, Oguz I, et al. 2000. ADPglucose pyrophosphorylase activity and starch accumulation in immature tomato fruit: the effect of a Lycopersicon hirsutum-derived introgression encoding for the large subunit. *Plant Science* **152**: 135–144.

Schauer N, Semel Y, Roessner U, et al. 2006. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nature Biotechnology* 24: 447–454.

Schauer N, Zamir D, Fernie AR. **2004**. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *Journal of Experimental Botany* **56**: 297–307.

Schechter I, Proctor JTA, Elfving DC. **1993**. Characterization of seasonal fruit growth of 'Idared' apple. *Scientia Horticulturae* **54**: 203–210.

Scheel GL, Pauli ED, Rakocevic M, Bruns RE, Scarminio IS. 2016. Environmental stress evaluation of Coffea arabica L. leaves from spectrophotometric fingerprints by PCA and OSC–PLS–DA. *Arabian Journal of Chemistry* **In Press**.

Serrano M, Zapata PJ, Castillo S, Guillén F, Martínez-Romero D, Valero D. 2010. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry* **118**: 497–503.

Seymour GB, Harding SE, Taylor AJ, Hobson GE, Tucker GA. **1987**. Polyuronide solubilization during ripening of normal and mutant tomato fruit. *Phytochemistry* **26**: 1871–1875.

Seymour GB, Østergaard L, Chapman NH, Knapp S, Martin C. 2013. Fruit Development and Ripening. *Annual Review of Plant Biology* 64: 219–241.

Seymour G, Poole M, Manning K, King GJ. 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 58–63.

Shahnejat-Bushehri S, Allu AD, Mehterov N, et al. 2017. Arabidopsis NAC Transcription Factor JUNGBRUNNEN1 Exerts Conserved Control Over Gibberellin and Brassinosteroid Metabolism and Signaling Genes in Tomato. *Frontiers in Plant Science* **8**.

Shiratake K, Kanayama Y, Maeshima M, Yamaki S. **1997**. Changes in H⁺-Pumps and a Tonoplast Intrinsic Protein of Vacuolar Membranes during the Development of Pear Fruit. *Plant and Cell Physiology* **38**: 1039–1045.

Sonnewald U, Braue M, Stitt M, Willmitzer L. 1991. Transgenic tobacco plants expressing yeastderived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sinkkource interactions. *The Plant Journal* **1**: 95–106.

Sorce C, Montanaro G, Bottega S, Spanò C. 2017. Indole-3-acetic acid metabolism and growth in young kiwifruit berry. *Plant Growth Regulation* **82**: 505–515.

Soubeyrand E, Colombié S, Beauvoit B, et al. 2018. Constraint-Based Modeling Highlights Cell Energy, Redox Status and α -Ketoglutarate Availability as Metabolic Drivers for Anthocyanin Accumulation in Grape Cells Under Nitrogen Limitation. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–14.

Srivastava RK, Talluri S, Beebi SK, Rajesh Kumar B. **2018**. Magnetic Resonance Imaging for Quality Evaluation of Fruits: a Review. *Food Analytical Methods* **11**: 2943–2960.

Steinhauser MC, Steinhauser D, Koehl K, et al. 2010. Enzyme Activity Profiles during Fruit Development in Tomato Cultivars and Solanum pennellii. *Plant Physiology* **153**: 80–98.

Stitt M, Lilley RM, Gerhardt R, Heldt HW. **1989**. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 518–552.

Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG. **2010**. Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15**: 462–470.

Sweetman C, Deluc LG, Cramer GR, Ford CM, Soole KL. **2009**. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* **70**: 1329–1344.

Teusink B, Walsh MC, van Dam K, Westerhoff HV. **1998**. The danger of metabolic pathways with turbo design. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 162–169.

Tewolde FT, Lu N, Shiina K, et al. 2016. Nighttime Supplemental LED Inter-lighting Improves Growth and Yield of Single-Truss Tomatoes by Enhancing Photosynthesis in Both Winter and Summer. *Frontiers in Plant Science* **7**.

Thom E. 2007. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. *Journal of International Medical Research* **35**: 900–908.

Thompson AJ, Tor M, Barry CS, et al. 1999. Molecular and Genetic Characterization of a Novel Pleiotropic Tomato-Ripening Mutant. *Plant Physiology* **120**: 383–390.

Tiessen A. **2002**. Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. *The Plant Cell* **14**: 2191–2213.

Tomita S, Nemoto T, Matsuo Y, et al. 2015. A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed l-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins. *Food Chemistry* **174**: 163–172.

Tompkins D, Toffaletti J. 1982. Enzymic Determination of Citrate in Serum and Urine, with Use of the Worthington "Ultrafree" Device. *Clinical chemistry* **28**: 192–195.

Truffault V, Fry SC, Stevens RG, Gautier H. **2017**. Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *The Plant Journal* **89**: 996–1008.

Truffault V, Riqueau G, Garchery C, Gautier H, Stevens RG. **2018**. Is monodehydroascorbate reductase activity in leaf tissue critical for the maintenance of yield in tomato? *Journal of Plant Physiology* **222**: 1–8.

Tuohy KM, Conterno L, Gasperotti M, Viola R. **2012**. Up-regulating the Human Intestinal Microbiome Using Whole Plant Foods, Polyphenols, and/or Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 8776–8782.

Udenfriend S, Stein S, Böhlen P, Dairman W, Leimgruber W, Weigele M. 1972. Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* 178: 871.

Ulrich R. 1952. La vie des fruits. Paris: Masson et Cie.

Updegraff DM. **1969**. Semimicro determination of cellulose inbiological materials. *Analytical Biochemistry* **32**: 420–424.

Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. 2012. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data. *Metabolites* 2: 775–795.

Vriezen WH, Feron R, Maretto F, Keijman J, Mariani C. 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist* **170**: 60–76.

Wang P-Y, Fang J-C, Gao Z-H, Zhang C, Xie S-Y. 2016. Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *Journal of Diabetes Investigation* **7**: 56–69.

Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A. **1993**. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiology* **101**: 321–327.

Wang L, Sun X, Weiszmann J, Weckwerth W. 2017. System-Level and Granger Network Analysis of Integrated Proteomic and Metabolomic Dynamics Identifies Key Points of Grape Berry Development at the Interface of Primary and Secondary Metabolism. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1–19.

Went FW. **1953**. The Effect of Temperature on Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology* **4**: 347–362.

Wheaton TA, Stewart I. 1969. Biosynthesis of synephrine in citrus. Phytochemistry 8: 85–92.

Yakushiji H, Morinaga K. 1998. Sugar Accumulation and Partitioning in Satsuma Mandarin Tree Tissues and Fruit in Response to Drought Stess. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 123: 719–172.

Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, DeVerna JW, Bennett AB. **1991**. Sink Metabolism in Tomato Fruit : IV. Genetic and Biochemical Analysis of Sucrose Accumulation. *Plant Physiology* **95**: 1026–1035.

Yelle S, Hewitt JD, Robinson NL, Damon S, Bennett AB. **1988**. Sink Metabolism in Tomato Fruit : III. Analysis of Carbohydrate Assimilation in a Wild Species. *Plant Physiology* **87**: 737–740.

Yuan H, Cheung CYM, Poolman MG, Hilbers PAJ, van Riel NAW. **2016**. A genome-scale metabolic network reconstruction of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and its application to photorespiratory metabolism. *The Plant Journal* **85**: 289–304.

Yuan H, Zhang J, Nageswaran D, Li L. 2015. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research* 2.

Zanor MI, Osorio S, Nunes-Nesi A, *et al.* **2009**. RNA Interference of LIN5 in Tomato Confirms Its Role in Controlling Brix Content, Uncovers the Influence of Sugars on the Levels of Fruit Hormones, and

Demonstrates the Importance of Sucrose Cleavage for Normal Fruit Development and Fertility. *Plant Physiology* **150**: 1204–1218.

Zaro MJ, Keunchkarian S, Chaves AR, Vicente AR, Concellón A. **2014**. Changes in bioactive compounds and response to postharvest storage conditions in purple eggplants as affected by fruit developmental stage. *Postharvest Biology and Technology* **96**: 110–117.

Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. **2007**. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* **401**: 13–28.

Zepeda B, Olmedo P, Ejsmentewicz T, *et al.* **2018**. Cell wall and metabolite composition of berries of Vitis vinifera (L.) cv. Thompson Seedless with different firmness. *Food Chemistry* **268**: 492–497.

Zhang Y, Li P, Cheng L. 2010. Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry* **123**: 1013–1018.

Zhao L, Hu J, Huang Y, et al. 2017. ¹ H NMR and GC–MS based metabolomics reveal nano-Cu altered cucumber (*Cucumis sativus*) fruit nutritional supply. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**: 138–146.

Annexes



Annexe 1 : Fruit salad in the lab: Comparing botanical species to help deciphering fruit primary metabolism

Léa Roch, Zhanwu Dai, Eric Gomes, Stéphane Bernillon, Jiaojiao Wang, Yves Gibon, Annick Moing Soumis pour publication dans *Frontiers in Plant Science*

Résumé

Bien que les espèces de fruits charnus soient économiquement importantes au niveau mondial et cruciales pour la nutrition humaine, la régulation du métabolisme de leurs fruits reste à décrire en détail. Ces espèces fruitières diffèrent par l'origine du ou des tissus constituant la chair, la durée du développement du fruit, la coordination des changements de leur maturation (de type climactérique et non climactérique) et leur composition biochimique à maturité liée aux caractères sucré et acide. Les principaux constituants des fruits mûrs résultent de différentes stratégies de transport et de métabolisme du carbone. Ainsi, le moment et le type de chargement et déchargement du phloème peuvent varier considérablement d'une espèce à l'autre. De plus, l'accumulation et la transformation des principaux sucres solubles, des acides organiques, des acides aminés, de l'amidon et des parois cellulaires sont très variables selon l'espèce de fruit. La comparaison des espèces fruitières apparaît donc comme un moyen appréciable pour mieux comprendre leur métabolisme. D'une part, la comparaison des résultats d'études portant sur des espèces de différentes familles botaniques permet de mettre en évidence les facteurs contrôlant l'accumulation des sucres ou des acides organiques, mais ce type de comparaison est souvent limité par l'hétérogénéité des approches analytiques appliquées dans chaque étude et par des jeux de données incomplets. D'autre part, les études interspécifiques demeurent rares, mais elles ont apporté de nouvelles connaissances sur des aspects clés de la régulation du métabolisme primaire. De plus, de nouveaux outils de comparaison multi-espèces sont en train d'émerger, notamment des méta-analyses ou la réutilisation de données métaboliques ou génomiques partagées, et la comparaison de modèles de flux métaboliques ou basés sur les processus. Toutes ces approches contribuent à l'identification de facteurs métaboliques qui influencent la croissance et la qualité des fruits, afin de pouvoir ajuster leurs niveaux à l'aide de la sélection variétale ou de pratiques culturales, en vue d'améliorer les caractères des fruits.

Fruit salad in the lab: Comparing botanical species to help deciphering fruit primary metabolism

Léa Roch¹, Zhanwu Dai², Eric Gomes², Stéphane Bernillon^{1, 3}, Jiaojiao Wang¹, Yves Gibon^{1,3}, Annick Moing^{1,3*}

¹ UMR1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Univ. Bordeaux, Centre INRA de Bordeaux, F-33140 Villenave d'Ornon, France

² UMR 1287 EGFV, INRA, Univ. Bordeaux, Bordeaux Sci Agro, F-33140 Villenave d'Ornon, France

³ Plateforme Métabolome Bordeaux, CGFB, MetaboHUB-PHENOME, IBVM, Centre INRA de Bordeaux F-33140 Villenave d'Ornon, France

* Correspondence: Dr Annick Moing annick.moing@inra.fr

Keywords: amino acids, cross-species, fleshy fruit, inter-species, metabolism regulation, organic acids, primary metabolism, sugars

Abstract

Although fleshy fruit species are economically important worldwide and crucial for human nutrition, the regulation of their fruit metabolism remains to be described finely. Fruit species differ in the origin of the tissue constituting the flesh, duration of fruit development, coordination of ripening changes (climacteric vs nonclimacteric type) and biochemical composition at ripeness as linked to sweetness and acidity. The main constituents of mature fruit result from different strategies of carbon transport and metabolism. Thus, the timing and nature of phloem loading and unloading can largely differ from one species to another. Furthermore, accumulations and transformations of major soluble sugars, organic acids, amino acids, starch and cell walls are very variable among fruit species. Comparing fruit species therefore appears as a valuable way to get a better understanding of metabolism. On the one hand, the comparison of results of studies about species of different botanical families allows pointing the drivers of sugar or organic acid accumulation but this kind of comparison is often hampered by heterogeneous analysis approaches applied in each study and incomplete dataset. On the other hand, cross-species studies remain rare but have brought new insights into key aspects of primary metabolism regulation. In addition, new tools for multi-species comparisons are currently emerging, including meta-analyses or re-use of shared metabolic or genomic data, and comparative metabolic flux or process-based modeling. All these approaches contribute to the identification of the metabolic factors that influence fruit growth and quality, in order to adjust their levels with breeding or cultural practices, with respect to improving fruit traits.

Introduction

Fresh fruits (866 Mt worldwide in 2016, www.fao.org/faostat) and their derived products are economically important. Besides their energetic role in human diet linked notably with their carbohydrate contents, they are also crucial for human nutrition and health, especially in relation with their contents in vitamins, antioxidants and fibers (Aune et al., 2017; Baldet et al., 2014; Padayachee et al., 2017; Rodriguez-Casado, 2016; Wang et al., 2016). In fruit tissues, primary metabolism can be defined as the biochemical processes that are necessary for growth and development and shared by a large number of taxonomic groups (Verpoorte, 2000), and produces metabolites that are generally essential for organism survival (Aharoni and Galili, 2011). It contributes to flesh growth and ripening, and final fruit quality, particularly sweetness and acidity. Its operation varies according to botanical species and developmental stages. Different botanical species may differ in the composition of the phloem sap originating from leaves and unloaded into the fruit, the occurrence of transient starch accumulation during development, the hormonal orchestration of ripening changes, and the major metabolites accumulated at ripening (Fig. 1). All these aspects are linked with primary metabolic pathways involving carbohydrates, organic acids and amino acids. These pathways are regulated along fruit development that can last from a few dozens to more than two-hundred days-post-anthesis (DPA), from fruit set to ripe fruit, depending on the species (Table 1). Early development stages after fruit set are usually characterized by a high concentration of organic acids whereas ripening is associated with soluble sugar accumulation (Beauvoit et al., 2018; Famiani et al., 2015). However, the regulation of metabolic pathways is not that simple.

Studies dealing with fruit metabolism include biochemical analyses of metabolites from targeted analyses to metabolomics in tissues or sap, measurement of enzyme activity and regulation, transcriptomics, mapbased cloning or genome (re)sequencing. Several of these approaches can be combined for one cultivar across fruit development or use a large collection of genetic resources. This review focuses on comparing species for the programming and integration of primary metabolic pathways with growth and fruit quality, mostly for temperate fruits. Such comparisons should help identifying key regulation points, for instance regarding the trade-offs between fruit yield and quality, and possibly propose hypotheses for breeding or agricultural practices.

Similarities and dissimilarities are noticed in the composition of primary metabolites in fruits

Sweet taste of fruit is the thought that probably comes first when thinking of fleshy fruits. This taste results in fact from a subtle balance between sweetness and acidity. Sweetness is generally due to the presence of sugars at high concentration. It should be noted that fructose, one of the most abundant soluble sugars with glucose and sucrose, is named after fruit. Organic acids have an impact on acidity, and several amino acids on umami taste. The composition and concentrations of these major constituents of the ripe fruit vary according to species (Table 1).

Concerning soluble sugars, hexoses are usually more abundant than sucrose. This is the case for most berries, *e.g.* raspberries, blackberry (Mikulic-Petkovsek et al., 2012) and grape berry (Dai et al., 2013), as well as kiwifruit (Richardson et al., 2011), pepper (Osorio et al., 2012), eggplant (Makrogianni et al., 2017) and cherry (Usenik et al., 2008; Wills et al., 1983). In some species, fructose is more abundant than glucose and sucrose, such as in apple and pear (Drake and Eisele, 1999) or black currant (Mikulic-Petkovsek et al., 2012).

However, there are also species in which sucrose is the most abundant sugar, such as mandarin (Legua et al., 2014), peach (Wills et al., 1983), watermelon (Gao et al., 2018), melon (Wang et al., 1996) and hardy kiwi (Klages et al., 1998; Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Finally, some species contain sucrose in almost the same proportion as hexoses, for instance several cultivars of litchi (*Litchi chinensis*) (Wang et al., 2006) and cultivated as well as wild strawberry (Mikulic-Petkovsek et al., 2012; Moing et al., 2001).

Sugar alcohols are a major component for some fruit species. Sorbitol, which is common in Rosaceae trees, is present in notable quantities in the developing peach and apricot fruit (Bae et al., 2014). It is also one of the main sugars in ripe chokeberry, rowanberry and eastern shadbush (Mikulic-Petkovsek et al., 2012). Another sugar-alcohol, *myo*-inositol, is present in the early stages of kiwifruit and hardy kiwi development (Klages et al., 1998).

Concerning organic acids, a recent review (Famiani et al., 2015) and research study (Mikulic-Petkovsek et al., 2012) listed the main organic acids found in fruits of more than 50 species. Citrate and malate are the major organic acids in many fruit species. Typically, young fruits are likely to accumulate malate, which will tend to be replaced by citrate at ripening (Flores et al., 2012; McFeeters et al., 1982). Thus, species such as lime, orange, raspberry, strawberry, blueberry and melon (Wang et al., 1996) accumulate high level of citrate, while other species such as apple, cherry, chokeberry, rowanberry, eastern shadbush, watermelon (Gao et al., 2018) and eggplant (Kozukue et al., 1978) build up in malate. Other species, *e.g.* pear, apricot, goji berry and black current accumulate both organic acids. In some cases, other organic acids are also overrepresented, as for example isocitrate in blackberry, tartrate in grape berry and lychee, or quinate in kiwifruit and hardy kiwi (Kim et al., 2012).

Large compositional differences for major compounds have been reported between domesticated species and wild relatives. For instance, the tomato domesticated species (*Solanum lycopersicum*) accumulates hexoses whereas several wild species (*Solanum. neorickii, Solanum. chmielewskii, Solanum. habrochaites*) accumulate sucrose as the major sugar (Schauer et al., 2004; Yelle et al., 1988). Furthermore, wild tomato species (*Solanum pennellii, S. neorickii, S. chmielewskii, S. habrochaites*) were found to accumulate higher levels of malate and citrate (Schauer et al., 2004; Steinhauser et al., 2010) than cultivated tomatoes. Similarly, the domestication of mandarin led to a strong decrease in citrate (Wang et al., 2018). Large compositional differences may even be found between cultivars of a given species. An example is given for acidic lemon and lime, where glucose and sucrose are the major sugars, and citrate the main organic acid, whilst in acidless lemon and lime, fructose is the major sugar and citrate, malate and quinate are equally present (Albertini et al., 2006).

