

Université Bordeaux 1

Année 2006

Thèse n° 3162

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1

Mention : Science du Vivant, Géosciences, Sciences de l'Environnement

Option : Science des Aliments

Présentée et soutenue publiquement le 30 Mai 2006

Par

Moftah Mohamed Alhagdow

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA GDP-D-MANNOSE-3,5-
EPIMERASE ET GALACTONO-1,4-LACTONE DESHYDROGENASE,
ENZYMES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA VITAMINE C CHEZ LA
TOMATE.**

Membres du jury :

M.	J.P. Renaudin	Président
Mme	M. Causse	Rapporteur
M.	C. Alban	Rapporteur
M.	A. Fernie	Examineur
M.	C. Rothan	Examineur
M.	P. Gallusci	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire de Physiologie et Biotechnologie
Végétales (UMR 619 INRA-UB1-UB2) sous l'encadrement du Dr. Pierre Baldet.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR Physiologie et Biotechnologie Végétales du Centre de Recherches INRA de Bordeaux sous la direction de Pierre Baldet. Je tiens à lui exprimer ma plus profonde gratitude pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, pour son immense implication, d'avoir suivi le déroulement de mon travail avec patience et optimisme, pour l'aide précieuse qu'il m'a accordé et pour son soutien aussi bien professionnel que personnel pendant toutes ces années passées ensemble. Je garderai en mémoire son amitié.

Je remercie Mr Christophe Rothan de m'avoir accueillie dans son groupe et pour avoir suivi mon travail et pour l'aide précieuse qu'il m'a accordé.

Je remercie Mrs Philippe Raymond, Armand Mouras et Dominique Rolin, directeurs successifs de l'UMR pour m'avoir accordé tous les moyens aussi bien matériels qu'intellectuels pour réaliser ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mme Mathilde Causse et Mrs Philippe Gallusci, Jean-Pierre Renaudin, Claude Alban et Alisdair Fernie pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier à Mrs Alisdair Fernie et Adriano Nunes-Nesi du Max-Planck-Institut pour leur précieuse collaboration dans l'analyse par GC-MS des plantes, ainsi que Marc Lahaye et son équipe à l'INRA de Nantes pour leur précieuse collaboration dans l'analyse immuno-cytochimique des plantes.

Il est très difficile de remercier toutes les personnes impliquées dans un travail aussi long mais je tiens à apporter toute mon amitié à Cécile Cabasson, Johann Petit, Virginie Garcia, Catherine Cheniclet, Michel Hernould, Christian Chevalier, Daniel Just, Alain Roos, Monique Gaudillère, Christelle Renaud, Patricia Coat, Véronique Germain et Martine Lemaire pour leur disponibilité et leur aide dans ce travail.

Les autres personnes indispensables à la vie du laboratoire sont bien entendu les étudiants et les thésards, je voudrais remercier Frédéric Delmas qui a déjà passé le cap et Fabien Mounet, Adrien Sicard, Anne Pribat qui vont bientôt le passer.

J'associe à ces remerciements tous ceux qui de près ou de loin m'ont permis de mener à terme mes travaux.

Enfin, je dédie cette thèse à ma chère femme Amal en témoignage de ma profonde affection. Bien sûr, je n'oublie pas mes enfants, Ahmed, Alaa et Ayoub, qu'ils retrouvent ici ma profonde gratitude car leur insouciance d'enfant m'a été très précieuse au cours de cette thèse. Je ne saurais oublier d'exprimer mon amour et ma reconnaissance à mes parents.

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I. INTRODUCTION	1
1- La Tomate	1
1.1. Identification de la tomate et son importance	1
1.2. Historique et production mondiale	2
1.3. La qualité de la tomate et sa valeur nutritionnelle	3
1.4. Structure et développement du fruit de tomate	5
1.4.1. Structure du fruit de tomate	5
1.4.2. Le développement du fruit de tomate	7
1.4.2.1. Le développement précoce	7
1.4.2.1.a. La mise à fruit	7
1.4.2.1.b. La phase de division cellulaire	9
1.4.2.1.c. La phase d'expansion cellulaire	11
1.4.2.2.. La maturation du fruit de tomate	11
2- La vitamine C : Structure, biosynthèse et fonction dans la cellule	14
2.1. Structure de la vitamine C	14
2.2. Production d'acide ascorbique	16
2.2.1. Synthèse chimique	16
2.2.2. La biosynthèse de l'acide ascorbique	16
2.2.2.1. Biosynthèse du D-erythroascorbate chez la levure	16
2.2.2.2. Biosynthèse de l'ascorbate chez les animaux	16
2.2.2.3. Biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes	18
2.2.2.3.1. Voie Smirnoff	18
2.2.2.3.1.a. GDP-D-Mannose pyrophosphorylase.	20
2.2.2.3.1.b. GDP-D-Mannose 3,5-épimérase	22
2.2.2.3.1.c. L-galactose déshydrogénase	22
2.2.2.3.1.d. L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase	24
2.2.2.3.2. Autres voies de biosynthèse de l'ascorbate	27
2.3. Rôle de la vitamine C dans la cellule	30
2.3.1. La vitamine C et la nutrition humaine	30
2.3.2. Rôle de l'ascorbate chez les plantes	32
2.3.2.1. L'antioxydant : acide ascorbique	32
2.3.2.2. Le rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse	35
2.3.2.3. Rôle de l'Ascobate dans la croissance et le développement des plantes	37
2.3.2.3.a. Rôles de l'ascorbate dans la division cellulaire	38
2.3.2.3.b. Rôles de l'ascorbate dans l'expansion cellulaire	40

