

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN ASPECTS CELLULAIRES ET
MOLECULAIRES DE LA BIOLOGIE
Mention : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement par
MARIE DURAND-HULAK
Le 17 Décembre 2015

Etude des interactions climat radiatif x géotypes sur la
concentration en flavonoïdes des fruits chez des agrumes
diploïdes et tétraploïdes.

Directeurs :

M Yann Froelicher, Dr-HDR, CIRAD de Corse
Mme Anne-Laure Fanciullino, Dr, INRA Avignon

Rapporteurs :

Mme Claudine Campa, DR, IRD Montpellier
M Jean-Luc Regnard, Professeur, Supagro Montpellier

Jury :

Mme Claudine Campa, DR, IRD Montpellier
M Jean-Luc Regnard, Professeur, Supagro Montpellier
Mme Liliane Berti, Professeur, Université de Corse - Pascal Paoli
M Julien Paolini, Dr-HDR, Université de Corse - Pascal Paoli
M Yann Froelicher, Dr-HDR, CIRAD de Corse
Mme Anne-Laure Fanciullino, Dr, INRA Avignon

Résumé

Les composés phénoliques, au potentiel antioxydant important, sont généralement associés à l'effet protecteur d'une alimentation riche en végétaux. Ils contribuent également à la qualité organoleptique des fruits et légumes et participent à la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Les agrumes, première production fruitière mondiale, représentent une source importante en composés phénoliques. Dans le contexte agrumicole actuel, l'amélioration de la qualité organoleptique et nutritionnelle des fruits ainsi que l'amélioration de la résistance des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques sont des axes majeurs pour les sélectionneurs. Les composés phénoliques constituent donc une cible privilégiée pour la sélection des agrumes. Cependant, la régulation de l'accumulation des composés phénoliques ainsi que leurs rôles physiologiques restent mal compris chez les agrumes. Par ailleurs, la création variétale passe par l'obtention d'individus tétraploïdes, via le doublement d'un génome ou l'addition de deux génomes. Or, l'effet de la ploïdie sur la composition en composés phénoliques demeure peu connu. Afin d'acquérir de nouvelles connaissances sur ces sujets, nous avons d'abord mis au point une méthode d'analyse haut débit des composés phénoliques par chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS). Par cette méthode validée sur 4 tissus, 64 métabolites appartenant à 6 classes chimiques différentes ont pu être analysés simultanément en 20 minutes. Cette mise au point a permis de cartographier les profils en composés phénoliques de 11 espèces du genre *Citrus*, d'améliorer les classifications phylogénétiques basées sur cette famille de composés, et d'identifier les étapes de la voie de biosynthèse impliquées dans la variabilité phénotypique observée. Nous avons ensuite appliqué cette méthode pour étudier la variabilité des profils en flavonoïdes chez des agrumes diploïdes, diploïdes doublés, et issus d'hybridations somatiques. Cette étude a permis de vérifier que certains génotypes, notamment les oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck), n'accumulaient pas de flavonoïdes néohespéridosides aux saveurs amères, alors que les pomélos (*C. paradisi* Macf.) en accumulaient en grande quantité. De plus, nous avons mis en évidence que le doublement de génome n'entraînait pas de changement important dans le profil d'accumulation des flavonoïdes glycosylés alors que l'addition de génome pouvait induire des sur-accumulations transgressives de ces composés. L'analyse de deux gènes codant pour les rhamnosyle transférases, impliquées dans la formation des néohespéridosides et des rutinosides, n'a pas permis de valider ce niveau de régulation, mais a suggéré d'autres mécanismes régulant l'accumulation des flavonoïdes glycosylés chez l'hybride somatique allotétraploïdes. Enfin, nous avons étudié la réponse de deux génotypes de *Citrus* soumis à une contrainte abiotique, les UV-B, et la dépendance de cette réponse au niveau de ploïdie. Durant le traitement UV-B appliqué en serre, et après l'arrêt du traitement, nous avons analysé les profils en flavonoïdes des feuilles adultes et en croissance. Notre étude a révélé que, contrairement aux génotypes diploïdes, les génotypes polyploïdes n'étaient que faiblement affectés par les UV-B. Les fortes teneurs en flavonoïdes filtrant les UV-B combinées aux concentrations élevées en dérivés de quercétine et lutéoline, ayant des activités antioxydantes, pourraient être impliquées dans l'atténuation de l'effet des UV-B chez les polyploïdes. L'induction des gènes *F3H* et *DFR* et l'augmentation des dérivés de quercétine et des anthocyanes sous l'action des UV-B pourraient apporter un effet protecteur vis-à-vis d'autres contraintes abiotiques et biotiques. En conclusion, cette cartographie des profils en composés phénoliques chez différentes espèces du genre *Citrus*, à différents niveaux de ploïdie, dans différents organes et tissus, et en situation de contrainte abiotique, apporte de nouvelles connaissances tant fondamentales (meilleure compréhension de la régulation de voie de biosynthèse) que finalisées (caractérisation phénotypique du nouveau matériel polyploïde créé). L'étude du fonctionnement de *Citrus* tétraploïdes en situation de contrainte a confirmé leur intérêt comme nouvel outil dans les systèmes de productions soumis à des contraintes croissantes et a permis de dégager de nouvelles pistes quant aux mécanismes impliqués dans leur vigueur.