Regarding amino acids, there are also differences according to botanical species. For berries such as strawberry, glutamine and asparagine are the most abundant ones whereas blackberry accumulate asparagine and glutamate. For blackcurrant, orange and lemon glutamine is the major amino acid besides alanine (Brückner and Westhauser, 1994; Burroughs, 1960). The latter one is also abundant in raspberry with serine (Burroughs, 1960). In grape berry, proline, arginine, glutamine and alanine dominate in berry skin, while proline, alanine and GABA dominate in berry pulp (Guan et al., 2017). For several Rosaceae trees, asparagine dominates with glutamate and aspartate in apple (Zhang et al., 2010), with serine in pear (Chen et al., 2007), and with glutamate and proline in peach (Moing et al., 1998). Concerning Solanaceae, asparagine, GABA and proline seem to be the predominant amino acids in pepper (Osorio et al., 2012). Glutamine and glutamate are the major ones in domesticated tomato (*S. lycopersicum*) together with GABA which is also present in high quantities (Schauer et al., 2004). However, two wild tomato species largely differ according to the latter

authors: *S. habrochaites* harbours a high tryptophan content, and *S. pennellii* a high GABA pool, five times higher than in the domesticated species. In kiwifruit, aspartate is the main amino acid (Nardozza et al., 2013).

Hence, the accumulation of primary metabolites influencing fresh fruit taste depends on the fruit species.

Phloem loading and unloading strategies differ among fruits

Fruits are strong sinks attracting plenty of photoassimilates transported from leaves via phloem. From photosynthetic site to sink, photoassimilates need at least three transporting steps, including phloem loading, phloem long-distance transport, and phloem unloading. The strategies of phloem loading, unloading, and the transported forms of carbon are diverse (Braun et al., 2013; Rennie and Turgeon, 2009). Sucrose is the main photoassimilate transported in phloem in most fruit species such as cultivated tomato, grape, sweet orange and cultivated strawberry (Fu et al., 2011; Hijaz and Killiny, 2014; Rennie and Turgeon, 2009; Swanson and El-Shishiny, 1958). However, several fruit species of the Cucurbitaceae family, such as cucumber, watermelon, and melon also transport oligosaccharides including raffinose and stachyose, in higher or equal concentration than sucrose (Fu et al., 2011; Mitchell et al., 1992; Rennie and Turgeon, 2009). Tree species from the Rosaceae family, such as apple, peach, plum or prune, apricot and sweet cherry also transport sugar alcohols (e.g. sorbitol) (Fu et al., 2011; Rennie and Turgeon, 2009). For example, sorbitol can account for 60-90% of the carbon transported in phloem in peach tree (Moing et al., 1997).

Sucrose can be loaded into phloem by three loading strategies, including active apoplasmic, active symplasmic (also called polymer trapping), and passive symplasmic routes (Fu et al., 2011; Rennie and Turgeon, 2009). Active apoplasmic loaders normally have low-abundant plasmodesmata in leaf and require the presence of sucrose transporters (SUTs) and SWEETs, such as in tomato leaf (Fu et al., 2011; Jensen et al., 2016; Liesche and Patrick, 2017). In active symplasmic loaders, sucrose diffuses into the companion cells through abundant plasmodesmata, and is enzymatically converted into sugar oligomers (e.g. raffinose and stachyose), which are molecularly larger and cannot diffuse back to phloem parenchyma, forming a polymer trapping mechanism. Fruit species of Cucurbitaceae family, such as cucumber, watermelon and melon, are active symplasmic loaders (Fu et al., 2011; Rennie and Turgeon, 2009). Passive symplasmic loading requires abundant plasmodesmata to allow sucrose diffusion or convection from mesophyll cells to sieve elements following the sugar concentration gradient. Strawberry is a passive loader, and grape is a candidate passive loader (Rennie and Turgeon, 2009). The phloem loading strategies for sugar-alcohols (e.g. sorbitol, mannitol) can be active apoplasmic or passive symplasmic (Reidel et al., 2009). Most fruit trees of Rosaceae family, including apple, apricot, sweet cherry, peach, and pear are passive symplasmic loaders (Fu et al., 2011; Reidel et al., 2009). Multi-species comparison analysis showed that active loading is associated with efficient water conduction and maximized carbon efficiency and growth, while the reverse is true for passive loading (Fu et al., 2011). A meta-analysis of 41 species with a modelling approach further showed that phloem sugar concentrations are in average at 21.1% for active loaders and 15.4% for passive loaders (Jensen et al., 2013). The theoretical optimum sugar concentration in phloem sap proposed was 23.5%. Organic acids are also transported in phloem (Fiehn, 2003), although references are rare. Amino acids, for instance arginine and glycine in grapevine (Gourieroux et al., 2016), also use phloem as the main transport route from source to sink, and are also transported in xylem sap (Tegeder and Hammes, 2018).

In fruit sinks, photoassimilates (sucrose, sugar-alcohols, or oligosaccharides) need to be unloaded following symplasmic or apoplasmic pathways (Braun et al., 2013). In apple and cucumber fruits, phloem unloading is apoplasmic throughout fruit development (Hu et al., 2011; Zhang et al., 2004). In several fruits, shifts between the two phloem unloading strategies can occur during development. Tomato and grape fruits operate

symplasmic unloading during early development stage when soluble sugar is low, and switches to apoplasmic unloading during fruit ripening when soluble sugars accumulate (Patrick, 1997; Ruan and Patrick, 1995; Zhang et al., 2006). For kiwifruit, Chen et al. (2017) showed that sucrose phloem unloading occurs mainly through the apoplasmic route along fruit development (44 to 135 days after blooming). However, Gould et al. (2013), working from 22 to 200 days after anthesis, found that phloem unloading dominantly appeared via symplasmic route in early fruit development, while an apoplasmic route becomes important during the later developmental stages. The dominant symplastic import of sugar at the initial stages of fruit development allows a high inflow of carbon input via mass flow. Shifting from symplasmic to apoplasmic unloading during fruit ripening limits back-flow of assimilates from fruit sink to sieve elements and likely facilitates sugar accumulation to high concentrations in fruit tissues (Patrick, 1997; Ruan and Patrick, 1995; Zhang et al., 2006). For amino acid unloading, most plant species follow a symplasmic process driven by a downhill concentration gradient (Tegeder and Hammes, 2018). The question whether and how loading strategies, carbon loading forms, and unloading strategies influence fruit growth and quality are still under debate.

Primary metabolism pathways are differentially regulated

In most fruits, the main source of carbon is imported via phloem in form of sucrose, which can be degraded via the reactions catalyzed by cell wall invertase in the apoplast, neutral invertase or sucrose synthase following symplastic import into the cytosol, or acid invertase following subsequent import into the vacuole. Carbon import patterns are highly variable from one species to another. For example, in sweet pepper both vacuolar and neutral invertases have been proposed as determining carbon import at young stages (Nielsen et al., 1991). This contrasts with kiwifruit, in which sucrose synthase has been proposed as controlling most of the carbon import in growing fruits (Chen et al., 2017). In the same species, the previous measurement of neutral invertase and sucrose synthase cytosolic enzymes seemed in agreement with symplastic phloem unloading throughout fruit development before ripening (Nardozza et al. 2013). Also, parietal invertase has been found to impact significantly tomato sugar content at maturity (Fridman et al., 2004). A low level of acid invertase activity and the absence of sucrose synthase activity in S. chmielewskii, a wild tomato species, were associated with the high content of sucrose (Yelle et al., 1988). In contrast to S. lycopersicum, the capacity of most enzymes of glycolysis and the tricarboxylic acid cycle of S. pennellii, which also accumulates hexoses, is maintained and increases even during the ripening of the fruit, probably reflecting the fact that the fruit continues to grow until maturity (Steinhauser et al., 2010). For sorbitol transporting fruit species, imported sorbitol is converted into fructose by sorbitol dehydrogenases (Park et al., 2002). In apple, for instance, fructose is stored in the vacuole or metabolized. (Berüter et al., 1997). Sorbitol oxidase (Lo Bianco and Rieger, 2002) and sorbitol-6-phosphate dehydrogenase (S6PDH) (Ohkawa et al., 2008) may also play a role in sorbitol metabolism in Rosaceae fruit trees. For Cucurbitaceae, imported raffinose and stachyose are rapidly metabolized via a pathway which includes enzymes of sugar hydrolysis, phosphorylation, transglycosylation, nucleotide sugar metabolism, sucrose cleavage and synthesis, with an initial implication of α -galactosidases (Dai et al., 2011).

In the cytosol, hexoses resulting from import, degradation or export from the vacuole are phosphorylated via the reactions catalyzed by hexokinases (both hexoses) or fructokinases (fructose only). It has been proposed that the high capacities found for these enzymes in young growing fruits results in high fluxes through glycolysis (Biais et al., 2014). Hexoses-phosphates are partitioned between cytosol and plastids, although, unlike leaf plastids, fruit plastids are capable of importing hexoses phosphates (Batz et al., 1995; Butowt et al., 2003). Fructose-6-phosphate is phosphorylated via the reaction catalyzed by ATP- or PPi-dependent phosphofructokinases (only the former is found in both cytosol and plastid), which enables its

breakdown via glycolysis in both compartments. Results obtained in banana suggest that these enzymes are inhibited by PEP via allosteric feedback, indicating that there is a crossed glycolytic flux control between PEP and fructose-6-phosphate, which activates PEP carboxylase (Turner and Plaxton, 2003). In both the cytosol and plastid, glucose-6-phosphate tends to equilibrate with fructose-6-phosphate and glucose-1-phosphate via the reaction catalyzed by phosphoglucose isomerase and phosphoglucomutase, respectively, which are present in both compartments. In the cytosol, glucose-1-phosphate is the precursor of UDP-glucose (via the reaction catalyzed by UDP-glucose pyrophosphorylase), precursor of cell wall (Mohnen, 2008; Reiter, 2002, 2008), ascorbate and sucrose (Reiter and Vanzin, 2001). In the chloroplast, glucose-1-phosphate is converted into ADP-glucose, the precursor of starch. In most fruits, the acquisition of sweetness at maturation is the result of important metabolic changes leading to sugar accumulation (Bonghi and Manganaris, 2012). Of these, starch degradation is often a major source of sugars and energy as detailed below. Finally, sugar vacuolar storage is probably one of the most important, although overlooked, features regarding fruit sweetness. In particular, modelling sugar metabolism in tomato fruit suggested that tonoplastic sucrose and hexose transporters are major control points that condition fruit sugar content (Beauvoit et al., 2014), in line with dramatic alterations in fruit sugar accumulation provoked by the overexpression of a tonoplast transporters in melon (Cheng et al., 2018).

Malate, citrate, quinate and tartrate constitute the four main organic acids accumulated to high levels in the vacuoles of fleshy fruits, during their development (DeBolt et al., 2006; Hussain et al., 2017; Richardson et al., 2011; Tril et al., 2014). In fruit, malate is mostly synthetized by the pyruvate kinase bypass, which involves the irreversible carboxylation of phosphenolpyruvate into oxaloacetate (OAA) by phosphenolpyruvate carboxylase, and OAA is subsequently reduced to malate by cytosolic NAD-dependent malate dehydrogenase (Sweetman et al., 2009; Yao et al., 2011). Citrate is produced from OAA by the TCA pathway, operating in a non-cyclic mode, which is known to take place in plants (Sweetlove et al., 2010) and evidenced in citrus fruits (Katz et al., 2011), with the mitochondrial citrate synthase being the key enzyme of the pathway (Sadka et al., 2001). Quinate is produced at a branch point of the shikimate biosynthesis pathway by the enzyme quinate dehydrogenase (Gritsunov et al., 2018; Marsh et al., 2009). It is a precursor of chlorogenic acids that are major specialized metabolites in a range of fruit species. Tartrate synthesis results from L-ascorbic acid catabolism through the Smirnoff-Weelher pathway (Melino et al., 2009). L-idonate dehydrogenase, which catalyzes a key step in this pathway, is present in grape during the green stage of berry development, concomitantly with the tartrate synthesis peak (DeBolt et al., 2006). Once produced, organic acids are stored into flesh cell vacuoles thanks to an acid trap mechanism, which relies on (i) the existence of strong pH difference between the cytosol (neutral or slightly alkaline) and the vacuole (highly acidic, pH down to 2.5 in citrus) and the existence of passive di- and tri-anions transporters on the tonoplast (De Angeli et al., 2013; Etienne et al., 2013). For citrate, the existence of a proton coupled active symporter, CsCit1, has also been reported (Shimada et al., 2006). The regulation of vacuolar malate storage has recently begun to be deciphered (Jia et al., 2018). Once the ripening phase starts, organic acids exit the vacuole and are metabolized to (i) fuel the respiration increase linked to climacteric crisis in climacteric fruits (Colombié et al., 2015) or to meet higher energy demand in nonclimacteric fruits such as grapes (Sweetman et al., 2009), or (ii) produce hexoses by neoglucogenesis (Famiani et al., 2016; Walker et al., 2015).

Amino acid accumulation in developing fruits is the result of both import from phloem and xylem translocation, and *in situ* synthesis (Beshir and Mbong, 2017; Mechthild and Hammes, 2018; Wang et al., 2017b). Several enzymes of amino acid biosynthesis, including, among others, glutamine synthetase, asparagine synthetase, alanine aminotransferase and methionine synthase have been detected in global proteomic studies in developing grape berries (Wang et al., 2017a) or by ¹³C-based flux variance analysis in apple (Beshir and Mbong, 2017). Beside the classical 20 amino acids, fruits can also produce other, non-

proteogenic amino acids, such as \mathbb{P} -aminobutyric acid (GABA), which is synthesized through the GABA shunt (Bouché and Fromm, 2004), and possibly β -aminobutyric acid (Thevenet et al., 2017), or citrulline for instance in cucurbits (Fish and Bruton, 2010) including melon (Bernillon et al., 2013) which is produced from arginine (Joshi and Fernie, 2017). Amino acids are not just bricks to build protein in fruits, but also contribute to the global organoleptic qualities of fruits. For example, levels of glutamate contribute to the so-called "Umami" taste of tomato (Kurihara, 2015). Amino acid catabolism has been particularly studied in fruits, as it produces numerous quality-related compounds. Phenylalanine leads to the production of polyphenols through the phenylpropanoid pathway, which have antioxidant properties and are health-promoting compounds (Butelli et al., 2008; Cirillo et al., 2014). It is also the starting point of volatile aromas (3-phenylpropanol, 2phenethylacetate) in melon fruit (Gonda et al., 2018). Isoleucine was shown to be the precursor for 2methylbutyl ester aromas in strawberry (Pérez et al., 2002) and methoxypyrazines in grape berries (Guillaumie et al., 2013). Thus, amino acid metabolism is a key determinant of fruit quality and palatability.

Fruit primary metabolism also provides building blocks for the synthesis of cell-walls, and non-volatile specialized metabolites (Verpoorte, 2000) besides those mentioned above (*e.g.* flavonoids, alkaloids, anthocyanins, isoprenoids). Primary cell-wall precursors are mainly supplied as NDP-derivatives to produce cellulose, hemicelluloses and pectins (Mohnen, 2008; Reiter, 2002, 2008). Secondary cell-wall lignin precursors, monolignols, are produced by the phenylpropanoid pathway (Zhong and Ye, 2015). Flavonoid and anthocyanin precursors are 4-coumaroyl-coA and malonyl-CoA molecules condensed by chalcone synthase (Jaakola, 2013). Alkaloids are a diverse family of specialized metabolites and are synthesized from various precursors. For instance, steroidal alkaloids of tomato fruit derive from cholesterol (Itkin et al., 2013), whereas tropane alkaloids of deadly nightshade come from arginine and ornithine (Sato et al., 2001). Carotenoids come from both the mevalonic (MVA) and the MVA-independent pathway. Their precursor isopentenyl-diphosphate is either produced from acetyl-CoA or pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate (Fraser and Bramley, 2004). Furthermore, most of these specialized metabolites are decorated with sugars and organic acids. Specialized metabolites have a role in plant defense but their biosynthesis has a metabolic cost. Thus, allocation theory has been developed to explain resource-based trade-off between plant physiological functions (Bazzaz et al., 1987) and was confirmed experimentally at the plant level (Caretto et al., 2015).

Starch transiently accumulates or not during fruit development

Starch transient accumulation occurs during fruit development in several fleshy fruits such as strawberry, tomato, banana, kiwifruit, apple and pear. In strawberry, starch accumulates extremely early in the fruit formation process to 3-5% dry weight, and starch degradation predominates thereafter (Moing et al., 2001; Souleyre et al., 2004). In tomato fruit, starch amount peaks at immature green stage, contributing around 20% dry weight (Schaffer and Petreikov, 1997). In apple, starch accumulation occurs continuously from four weeks after anthesis until maximal concentration at about 15-17 weeks, then following a continuous net starch degradation (Brookfield et al., 1997). In pear, starch degradation starts several weeks before fruit harvest (Mesa et al., 2016). Though kiwifruit and banana can accumulate more starch than the abovementioned fruit species during fruit growth, nearly 40% and 70% dry weight, respectively, a similar temporal accumulation/degradation pattern is observed (Hall et al., 2013; Li and Zhu, 2017; Zhang et al., 2005). Because of their conserved temporal profiles, starch levels are used to define a ripening index for fruit harvest in several

species including apple (Doerflinger et al., 2015). In all these fruits, in addition to a temporal accumulation, starch also shows spatial distribution patterns. In tomato fruit, starch accumulates more in parenchyma (inner pericarp) than in columella (Schaffer and Petreikov, 1997). For different apple cultivars, along with fruit ripening, different spatial starch accumulation/degradation patterns, such as ring or star-shaped pattern, were observed (Szalay et al., 2013). In banana, starch is lost from the fruit center to the banana outwards (Blankenship et al., 1993). Both the temporal and spatial variations of starch in fruits are linked with sucrose-to-starch metabolic enzyme activities (Schaffer and Petreikov, 1997). For example, Shinozaki et al. (2018) showed that the genes encoding key enzymes involved in starch biosynthesis, including ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) and starch-branching enzyme, showed higher expression in parenchyma, which is coherent with the AGPase enzyme activity and starch amount abundance observed in tomato pericarp. Moreover, the AGPase large subunit allele from *S. habrochaites* is characterized by increased AGPase activity in line with higher immature fruit starch content, compared to *S. lycopersicum*. Near-isogenic lines resulting from the interspecific cross of *S. habrochaites* and *S. lycopersicum*, allowed showing that the high-starch phenotype was related to a temporal extension of transcription of an AGPase large subunit gene that also conferred higher AGPase activity to the high-starch tomato line (Petreikov et al., 2006, 2009).