2.3.2.4. Rôles de l'ascorbate dans la réponse hypersensible et les interactions plante-pathogène	41
Présentation et objectif du travail de thèse	43
CHAPITRE II. RESULTATS ET DISCUSSION	45
Transgénèse pour des enzymes du métabolisme de l'ascorbate chez la tomate	45
1^{ère} Partie. Caractérisation des transformants pour la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH)	48
ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA GALACTONO-1,4-LACTONE DESHYDROGENASE DE TOMATE	52
Silencing of the key ascorbic acid enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) affects plant and fruit development in tomato.	54
2. Résultats complémentaires.	96
2.1. Détermination du nombre de copies du gène <i>GalLDH</i> par Southern et cartographie	96
2.2. Caractérisation des profils d'accumulation de l'ascorbate au cours du développement du fruit et d'expression des transcrits GalLDH en relation avec la taille du fruit chez plusieurs génotypes de tomate	96
2.3. Effet de la suppression de l'expression du gène <i>GalLDH</i> sur l'accumulation des transcrits de la GDP-mannose pyrophosphorylase et la GDP-mannose-3,5-épimérase, deux enzymes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate	98
2.4. Etude de la localisation cellulaire de l'ascorbate dans les tissus du fruit de tomate	100
2.5. Effet de la suppression de l'expression de la GalLDH sur la photosynthèse, la respiration des plantes et la production d'éthylène chez le fruit	100
2^{ème} Partie. Caractérisation des transformants pour la GDP-mannose épimérase (GME)	105
The GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) enzyme is essential for ascorbate biosynthesis and plays a key role in the control of cell wall mannan content in tomato	111
3^{ème} Partie. Caractérisation des transformants pour la GDP mannose pyrophosphorylase (GMP) Et pour l'ascorbate oxydase (AO)	145
A. Caractérisation des transformants pour la GDP mannose pyrophosphorylase (GMP)	145
B. Caractérisation des transformants pour l'ascorbate oxydase (AO)	149
CHAPITRE III. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152

CHAPITRE IV . MATERIEL ET METHODES	158
I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE	158
1. Matériel végétal et conditions de culture	158
2. Souches bactériennes et milieux de culture	158
3. Plasmides recombinants utilisés	160
II MÉTHODE D'ANALYSE HISTOLOGIQUE	162
1- Protocole expérimental de marquage histochimique pour la localisation de l'ascorbate	162
2- Méthode de détection <i>in vivo</i> de l'H ₂ O ₂	164
3. Méthode d'analyse de la taille des cellules	164
3.1. Méthode d'analyse de la taille des cellules du péricarpe du fruit de tomate	164
3.2. Méthode d'analyse de la taille des cellules épidermiques de feuille	165
III. CYTOMÉTRIE EN FLUX	166
1- Extraction des noyaux des cellules de feuilles de tomate	166
2- Analyse par cytométrie en flux	166
IV. MÉTHODES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES	167
1. Extraction des acides nucléiques	167
1.1. Extraction d'ADN génomique de feuille de tomate	167
1.2. Extraction d'ADN plasmidique	168
1.3. Extraction d'ARN totaux des feuilles de tomate	168
1.4. Extraction d'ARN totaux de fruits de tomate	168
2. Electrophorèse des acides nucléiques	169
2.1. Electrophorèse d'ADN	169
2.1.1. Electrophorèse analytique	169
2.1.2. Electrophorèse préparative	169
2.2. Electrophorèse d'ARN	169
3. Transfert des acides nucléiques sur membrane de nylon ou de nitrocellulose	170
3.1. Transfert de l'ADN	170
3.2. Hybridation moléculaire	170
3.2.1. Préparation de sondes radioactives	170
3.2.2. Hybridation	171
4. Clonage moléculaire	171
4.1. Enzymes de restriction et de modification	171
4.2. Préparation et transformation des bactéries E.coli électrocompétentes	171
4.3. Préparation et transformation des bactéries E.coli thermocompétentes	173
5. Synthèse des ADNc par transcription inverse (Reverse Transcription ou RT)	174
6. Amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction)	174
6.1. L'ADN matriciel	174
6.2. Mélange réactionnel	175
6.3. Conditions de PCR	175
6.4. Quantification par densitométrie des résultats d'expression par RT-PCR semi-quantitative	175