Mots clés : *Citrus*, tétraploïdes, hybrides somatiques, flavonoïdes, rayonnement UV-B

Abstract

Phenolic compounds have important antioxidant properties and are generally associated with the protective effect of diets rich in fruits and vegetables. They also contribute to their organoleptic quality and participate to plant response to biotic and abiotic stresses. Citrus fruits are one of the most important fruit crops in the world. Thus, they represent an important nutritional source of phenolic compounds. In the current context of citrus crop, improving the organoleptic and nutritional qualities of fruit as well as the improvement of plant resistance to biotic and abiotic constraints are priorities for breeders. Phenolic compounds are therefore an important target for citrus selection. However, the regulation of the phenolic compounds accumulation in citrus as well as their physiological roles remain unclear. Moreover, citrus breeding involves selection of tetraploid cultivars. In case of tetraploidy, we have to distinguished, doubled diploids from somatic hybrid coming from genome addition. However, the effect of ploidy on the composition of phenolic compounds remains not well understood. To address these issues, we first developed a high-throughput method for the analysis of phenolic compounds by ultra high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with mass spectrometry (MS). This method was validated on 4 tissues and allowed the analysis of 64 metabolites belonging to 6 different chemical classes simultaneously, in 20 minutes. This method allowed us to map the phenolic compound profiles of 11 *Citrus* species, to improve phylogenetic classifications based on those compounds and to identify the steps of the biosynthetic pathway involved in the phenotypic variability. We then applied this method to study the variability of flavonoid profiles in *Citrus* diploids, doubled diploid and coming from somatic hybridization. This study highlighted that some genotypes, including oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck) did not accumulate flavonoid-neohesperidosides with bitter flavors, while grapefruits (*C. paradisi* Macf.) accumulated those molecules in large quantities. In addition, we have shown that genome doubling did not cause significant changes in the accumulation of glycosylated flavonoids while genome addition can induce transgressive over-accumulation of these compounds. The analysis of two genes encoding rhamnosyl transferases and involved in rutinoid and neohesperidosides formation, failed to validate this level of regulation but suggested other mechanisms regulating the accumulation of glycosylated flavonoids in the allotetraploid. Finally, we studied the response of two *Citrus* genotypes subjected to abiotic stress, UV-B, and the dependence of this response on ploidy level. We analyzed flavonoid profiles in growing and mature leaves during UV-B treatment, applied in greenhouses, and after the end of the treatment. Our study revealed that unlike diploids, polyploids were weakly affected by UV-B. The high levels of flavonoids screening UV-B combined with high concentrations of quercetin and luteolin derivatives, with antioxidant activity, may buffer the negative effect of UV-B radiation in polyploids. The induction of *DFR* and *F3H* genes and the rise in anthocyanins and quercetin derivatives under the action of UV-B may help to prevent other biotic and abiotic stresses. In conclusion, mapping phenolic profiles in different *Citrus* species, with different ploidy levels, in several organs and tissues, and under abiotic constraint, brings insights into fundamental knowledge (better understanding of the biosynthetic pathway regulation) as well as applied knowledge (phenotypic characterization of new polyploid materials). Studying the functioning of *Citrus* tetraploids under abiotic stress validated them as a promising tool to manage abiotic and biotic constraints and paves the way for the identification of some mechanisms involved in their vigor.

Key words: *Citrus*, tetraploids, somatic hybrids, flavonoids, UV-B radiation