Starch plays multiple roles during fruit development, for fruit set, fruit growth and fruit ripening. For early fruit set, starch is suggested to be a carbon reserve, particularly under mild stress conditions, for supplying glucose, which is a signal for fruit set (Ruan et al., 2012). A study on kiwifruit suggested that starch turnover occurs at early developmental stage during cell division (Nardozza et al., 2013). When tomato plants were grown under control, shading or water shortage conditions, fruit hexose and sucrose amounts were similar, but fruit starch contents showed large fluctuations during fruit growth, which suggested that starch may play a buffering role for carbon supply under different abiotic stresses (Biais et al., 2014). Fruit species that do not store carbohydrate reserves such as starch, for instance muskmelon, must remain attached to the plant for the accumulation of soluble sugars to occur during ripening (Hubbard et al., 1990). In fruit species that store starch as a reserve of carbohydrates when fruit is ripening, net starch degradation, attributed to the complex actions of a range of enzymes related to starch breakdown at transcriptional and translational levels in banana (Xiao et al., 2018), also contributes to sugar content in banana (Prabha and Bhagyalakshmi, 1998) or kiwifruit (Nardozza et al., 2013). Petreikov et al., (2009) proposed an increase in transient starch accumulation in tomato as a valuable strategy for increasing the sink strength of the developing fruit and its final size and sugar levels. However, starch is not always degraded at fruit maturity. A striking example is the Musa genus, where we find dessert bananas characterized by a record degradation of starch (sometimes more than 10% of the dry matter) but also the cooking banana that remains rich in starch at maturity (Hill and Ap Rees, 1994; Jourda et al., 2016).

Several cross-species studies highlight domestication effects as well as mechanisms shared across plant families

Studies comparing two or more fruit species are usually conducted with species belonging to the same genus or family. They rely on approaches ranging from simple biochemical analysis of metabolites to a combination of omics approaches. The use of introgression lines between a cultivated and a wild fruit species will not be considered in this paragraph, although a range of interesting works contributed to decipher the complexity of sugar or carboxylic acid metabolism, especially in tomato (see Ofner et al. 2016 for a summary of *S. pennellii* introgression lines for instance).

For comparisons within a genus, the parallel study of a cultivated species and one of its close wild relatives may provide insights into the effect of domestication on a primary metabolism pathway and its regulation. For instance, large-scale resequencing of 10 wild and 74 cultivated peach cultivars allowed comparative population genomics that showed an enrichment of gene families related to the carbohydrate metabolic process and tricarboxylic acid cycle within the edible group of peach genotypes (Cao et al., 2014). This work also identified a set of domestication genes, including one encoding a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. The draft genome of peach and whole-genome resequencing of 14 *Prunus* accessions paved the way to comparative and phylogenetic analyses on manually annotated gene families among peach and other sequenced species, and enabled the identification of members with specific roles in peach metabolic processes for instance for sorbitol metabolism, and stressed common features with other Rosaceae species (The International Peach Genome Initiative et al., 2013).

Regarding another Rosaceae species, apple, a large-scale biochemical study on several hundreds of accessions, revealed that fruits of wild species showed significantly higher level of ascorbic acid than fruits of cultivated species (Fang et al., 2017). Ascorbic acid content was highly positively correlated with malic acid content, but negatively correlated with fruit weight and soluble solid content. As the expression levels of three genes involved in ascorbic acid accumulation were significantly negatively correlated with ascorbic acid contents in fruits, the latter authors suggested a feedback regulation mechanism in ascorbic acid related gene expression. They attributed the differences observed for fruit ascorbic acid content between the wild and cultivated species to an indirect consequence of human selection for increased fruit size and sweetness and decreased acidity.

For tomato, a combination of genome, transcriptome, and metabolome data from several hundreds of genotypes (wild tomato, *S. pimpinellifolium, S I.* var *cerasiforme*, and *S. lycopersicum* accessions) showed how breeding altered fruit metabolite contents (Zhu et al., 2018). During fruit-size targeted selection, the contents of hundreds of metabolites, including primary metabolites, were changed. The authors propose that the increased primary metabolite content between their big-fruit and their small-fruit accession-pools might be the consequence of a larger metabolic sink in domesticated fruits, and that a range of the related metabolic changes may not be caused by the fruit weight genes themselves but rather be the consequence of linked genes. A study involving *S. pimpinellifolium, S. lycopersicum* var *cerasiforme*, and *S. l. lycopersicum* (Ye et al., 2017) that used a metabolite-based genome-wide association study with linkage mapping and gene functional studies identified a malate transporter (SI-ALMT9) as being required for malate accumulation during ripening. It also showed that tomato domestication was associated with fixation and extension of favored alleles or mutations that increased malate accumulation.

A comparison of two citrus species, mandarin and orange with difference in ascorbate content in pulp (Yang et al., 2011) showed that higher expression of four genes along with lower activity of oxidation enzymes contributes to higher ascorbate in orange. A comparative study of two species of two different genera (Osorio et al., 2012), tomato (climacteric) and pepper (nonclimacteric), based on transcript and metabolite data, unraveled the similarities and differences of the regulatory processes underlying ethylene-mediated signaling in these two fruit types: differences in signaling sensitivity or regulators and activation of a common set of ripening genes influencing metabolic traits.

Finally, an elegant study combining species of three different genera concerns flesh acidity (Cohen et al., 2014). After map-based cloning of *C. melo PH* gene (encoding a membrane protein) from melon, metabolites that changed in a common and consistent manner between high- and low-acid fruits of three species from three different genera, melon, tomato and cucumber, were searched using metabolic profiling. Functional

silencing of orthologous *PH* genes in the latter two distantly related botanical families led to fruits with low acidity, revealing that the function of *PH* genes is conserved across plant families.

New tools are emerging for multi-species comparisons

Metabolomics profiling has been used to study fruit metabolism within and between species. Thus, comparison by metabolic profiling of 15 peach cultivars pointed to cultivar-dependent and -independent metabolic changes associated with ripening and to the identification of ripening markers (Monti et al., 2016). The latter authors propose that metabolomics, revealing compositional diversity, will help improve fruit quality. Similarly, the profiling of volatile compounds in nine fruit species revealed that differences were mostly qualitative, with only seven common compounds (Porto-Figueira et al., 2015). Classical multivariate analyses such as principal component analysis (PCA), or more elaborated ones such as STATIS, which handles multiple data tables, are being used to mine metabolite data for comparisons between species. This latter statistical analysis was used at the fruit level to compare five species based on the pattern of 16 primary metabolites, and showed that climacteric species most significantly differed from non-climacteric ones with respect to the metabolism of some sugars and amino acids (Klie et al., 2014). However, tools are still required to take full advantage of the metabolomics datasets describing fruit composition that have been or will be, collected in repositories such as Metabolights (Haug et al., 2013) or the Metabolomics Workbench (http://www.metabolomicsworkbench.org/). Although absolute quantitative data are easily reusable and comparable, this is not the gold standard for metabolomic data collected in these repositories, which are generally relative quantification datasets. Normalization methods for appropriate comparison of those data still need to be developed.

The comparative analysis of transcriptomic profiles in varieties of climacteric and non-climacteric melon has highlighted differences, in particular for genes related to ethylene biosynthesis and signalling, but also in gene expression related to sugar metabolism. Indeed, the upward regulation of a soluble (vacuolar) acid invertase could influence the sucrose content of ripe fruit and post-harvest sucrose losses in climacteric fruit, while the upward regulation of invertase inhibitors would explain the high and stable sucrose levels in the nonclimacteric variety and could be an important factor in their prolonged shelf-life (Saladié et al., 2015). A comparative study about tomato (climacteric) and pepper (non-climacteric) fruit combined analyses of transcriptomic and metabolic profiles (Osorio et al., 2012). As expected, it showed that genes involved in ethylene biosynthesis were not induced in pepper. However, genes downstream of ethylene perception, such as those implicated in fruit cell wall metabolism or carotenoid biosynthesis, were clearly induced in both Solanaceae species.

While data on fruit metabolism of different species have been accumulated through years, their use to produce knowledge is now ranging from established statistical approaches to emerging modelling ones (Beauvoit et al., 2018). Modelling approaches involve several tools such as kinetic, stoichiometric or process-based modelling. For tomato, a kinetic metabolic model pointed to the importance of vacuolar storage for sugars (Beauvoit et al., 2014). A stoichiometric model highlighted a climactic behavior as an emergent property of the metabolic system (Colombié et al., 2015). However, these properties are to be confirmed or infirmed for other fruit species. Recently, process-based models allowed the comparison of sugar concentration in fruits of four species or varieties and showed three species-related modes of sugar concentration control (Dai et al., 2016).

For genomics, a computational pipeline has been proposed to identify metabolic enzymes, pathways and gene clusters for about 20 plant species from their sequenced genome including tomato, grapevine and papaya fruit species (Schläpfer et al., 2017). Metabolic pathway databases were generated for 22 species and metabolic gene clusters were identified from 18 species. These vast resources can be used to conduct comparative studies of metabolism regulation between species, with the challenge to decipher organ specificities. Recently, an ambitious study about the evolution of fruit ripening involving transcriptomics, accessible chromatin study and histone and DNA methylation profiling of 11 fruit species revealed three types of transcriptional feedback circuits controlling ethylene-dependent fruit ripening (Lü et al., 2018). Similar approaches could highlight the circuits controlling primary metabolism during fruit growth.

However, inter-species comparisons should not be comparing apples and oranges. In this perspective, an early study highlighted the challenge of aligning the different developmental stages (Klie et al., 2014). It could be partially solved by a more systematic use of development ontologies (Jaiswal et al., 2005), or by the use of metabolic modelling along development and the comparison of model topologies and model parameters between species.

Conclusions

Although different botanical species share the same primary metabolism pathways, the regulation of these pathways is finely tuned along fruit development in particular ways in different species and results in compositional differences of the ripe fruit (Fig. 1, Table 1). These differences result from genetic and epigenetic modifications linked with evolution, adaptation of species to their environment, domestication or breeding. It seems interesting although challenging, to search whether differences between fruit species for fruit development duration are directly or indirectly related to fruit metabolic characteristics as shown for metabolic profiles and lifespan of yeast mutants (Yoshida et al., 2010), or if differences in maturation duration may be related to mitochondrial metabolism as shown for yeast mitochondrial respiration and redox state and lifespan (Barros et al., 2010). Fruit quality improvement remains one of the major objectives of recent years for breeding. Many tools have been developed to achieve this objective, for instance the use of wild genetic material, omics technology, high-throughput phenotyping or biotechnology (Gascuel et al., 2017). Possible targets to improve sugar levels for instance include adjusting the time of shifting from symplasmic to apoplasmic phloem unloading, modifying sugar vacuolar storage, increasing transient starch storage, or increasing early organic acid accumulation and late neoglucogenesis. Most of the latter targets are linked directly with primary metabolism, but fine regulation networks need further attention. In a comparative study of orange varieties (*C. sinensis*), a gene coexpression analysis showed that the sugar/acid ratio-related genes not only encoded enzymes involved in metabolism and transport but also were predicted to be involved in regulatory functions like signaling and transcription (Qiao et al., 2017).

Comparing species helps to identify metabolic factors that influence fruit growth and quality, with a view to manipulating these levels to improve fruit traits. New strategies in species comparison, for instance omics, statistics and modelling, are promising and should continue to be developed in response to the large amount of metabolic data generated by increasingly efficient quantification and identification technologies.

Table 1. Major characters linked with primary metabolism and differing between temperate fruit species. Fruit development duration in days
 post-anthesis (DPA), ripening type (climacteric or non-climacteric) and compositional characteristics of phloem sap and ripe fruit.

3

Botanical family	Species	Fruit development duration (DPA)	Climacteric ripening ^a	Major phloem transported sugar	Transient starch storage	Major soluble sugars in ripe fruit	Major organic acids in ripe fruit	Major amino acids in ripe fruit	References
Actinidiaceae	kiwifruit Actinidia deliciosa Actinidia chinensis	237	yes	sucrose	yes	glucose/fructose	quinate/citrate	aspartate	(Chen et al., 2017; Klages et al., 1998; Nardozza et al., 2013; Richardson et al., 2011)
	hardy kiwifruit (kiwai) Actinidia arguta	140	yes		yes	sucrose	quinate/citrate	-	(Kim et al., 2012; Klages et al., 1998; Mikulic-Petkovsek et al., 2012)
	cucumber <i>Cucumis sativus</i>	20	no ¹	raffinose/ stachyose/ sucrose ⁴		fructose/glucose	malate (commercial)/ citrate (physiological)	-	(Hu et al., 2009; McFeeters et al., 1982)
Cucurbitaceae	melon <i>Cucumis melo</i>	48	yes for cantaloupe no for honey dew	raffinose/ stachyose/ sucrose		sucrose	citrate	glutamate/ glutamine/ GABA	(Mitchell et al., 1992; Wang et al., 1996)
	watermelon <i>Citrullus lanatus</i>	55	no ²	raffinose /stachyose/ sucrose ³		sucrose	malate		(Gao et al., 2018; Zhang and Ge, 2016)
Ericaceae	blueberry Vaccinium corymbosum		yes ²			glucose/fructose	citrate		(Mikulic- Petkovsek et al., 2012)
Crossulariagoago	black currant <i>Ribes nigrum</i>					glucose/fructose	citrate	glutamine/ α- alanine	(Burroughs, 1960; Mikulic-Petkovsek et al., 2012)
	red currant <i>Ribes rubrum</i>					glucose/fructose	citrate	glutamine/ α- alanine	(Burroughs, 1960; Mikulic-Petkovsek et al., 2012)

	apple Malus domestica	160	yes ²	sucrose/ sorbitol ⁴	yes	fructose	malate	asparagine/ aspartate/ glutamate	(Brookfield et al., 1997; Drake and Eisele, 1999; Zhang et al. 2010)
	apricot Prunus armeniaca	65	yes ²	sucrose/ sorbitol ⁴		glucose/fructose (cv. Harcot) sucrose (cvs Bavinity & Trevatt)	citrate/malate		(Bae et al., 2014; Wills et al., 1983)
	blackberry <i>Rubus fruticosus</i>		yes/no			glucose/fructose	isocitrate	asparagine/ glutamate	(Burdon and Sexton, 1993; Burroughs, 1960; Mikulic-Petkovsek et al., 2012; Whiting, 1958)
	sweet cherry Prunus avium		no²	sucrose/ sorbitol ⁴		glucose/fructose	malate		(Usenik et al., 2008; Wills et al., 1983)
Rosaceae	chokeberry Aronia melanocarpa					sorbitol/glucose	malate		(Mikulic- Petkovsek et al., 2012)
	eastern shadbush Amelanchier canadensis					glucose/fructose /sorbitol	malate		(Mikulic- Petkovsek et al., 2012)
	peach Prunus persica	125	yes ²	sucrose/ sorbitol ⁴	yes	sucrose	malate/citrate	asparagine/ glutamate/ proline	(Moing et al., 1998; Wills et al., 1983)
	pear Pyrus communis Pyrus pyrifolia		yes ²	sucrose/ sorbitol ⁴	yes	fructose	malate/citrate	asparagine/ serine	(Chen et al., 2007; Drake and Eisele, 1999; Mesa et al., 2016)
	prune Prunus domestica			sucrose/ sorbitol ⁴		glucose/fructose /sucrose (cultivar dependent)	malate		(Wills et al., 1983)
	plum Prunus salicina	91	yes/no			glucose/fructose	quinate		(Bae et al., 2014)

	raspberry <i>Rubus idaeus</i> rowanberry		no²			glucose/fructose sorbitol	citrate malate	serine/ α- alanine	(Burroughs, 1960; Mikulic-Petkovsek et al., 2012) (Mikulic-
	Sorbus aucuparia								Petkovsek et al., 2012)
	strawberry Fragaria x ananassa	39	no²	sucrose ³	yes	glucose/fructose or glucose/fructose /sucrose cultivar dependent	citrate	asparagine/ glutamine	(Burroughs, 1960; Mikulic-Petkovsek et al., 2012; Moing et al., 2001; Souleyre et al., 2004)
	wild strawberry Fragaria vesca					glucose/fructose /sucrose	citrate		(Mikulic- Petkovsek et al., 2012)
	clementine/man darine <i>Citrus clementina</i> <i>Citrus unshiu</i>		no ²		no	sucrose	citrate		(Legua et al., 2014; Mehouachi et al., 1995)
	acidic lemon <i>Citrus limon</i>	150	no²			glucose/sucrose	citrate		(Albertini et al., 2006)
	acidless lemon <i>Citrus limon</i>	150	no ²			fructose	citrate/malate/ quinate	glutamate/ alanine	(Albertini et al., 2006; Brückner and Westhauser, 1994)
Rutaceae	acidic lime <i>Citrus latifolia</i>	150	no ²			glucose/sucrose	citrate		(Albertini et al. <i>,</i> 2006)
indiacede	acidless lime Citrus limettioides	150	no ²			fructose	citrate/malate/ quinate		(Albertini et al., 2006)
	acidic orange Citrus sinensis	150	no²			glucose/fructose	citrate		(Albertini et al. <i>,</i> 2006)
	acidless orange Citrus sinensis	150	no²	sucrose		fructose	quinate	glutamate/ alanine	(Albertini et al., 2006; Brückner and Westhauser, 1994; Hijaz and Killiny, 2014)

	eggplant Solanum melongena		yes/no			glucose/fructose	malate		(Kozukue et al., 1978; Makrogianni et al., 2017)
	pepper Capsicum chilense	70	yes/no ¹			glucose/fructose	citrate (red) malate (green)	GABA/ proline/ asparagine	(Flores et al., 2012; Osorio et al., 2012)
	goji berry Lycium barbarum					glucose/fructose	citrate/malate		(Mikulic- Petkovsek et al., 2012)
Solanaceae	cultivated tomato, <i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i>	40-60	yes ²	sucrose ⁴	yes	glucose/fructose	citrate/malate	glutamate/ glutamine	(Schaffer and Petreikov, 1997; Schauer et al., 2004)
	wild tomato, S. neorickii, S. chmielewskii, S. habrochaites S. pennellii	40-60				sucrose	citrate/malate	tryptophan (S. habrichait) aspartate (S. chmielewskii) pyoglutamate/ aspartate (S. habrochaites) GABA (S. pennellii)	(Schauer et al., 2004)
Vitaceae	grape berry Vitis vinifera	100-110	no²	sucrose	little or no	glucose/fructose	malate/tartrate	proline/ alanine/ GABA	(Dai et al., 2013; Guan et al., 2017; Ollat et al., 2002; Swanson and El- Shishiny, 1958)

^a Defined according to Barry and Giovannoni, 2007¹; Paul et al., 2012²; Rennie and Turgeon³, 2009; Fu et al., 2011⁴

Figure 1. Schema of the major physiological and metabolic differences and similarities between fleshy fruit species leading to varying fruit composition at ripe stage.



Conflict of Interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

The authors confirm being the sole contributors of this work and approved it for publication.

Funding

Lea Roch was funded by the French 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR) through the FRIMOUSS project (ANR-15-CE20-0009-01). We acknowledge the FRIMOUSS, MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010) and PHENOME (ANR-11-INBS-0012) projects for further funding.