7. Hybridation in situ	177
7.1. Préparation des sondes ARN sens et antisens marquées à la digoxygénine	177
7.2. Préparation des lames et lamelles	179
7.3. Préparation du matériel biologique	179
7.4. Déparaffinage et réhydratation des coupes	179
7.5. Préhybridation, et hybridation	179
7.6. Lavages et détection immunologique	180
8. Méthode de transgénèse et d'analyses des plantes transgéniques	180
8.1. Construction des vecteurs de transformation selon la Technologie Gateway™	180
8.1.1. Obtention des séquences d'ADN pour le clonage Gateway	181
8.1.2. Réaction de recombinaison BP	183
8.1.3. Réaction de LR	183
8.2. Transformation et sélection des plantes	185
8.2.1. Transformation des cotylédons de tomate	185
8.2.2. Méthodes d'analyses des plantes transgéniques	186
8.2.2.1. Analyse moléculaire	186
8.2.2.2. Analyse phénotypique	186
8.2.2.3. Mesure de la ploïdie	186
8.2.2.4. Méthode de sélection des plantes transformées homozygotes et hétérozygotes	186
9. Méthode d'analyse du transcriptome de la tomate par la technique des micro-réseaux d'ADNc (cDNA Microarray)	188
9.1. Synthèse des ADNc et marquage indirect par des fluorochromes	188
9.2. Acquisition des données	189
9.3. Analyse statistique	189
V. Méthodes d'analyse des protéines	190
1. Extraction des protéines végétales	190
2. Dosage des protéines	190
3. Analyse par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	190
4. Révélation des protéines au bleu de Coomassie	191
5. Production d'anticorps polyclonaux anti-galactono-1,4-lactone déshydrogénase de tomate	191
6. Analyse par western-blot	192
6.1. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	192
6.2. Immunodétection des protéines sur membrane de nitrocellulose	192
7. Mesure de l'activité enzymatique GalLDH in vitro	193
IV. Méthode d'analyse des Métabolites	193
1. Méthode d'analyse de l'ascorbate et de son état d'oxydo-réduction	193
1.1. Méthode d'extraction de l'ascorbate	194
1.2. Méthode d'extraction de l'ascorbate contenu dans l'apoplaste	194

1.3. Dosage de l'ascorbate réduit et total	195
1.4. Paramètres de correction	196
2. Méthode d'analyse des isoprénoïdes dans les fruits de la tomate	196
2.1. Extraction des isoprénoïdes	196
2.2. Dosage des isoprénoïdes	197
3. Méthode de dosage de la chlorophylle dans les feuilles de tomate	197
4. Méthode de mesure de la photosynthèse dans les feuilles de tomate	197
5. Méthode de mesure de l'activité respiratoire et la production d'éthylène des fruits de tomate	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201

ABREVIATIONS

Enzymes

AO	Ascorbate oxydase
GalLDH	L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase
GME	GDP-D-Mannose-3,5-épimérase
GMP	GDP-D-Mannose pyrophosphorylase

Acides nucléiques et nucléotides

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine 5' tri-phosphate
dNTP	Désoxynucléotide 5' triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Divers

AsA	Ascorbate réduit
BET	Bromure d'éthidium
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoyle-phosphate disodique
BSA	Sérum albumine bovine
CaMV	Virus de la Mosaïque du chou-fleur
CTAB	Cetyltriméthylammonium bromide
DAPI	4',6-diamino-2-phénylindole
DCIP	2,6-dichloroinodolphénol
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DHA	Déhydroascorbate
Dig-11-UTP	Digoxygénine-11-Uridine triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétate
HMM	Hydroxy méthyl mercurate
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
JAA	Jours après anthèse
MDHA	Monodéhydroascorbate
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
NBT	"Nitroblue tetrazolium"
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PSA	Persulfate d'ammonium
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RNAi	RNA interférence
RNasin	Inhibiteur de ribonucléases
RT	Transcription inverse
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse SDS en gel de polyacrylamide
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
Tm	"Melting Temperature"
Tris	Tris hydroxyméthylaminométhane
UV	Ultraviolet

Unités

pb, kb	Paire de bases, kilo base
Ci	Curie
Rpm	Rotations par min
sec, min, h	Seconde, minute, heure
U	Unité
% (p/v)	Pourcentage (poids/volume)

CHAPITRE I
INTRODUCTION

INTRODUCTION

1- La Tomate

1.1. Identification de la tomate et son importance.

Dans la tradition horticultrale, la tomate est considérée comme un légume, alors que selon la classification botanique il s'agit d'un fruit *i.e.* un organe qui contient des graines et qui provient en général, uniquement de l'ovaire de la fleur. La tomate est une plante herbacée annuelle dont le cycle végétatif de graine à graine est court (environ 3 à 4 mois). La gamme de température optimale pour la culture de la tomate se situe entre 10-32 °C. La durée de la photopériode et la température influent beaucoup le développement des plantes ainsi que celui des inflorescences. La qualité des fruits est particulièrement sensible à la quantité totale d'énergie lumineuse reçue chaque jour et la température. Chez toutes les espèces de tomate, les fleurs sont bisexuées, les étamines sont soudées et forment un cône qui entoure le pistil. L'autogamie est de règle chez la tomate cultivée, mais certaines conditions culturales entraînent l'allongement du style et favorisent ainsi les fécondations croisées.

La tomate fait partie de la famille des Solanacées qui regroupe plus de 3000 espèces tropicales et subtropicales originaires d'Amérique Centrale et d'Amérique de Sud.

Au niveau mondial, la tomate représente des enjeux économiques et agronomiques majeurs. De plus, elle constitue l'espèce modèle pour l'étude du développement des fruits charnus et l'étude génétique du fruit en général puisque les croisements entre différentes espèces de tomate ainsi que la transformation génétique sont aisés. La tomate est une plante diploïde qui possède 12 chromosomes, son génome est de petite taille, 950 Mb (Etienne *et al.*, 2003). Actuellement, on estime que la tomate possède environ 35000 gènes concentrés dans l'euchromatine des chromosomes qui ne représente que 23% de la totalité de l'ADN chromosomique (Van der Hoeven *et al.*, 2002). Un consortium international a été dernièrement constitué avec l'objectif de coordonner les initiatives en matière de génomique pour aborder le séquençage du génome de la tomate. L'ensemble des résultats obtenus est rassemblé dans les bases de données du TIGR (The Institute for Genomic Research, www.tigr.org/tdb/tgi/lgi) et du SGN (Solanaceae Genomics Network, www.sgn.cornell.edu).

1.2. Historique et production mondiale.

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est cultivée presque dans tous les pays de monde. La famille des Solanacées comprend un grand nombre de plantes qui présentent des vertus nutritives, pharmaceutiques et ornementales comme la pomme de terre, le poivron, le piment, l'aubergine, le tabac, le pétunia, le datura et la belladone. Les Solanacées ont évolué depuis 30 millions d'années dans la région des Andes Amazoniennes en colonisant des habitats aussi variés que des forêts tropicales, des déserts et des hautes montagnes.

Toutes les formes cultivées de tomate appartiennent à l'espèce *Solanum lycopersicum* et proviennent des Andes péruviennes sur une région qui inclue la Bolivie, le Chili, la Colombie, l'Equateur, et le Pérou. La tomate cerise «*Solanum lycopersicum* var. *cerasiformae*» est le sous-espace qui paraît la plus proche de la forme ancestrale de la tomate cultivée et qui pousse à l'état sauvage dans toute l'Amérique du Sud. L'augmentation de la taille du fruit semble être une conséquence des étapes de sélection par l'homme. Cette domestication de la tomate semble avoir eu lieu au Mexique, où les fruits montrent une grande variété de forme, de taille et de couleur (Hobson *et al.*, 1993). Dans le langage Nahuatl parlée dans la région de Mexico la tomate est appelée *tomatl*. Ce sont les Espagnols qui ont répandu la tomate en l'appelant *tomate*.

En 1544, le botaniste italien Pietro Matthioli est le premier à citer le nom de la tomate dans un chapitre traitant de la Mandragore, plante aux vertus magiques « *des fruits aplatis et côtelés qui, de verts deviennent jaune d'or, et que certains consomment, frits dans de l'huile avec du sel et du poivre, comme les aubergines et les champignons* ». Les premières représentations graphiques de la tomate sont celles de Rembertus Dodoens (Anvers, 1553) et de Samuel Quicchelberg dans l'herbier de Georg Oelinger ,Nuremberg 1553 (Pitrat et Coord, 2003).

C'est au 16^{ième} siècle que la tomate arrive en Europe avec le retour des "conquistadores" en Espagne. A cette époque, la plante de tomate est connue sous le nom de pomme d'or ou pomme d'amour. En raison d'une forte odeur exhalée, le fruit de tomate était considéré comme toxique, dangereux à la consommation voire même possédant des vertus surnaturelles. La plante de tomate est utilisée essentiellement comme plante ornementale, médicinale ou comme objet de curiosité. Par la suite, son usage alimentaire s'est développé sous forme de sauces dans la région de Naples, puis sa consommation à l'état de produit frais a commencé dans de nombreux pays du bassin méditerranéen et s'est répandue vers le nord de l'Europe à la fin XVIII siècle (Pitrat et Coord, 2003).

En 1753, Carl von Linné la baptise "pêche de loup" en la nommant *Solanum lycopersicum* du grec *lycos* (loup) et du latin *persica* (pêche). En 1754, Philip Miller la distingue du genre *Solanum* et la nomme *Lycopersicon esculentum*, enfin en 1778, la tomate apparaît en tant que plante potagère dans le catalogue de Villmorin-Andrieux (Rick, 1978).

Très récemment, lors du 1^{ère} Solanaceae Genome Workshop qui a eu lieu en Septembre 2004 à Wageningen au Pays Bas, la communauté scientifique a rebaptisée la tomate sous le nom d'origine *Solanum lycopersicum*.

La production mondiale de tomates en 2004 s'élève à près de 120,4 millions de tonnes. La tomate se place donc au premier rang des fruits produits dans le monde avant la pastèque (95), la banane (71), le raisin (67) l'orange (63), et la pomme (62). (selon la F.A.O : Food and Agricultural Organisation of the United Nations, www.fao.org, 2004). De plus, la tomate est le fruit le plus consommé dans le monde et sa consommation est en constante augmentation chaque année. La **figure 1** présente les données relatives à la production mondiale de fruits et de tomates, issues de la base de données statistiques de la F.A.O. La production de tomate a augmenté de 335% entre 1970 et 2004, les superficies de culture ont été aussi augmentées de 1,9 à 4,4 million d'hectares, soit une augmentation de 231%. Les principaux producteurs de tomate sont la Chine (25% de la production mondiale), les Etats-Unis (10,6%), la Turquie (6,6%), l'Inde (6,3%), l'Italie (6,2 %), l'Egypte (5,6%) et l'Espagne (3,7%). La production de tomates en France est de 808583 tonnes en 2004, ce qui place le pays au 16^{ième} rang mondial et à la 5^{ième} place dans l'Union Européen avec environ 0,7% de la production totale.