Acknowledgments

We thank Dr Pierre Pétriacq for critical reading of the manuscript.

References

- Aharoni, A., and Galili, G. (2011). Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 239–244. doi:10.1016/j.copbio.2010.11.004.
- Albertini, M.-V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., and Berti, L. (2006). Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit. J. Agric. Food Chem. 54, 8335–8339. doi:10.1021/jf061648j.
- Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L. T., Keum, N., Norat, T., et al. (2017). Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality—a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int. J. Epidemiol.* 46, 1029–1056. doi:10.1093/ije/dyw319.
- Bae, H., Yun, S. K., Jun, J. H., Yoon, I. K., Nam, E. Y., and Kwon, J. H. (2014). Assessment of organic acid and sugar composition in apricot, plumcot, plum, and peach during fruit development. J. Appl. Bot. Food Qual. 87, 24–29. doi:10.5073/jabfq.2014.087.004.
- Baldet, P., Ferrand, C., and Rothan, C. (2014). "Vitamins in Fleshy Fruit," in *Fruit ripening*: *Physiology, Signalling and Genomics* (USA).
- Barros, M. H., da Cunha, F. M., Oliveira, G. A., Tahara, E. B., and Kowaltowski, A. J. (2010). Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. *Mech. Ageing Dev.* 131, 494–502. doi:10.1016/j.mad.2010.04.008.
- Barry, C. S., and Giovannoni, J. J. (2007). Ethylene and Fruit Ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26, 143–159. doi:10.1007/s00344-007-9002-y.
- Batz, O., Scheibe, R., and Neuhaus, H. E. (1995). Purification of chloroplasts from fruits of green pepper (*Capsicum anuum* L.) and characterization of starch synthesis. *Planta* 196, 50–57. doi:https://doi.org/10.1007/BF00193216.
- Bazzaz, F. A., Chiariello, N. R., Coley, P. D., and Pitelka, L. F. (1987). Allocating Resources to Reproduction and Defense. *BioScience* 37, 58–67. doi:10.2307/1310178.

- Beauvoit, B., Belouah, I., Bertin, N., Cakpo, C. B., Colombié, S., Dai, Z., et al. (2018). Putting primary metabolism into perspective to obtain better fruits. *Ann. Bot.* 122, 1–21. doi:10.1093/aob/mcy057.
- Beauvoit, B. P., Colombie, S., Monier, A., Andrieu, M.-H., Biais, B., Benard, C., et al. (2014). Model-Assisted Analysis of Sugar Metabolism throughout Tomato Fruit Development Reveals Enzyme and Carrier Properties in Relation to Vacuole Expansion. *Plant Cell* 26, 3224–3242. doi:10.1105/tpc.114.127761.
- Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., et al. (2013). Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics* 9, 57–77. doi:10.1007/s11306-012-0429-1.
- Berüter, J., Feusi, M. E. S., and Rüedi, P. (1997). Sorbitol and sucrose partitioning in the growing apple fruit. *J. Plant Physiol.* 151, 269–276. doi:10.1016/S0176-1617(97)80252-0.
- Beshir, W. F., and Mbong, V. B. M. (2017). Dynamic labeling reveals temporal changes in carbon Reallocation within the central metabolism of developing apple fruit. *Front Plant Sci.* 8, 1785. doi: 10.3389/fpls.2017.01785
- Biais, B., Benard, C., Beauvoit, B., Colombie, S., Prodhomme, D., Menard, G., et al. (2014). Remarkable Reproducibility of Enzyme Activity Profiles in Tomato Fruits Grown under Contrasting Environments Provides a Roadmap for Studies of Fruit Metabolism. *Plant Physiol.* 164, 1204–1221. doi:10.1104/pp.113.231241.
- Blankenship, S. M., Ellsworth, D. D., and Powell, R. (1993). A Ripening Index for Banana Fruit Based on Starch Content. *HortTechnology* 3, 338–339.
- Bonghi, C., and Manganaris, G. A. (2012). "Systems Biology Approaches Reveal New Insights into Mechanisms Regulating Fresh Fruit Quality," in OMICs Technologies - Tools for Food Science (Benkeblia N), 201–226.
- Bouché, N., and Fromm, H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9, 110–115. doi:https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.01.006.
- Braun, D. M., Wang, L., and Ruan, Y.-L. (2013). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J. Exp. Bot.* 65, 1713–1735. doi:10.1093/jxb/ert416.
- Brookfield, P., Murphy, P., Harker, R., and MacRae, E. (1997). Starch degradation and starch pattern indices; interpretation and relationship to maturity. *Postharvest Biol. Technol.* 11, 23–30. doi:10.1016/S0925-5214(97)01416-6.
- Brückner, H., and Westhauser, T. (1994). Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia* 39, 419–426. doi:10.1007/BF02278756.
- Burdon, J. N., and Sexton, R. (1993). Fruit abscission and ethylene production of four blackberry cultivars (*Rubus* spp.). *Ann. Appl. Biol.* 123, 121–132. doi:10.1111/j.1744-7348.1993.tb04079.x.
- Burroughs, L. F. (1960). The free amino-acids of certain British fruits. J. Sci. Food Agric. 11, 14–18. doi:10.1002/jsfa.2740110103.
- Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H., Matros, A., Peterek, S., et al. (2008). Enrichement of tomato fruit with healt-promoting anthocyanins by expression of selected transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 26, 1301–1308. doi:https://doi.org/10.1038/nbt.1506.
- Butowt, R., Granot, D., and Rodríguez-García, M. I. (2003). A Putative Plastidic Glucose Translocator is Expressed in Heterotrophic Tissues that do not Contain Starch, during Olive (*Olea europea* L.) Fruit Ripening. *Plant Cell Physiol.* 44, 1152–1161. doi:10.1093/pcp/pcg149.
- Cao, K., Zheng, Z., Wang, L., Liu, X., Zhu, G., Fang, W., et al. (2014). Comparative population genomics reveals the domestication history of the peach, *Prunus persica*, and human influences on perennial fruit crops. *Genome Biol.* 15, 1–15. doi:10.1186/s13059-014-0415-1.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., and Lattanzio, V. (2015). Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26378–26394. doi:10.3390/ijms161125967.
- Chen, C., Yuan, Y., Zhang, C., Li, H., Ma, F., and Li, M. (2017). Sucrose phloem unloading follows an apoplastic pathway with high sucrose synthase in *Actinidia* fruit. *Plant Sci.* 255, 40–50. doi:10.1016/j.plantsci.2016.11.011.

- Chen, J., Wang, Z., Wu, J., Wang, Q., and Hu, X. (2007). Chemical compositional characterization of eight pear cultivars grown in China. *Food Chem.* 104, 268–275. doi:10.1016/j.foodchem.2006.11.038.
- Cheng, J., Wen, S., Xiao, S., Lu, B., Ma, M., and Bie, Z. (2018). Overexpression of the tonoplast sugar transporter CmTST2 in melon fruit increases sugar accumulation. *J. Exp. Bot.* 69, 511–523. doi:10.1093/jxb/erx440.
- Cirillo, G., Curcio, M., Vittorio, O., Lemma, F., Restuccia, D., Spirizzi, U. G., et al. (2014). Polyphenol conjugates and human health: a perspective review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 326–337. doi:10.1080/10408398.2012.752342.
- Cohen, S., Itkin, M., Yeselson, Y., Tzuri, G., Portnoy, V., Harel-Baja, R., et al. (2014). The PH gene determines fruit acidity and contributes to the evolution of sweet melons. *Nat. Commun.* 5, 1– 9. doi:10.1038/ncomms5026.
- Colombié, S., Nazaret, C., Bénard, C., Biais, B., Mengin, V., Solé, M., et al. (2015). Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicon* (tomato) fruit. *Plant J.* 81, 24–39. doi:10.1111/tpj.12685.
- Dai, N., Cohen, S., Portnoy, V., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Pompan-Lotan, M., et al. (2011). Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Mol. Biol.* 76, 1–18. doi:10.1007/s11103-011-9757-1.
- Dai, Z. W., Léon, C., Feil, R., Lunn, J. E., Delrot, S., and Gomès, E. (2013). Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. J. Exp. Bot. 64, 1345–1355. doi:10.1093/jxb/ers396.
- Dai, Z., Wu, H., Baldazzi, V., van Leeuwen, C., Bertin, N., Gautier, H., et al. (2016). Inter-Species Comparative Analysis of Components of Soluble Sugar Concentration in Fleshy Fruits. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. doi:10.3389/fpls.2016.00649.
- De Angeli, A., Baetz, U., Francisco, R., Zhang, J., Chaves, M. M., and Regalado, A. (2013). The vacuolar channel VvALMT9 mediates malate and tartrate accumulation in berries of *Vitis vinifera*. *Planta* 238, 283–291. doi:10.1007/s00425-013-1888-y.
- DeBolt, S., Cook, D. R., and Ford, C. M. (2006). L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 5608–5613. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.0510864103.
- Doerflinger, F. C., Miller, W. B., Nock, J. F., and Watkins, C. B. (2015). Relationships between starch pattern indices and starch concentrations in four apple cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 110, 86–95. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.07.012.
- Drake, S. R., and Eisele, T. A. (1999). Carbohydrate and Acid Contents of Gala Apples and Bartlett Pears from Regular and Controlled Atmosphere Storage. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3181–3184. doi:10.1021/jf981228x.
- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbéguié-A-Mbéguié, D., and Bugaud, C. (2013). What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J. Exp. Bot.* 64, 1451–1469. doi:10.1093/jxb/ert035.
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J. G., and Walker, R. P. (2015). The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents – a review. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 21, 97–128. doi:10.5154/r.rchsh.2015.01.004.
- Famiani, F., Farinelli, D., Frioni, T., Palliotti, A., Batistelli, A., Moscatello, S., et al. (2016). Malate as substrate for catabolism and gluconeogenesis during ripening in the pericarp of different grape cultivars. *Biol. Plant.* 60, 155–162. doi:https://doi.org/10.1007/s10535-015-0574-2.
- Fang, T., Zhen, Q., Liao, L., Owiti, A., Zhao, L., Korban, S. S., et al. (2017). Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chem.* 225, 132–137. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.014.
- Fiehn, O. (2003). Metabolic networks of Cucurbita maxima phloem. *Phytochemistry* 62, 875–886. doi:10.1016/S0031-9422(02)00715-X.
- Fish, W. W., and Bruton, B. D. (2010). Quantification of L-citrulline and other physiologic amino acids in watermelon and various cucurbits. *Proc Amer Soc Hort Sci* 10, 152–154.

- Flores, P., Hellín, P., and Fenoll, J. (2012). Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chem.* 132, 1049–1054. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.064.
- Fraser, P., and Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43, 228–265. doi:10.1016/j.plipres.2003.10.002.
- Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y. ., Fernie, A. R., and Zamir, D. (2004). Zooming In on a Quantitative Trait for Tomato Yield Using Interspecific Introgressions. *Science* 305, 1786–1789. doi:10.1126/science.1101666.
- Fu, Q., Cheng, L., Guo, Y., and Turgeon, R. (2011). Phloem loading strategies and water relations in trees and herbaceous plants. *Plant Physiol.*, 111.184820. doi:https://doi.org/10.1104/pp.111.184820.
- Gao, L., Zhao, S., Lu, X., He, N., and Liu, W. (2018). 'SW', a New Watermelon Cultivar with a Sweet and Sour Flavor. *HortScience* 53, 895–896. doi:10.21273/HORTSCI12857-18.
- Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., and Granell, A. (2017). Use of Natural Diversity and Biotechnology to Increase the Quality and Nutritional Content of Tomato and Grape. *Front. Plant Sci.* 8, 1–24. doi:10.3389/fpls.2017.00652.
- Gonda, I., Davidovich-Rikanati, R., Bar, E., Lev, S., Jhirad, P., Meshulam, Y., et al. (2018). Differential metabolism of L-phenylalaninein the formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo*) fruit. *Phytochemistry* 148, 122–131. doi:10.1016/j.phytochem.2017.12.018.
- Gould, N., Morrison, D. R., Clearwater, M. J., Ong, S., Boldingh, H. L., and Minchin, P. E. (2013).
 Elucidating the sugar import pathway into developing kiwifruit berries (*Actinidia deliciosa*). N.
 Z. J. Crop Hortic. Sci. 41, 189–206. doi:10.1080/01140671.2013.801356.
- Gourieroux, A. M., Holzapfel, B. P., Scollary, G. R., McCully, M. E., Canny, M. J., and Rogiers, S. Y. (2016). The amino acid distribution in rachis xylem sap and phloem exudate of *Vitis vinifera* 'Cabernet Sauvignon' bunches. *Plant Physiol. Biochem.* 105, 45–54. doi:10.1016/j.plaphy.2016.04.010.
- Gritsunov, A., Peek, J., Diaz Caballero, J., Guttman, D., and Christendat, D. (2018). Structural and biochemical approaches uncover multiple evolutionary trajectories of plant quinate dehydrogenases. *Plant J.* doi:10.1111/tpj.13989.
- Guan, L., Wu, B., Hilbert, G., Li, S., Gomès, E., Delrot, S., et al. (2017). Cluster shading modifies amino acids in grape (*Vitis vinifera* L.) berries in a genotype- and tissue-dependent manner. *Food Res. Int.* 98, 2–9. doi:10.1016/j.foodres.2017.01.008.
- Guillaumie, S., Ilg, A., Réty, S., Brette, M., Trossat-Magnin, C., Decroocq, S., et al. (2013). Genetic analysis of the biosynthesis of 2-methox-3-isobutylpyrazine, a major grape-derived aroma compound impacting wine quality. *Plant Physiol.* 162, 604–615. doi:https://doi.org/10.1104/pp.113.218313.
- Hall, A. J., Minchin, P. E. H., Clearwater, M. J., and Génard, M. (2013). A biophysical model of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berry development. J. Exp. Bot. 64, 5473–5483. doi:10.1093/jxb/ert317.
- Haug, K., Salek, R. M., Conesa, P., Hastings, J., de Matos, P., Rijnbeek, M., et al. (2013). MetaboLights—an open-access general-purpose repository for metabolomics studies and associated meta-data. *Nucleic Acids Res.* 41, D781–D786. doi:10.1093/nar/gks1004.
- Hijaz, F., and Killiny, N. (2014). Collection and Chemical Composition of Phloem Sap from *Citrus* sinensis L. Osbeck (Sweet Orange). *PLoS ONE* 9, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0101830.
- Hill, S. A., and Ap Rees, T. (1994). Fluxes of carbohydrate-metabolism in ripening bananas. *Planta* 192, 52–60. doi:https://doi.org/10.1007/BF00198692.
- Hu, L., Sun, H., Li, R., Zhang, L., Wang, S., Sui, X., et al. (2011). Phloem unloading follows an extensive apoplasmic pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit from anthesis to marketable maturing stage. *Plant Cell Environ.* 34, 1835–1848. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02380.x.
- Hu, L.-P., Meng, F.-Z., Wang, S.-H., Sui, X.-L., Li, W., Wei, Y.-X., et al. (2009). Changes in carbohydrate levels and their metabolic enzymes in leaves, phloem sap and mesocarp during cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit development. *Sci. Hortic.* 121, 131–137. doi:10.1016/j.scienta.2009.01.023.

- Hubbard, N. L., Pharr, D. M., and Huber, S. C. (1990). Sucrose metabolism in ripening muskmelon fruit as affected by leaf area. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 115, 798–802.
- Hussain, S. B., Shi, C.-Y., Guo, L.-X., Kamran, H. M., Sadka, A., and Liu, Y.-Z. (2017). Recent advances in the regulation of citric Acid Metabolism in Citrus Fruit. *Crit. Rev. Plant Sci.* 36, 241–256. doi:https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402850.
- Itkin, M., Heinig, U., Tzfadia, O., Bhide, A. J., Shinde, B., Cardenas, P., et al. (2013). Biosynthesis of Antinutritional Alkaloids in Solanaceous Crops Is Mediated by Clustered Genes. *Science* 1240230. doi:10.1126/science.1240230.
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci.* 18, 477–483. doi:10.1016/j.tplants.2013.06.003.
- Jaiswal, P., Avraham, S., Ilic, K., Kellogg, E. A., McCouch, S., Pujar, A., et al. (2005). Plant Ontology (PO): a Controlled Vocabulary of Plant Structures and Growth Stages. *Comp. Funct. Genomics* 6, 388–397. doi:10.1002/cfg.496.
- Jensen, K. H., Berg-Sørensen, K., Bruus, H., Holbrook, N. M., Liesche, J., Schulz, A., et al. (2016). Sap flow and sugar transport in plants. *Rev. Mod. Phys.* 88, 035007. doi:https://doi.org/10.1103/RevModPhys.88.035007.
- Jensen, K. H., Savage, J. A., and Holbrook, N. M. (2013). Optimal concentration for sugar transport in plants. J. R. Soc. Interface 10, 20130055. doi:10.1098/rsif.2013.0055.
- Jia, D., Shen, F., Wang, Y., Wu, T., Xu, X., Zhang, X., et al. (2018). Apple fruit acidity is genetically diversified by natural variations in three hierarchical epistatic genes: *MdSAUR37*, *MdPP2CH* and *MdALMTII*. *Plant J*. 95, 427–443. doi:10.1111/tpj.13957.
- Joshi, V., and Fernie, A. R. (2017). Citrulline metabolism in plants. *Amino Acids* 49, 1543–1539. doi:10.1007/s00726-017-2468-4.
- Jourda, C., Cardi, C., Gibert, O., Giraldo Toro, A., Ricci, J., Mbéguié-A-Mbéguié, D., et al. (2016). Lineage-Specific Evolutionary Histories and Regulation of Major Starch Metabolism Genes during Banana Ripening. *Front. Plant Sci.* 7, 1–21. doi:10.3389/fpls.2016.01778.
- Katz, E., Boo, K. H., Eigenheer, R. A., Phinney, B. S., Shulaev, V., Negre-Zakharov, F., et al. (2011). Label-free shotgun proteomics and metabolite analysis reveal a significant. J. Exp. Bot. 62, 5367–5384. doi:10.1093/jxb/err197.
- Kim, J. G., Beppu, K., and Kataoka, I. (2012). Physical and compositional characteristics of 'mitsuko' and local hardy kiwifruits in Japan. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53, 1–8. doi:10.1007/s13580-012-0066-7.
- Klages, K., Donnison, H., Boldingh, H., and MacRae, E. (1998). myo-Inositol is the major sugar in Actinidia arguta during early fruit development. Aust. J. Plant Physiol. 25, 61–67. doi:10.1071/PP97052.
- Klie, S., Osorio, S., Tohge, T., Drincovich, M. F., Fait, A., Giovannoni, J. J., et al. (2014). Conserved Changes in the Dynamics of Metabolic Processes during Fruit Development and Ripening across Species. *Plant Physiol.* 164, 55–68. doi:10.1104/pp.113.226142.
- Kozukue, N., Kozukue, E., Kishiguchi, M., and Lee, S.-W. (1978). Studies on keeping-quality of vegetables and fruits. III. Changes in sugar and organic acid contents accompanying the chilling-injury of eggplant fruits. *Sci. Hortic.* 8, 19–26. doi:10.1016/0304-4238(78)90065-1.
- Kurihara, K. (2015). Umami the fith basic taste: history of studies on receptor and role as a food flavor. *BioMed Res. Int.* 2015, 189402. doi:10.1155/2015/189402.
- Legua, P., Forner, J. B., Hernández, F., and Forner-Giner, M. A. (2014). Total phenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. *Sci. Hortic.* 174, 60–64. doi:10.1016/j.scienta.2014.05.004.
- Li, D., and Zhu, F. (2017). Physicochemical properties of kiwifruit starch. *Food Chem.* 220, 129–136. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.192.
- Liesche, J., and Patrick, J. (2017). An update on phloem transport: a simple bulk flow under complex regulation. *F1000Research* 6, 1–12. doi:10.12688/f1000research.12577.1.
- Lo Bianco, R., and Rieger, M. (2002). Partitioning of Sorbitol and Sucrose Catabolism within Peach Fruit. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 127, 115–121.