Pour différentes raisons, climatiques et, économiques, la France importe chaque année des quantités considérables. En 2001, la France a importé plus de 860 000 tonnes de tomate, pratiquement autant que sa production intérieure, et a exporté quelques 126 000 tonnes. Environ la moitié de la production de tomate est destinée au marché de frais, le reste est destiné à la transformation industrielle (concentré, jus ou purée de tomate). Ce qui fait de la tomate un fruit très important dans l'industrie alimentaire et la place au premier rang des légumes transformés.

1.3. La qualité de la tomate et sa valeur nutritionnelle.

Dans la nutrition humaine, il est maintenant bien admis qu'une alimentation variée et riche en fruits et légumes frais permet de diminuer les risques de maladies cardiovasculaires ainsi que les cancers (Ahuja *et al.*, 2003 ; Hodge *et al.*, 2004). En 2001, la F.A.O a indiqué que les plus grands consommateurs de tomates sont les Grecs et les Libyens avec environ 120 kg par an et par habitant, suivis par les pays d'Afrique du Nord et du Proche Orient. Un français consomme approximativement 25 kg de tomate par an. La tomate est bénéfique pour la santé car elle est riche en provitamines A (β -carotène), vitamine C et surtout en lycopène, antioxydant le plus actif des caroténoïdes alimentaires (Agarwal *et al.*, 2000), qui donne sa couleur rouge à la tomate mûre. De plus, la tomate est très peu calorique puisque pauvre en lipides, exempte de cholestérol et l'eau représente environ 94% de sa matière fraîche.

De par le monde, la production de tomate s'est considérablement développée au cours de 50 dernières années. Les professionnels ont depuis longtemps cherché à améliorer

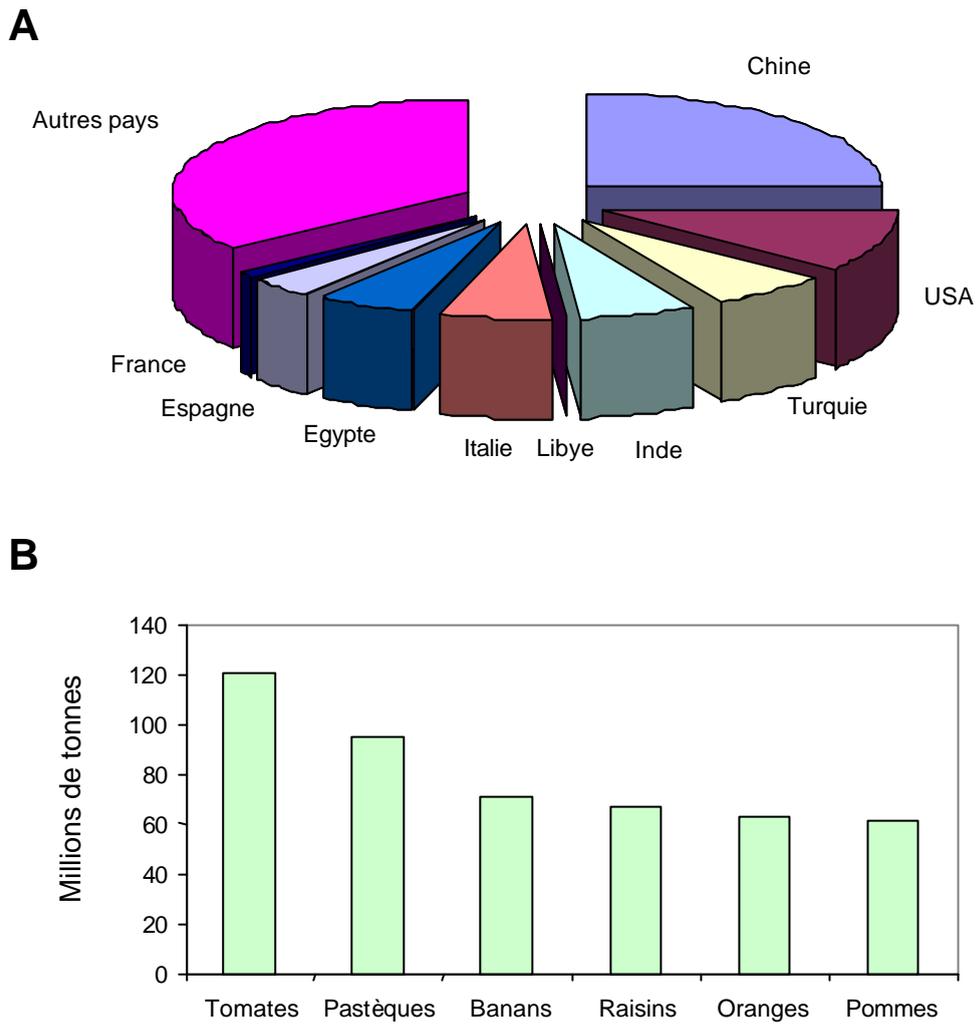


Figure 1. Quelques données économiques (données © FAO 2004)

A- Proportion de la production mondiale de tomate par pays en 2004.

B- Production mondiale des principaux fruits en 2004.

la qualité des tomates en sélectionnant des variétés qui présentent des caractères intéressants d'un point de vue commercial. C'est dans cette optique que l'apparence du fruit a été privilégiée puis la fermeté et la durée de conservation, au détriment de la qualité gustative. Ces dernières années, face au mécontentement grandissant des consommateurs, les sélectionneurs et les producteurs portent un intérêt croissant à l'amélioration des qualités organoleptiques ainsi que de la qualité nutritionnelle de la tomate pour la valeur Santé.

Les qualités organoleptiques du fruit de tomate proviennent d'une subtile combinaison de différents paramètres comme le génotype, la nutrition ou l'environnement de la plante au cours de sa croissance (Davies et Hobson, 1981). La saveur de la tomate (goût sucré, salé, amer ou acide) et son arôme résulte de la présence et de l'interaction de différents composés tels que les sucres, les acides organiques, les acides aminés et les composés aromatiques qui sont résumés dans la **figure 2**.

1.4. Structure et développement du fruit de tomate.

1.4.1 Structure du fruit de tomate

Chez les plantes supérieures, l'espèce genre *Solanum lycopersicum* représente un très grand nombre de variétés de tomate, dont les fruits à maturité peuvent avoir des tailles, des formes et des couleurs très différentes. Au cours de ce travail de thèse, la variété de tomate cerise *Solanum lycopersicum* Mill. var. cerasiforme cv. West Virginia 106 (WV106) a été utilisée. Le fruit de cette tomate cerise à maturité a un diamètre d'environ deux centimètres. Les différents tissus du fruit de tomate sont présentés sur la **figure 3**.

Le péricarpe provient de la différenciation des parois de l'ovaire de la fleur. Il peut être divisé en péricarpe externe, péricarpe radial ou « septum » (qui divise le fruit en plusieurs loges), et péricarpe interne ou « columelle ». Le septum et la columelle sont moins pigmentés que le péricarpe externe. Celui-ci comprend trois tissus : l'épiderme ou peau du fruit, le mésocarpe renfermant les vaisseaux conducteurs et l'endocarpe qui délimite des loges. L'épiderme est composé d'une couche de cellules supérieures ou épiderme et de deux à quatre couches de cellules inférieures ou hypoderme. Il peut être recouvert d'une cuticule qui s'épaissit avec l'âge.

Le placenta s'étend dans les loges pour entourer les graines. Dans le fruit immature, le placenta est ferme et compact. A maturité, les parois des cellules placentaires se séparent, le tissu loculaire devient gélatineux et homogène (on parle de gel), et il finit par remplir toute la cavité loculaire ou loge carpellaire.

Les tissus vasculaires s'organisent en deux réseaux distincts déjà présents avant la fécondation. Le premier part du pédicelle à travers le péricarpe externe de manière plus ou

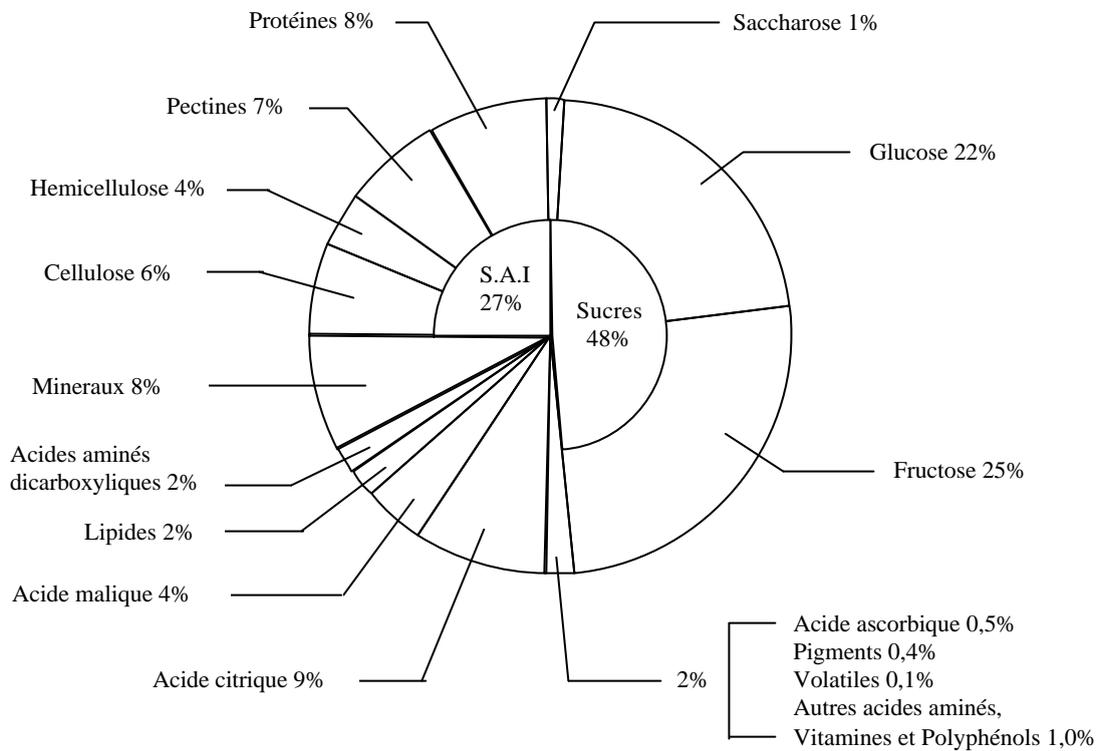


Figure 2. Analyse des constituants de la matière sèche du fruit de tomate mûr (Adapté de Davis et Hobson, 1981).