- Lü, P., Yu, S., Zhu, N., Chen, Y.-R., Zhou, B., Pan, Y., et al. (2018). Genome encode analyses reveal the basis of convergent evolution of fleshy fruit ripening. *Nat. Plants* 4, 784–791. doi:10.1038/s41477-018-0249-z.
- Makrogianni, D. I., Tsistraki, A., Karapanos, I. C., and Passam, H. C. (2017). Nutritional value and antioxidant content of seed-containing and seedless eggplant fruits of two cultivars grown under protected cultivation during autumn-winter and spring-summer: Properties of seed-containing and seedless eggplants. *J. Sci. Food Agric*. 97, 3752–3760. doi:10.1002/jsfa.8238.
- Marsh, K. B., Boldingh, H. L., Shilton, R. S., and Laing, W. A. (2009). Changes in quinic acid metabolism during fruit development in three kiwifruit species. *Funct. Plant Biol.* 36, 463–470. doi:10.1071/FP08240.
- McFeeters, R. F., Fleming, H. P., and Thompson, R. L. (1982). Malic and Citric Acids in Pickling Cucumbers. J. Food Sci. 47, 1859–1861. doi:10.1111/j.1365-2621.1982.tb12899.x.
- Mechthild, T., and Hammes, U. (2018). The way out and in: phloem loading and unloading of amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 43, 16–21. doi:10.1016/j.pbi.2017.12.002.
- Mehouachi, J., Serna, D., Zaragoza, S., Agusti, M., Talon, M., and Primo-Millo, E. (1995). Defoliation increases fruit abscission and reduces carbohydrate levels in developing fruits and woody tissues of *Citrus unshiu*. *Plant Sci*. 107, 189–197. doi:10.1016/0168-9452(95)04111-7.
- Melino, V. J., Soole, K. L., and Ford, C. M. (2009). Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biol.* 9, 145. doi:10.1186/1471-2229-9-145.
- Mesa, K., Serra, S., Masia, A., Gagliardi, F., Bucci, D., and Musacchi, S. (2016). Seasonal trends of starch and soluble carbohydrates in fruits and leaves of 'Abbé Fétel' pear trees and their relationship to fruit quality parameters. *Sci. Hortic.* 211, 60–69. doi:10.1016/j.scienta.2016.08.008.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., and Veberic, R. (2012). Composition of Sugars, Organic Acids, and Total Phenolics in 25 Wild or Cultivated Berry Species. *J. Food Sci.* 77, 1064–1070. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02896.x.
- Mitchell, D. E., Gadus, M. V., and Madore, M. A. (1992). Patterns of Assimilate Production and Translocation in Muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Plant Physiol.* 99, 959–965. doi:https://doi.org/10.1104/pp.99.3.959.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. 11, 266–277. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006.
- Moing, A., Carbonne, F., Zipperlin, B., Svanella, L., and Gaudillère, J.-P. (1997). Phloem loading in peach: symplastic or apoplastic? *Physiol. Plant.* 101, 489–496. doi:https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01028.x.
- Moing, A., Renaud, C., Gaudillère, M., Raymond, P., Roudeillac, P., and Denoyes-Rothan, B. (2001). Biochemical Changes during Fruit Development of Four Strawberry Cultivars. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 126, 394–403.
- Moing, A., Svanella, L., Rolin, D., Gaudillère, J.-P., and Monet, R. (1998). Compositional Changes during the Fruit Development of Two Peach Cultivars Differing in Juice Acidity. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123, 770–775.
- Monti, L. L., Bustamante, C. A., Osorio, S., Gabilondo, J., Borsani, J., Lauxmann, M. A., et al. (2016). Metabolic profiling of a range of peach fruit varieties reveals high metabolic diversity and commonalities and differences during ripening. *Food Chem.* 190, 879–888. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.043.
- Nardozza, S., Boldingh, H. L., Osorio, S., Höhne, M., Wohlers, M., Gleave, A. P., et al. (2013). Metabolic analysis of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) berries from extreme genotypes reveals hallmarks for fruit starch metabolism. J. Exp. Bot. 64, 5049–5063. doi:10.1093/jxb/ert293.
- Nielsen, T. H., Skjaerbae, H. C., and Karlsen, P. (1991). Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiol. Plant.* 82, 311–319. doi:10.1111/j.1399-3054.1991.tb00099.x.
- Ofner, I., Lashbrooke, J., Pleban, T., Aharoni, A., and Zamir, D. (2016). *Solanum pennellii* backcross inbred lines (BILs) link small genomic bins with tomato traits. *Plant J.* 87, 151–160. doi:10.1111/tpj.13194.

- Ohkawa, W., Moriya, S., Kanahama, K., and Kanayama, Y. (2008). Re-evaluation of sorbitol metabolism in fruit from rosaceae trees. *Acta Hortic*. 772, 159–166. doi:https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.772.19.
- Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J.-P., Barrieu, F., Gaudillère, J.-P., and Moing, A. (2002). Grape berry development: A review. J. Int. Sci. Vigne Vin. 36, 109–131. doi:https://doi.org/10.20870/oeno-one.2002.36.3.970.
- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R., and 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 Physiol.* 159, 1713–1729. doi:10.1104/pp.112.199711.
- Padayachee, A., Day, L., Howell, K., and Gidley, M. J. (2017). Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 59–81. doi:10.1080/10408398.2013.850652.
- Park, S. W., Song, K. J., Kim, M. Y., Hwang, J.-H., Shin, Y. U., Kim, W.-C., et al. (2002). Molecular cloning and characterization of four cDNAs encoding the isoforms of NAD-dependent sorbitol dehydrogenase from the Fuji apple. *Plant Sci.* 162, 513–519. doi:10.1016/S0168-9452(01)00599-4.
- Patrick, J. W. (1997). Phloem Unloading: Sieve Element Unloading and Post-Sieve Element Transport. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 191–222. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.191.
- Paul, V., Pandey, R., and Srivastava, G. C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene : An overview. J. Food Sci. Technol. 49, 1–21. doi:10.1007/s13197-011-0293-4.
- Pérez, A. G., Olias, R., Luaces, P., and Sanz, C. (2002). Biosynthesis of strawberry compounds through amino acid metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4037–4042. doi:10.1021/jf011465r.
- Petreikov, M., Shen, S., Yeselson, Y., Levin, I., Bar, M., and Schaffer, A. A. (2006). Temporally extended gene expression of the ADP-Glc pyrophosphorylase large subunit (AgpL1) leads to increased enzyme activity in developing tomato fruit. *Planta* 224, 1465–1479. doi:10.1007/s00425-006-0316-y.
- Petreikov, M., Yeselson, L., Shen, S., Levin, I., Schaffer, A. A., Efrati, A., et al. (2009). Carbohydrate Balance and Accumulation during Development of Near-isogenic Tomato Lines Differing in the AGPase-L1 Allele. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 134, 134–140.
- Porto-Figueira, P., Freitas, A., Cruz, C. J., Figueira, J., and Câmara, J. S. (2015). Profiling of passion fruit volatiles: An effective tool to discriminate between species and varieties. *Food Res. Int.* 77, 408–418. doi:10.1016/j.foodres.2015.09.007.
- Prabha, T. N., and Bhagyalakshmi, N. (1998). Carbohydrate metabolism in ripening banana fruit. *Phytochemistry* 48, 915–919. doi:10.1016/S0031-9422(97)00931-X.
- Qiao, L., Cao, M., Zheng, J., Zhao, Y., and Zheng, Z.-L. (2017). Gene coexpression network analysis of fruit transcriptomes uncovers a possible mechanistically distinct class of sugar/acid ratioassociated genes in sweet orange. *BMC Plant Biol.* 17, 1–13. doi:10.1186/s12870-017-1138-8.
- Reidel, E. J., Rennie, E. A., Amiard, V., Cheng, L., and Turgeon, R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiol.* 149, 1601–1608. doi:https://doi.org/10.1104/pp.108.134791.
- Reiter, W. (2008). Biochemical genetics of nucleotide sugar interconversion reactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 236–243. doi:10.1016/j.pbi.2008.03.009.
- Reiter, W.-D. (2002). Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 536–542. doi:10.1016/S1369-5266(02)00306-0.
- Reiter, W.-D., and Vanzin, G. F. (2001). "Molecular genetics of nucleotide sugar interconversion pathways in plants," in *Plant Cell Walls*, eds. N. C. Carpita, M. Campbell, and M. Tierney (Dordrecht: Springer Netherlands), 95–113. doi:10.1007/978-94-010-0668-2_6.
- Rennie, E. A., and Turgeon, R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 14162–14167. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.0902279106.
- Richardson, A. C., Boldingh, H. L., McAtee, P. A., Gunaseelan, K., Luo, Z., Atkinson, R. G., et al. (2011). Fruit development of the diploid kiwifruit, *Actinidia chinensis* "Hort16A." *BMC Plant Biol.* 11, 182. doi:10.1186/1471-2229-11-182.

- Rodriguez-Casado, A. (2016). The Health Potential of Fruits and Vegetables Phytochemicals: Notable Examples. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1097–1107. doi:10.1080/10408398.2012.755149.
- Ruan, Y.-L., and Patrick, J. W. (1995). The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* 196, 434–444. doi:https://doi.org/10.1007/BF00203641.
- Ruan, Y.-L., Patrick, J. W., Bouzayen, M., Osorio, S., and Fernie, A. R. (2012). Molecular regulation of seed and fruit set. *Trends Plant Sci.* 17, 656–665. doi:10.1016/j.tplants.2012.06.005.
- Sadka, A., Dahan, E., Or, E., Roose, M. L., Marsh, K. B., and Cohen, L. (2001). Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. *Funct. Plant Biol.* 28, 383–390. doi:10.1071/PP00136.
- Saladié, M., Cañizares, J., Phillips, M. A., Rodriguez-Concepcion, M., Larrigaudière, C., Gibon, Y., et al. (2015). Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC Genomics* 16, 1–20. doi:10.1186/s12864-015-1649-3.
- Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K. -i., Choi, K.-B., Morishige, T., et al. (2001). Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 367–372. doi:10.1073/pnas.98.1.367.
- Schaffer, A. A., and Petreikov, M. (1997). Sucrose-to-Starch Metabolism in Tomato Fruit Undergoing Transient Starch Accumulation. *Plant Physiol.* 113, 739–746. doi:10.1104/pp.113.3.739.
- Schauer, N., Zamir, D., and Fernie, A. R. (2004). Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. J. Exp. Bot. 56, 297–307. doi:10.1093/jxb/eri057.
- Schläpfer, P., Zhang, P., Wang, C., Kim, T., Banf, M., Chae, L., et al. (2017). Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants. *Plant Physiol.* 173, 2041–2059. doi:10.1104/pp.16.01942.
- Shimada, T., Nakano, R., Shulaev, V., Sadka, A., and Blumwald, E. (2006). Vacuolar citrate/H⁺ symporter of citrus juice cells. *Planta* 224, 472–480. doi:10.1007/s00425-006-0223-2.
- Shinozaki, Y., Nicolas, P., Fernandez-Pozo, N., Ma, Q., Evanich, D. J., Shi, Y., et al. (2018). Highresolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening. *Nat. Commun.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41467-017-02782-9.
- Souleyre, E. J. F., Iannetta, P. P. M., Ross, H. A., Hancock, R. D., Shepherd, L. V. T., Viola, R., et al. (2004). Starch metabolism in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *Physiol. Plant.* 121, 369–376. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0338.x.
- Steinhauser, M. C., Steinhauser, D., Koehl, K., Carrari, F., Gibon, Y., Fernie, A. R., et al. (2010). Enzyme Activity Profiles during Fruit Development in Tomato Cultivars and Solanum pennellii. *Plant Physiol.* 153, 80–98. doi:10.1104/pp.110.154336.
- Swanson, C. A., and El-Shishiny, E. D. H. (1958). Translocation of sugars in the Concord grape. *Plant Physiol.* 33, 33.
- Sweetlove, L. J., Beard, K. F. M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., and Ratcliffe, R. G. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci.* 15, 462–470. doi:0.1016/j.tplants.2010.05.006.
- Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., and Soole, K. L. (2009). Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 70, 1329–1344. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.08.006
- Szalay, L., Ordidge, M., Ficzek, G., Hadley, P., Tóth, M., and Battey, N. H. (2013). Grouping of 24 apple cultivars on the basis of starch degradation rate and their fruit pattern. *Hortic. Sci.* 40, 93–101. doi:10.17221/143/2012-HORTSCI.
- Tegeder, M., and Hammes, U. Z. (2018). The way out and in: phloem loading and unloading of amino acids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 43, 16–21. doi:10.1016/j.pbi.2017.12.002.
- The International Peach Genome Initiative, Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., et al. (2013). The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nat. Genet.* 45, 487–494. doi:10.1038/ng.2586.

- Thevenet, D., Pastor, V., Baccelli, I., Balmer, A., Vallat, A., Neier, R., et al. (2017). The priming molecule β -aminobutyric acid is naturally present in plants and is induced by stress. *New Phytol.* 213, 552–559. doi:10.1111/nph.14298.
- Tril, U., Fernández-López, J., Pérez Alvarez, J. A., and Vuida-MArtos, M. (2014). Chemical, physiochemical, technological, antibacterialand antioxydant properties of rich-fibre powder extract obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Ind. Crops Prod.* 55, 155–162. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.047.
- Turner, W. L., and Plaxton, W. C. (2003). Purification and characterization of pyrophosphate- and ATPdependent phosphofructokinases from banana fruit. *Planta* 217, 113–121. doi:0.1007/s00425-002-0962-7.
- Usenik, V., Fabčič, J., and Štampar, F. (2008). Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 107, 185–192. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.004.
- Verpoorte, R. (2000). "Secondary Metabolism," in *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, eds. R. Verpoorte and A. W. Alfermann (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–29.
- Walker, R. P., Batistelli, A., Moscatello, S., Técsi, L., Leegood, R. C., and Famiani, F. (2015). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in grape pericarp. *Plant Physiol. Biochem.* 97, 62–69. doi:10.1016/j.plaphy.2015.09.004.
- Wang, G., Xu, M., Wang, W., and Gad, G. (2017a). Fortifying horticutural crops with essential amino acids: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1306. doi:10.3390/ijms18061306.
- Wang, H. C., Huang, H. B., Huang, X. M., and Hu, Z. Q. (2006). Sugar and acid compositions in the arils of *Litchi chinensis* Sonn.: cultivar differences and evidence for the absence of succinic acid. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 81, 57–62. doi:10.1080/14620316.2006.11512029.
- Wang, L., He, F., Huang, Y., He, J., Yang, S., Zeng, J., et al. (2018). Genome of Wild Mandarin and Domestication History of Mandarin. *Mol. Plant* 11, 1024–1037. doi:10.1016/j.molp.2018.06.001.
- Wang, L., Sun, X., Weiszmann, J., and Wolfram, W. (2017b). System-level and Granger network analysis of integrated proteomic and metabolomic dynamics identitfies key points of grape berry develoment at teh interface of primary and secondary metabolism. *Front Plant Sci.*8, 1066. doi: 10.3389/fpls.2017.01066
- Wang, P.-Y., Fang, J.-C., Gao, Z.-H., Zhang, C., and Xie, S.-Y. (2016). Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *J. Diabetes Investig.* 7, 56–69. doi:10.1111/jdi.12376.
- Wang, Y., Wyllie, S. G., and Leach, D. N. (1996). Chemical Changes during the Development and Ripening of the Fruit of *Cucumis melo* (Cv. Makdimon). J. Agric. Food Chem. 44, 210–216. doi:10.1021/jf9503568.
- Whiting, G. C. (1958). The non-volatile organic acids of some berry fruits. J. Sci. Food Agric. 9, 244–248. doi:10.1002/jsfa.2740090411.
- Wills, R. B. H., Scriven, F. M., and Greenfield, H. (1983). Nutrient composition of stone fruit (<I>Prunus</i> spp.) cultivars: Apricot, cherry, nectarine, peach and plum. J. Sci. Food Agric. 34, 1383–1389. doi:10.1002/jsfa.2740341211.
- Xiao, Y., Kuang, J., Qi, X., Ye, Y., Wu, Z.-X., Chen, J., et al. (2018). A comprehensive investigation of starch degradation process and identification of a transcriptional activator MabHLH6 during banana fruit ripening. *Plant Biotechnol. J.* 16, 151–164. doi:10.1111/pbi.12756.
- Yang, X.-Y., Xie, J.-X., Wang, F.-F., Zhong, J., Liu, Y.-Z., Li, G.-H., et al. (2011). Comparison of ascorbate metabolism in fruits of two citrus species with obvious difference in ascorbate content in pulp. J. Plant Physiol. 168, 2196–2205. doi:10.1016/j.jplph.2011.07.015.
- Yao, Y.-X., Li, M., Zhei, H., You, C.-X., and Hao, Y.-J. (2011). Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis. J Plant Physiol 168, 474–480. doi:10.1016/j.jplph.2010.08.008.
- Ye, J., Wang, X., Hu, T., Zhang, F., Wang, B., Li, C., et al. (2017). An InDel in the Promoter of Al-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9 Selected during Tomato Domestication Determines Fruit Malate Contents and Aluminum Tolerance. Plant Cell 29, 2249–2268. doi:10.1105/tpc.17.00211.