La matière sèche représente 5 à 7,5 % de la matière fraîche.

S.A.I = substances alcooliques insolubles.

moins parallèle à la périphérie du fruit, le second passe à travers la columelle et le péricarpe interne pour se diriger vers les graines.

1.4.2. Le développement du fruit de tomate.

Dans des conditions de culture optimales, la mesure du diamètre du fruit au cours du développement de la tomate cerise décrit une sigmoïde qui fait apparaître trois périodes distinctes (**figure 3B** d'après Joubès *et al.*, 1999). Une phase de croissance lente durant laquelle l'activité mitotique dans l'ovaire est intense, une phase de croissance rapide qui correspond à l'expansion des cellules du fruit et une phase finale de croissance lente qui correspond aux modifications biochimiques et physiologiques de la maturation. Les deux premières phases de croissance sont regroupées sous le terme de développement précoce du fruit de tomate qui comporte la phase de mise à fruit, une phase de division cellulaire et une phase d'expansion cellulaire. Au cours de la maturation, le fruit subit de nombreuses modifications biochimiques qui aboutissent à un fruit coloré, sucré et de texture molle, propre à la consommation.

1.4.2.1. Le développement précoce.

La synthèse d'hormones (auxines, cytokinines et gibbérellines) semble jouer un rôle important dans le contrôle de la mise à fruit, la phase de division cellulaire et la phase d'expansion cellulaire (**figure 4**, Gillaspay *et al.*, 1993).

1.4.2.1.a. La mise à fruit

La première étape du développement précoce du fruit de tomate correspond au développement de l'ovaire jusqu'aux étapes de pollinisation et de fécondation des ovules. Au cours du développement de la fleur, une première vague de divisions cellulaires a lieu dans l'ovaire. Puis la croissance de l'ovaire cesse ; elle ne reprendra qu'après fécondation. Le développement de l'ovaire en fruit et la décision d'avorter ou non dépendent du succès de la pollinisation et de l'efficacité de la fécondation. Chez la tomate, espèce autogame, le terme d'anthèse correspond à la période de développement recouvrant les phénomènes d'anthèse proprement dite (déhiscence des anthères), de pollinisation et de fécondation. Ces différentes étapes se font de manière très rapprochée dans le temps et sont souvent considérées comme un seul processus de développement.

Au plan génétique, la taille du fruit de tomate est contrôlée par un peu moins d'une trentaine de loci à caractère quantitatif (QTL) (Grandillo *et al.*, 1999). Parmi ces QTL, *fw2.2* (pour « *fruit weight 2.2* ») présent sur le chromosome 2, est un QTL majeur de la taille du fruit qui serait responsable d'environ 30% des variations phénotypiques entre les variétés domestiquées à gros fruits et les variétés sauvages "d'origine" à petits fruits (Alpert *et al.*,

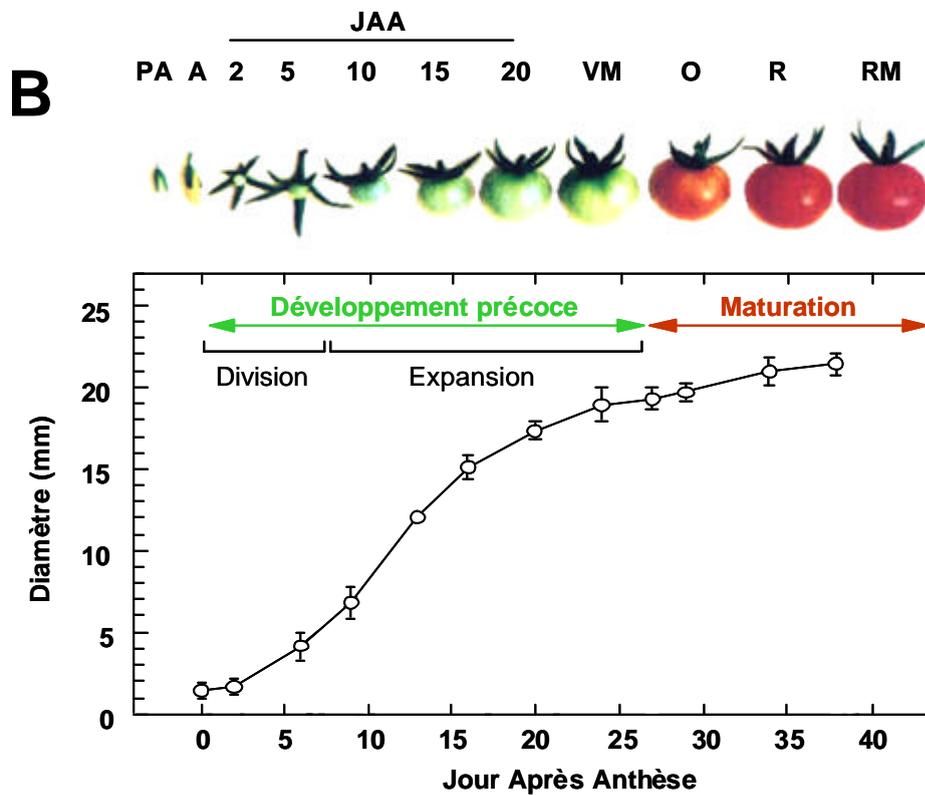
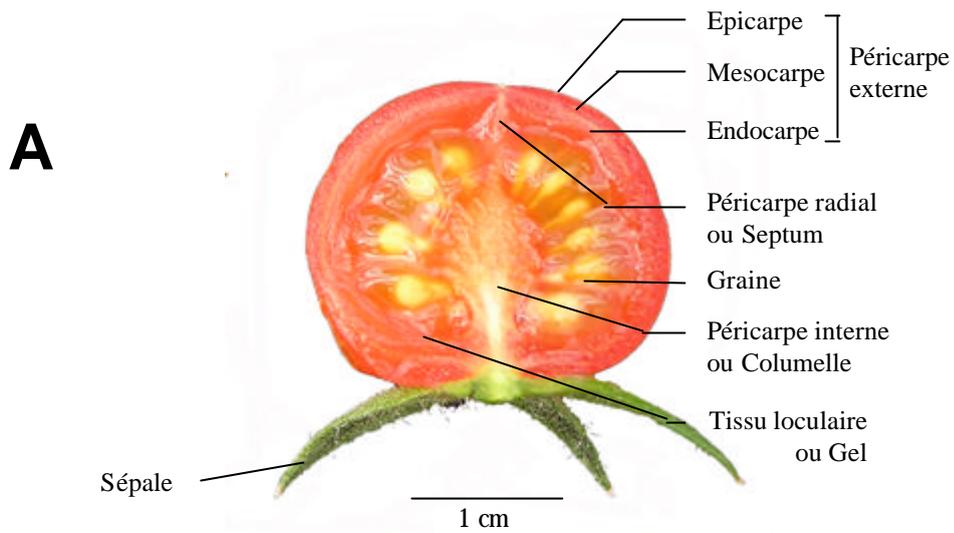