- Yelle, S., Hewitt, J. D., Robinson, N. L., Damon, S., and Bennett, A. B. (1988). Sink Metabolism in Tomato Fruit : III. Analysis of Carbohydrate Assimilation in a Wild Species. *Plant Physiol.* 87, 737–740. doi:10.1104/pp.87.3.737.
- Yoshida, R., Tamura, T., Takaoka, C., Harada, K., Kobayashi, A., Mukai, Y., et al. (2010). Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants: Semi-rational screening of ageing-related mutants. *Aging Cell* 9, 616–625. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00590.x.
- Zhang, H., and Ge, Y. (2016). Dynamics of sugar-metabolic enzymes and sugars accumulation during watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit development. *Pak. J. Bot.* 48, 2535–2538.
- Zhang, L.-Y., Peng, Y.-B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y.-F., Lu, Y.-M., et al. (2004). Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol.* 135, 574–586. doi:https://doi.org/10.1104/pp.103.036632.
- Zhang, P., Whistler, R. L., BeMiller, J. N., and Hamaker, B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydr. Polym.* 59, 443–458. doi:10.1016/j.carbpol.2004.10.014.
- Zhang, X.-Y., Wang, X.-L., Wang, X.-F., Xia, G.-H., Pan, Q.-H., Fan, R.-C., et al. (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiol.* 142, 220–232. doi:https://doi.org/10.1104/pp.106.081430.
- Zhang, Y., Li, P., and Cheng, L. (2010). Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chem.* 123, 1013–1018. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.053.
- Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2015). Secondary Cell Walls: Biosynthesis, Patterned Deposition and Transcriptional Regulation. *Plant Cell Physiol.* 56, 195–214. doi:10.1093/pcp/pcu140.
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., et al. (2018). Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell* 172, 249-261.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.12.019.

Enzyme	Abreviation	Mesure	Aubergine	Poivron
Invertase acide (avec dessalage)	AI	Indirecte	D1	D1
Invertase neutre	NI	Directe	D1	D1
Glucokinase	GK	Indirecte	D1	D1
Fructokinase	FK	Indirecte	D2	D1
ATP-Phosphofructokinase	ATP-PFK	Indirecte	D1	D1
NAD-glycéraldehyde-3- phosphase déshydrogénase	NAD-GAPDH	Indirecte	D4	-
Fructose-1,6-bisphosphate	F-1,6-Bp	Directe	-	D4
Aldolase	Aldolase	Indirecte	DZ	D4
Phospho <i>énol</i> pyruvate	PEPc	Directe	-	D2
Carboxylase		Indirecte	D2	-
Pyruvate kinase	PK	Directe	D2	D2
Citrate synthase totale	Cstot	Directe	D2	D1
Citrate synthase mitochondriale	Csmit	Directe	D1	D2
NADP-enzyme malique	NADP-ME	Directe	D1	D4
NAD-malate déshydrogénase	NAD-MDH	Directe	D4	D8
NADP-malate déshydrogénase	NADP-MDH	Directe	D1	D1
NADP-isocitrate déshydrogénase	NADP-IDH	Directe	D1	D4
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	G6PDH	Directe	D2	D8
Phosphoglucose isomérase	PGI	Directe	D8	D8
Phosphoglucomutase	PGM	Directe	D2	D8
Phosphoglycérokinase	PGK	Directe	D4	D16
Triose phosphate isomérase	TPI	Directe	D16	D32
UDP-Glucose pyrophosphorylase	UGPase	Directe	D8	D8

Annexe 2 : Tableau des dilutions utilisées pour la mesure des capacités enzymatiques pour l'aubergine et le poivron

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des paramètres d'acquisition RMN

1D (A) et 2D (B) en proton, carbone et phosphore. Avec TD la taille de la FID, D1 le délai entre deux impulsions, NS le nombre de scans, DS le nombre de scans factices, P1 la durée d'impulsion à 90° espèces dépendante et SW la largeur spectrale

Noyaux	¹ H	¹³ C { ¹ H}	¹³ C { ¹ H}	¹ H	¹ H
Nom de la séquence	zg	zgpg	dept135	cpmgpr1d (poivron)	selmlgp (aubergine)
TD	32 768	32 768 65 536		65 536	65 536
D1 (s)	25	2	2	2	2
NS	64	10 240 3 200		64	24
DS	0	0	8	16	2
P1 (µs)	8,2-9,7	15	15	9,5	9,41
SW (ppm)	12	219	180	12	12
Gain de réception, rg	28,5-90,5	2 050	2 050	128	2 050
Intérêt	Déplacement chimique des protons	Déplacement chimique des carbones	Séparation des CH ₂ (négatifs) des CH et CH ₃ (positifs)	Elimination du signal des macromolécules	lsolement d'un système de spins

Α

В

Noyaux	¹ H- ¹ H	¹ H- ¹³ C	¹ H- ¹³ C	¹ H- ¹ H	¹ H- ³¹ P
Nom de la séquence	cosygpqf	hsqcetgp	hmbcgndqf	jresgpprqf	hmbcgndqf
TD	4 096-1 024	4 096-512	2 048-1 024	8 192-32	4 096-1024
D1 (s)	2	2	2	4	1.5
NS	60	100	128	16	128
DS	16	16	16	8	16
P1 (µs)	8,2-9,7	8,2-9,7	8,2-9,7	8,2-9,7	8,2-9,7
SW (ppm)	12-12	12-220	12-220	57-114	12-30
Gain de réception, rg	114-256	2 050	2 050	80.6	2 050
Intérêt	Corrélation des déplacements chimiques entre protons voisins	Corrélation des déplacements chimiques ¹ H et ¹³ C par les couplages directs	Corrélation des déplacements chimiques ¹ H et ¹³ C par les couplages à longue distance	Couplage entre protons	Corrélation des déplacements chimiques ¹ H et ³¹ P par les couplages à longue distance

Annexe 4 : Liste des composés intermédiaires phosphorylés et des paramètres de la méthode d'analyse LC-MS/MS

Avec les valeurs des rapports masse sur charge (m/z) des 2 transitions MRM choisies pour les deux quadripôles Q1 et Q3, la première transition correspond au fragment caractéristique du groupement phosphate et la seconde est spécifique à la molécule, les temps de rétention RT, l'énergie de collision EC et le standard interne marqué utilisé pour la quantification.

Composés	Abréviation	Q1 (<i>m</i> / <i>z</i>)	Q3 (m/z)	EC (V)	RT (min)	Standard interne marqué U- ¹³ C ^c	
Glycérol-3-phosphate	Glv-3-P	171,0	78,9	-30	17,0	Glv-3-P	
	Gly 51	171,0	96,9	-22	17,0	019 5 1	
Pyrophosphate	PPi	177,0	78,9	-33	51,3	aucun ^a	
Phosphoglycérate	PGA	185,0	78,8	-35	40,6	PGA	
Thosphogrycerate	IGA	185,0	96,9	-18	40,6	IGA	
Pantosas 5 phosphata ^b	Pentoses5P	228,9	97,0	-17	31,0	Dontosos 5D	
	T entoses51	228,9	79,0	-57	31,0	T entoses51	
Mannosa 6 nhosnhata	Man6P	258,9	97,0	-24	30,6	Man6P	
Mannose-o-phosphate	Wallor	258,9	78,9	-65	30,6	Wallor	
Glucose 1 phosphate	C1P	258,9	78,9	-55	17,2	G1P	
Glucose-1-phosphale	011	258,9	97,0	-22	17,2	OII	
Clucosa 6 phosphata	C6P	258,9	97,0	-22	28,2	C6D	
Glucose-o-phosphate	Gor	258,9	78,9	-58	28,2	Gor	
Calactosa 1 phosphata	GallP	258,9	78,9	-56	16,6	GallP	
Galaciose-1-pilospilate	Gailf	258,9	97,0	-23	16,6	Gailf	
Fructose 6 phosphate	F6D	258,9	97,0	-20	29,4	F6D	
Tructose-o-phosphate	1.01	258,9	78,9	-70	29,4	1.01	
Risphosphoglycórata	dDC	265,0	78,9	-49	55,5	dDC	
	uro	265,0	97,0	-37	55,5	uru	
6 phosphogluconata	6P Cluc	275,1	97,0	-23	38,9	6D Cluc	
o-phosphogluconate	or-Oluc	275,1	79,0	-60	38,9	or-Oluc	
LIDD Clucoso	UDDC	282,0	111,0	-22	45,3		
ODF-Olucose	ODFO	282,0	240,8	-20	45,3	UDFU	
LIDP Galactore	UDPGal	282,0	111,0	-22	44,6	LIDPC 1	
ODF-Galaciose	ODFGal	282,0	240,8	-20	44,6	ODFGal	
Sedoheptulose-7-	\$7D	288,9	97,0	-24	32,6	\$7D	
phosphate	571	288,9	79,0	-70	32,6	571	
Fructose-1,6-	E 16 hD	339,1	97	-26	52,7	E 1.6 hD	
bisphosphate	1°-1,0-0F	339,1	78,9	-60	52,7	1'-1,0-0F	
Sucrosa 6 phosphate	SuceD	421,1	97,0	-36	21,3	C1D	
Sucrose-o-phosphate	Sucor	421,1	79,0	-90	21,3	GIP	
Temps (min)	A (%)	B (%)	Débit (ml/min)				
-------------	-------	-------	----------------				
0	100	0	0,35				
2	100	0	0,35				
13	95,2	4,8	0,35				
20	95,2	4,8	0,35				
32	85,5	14,5	0,35				
50	58	42	0,35				
60	0	100	0,35				
65	0	100	0,35				
65,1	100	0	0,35				
70	100	0	0,35				

Annexe 5 : Gradient d'élution utilisé pour la chromatographie liquide pour l'analyse des composés intermédiaires du métabolisme central par LC-MS/MS.

Annexe 6 : Tableaux des déplacements chimiques proton des métabolites primaires majeurs pour l'annotation des spectres RMN 1D de huit espèces de fruit

(A) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour l'**aubergine**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de proton									
			Acides organiques									
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,70 (d) CH ₂ ; 2.57 (d) CH ₂									
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH									
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,39 (dd) CH									
Quinate	$C_7H_{12}O_6$	192.167	4.15 (q) CH; 4.03 (ddd) CH; 3.56 (dd) CH; 2.06 (m) CH + CH; 1.97 (ddd) CH; 1.88 (dd) CH + CH + CH; 1.97 (ddd) CH; 1.88 (dd) CH + CH									
Shikimate	C7H10O5	174.151	6.45 (m) CH ; 4.40 (t) CH ; 2.77 (dd) CH ; 2.20 (dd) CH									
Succinate	$\mathrm{C_4H_6O_4}$	118.088	2.43 (s) CH ₂ +CH ₂									
Sucres et sucres alcool												
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4.12 (m) $^{a}CH_{+} {}^{b}CH$; 4.03 (dd) $^{a}CH_{2}$; 4.00 (m) ^{c}CH ; 3.90 (dd) ^{b}CH ; 3.82 (m) $^{a}CH + {}^{c}CH + {}^{a}CH_{2}$; 3.70 (m) $^{b}CH_{2} + {}^{a}CH_{2}$; 3.57 (m) $^{b}CH_{2}$									
a-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5,24 (d) C H- α									
β-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4,65 (d) C <mark>H-β</mark>									
Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	$ \begin{array}{l} \textbf{5.24 (d) CH-}\alpha \ \textbf{; 4.65 (d) CH-}\beta \ \textbf{; 3.90 (dd) }^{\text{c}}\text{CH}_2 \ \textbf{; 3.84 (m) }^{\text{s}}\text{CH}_2 \ \textbf{+ }^{\text{s}}\text{CH} \ \textbf{; 3.74 (m) }^{\text{s}}\text{CH}_2 \ \textbf{+ }^{\text{b}}\text{CH} \ \textbf{; 3.53 (dd) }^{\text{c}}\text{CH} \ \textbf{; 3.48 (m) }^{\text{c}}\text{CH} \ \textbf{; 3.41 (m) CH} \ \textbf{; 3.25 (dd) }^{\text{c}}\text{CH} \end{array} $									
Inositol	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4.07 (t) CH ; 3,63 (t) CH + CH ; 3,53 (dd) CH + CH ; 3,29 (t) CH									
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.89 (m) CH + CH ; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH ; 3.69 (s) CH ₂ ; 3.56 (dd) CH ; 3.48 (t) CH									
Acides aminés												
Acetyl-choline	C7H16NO2	146.207	3.22 (s) CH₃ + CH₃ + CH₃ ; 2.15 (s) CH ₃									
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89.083	1.49 (d) CH ₃									
Arginine	$C_6 H_{14} N_4 O_2$	174.201	1.70 (m) CH ₂									
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,86 (dd) CH									
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH ; 2,70 (dd) CH									
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.21 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃									
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH₂ ; 2.31 (t) CH₂ ; 1.91 (m) CH₂									
Glutamate	$C_5H_9NO_4$	147.129	2.36 (m) CH₂ ; 2.11 (m) CH₂									
Glutamine	$C_5 H_{10} N_2 O_3$	146.145	2.45 (m) CH₂ ; 2.13 (m) CH₂									
Histamine	C5H9N3	111.145	8.44 (m) CH ; 7.31 (m) CH ; 3.34 (t) CH ₂ ; 3.14 (t) CH ₂									
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH ₃ ; 0.94 (d) CH ₃									
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	0.96 (t) CH ₃ + CH ₃									
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.189	7.43 (m) CH + CH ; 7.38 (m) CH + CH ; 7.33 (d) CH + CH ; 3.22 (m) CH ₂									
Putrescine	$C_4 H_{12} N_2$	88.152	1.77 (m) CH ₂ + CH ₂									
Pyroglutamate	C ₅ H ₇ NO ₃	129.114	4.18 (dd) CH ; 2.50 (m) CH ; 2.40 (m) CH ₂ ; 2.03 (m) CH									
Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	137.136	9.12 (s) CH ; 8.83(m) CH + CH ; 8.08 (m) CH ; 4.44 (s) CH ₃									
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH₃ + CH₃ ; 1.00 (d) CH₃ + CH₃ ; 2.28 (m) CH									
			Composés phénoliques									
Chlorogénate	C16H18O9	354.309	7.65 (d) CH ; 7.20 (d) CH ; 7.12 (dd) CH ; 6.95 (d) CH ; 6.40 (d) CH ; 5.33 (m) CH ; 2.20 (m) CH									
			Autres composés									
UDPG	C15H24N2O17P2	566.302	7.95 (d) CH ; 5.98 (m) CH + CH ; 5.61 (dd) CH									

(B) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour le **poivron**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de proton						
			Acides organiques						
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,70 (d) CH ₂ ; 2.57 (d) CH ₂						
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH						
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,39 (dd) CH						
Quinate	$C_{7}H_{12}O_{6}$	192.167	4.15 (q) CH ; 4.03 (ddd) CH ; 3.56 (dd) CH ; 2.06 (m) CH + CH ; 1.97 (ddd) CH ; 1.88 (dd) CH						
Succinate	$C_4H_6O_4$	118.088	2.43 (s) CH ₂ +CH ₂						
			Sucres et sucres alcool						
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	$ \begin{array}{l} \textbf{4.12 (m) }^{a}\textbf{CH} + {}^{b}\textbf{CH} \ ; \ 4.03 \ (dd) {}^{a}\textbf{CH}_{2} \ ; \ 4.00 \ (m) {}^{c}\textbf{CH} \ ; \ 3.90 \ (dd) {}^{b}\textbf{CH} \ ; \ 3.82 \ (m) {}^{a}\textbf{CH} + {}^{c}\textbf{CH} + {}^{a}\textbf{CH}_{2} \ ; \ 3.70 \ (m) {}^{b}\textbf{CH}_{2} + {}^{a}\textbf{CH}_{2} \ ; \ 3.57 \ (m) {}^{b}\textbf{CH}_{2} \end{array} $						
α-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	5,24 (d) CH-α						
β-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4,65 (d) CH-β						
Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5.24 (d) CH- α ; 4.65 (d) CH- β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.85 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.74 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.54 (dd) ^a CH ; 3.48 (m) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^a CH						
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4.07 (t) CH ; 3,63 (t) CH + CH ; 3,29 (t) CH						
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.89 (m) CH + CH ; 3.83 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH ; 3.69 (s) CH ₂ ; 3.56 (dd) CH ; 3.48 (t) CH						
			Acides aminés et composés azotés						
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89.083	1.49 (d) CH ₃						
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH						
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH ; 2,70 (dd) CH						
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.20 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃						
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH₂ ; 2.31 (t) CH₂						
Glutamate	$C_5H_9NO_4$	147.129	2.36 (m) CH₂ ; 2.11 (m) CH ₂						
Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.145	2.46 (m) CH₂ ; 2.15 (m) CH ₂						
Histidine	C6H9N3O2	155.155	8.42 (d) CH ; 7.30 (d) CH						
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH ₃ ; 0.94 (d) CH ₃						
Ketoleucine	C6H10O3	130.142	0.93 (d) CH ₃ + CH ₃						
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	0.96 (t) CH ₃ + CH ₃						
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.189	7.42 (m) CH + CH						
Putrescine	$C_4H_{12}N_2$	88.152	1.77 (m) CH ₂ + CH ₂						
Tryptophane	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.225	7.73 (d) CH ; 7.54 (d) CH ; 7.32 (s) CH ; 7.28 (m) CH ; 7.19 (m) CH						
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH₃ + CH₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃						
			Composés phénoliques						
Chlorogénate	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.309	7.64 (d) CH						
			Aures composes						
UDPG	C15H24N2O17P2	566.302	7.95 (d) CH ; 5.61 (dd) CH						

(C) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour le **concombre**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique ($d^{1}H$ en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de proton					
			Acides organiques					
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,74 (d) CH ₂					
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH					
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,41 (dd) CH					
Succinate	$C_4H_6O_4$	118.088	2.42 (s) CH ₂ +CH ₂					
			Sucres et sucres alcool					
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	$ \begin{array}{c} \textbf{4.12 (m)} \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH} + \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH} \ ; \ \textbf{4.03 (dd)} \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH}_2 \ ; \ \textbf{4.00 (m)} \ ^{\mathrm{c}}\textbf{CH} \ ; \ \textbf{3.90 (dd)} \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH} \ ; \ \textbf{3.82 (m)} \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH} + \ ^{\mathrm{c}}\textbf{CH} + \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH}_2 \ ; \ \textbf{3.70 (m)} \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH}_2 + \ ^{\mathrm{b}}\textbf{CH}_2 \ ; \ \textbf{3.70 (m)} \ 3.7$					
α-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5,24 (d) CH-a					
β-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	4,65 (d) C Π-β					
Glucose	$\mathrm{C_6H_{12}O_6}$	180.156	5.24 (d) CH- α ; 4.65 (d) CH- β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.84 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.74 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.53 (dd) ^c CH ; 3.48 (m) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^c CH					
β-Galactose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5,27 (d) C H; 4,59 (d) CH					
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4.07 (t) CH ; 3,63 (t) CH + CH ; 3,29 (t) CH					
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH ; 3.68 (s) CH ₂ ; 3.56 (dd) CH ; 3.48 (t) C					
			Acides aminés et composés azotés					
Acetyl-choline	C7H16NO2	146.207	3.22 (s) CH₃ + CH₃ + CH₃ ; 2.16 (s) CH ₃					
Alanine	$C_3H_7NO_2$	89.083	1.48 (d) CH ₃					
Arginine	$C_{6}H_{14}N_{4}O_{2}$	174.201	1.70 (m) CH ₂					
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH					
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH ; 2,69 (dd) CH					
Citrulline	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175.186	1.90 (m) CH ₂ ; 1.59 (m) CH ₂					
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.20 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃					
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH ₂ ; 2.31 (t) CH ₂ ; 1.91 (m) CH ₂					
Glutamate	$C_5H_9NO_4$	147.129	2.36 (m) CH₂ ; 2.10 (m) CH ₂					
Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.145	2.46 (m) CH₂ ; 2.15 (m) CH ₂					
Histidine	C6H9N3O2	155.155	8.32 (d) CH ; 7.26 (d) CH					
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH ₃ ; 0.94 (d) CH ₃					
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	0.96 (t) CH ₃ + CH ₃					
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.189	7.43 (m) CH + CH ; 7.38 (m) CH ; 7.33 (d) CH + CH					
Pyroglutamate	C ₅ H ₇ NO ₃	129.114	4.18 (dd) CH ; 2.50 (m) CH ; 2.40 (m) CH ₂ ; 2.03 (m) CH					
Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	137.136	9.13 (s) CH ; 8.84(m) CH + CH ; 8.09 (m) CH ; 4.44 (s) CH ₃					
Tryptophane	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.225	7.74 (d) CH ; 7.55 (d) CH					
Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.189	7.20 (m) CH + CH ; 6.91 (m) CH + CH ; 3.06 (dd) CH ₂					
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH₃ + CH₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃					
			Autres composés					
UDPG	C15H24N2O17P2	566.302	7.95 (d) CH ; 5.98 (m) CH + CH ; 5.61 (dd) CH					

(D) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour la **pomme**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en pp m $\rm D_2O$ pH 6), Multiplicité et nombre de proton						
			Acides organiques						
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2.57 (d) CH ₂						
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH						
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,30 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH ; 2,38 (dd) CH						
Quinate	$C_{7}H_{12}O_{6}$	192.167	4.15 (q) CH ; 2.06 (m) CH + CH ; 1.97 (ddd) CH ; 1.88 (dd) CH						
Succinate	$C_4H_6O_4$	118.088	2.42 (s) CH ₂ +CH ₂						
			Sucres et sucres alcool						
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	4.12 (m) ${}^{a}CH + {}^{b}CH$; 4.03 (dd) ${}^{a}CH_{2}$; 4.00 (m) ${}^{c}CH$; 3.90 (dd) ${}^{b}CH$; 3.82 (m) ${}^{a}CH + {}^{c}CH + {}^{a}CH_{2}$; 3.70 (m) ${}^{b}CH_{2} + {}^{a}CH_{2}$; 3.57 (m) ${}^{b}CH_{2}$						
a-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5,24 (d) CH-α						
β-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4,65 (d) CH-β						
Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5.24 (d) CH- α ; 4.65 (d) CH- β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.84 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.74 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.53 (dd) ^c CH ; 3.48 (m) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^c CH						
Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	5,27 (d) CH; 4,59 (d) CH						
Inositol	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	3,63 (t) CH + CH ; 3,28 (t) CH						
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.89 (m) CH + CH ; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH ; 3.69 (s) CH ₂ ; 3.50 (d) CH ; 3.48 (t) CH						
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150.13	5,20 (d) CH ; 4,58 (d) CH ; 3.33 (dd) CH ; 3.22 (dd) CH						
			Acides aminés et composés azotés						
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89.083	1.49 (d) CH ₃						
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH						
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH ; 2,69 (dd) CH						
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.20 (s) $CH_3 + CH_3 + CH_3$						
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH ₂ ; 2.30 (t) CH ₂ ; 1.90 (m) CH ₂						
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH₃ ; 0.95 (d) CH ₃						
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.189	7.43 (m) CH + CH ; 7.39 (m) CH ; 7.33 (d) CH + CH						
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH₃ + CH₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃						
			Composés phénoliques						
Chlorogénate	$C_{16}H_{18}O_9$	354.309	7.68 (d) CH ; 7.22 (d) CH ; 7.15 (dd) CH ; 6.97 (d) CH ; 6.42 (d) CH ; 5.33 (m) CH ; 2.17 (m) CH						

(E) Tableau regroupantles composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour la **pêche**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D_2O pH 6), Multiplicité et nombre de proton						
			Acides organiques						
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,68 (d) CH ₂ ; 2.57 (d) CH ₂						
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH						
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,30 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,37 (dd) CH						
Quinate	$C_{7}H_{12}O_{6}$	192.167	4.15 (q) CH : 2.06 (m) CH + CH : 1.97 (ddd) CH : 1.88 (dd) CH						
Succinate	$C_4H_6O_4$	118.088	2.42 (s) CH ₂ +CH ₂						
			Sucres et sucres alcool						
Fructose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156							
α-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5,24 (d) CH-α						
β-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4,65 (d) CH-β						
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5.24 (d) CH- <i>u</i> ; 4.65 (d) CH- β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.84 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.74 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.53 (dd) ^c CH ; 3.60 (dd) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^c CH						
Galactose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5,27 (d) CH; 4,59 (d) CH						
Inositol	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	3,63 (t) CH + CH ; 3,28 (t) CH						
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH; 4.06 (t) CH; 3.89 (m) CH + CH; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH; 3.69 (s) CH ₂ ; 3.56 (d) CH; 3.48 (t) CH						
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150.13	5,20 (d) CH ; 4,58 (d) CH ; 3.33 (dd) CH ; 3.22 (dd) CH						
			Acides aminés et composés azotés						
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89.083	1.49 (d) CH ₃						
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH						
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH						
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	2.30 (t) CH ₂						
Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.145	2.46 (m) CH ₂						
Phénylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	165.189	7.43 (m) CH + CH ; 7.39 (m) CH; 7.33 (d) CH + CH						
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.00 (d) $CH_3 + CH_3$						

(F) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour le **kiwi**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de proton						
			Acides organiques						
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,69 (d) CH ₂ ; 2.57 (d) CH ₂						
Isocitrate	$C_6H_8O_7$	192.124	3.04 m) CH; 2.52 (dq) CH ₂						
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,38 (dd) CH						
Quinate	C7H12O6	192.167	4.15 (q) CH ; 4.03 (ddd) CH ; 3.56 (dd) CH ; 2.06 (m) CH + CH ; 1.97 (ddd) CH ; 1.88 (dd) CH						
Shikimate	C7H10O5	174.151	6.45 (m) CH ; 4.40 (t) CH ; 2.76 (dd) CH						
			Sucres et sucres alcool						
Fructose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4.12 (m) ${}^{a}CH + {}^{b}CH$; 4.03 (dd) ${}^{a}CH_{2}$; 4.00 (m) ${}^{c}CH$; 3.90 (dd) ${}^{b}CH$; 3.81 (m) ${}^{a}CH + {}^{c}CH + {}^{a}CH_{2}$; 3.70 (m) ${}^{b}CH_{2} + {}^{a}CH_{2}$; 3.57 (m) ${}^{b}CH_{2}$						
α-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5,24 (d) CH-α						
β-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	4,65 (d) CH-β						
Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5.24 (d) CH-α ; 4.65 (d) CH-β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.84 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.74 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.53 (dd) ^c CH ; 3.48 (m) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^c CH						
Galactose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5,27 (d) CH ; 4,59 (d) CH						
Inositol	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4.07 (t) CH ; 3,63 (t) CH + CH ; 3,53 (dd) CH + CH ; 3,29 (t) CH						
Raffinose			5 d; 5.43 d						
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.89 (m) CH + CH ; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.76 (t) CH ; 3.68 (s) CH ₂ ; 3.56 (d) CH ; 3.48 (t) CH						
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150.13	5,20 (d) CH : 4,58 (d) CH : 3.33 (dd) CH						
			Acides aminés et composés azotés						
Alanine	$C_3H_7NO_2$	89.083	1.49 (d) CH ₃						
Arginine	$C_6H_{14}N_4O_2$	174.201	1.70 (m) CH ₂						
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH						
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH						
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH ₂ ; 2.30 (t) CH ₂ ; 1.91 (m) CH ₂						
Glutamate	C ₅ H ₉ NO ₄	147.129	2.36 (m) CH₂ ; 2.11 (m) CH ₂						
Glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.145	2.45 (m) CH₂ ; 2.14 (m) CH ₂						
Isoleucine	$C_6H_{13}NO_2$	131.173	1.01 (d) CH ₃						
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH ₃ + CH ₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃						

(G) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour la **clémentine**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de proton							
			Acides organiques							
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,69 (d) CH ₂ ; 2,56 (d) CH ₂							
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,39 (dd) CH							
Quinate	$C_7H_{12}O_6$	192.167	4.15 (q) CH ; 4.03 (ddd) CH ; 3.56 (dd) CH ; 2.06 (m) CH + CH ; 1.97 (ddd) CH ; 1.88 (dd) CH							
			Sucres et sucres alcool							
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	4.12 (m) ${}^{a}CH + {}^{b}CH$; 4.03 (dd) ${}^{a}CH_{2}$; 4.00 (m) ${}^{c}CH$; 3.90 (dd) ${}^{b}CH$; 3.81 (m) ${}^{a}CH + {}^{c}CH + {}^{a}CH_{2}$; 3.70 (m) ${}^{b}CH_{2} + {}^{a}CH_{2}$; 3.57 (m) ${}^{b}CH_{2}$							
a-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	5,24 (d) CH-α							
β-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	4,65 (d) CH-β							
Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5.24 (d) CH- α ; 4.65 (d) CH- β ; 3.90 (dd) ⁶ CH ₂ ; 3.84 (m) ⁶ CH ₂ + ⁶ CH ; 3.74 (m) ⁸ CH ₂ + ⁶ CH ; 3.53 (dd) ⁶ CH ; 3.48 (m) ⁶ CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ⁶ CH							
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.156	3,63 (t) CH + CH							
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH ; 4.06 (t) CH ; 3.89 (m) CH + CH ; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH ; 3.68 (s) CH ₂ ; 3.56 (dd) CH ; 3.48 (t) CH							
			Acides aminés et composés azotés							
Acetyl-choline	C7H16NO2	146.207	3.22 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃							
Alanine	$C_3H_7NO_2$	89.083	1.49 (d) CH ₃							
Arginine	$C_{6}H_{14}N_{4}O_{2}$	174.201	1.70 (m) CH ₂							
Asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.118	2,96 (dd) CH ; 2,87 (dd) CH							
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH							
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.20 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃							
Dimethylproline	C ₇ H ₁₃ NO ₂	148.184	4.09 (t) CH ; 3.30 (s) CH ₃ ; 3.11 (s) CH ₃ ; 2.50 (m) CH ; 2.29 (m) CH ; 2.18 (m) CH ₂							
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.01 (t) CH ₂ ; 2.30 (t) CH ₂ ; 1.90 (m) CH ₂							
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH₃ ; 0.95 (d) CH ₃							
Phénylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.189	7.42 (m) CH + CH							
Putrescine	$C_4 H_{12} N_2$	88.152	3.06 (t) CH ₂ + CH ₂ ; 1.77 (m) CH ₂ + CH ₂							
Proline	C ₅ H ₉ NO ₂	115.131	3.34 (dt) CH ; 2.38 (m) CH ; 2.01 (m) CH + CH ₂							
Trigonelline	$C_7H_7NO_2$	137.136	9.12 (s) CH ; 8.84(m) CH + CH ; 4.44 (s) CH ₃							
Tyramine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.189	7.22 (m) CH + CH ; 6.91 (m) CH + CH							
Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.146	1.05 (d) CH ₃ + CH ₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃							
			Composés phénoliques							
Synephrine	C9H13NO2	167.205	7.34 (d) CH + CH ; 6.95 (d) CH+CH ; 5.00 (dd) CH ; 3.30 (m) ; 2.78 (s) CH ₃							

(H) Tableau regroupant les composés primaires majeurs identifiés en RMN ¹H avec des déplacements chimiques en proton pour le **raisin**

Métabolites	Formule Brute	Masse molaire	Déplacement chimique (d ¹ H en ppm D ₂ O pH 6), Multiplicité et nombre de protons					
			Acides organiques					
Citrate	$C_6H_8O_7$	192.124	2,70 (d) CH ₂ ; 2.57 (d) CH ₂					
Fumarate	$C_4H_4O_4$	116.072	6,53 (s) CH + CH					
Malate	$C_4H_6O_5$	134.087	4,31 (dd) CH ; 2,68 (dd) CH; 2,38 (dd) CH					
Shikimate	C7H10O5	174.151	6.45 (m) CH ; 4.41 (t) CH ; 2.77 (dd) CH ; 2.20 (dd) CH					
Succinate	$C_4H_6O_4$	118.088	2.43 (s) CH ₂ +CH ₂					
Tartrate	C4H6O6	150.087	4.34 (s) CH +CH					
			Sucres et sucres alcool					
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4.12 (m) ${}^{a}CH + {}^{b}CH$; 4.03 (dd) ${}^{a}CH_{2}$; 4.00 (m) ${}^{c}CH$; 3.90 (dd) ${}^{b}CH$; 3.81 (m) ${}^{a}CH + {}^{c}CH + {}^{a}CH_{2}$; 3.70 (m) ${}^{b}CH_{2} + {}^{a}CH_{2}$; 3.57 (m) ${}^{b}CH_{2}$					
a-Glucose	$C_{6}H_{12}O_{6}$	180.156	5,24 (d) CH-α					
β-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	4,65 (d) CH-β					
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.156	5.24 (d) CH-α ; 4.65 (d) CH-β ; 3.90 (dd) ^a CH ₂ ; 3.85 (m) ^a CH ₂ + ^a CH ; 3.75 (m) ^a CH ₂ + ^b CH ; 3.54 (dd) ^a CH ; 3 (m) ^a CH ; 3.41 (m) CH ; 3.25 (dd) ^a CH					
Inositol	$C_6H_{12}O_6$	180.156	3,63 (t) CH + CH ; 3,29 (t) CH					
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.297	5.42 (d) CH ; 4.22 (d) CH; 4.06 (t) CH; 3.82 (m) CH ₂ + CH ₂ ; 3.77 (t) CH; 3.69 (s) CH ₂ ; 3.56 (dd) CH; 3.48 (t) CH					
			Acides aminés et composés azotés					
Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂	89.083	1.49 (d) CH ₃					
Arginine	$C_6H_{14}N_4O_2$	174.201	1.70 (m) CH ₂					
Aspartate	$C_4H_7NO_4$	133.103	2,82 (dd) CH					
Choline	C ₅ H ₁₄ NO	104.171	3.20 (s) CH ₃ + CH ₃ + CH ₃					
GABA	$C_4H_9NO_2$	103.12	3.02 (t) CH₂ ; 2. 30 (t) CH ₂ ; 1.91 (m) CH ₂					
Histidine	C6H9N3O2	155.155	8.36 (d) CH ; 7.20 (d) CH					
Isoleucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	1.01 (d) CH ₃ ; 0.94 (d) CH ₃					
Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.173	0.97 (t) CH ₃ + CH ₃					
Proline	$C_5H_9NO_2$	115.131	3.34 (dt) CH ; 2.35 (m) CH ; 2.04 (m) CH + CH ₂					
Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	137.136	9.12 (s) CH ; 8.83(m) CH + CH ; 8.07 (m) CH ; 4.44 (s) CH ₃					
Tyrosine	$C_9H_{11}NO_3$	181.189	7.20 (m) CH + CH					
Valine	$C_5H_{11}NO_2$	117.146	1.05 (d) CH₃ + CH₃ ; 1.00 (d) CH ₃ + CH ₃					

				Analyse spectrophotométriques ciblées										Paramètres de croissance					
JAA	Croissance	Espèces	Botanique	Glucose	Fructose	Sucrose	Citrate	Malate	Acides aminés totaux	Proteines	Amidon	Ascorbate total	Ascorbate réduit	Ascorbate oxydé	Poids du fruit (g)	Vitesse de croissance (g/Jour)	RGR (g/g/Jour)	% MS	
5	Init	Poivron	Herbacé	142.96	165.87	89.46	79.84	129.06	392.40	71.57	155.44	42.53	37.48	5.05	0.19	0.33	0.21	12.46	
20	Vmax/2	Poivron	Herbacé	821.72	625.65	10.78	14.68	143.54	212.85	55.83	11.37	63.85	62.25	1.59	46.88	6.28	0.18	6.97	
30	Vmax	Poivron	Herbacé	1000.39	725.20	14.40	19.87	114.17	242.04	44.75	36.26	75.10	72.33	2.76	123.19	11.42	0.08	6.76	
40	Maturation	Poivron	Herbacé	1106.46	766.29	62.26	38.60	101.52	278.18	36.61	49.14	81.53	81.02	0.50	231.93	2.93	0.01	6.75	
76	Mûr	Poivron	Herbacé	1371.50	1111.60	123.79	66.85	7.96	165.64	23.75	4.23	97.89	97.41	0.47	205.63	0.00	0.00	10.14	
4	Init	Aubergine	Herbacé	361.75	351.62	70.51	31.16	81.33	298.17	85.28	21.49	21.00	16.20	4.80	1.29	1.87	0.21	9.44	
18	Vmax/2	Aubergine	Herbacé	1265.61	805.50	80.66	21.11	96.91	336.84	53.86	20.61	11.40	4.92	6.48	194.91	28.05	0.18	7.06	
25	Vmax	Aubergine	Herbacé	1436.09	883.53	88.34	31.95	107.79	292.58	38.85	13.95	8.70	2.82	5.87	418.65	52.75	0.12	6.73	
30	Maturation	Aubergine	Herbacé	1426.73	814.39	70.65	19.24	143.92	405.28	32.82	18.68	9.83	3.12	6.71	681.33	43.39	0.06	6.38	
59	Mûr	Aubergine	Herbacé	1421.72	921.08	32.60	117.82	80.61	424.47	8.07	6.37	8.70	2.68	5.91	1135.46	0.16	0.00	5.45	
26	Vmax/2	Kiwi	Vigne	456.51	49.50	24.57	16.45	117.29	76.18	38.87	88.29	156.30	156.30	0.00	14.54	1.25	0.09	7.67	
39	Vmax	Kiwi	Vigne	562.34	15.50	29.12	42.57	202.13	85.86	24.39	76.57	199.10	196.47	2.63	38.63	1.85	0.05	6.99	
118	Maturation	Kiwi	Vigne	174.65	100.26	45.14	274.06	116.10	36.77	10.51	1487.29	44.29	44.29	0.00	92.70	0.37	0.00	14.27	
222	Mûr	Kiwi	Vigne	1007.65	655.04	193.84	225.29	156.16	17.17	10.02	24.75	33.02	33.02	0.00	106.10	0.01	0.00	16.19	
2	Init	Concombre	Herbacé	214.01	264.55	21.89	29.02	488.88	256.36	144.80	89.20	32.08	23.78	8.29	3.24	1.93	0.26	6.05	
12	Vmax/2	Concombre	Herbacé	1242.38	991.35	4.00	12.65	371.79	596.89	50.10	1.86	15.16	12.03	3.13	143.44	40.06	0.28	3.97	
18	Vmax	Concombre	Herbacé	1074.88	906.32	3.13	26.87	378.05	606.65	30.82	1.37	10.03	8.73	1.31	516.73	68.02	0.13	3.81	
25	Maturation	Concombre	Herbacé	1130.85	972.99	0.95	29.21	518.30	876.63	22.15	0.00	9.40	9.40	0.00	765.91	15.23	0.02	2.92	
29	Mûr	Concombre	Herbacé	1285.08	1101.67	0.00	17.29	528.25	915.78	22.23	3.72	9.05	7.83	1.22	864.10	4.27	0.01	2.91	
2	Init	Pomme	Arbre	112.10	107.55	190.90	6.81	235.08	320.66	48.23	134.82	8.84	8.00	0.84	0.04	0.07	0.05	24.41	
63	Vmax/2	Pomme	Arbre	626.60	1045.61	105.30	2.69	1219.83	236.52	4.13	415.12	9.31	10.95	0.00	35.34	1.53	0.05	12.69	
94	Vmax	Pomme	Arbre	406.02	1383.97	112.79	1.83	570.11	103.87	4.65	653.39	6.13	4.97	1.16	105.64	3.08	0.03	15.21	
122	Maturation	Pomme	Arbre	316.43	1502.98	251.54	2.10	531.05	68.63	4.03	683.33	7.25	2.27	4.98	175.41	1.86	0.01	16.95	
157	Mûr	Pomme	Arbre	382.31	1618.78	499.88	2.06	409.29	42.66	4.28	370.64	2.13	1.87	0.26	212.51	0.38	0.00	18.25	
22	Init	Pêche	Arbre	96.90	133.10	93.85	42.77	163.23	385.91	67.84	116.13	9.28	8.74	0.54	0.04	0.01	0.09	16.09	
86	Vmax/2	Pêche	Arbre	784.79	593.13	503.40	140.33	327.51	209.74	6.82	4.61	0.31	0.00	0.31	63.60	3.54	0.05	11.54	
98	Vmax	Pêche	Arbre	588.48	503.18	815.30	98.43	204.07	161.45	8.64	2.60	0.14	0.06	0.08	136.79	6.04	0.05	12.03	
106	Maturation	Pêche	Arbre	659.28	559.58	903.55	111.62	221.68	176.76	9.72	2.98	0.16	0.06	0.11	178.97	6.08	0.03	13.49	
133	Mûr	Pêche	Arbre	459.91	527.17	1717.07	27.59	191.23	119.09	7.56	3.12	1.40	1.13	0.28	276.02	1.10	0.00	15.82	
30	Init	Clémentine	Arbre	4.48	0.00	27.88	0.00	21.62	153.78	41.25	7.43	31.23	27.55	3.68	0.21	0.02	0.03	31.33	
119	Vmax/2	Clémentine	Arbre	247.00	204.46	275.50	288.11	78.89	117.01	17.57	5.63	29.66	29.66	0.00	12.33	0.50	0.04	17.41	
160	Vmax	Clémentine	Arbre	653.94	634.79	1010.15	447.19	100.83	132.76	9.52	5.37	14.57	14.57	0.00	49.80	1.09	0.02	11.38	
190	Maturation	Clémentine	Arbre	592.26	633.80	1262.87	207.01	138.89	116.08	10.82	8.60	14.30	14.30	0.00	76.44	0.70	0.01	10.90	
253	Mûr	Clémentine	Arbre	695.15	720.12	1164.53	91.90	87.09	115.77	7.77	3.55	15.98	15.98	0.00	72.06	-0.65	-0.01	11.70	
4	Init	Raisin	Vigne	26.97	27.56	35.13	12.20	76.22	148.30	71.66	8.30	38.02	34.45	2.86	0.02	0.00	0.09	10.92	
14	Vmax/2	Raisin	Vigne	114.38	37.85	45.94	9.60	279.69	93.30	57.75	8.33	60.92	58.26	2.66	0.09	0.02	0.21	8.27	
21	Vmax	Raisin	Vigne	169.09	33.77	139.79	21.82	716.88	70.86	31.80	8.67	27.74	25.54	2.20	0.39	0.05	0.12	6.85	
63	Maturation	Raisin	Vigne	1518.99	1270.77	191.95	13.04	349.58	30.09	14.66	0.31	1.53	1.53	0.00	1.09	0.03	0.02	14.79	
105	Mûr	Raisin	Vigne	1676.76	1400.85	244.82	11.77	55.12	34.26	9.29	1.12	1.98	1.71	0.27	1.40	0.00	0.00	24.51	

(A) Tableau des regroupant les métabolites primaire majeurs mesurés par spectrophotométrie et les paramètres de croissance des fruits

Annexe 7: Tableau des moyennes des teneurs des composés quantifiés dans les huit espèces de fruit pour cinq stades de développement

sélectionnés (µmol.g⁻¹.MS)

	1			Parois cellulaires								FAMEs								
JAA	Croissance	Espèces	Botanique	Fucose	Rhamnose	Arabinose	Galactose	Xylose	Mannose	Galacturonate	Glucuronat e	Glucose	Cellulose	C16:0	C18:0	C18:1 cis-9	C18:2 cis- 9,12	C18:3 cis- 9,12,15	C20:0	C24:0
5	Init	Poivron	Herbacé	4.31	92.25	163.65	214.56	77.38	29.45	124.83	13.59	195.61	504.68	21.22	4.80	1.77	31.21	9.18	1.64	1.26
20	Vmax/2	Poivron	Herbacé	3.27	85.25	127.83	499.48	108.91	57.21	208.52	9.16	186.17	865.57	13.30	3.91	2.10	22.10	7.27	0.62	0.61
30	Vmax	Poivron	Herbacé	3.52	77.12	120.58	489.87	123.15	67.97	225.18	7.54	233.79	985.57	9.87	3.12	1.30	19.92	4.99	0.47	0.45
40	Maturation	Poivron	Herbacé	3.29	63.73	107.83	433.06	124.50	57.59	282.08	5.95	270.07	907.96	8.38	3.15	0.90	18.28	4.83	0.43	0.36
76	Mûr	Poivron	Herbacé	4.03	54.38	75.58	105.83	107.26	55.13	232.69	6.36	110.39	1005.78	11.54	3.58	1.27	23.16	13.12	0.68	0.24
4	Init	Aubergine	Herbacé	3.44	66.22	139.59	346.10	87.95	41.04	122.52	25.44	67.53	402.44	20.39	6.54	5.96	13.00	5.19	1.09	0.70
18	Vmax/2	Aubergine	Herbacé	2.92	67.57	145.01	636.01	153.31	69.45	207.30	17.25	117.47	756.21	9.65	3.68	1.81	4.77	1.30	0.71	0.50
25	Vmax	Aubergine	Herbacé	3.01	65.33	136.20	653.79	166.98	59.96	285.81	15.85	129.59	828.96	6.57	2.96	1.58	2.42	0.67	0.56	0.36
30	Maturation	Aubergine	Herbacé	2.74	65.12	127.95	680.31	195.64	65.23	356.60	16.98	152.44	982.93	5.68	2.99	0.68	2.28	0.68	0.53	0.36
59	Mûr	Aubergine	Herbacé	3.97	65.66	67.29	444.38	181.88	56.32	330.59	6.46	74.91	916.66	1.82	3.00	0.27	2.35	0.55	0.49	0.16
26	Vmax/2	Kiwi	Vigne	8.48	54.03	82.96	510.31	134.74	50.11	200.35	8.02	169.73	843.62	13.90	2.25	2.40	12.09	7.77	0.70	0.24
39	Vmax	Kiwi	Vigne	12.77	47.02	65.77	547.82	152.57	52.34	216.52	8.53	219.46	907.34	8.16	1.19	1.68	7.24	4.39	0.49	0.00
118	Maturation	Kiwi	Vigne	5.24	16.51	21.52	202.55	72.92	22.19	77.60	2.55	300.59	277.60							
222	Mûr	Kiwi	Vigne	16.32	46.04	53.27	257.19	243.19	53.63	273.82	6.66	260.87	964.73	2.31	0.36	1.48	2.32	4.91	0.10	0.00
2	Init	Concombre	Herbacé	10.66	40.08	99.22	225.64	61.10	35.49	103.67	10.97	51.26	322.54	34.97	3.52	2.41	23.58	38.63	0.00	1.17
12	Vmax/2	Concombre	Herbacé	13.58	36.53	61.71	503.76	118.53	70.46	146.11	8.40	128.35	815.31	12.56	1.25	1.96	7.82	9.13	0.00	0.61
18	Vmax	Concombre	Herbacé	15.49	32.22	50.14	538.65	126.29	76.78	143.79	7.76	131.69	873.41	8.88	1.26	1.04	5.96	3.03	0.00	0.00
25	Maturation	Concombre	Herbacé	15.20	29.22	44.56	418.23	120.42	71.58	149.40	4.52	124.37	801.33	8.39	1.22	0.26	5.28	2.78	0.00	0.00
29	Mûr	Concombre	Herbacé	15.77	32.75	52.02	324.59	134.61	73.33	183.12	9.63	122.46	945.26	8.46	1.49	0.00	4.27	2.03	0.00	0.00
2	Init	Pomme	Arbre	10.89	40.86	243.65	129.57	135.03	29.23	47.23	14.93	150.41	672.99	21.72	2.95	2.73	30.67	29.97	1.85	0.41
63	Vmax/2	Pomme	Arbre	22.27	43.68	335.96	431.24	102.24	65.23	165.51	9.73	604.28	1020.47	4.57	0.78	0.32	7.40	3.08	0.33	0.00
94	Vmax	Pomme	Arbre	13.97	27.36	194.71	315.36	71.05	46.01	91.91	11.22	780.23	553.30	3.13	0.64	0.11	4.66	1.65	0.22	0.00
122	Maturation	Pomme	Arbre	16.86	26.28	180.86	293.83	83.83	33.07	121.55	8.36	852.31	373.70	2.50	0.40	0.00	3.86	1.20	0.17	0.00
157	Mûr	Pomme	Arbre	27.44	40.79	258.84	294.72	140.42	26.85	187.17	3.23	997.51	323.24	2.59	0.48	0.00	4.37	1.05	0.17	0.00
22	Init	Pêche	Arbre	14.86	56.68	281.16	204.88	55.65	21.12	106.14	9.29	96.67	411.66	31.69	4.52	4.22	46.11	26.05	1.48	0.48
86	Vmax/2	Pêche	Arbre	29.26	67.67	417.76	511.88	155.18	64.64	204.07	23.99	106.58	756.59	3.88	0.86	1.66	5.40	1.94	0.31	0.00
98	Vmax	Pêche	Arbre	34.97	68.81	436.73	457.26	164.74	63.24	205.04	28.66	133.68	735.73	4.78	0.69	1.97	6.85	2.61	0.23	0.00
106	Maturation	Pêche	Arbre	34.86	69.51	426.46	377.93	160.89	59.58	239.70	17.83	145.15	670.27	3.97	0.46	1.88	4.65	1.77	0.16	0.00
133	Mûr	Pêche	Arbre	32.05	63.69	369.51	210.55	130.07	34.26	283.39	13.58	138.54	703.70	3.02	0.34	0.00	4.58	1.16	0.00	0.00
30	Init	Clémentine	Arbre	9.40	543.80	184.10	136.45	39.36	23.24	54.08	5.27	531.82	273.43	12.79	1.32	1.92	13.93	10.69	0.27	0.43
119	Vmax/2	Clémentine	Arbre	17.22	207.39	421.01	364.28	108.51	55.65	237.40	8.65	220.42	659.75	7.41	0.51	1.71	10.72	4.52	0.00	0.00
160	Vmax	Clémentine	Arbre	16.44	68.00	432.22	290.57	67.61	45.92	228.71	16.58	98.26	464.11	4.11	0.00	2.04	5.48	2.23	0.00	0.00
190	Maturation	Clémentine	Arbre	20.04	64.00	384.97	286.56	78.02	45.32	247.28	17.52	86.34	651.20	4.26	0.00	2.58	4.33	3.41	0.00	0.00
253	Mûr	Clémentine	Arbre	19.30	66.42	266.63	279.58	75.57	41.03	186.32	17.12	96.37	461.17	3.63	0.00	2.83	4.24	3.67	0.00	0.00
4	Init	Raisin	Vigne	11.45	45.91	81.74	226.49	58.16	31.08	68.63	11.14	43.35	242.70	22.78	2.60	4.16	30.07	15.25	0.78	0.68
14	Vmax/2	Raisin	Vigne	11.74	41.90	78.78	255.75	69.55	42.38	70.04	8.82	53.10	292.90	17.44	2.48	3.33	22.61	11.81	0.63	0.72
21	Vmax	Raisin	Vigne	17.08	49.34	101.32	294.37	119.96	68.59	116.05	9.31	72.90	512.60	10.78	2.17	3.05	13.68	7.49	0.47	0.81
63	Maturation	Raisin	Vigne	14.06	45.30	132.73	103.82	124.06	52.98	193.22	7.42	60.70	455.37	3.61	0.45	1.47	4.08	2.15	0.14	0.37
105	Mûr	Raisin	Vigne	12.66	47.56	156.47	86.65	101.54	48.02	135.96	11.00	115.03	640.85	2.59	0.42	0.89	3.02	1.08	0.11	0.15

(B) Tableau des regroupant les monomères des parois cellulaire et les acides gras

Annexe 8 : Evolution des concentrations des métabolites au cours du développement des fruits (μ mol/g MF)



(A) Profils des évolutions des métabolites au cours du développement de l'aubergine en µmol/g MF





(B) Profils des évolutions des métabolites au cours du développement du **poivron** en µmol/g MF



Annexe 9 : Evolution des quantités de métabolites par fruit au cours du développement des fruits (μ mol/fruit)



(A) Profils des évolutions des métabolites au cours du développement de l'aubergine en µmol/fruit





(B) Profils des évolutions des métabolites au cours du développement du poivron en µmol/fruit



Annexe 10 : Evolution des monomères des parois au cours du développement des fruits en (µmol/g MF) et (µmol/fruit)



(A) Profils des évolutions des monomères des parois au cours du développement de l'aubergine en μ mol/g MF

(B) Profils des évolutions des monomères des parois au cours du développement de l'aubergine en μ mol/fruit



(C) Profils des évolutions des monomères des parois au cours du développement du **poivron** en μ mol/g MF



(D) Profils des évolutions des monomères des parois au cours du développement du **poivron** en μ mol/fruit



Annexe 11 : Evolution des intermédiaires du métabolisme central au cours du développement des fruits en µmol/g MF







(B) Profils des évolutions intermédiaires du métabolisme au cours du développement du **poivron** en μ mol/g MF

Annexe 12 : Evolution des intermédiaires du métabolisme central au cours du développement des fruits en µmol/fruit



(A) Profils des évolutions intermédiaires du métabolisme au cours du développement de l'aubergine en µmol/fruit

DPA



(B) Profils des évolutions intermédiaires du métabolisme au cours du développement du **poivron** en µmol/fruit

Annexe 13 : Evolution des capacités enzymatiques au cours du développement du fruit en nmol/min/g MF

(A) Profils des évolutions des capacités enzymatiques au cours du développement de l'**aubergine** en nmol/min/ g MF





(B) Profils des évolutions des capacités enzymatiques au cours du développement du **poivron** en nmol/min/ g MF

Résumé: Le marché mondial des fruits représente des centaines de milliards d'euro par an et l'amélioration de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits est l'un des principaux objectifs de ces dernières années. Le métabolisme primaire est une cible toute trouvée pour tenter de répondre à ces exigences. En effet c'est lui qui va fournir les briques nécessaires à la croissance et au développement, mais également les composés qui confèrent les valeurs gustatives tels que les sucres et les acides organiques. C'est pourquoi la compréhension de son fonctionnement au cours du développement des fruits est nécessaire. Pour cela le métabolisme primaire a été étudié chez huit espèces de fruits charnus qui diffèrent en termes de durée de développement, de taille de fruit, de famille botanique, de qualité gustative (sucrosité, acidité...), et sujettes ou non à une crise respiratoire au début de la maturation. Des données physiologiques et biochimiques ont été collectées tout au long du développement du fruit, de l'anthèse à la maturité physiologique. La modélisation de la croissance des fruits a permis de standardiser les stades de développement et ainsi d'améliorer la comparaison entre espèces. La composition de la biomasse a ensuite été caractérisée qualitativement et quantitativement par des approches analytiques ciblées et non ciblées mettant en évidence les similitudes et les différences de composition et d'évolution au cours du développement. Des modèles linéaires généralisés combinant la composition et les données de croissance ont été utilisés pour comparer différentes phases de développement du fruit et une analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) a permis de séparer les fruits climactériques des non climactériques. Dans les deux cas les composés des parois cellulaires, les protéines et les lipides interviennent dans la différentiation des groupes. Enfin, une étude détaillée du métabolome et de l'activome du fruit a été réalisée chez trois espèces de Solanacées. Elle montre qu'au sein d'une même famille botanique la régulation diffère au cours du développement, notamment au niveau du métabolisme des sucres et de la glycolyse. Ces travaux revisitent le caractère climactérique des fruits, le positionnant bien en amont du déclenchement de la crise respiratoire, et, plus généralement, permettent de mieux comprendre le métabolisme primaire au cours du développement du fruit.

Mots clés: Fruit, métabolisme primaire, développement, métabolomique

Abstract: The world fruit market represents hundreds of billions of euros per year and improving the organoleptic and nutritional quality of fruit has been one of the main objectives in recent years. Primary metabolism is a target that can be used to try and meet these requirements. Indeed, it provides the bricks necessary for growth and development but also the compounds that contribute to taste such as sugars and organic acids. Therefore, it is necessary to understand how it operates during fruit development. For this purpose, primary metabolism has been studied in eight species of fleshy fruits that differ in terms of development duration, fruit size, botanical family, taste quality (sweetness, acidity, etc.), and are subject or not to a respiratory crisis at the initiation of ripening. Physiological and biochemical data have been collected throughout the fruit development from anthesis to physiological maturity. Fruit growth modelling allowed standardizing the stages of development and thus improved comparison between species. The composition of biomass was then characterized qualitatively and quantitatively by targeted and non-targeted analytical approaches highlighting similarities and differences in composition and changes during development. Generalized linear models combining composition and growth data were used to compare different phases of fruit development and a discriminant partial least square regression analysis (PLS-DA) was used to separate climacteric and non-climacteric fruits. In both cases, cell wall compounds, proteins and lipids were involved in group differentiation. Finally, a detailed study of the fruit metabolome and activome was performed in three species of Solanaceae. It revealed that within the same botanical family, regulation differs during development, particularly for sugar metabolism and glycolysis. This work revisits the climacteric character of fruits, positioning it long before the onset of the respiratory crisis, and, more generally, provides a better understanding of primary metabolism during fruit development.

Keywords: Fruit, primary metabolism, development, metabolomics

Unité de recherche

UMR1332, BFP, 71 av Edouard Bourlaux, 33140 Villenave d'Ornon