Figure 3. Développement du fruit de tomate (*Solanum Lycopersicum* Mill.).

A. Structure du fruit de tomate. Coupe longitudinale.

B. Les différents stades de développement du fruit de tomate. **PA**, pré-anthèse; **A**, anthèse; **JAA**, jour après anthèse; **VM**, vert mature; **OR**, orange; **R**, rouge; **RM**, rouge mûr.

1995). La cause de l'effet de ce QTL provient d'un gène unique, appelé *fw2.2*, qui est exprimé dès le développement floral, et dont le maximum d'expression est concomitant de la transition entre division et expansion cellulaire (Cong *et al.*, 2002). Les variations de taille observées et attribuées à l'effet de *fw2.2* ne proviennent pas de différences entre la séquence de la protéine FW2.2 des allèles, mais plutôt de variations transcriptionnelles associées à des changements nucléotidiques dans la séquence du promoteur des différents allèles (Nesbitt et Tanksley, 2002). La fonction du gène *fw2.2* est clairement associée à une activité de régulation négative de la division cellulaire qui contrôle très tôt le nombre de cellules dans le carpelle (Baldet *et al.*, 2006), et plus tard, le nombre de cellules dans le placenta et le nombre de couches cellulaires dans le péricarpe (Liu *et al.*, 2003).

La transformation de l'ovaire en fruit est étroitement liée à l'efficacité de la fécondation. Si les étapes de pollinisation/fécondation n'ont pas lieu dans les quelques jours qui suivent la déhiscence des anthères, ou si peu d'ovules sont fécondés, les fleurs ou les ovaires peuvent avorter. Pendant la germination et la pollinisation les gibbérellines produites par le pollen activent la synthèse d'auxines dans l'ovaire (Nitsch, 1970). Ces dernières vont alors déclencher la mise à fruit et activer les divisions cellulaires consécutives (Gillaspy *et al.*, 1993). Le nombre d'ovules fécondés est déterminant pour la croissance du fruit puisque la taille du fruit est positivement corrélée au nombre de graines (Varga et Bruinsma, 1986 ; Bertin *et al.*, 1998). Au cours des différentes phases de développement du fruit, les graines émettent des facteurs de croissance qui vont activer les divisions cellulaires (cytokinines) et initier l'expansion des cellules (auxines).

1.4.2.1.b. La phase de division cellulaire.

Suite à la fécondation des ovules, les divisions cellulaires sont activées dans l'ovaire et se poursuivent pendant 7 à 10 jours. L'entrée des cellules de l'ovaire en phase de division coïncide avec le début de l'importation de photoassimilats dans le fruit. Les divisions sont particulièrement actives dans le péricarpe et les tissus placentaires entourant les graines. Dans le péricarpe, les divisions en orientation péricleinale (dont le plan de division est parallèle à la surface du fruit) entraînent l'augmentation du nombre de couches cellulaires, alors que les divisions anticlinales (perpendiculaires à la surface du fruit) augmentent le nombre de cellules par assise. Les cellules de l'épiderme continuent leur division longtemps après la phase de division cellulaire et même jusqu'au début de la maturation pour supporter l'augmentation considérable du volume du fruit durant la phase d'expansion cellulaire (Joubès *et al.*, 1999). L'activité mitotique dans l'ovaire est conditionnée par le nombre d'ovules fécondés. Le développement des embryons et des graines semble contrôler la vitesse et le maintien des divisions dans le fruit (Varga et Bruinsma, 1986). Les graines en développement produisent des cytokinines qui activent les divisions cellulaires dans le fruit. Gillaspy *et al.* (1993) proposent deux mécanismes d'action possibles des cytokinines : soit

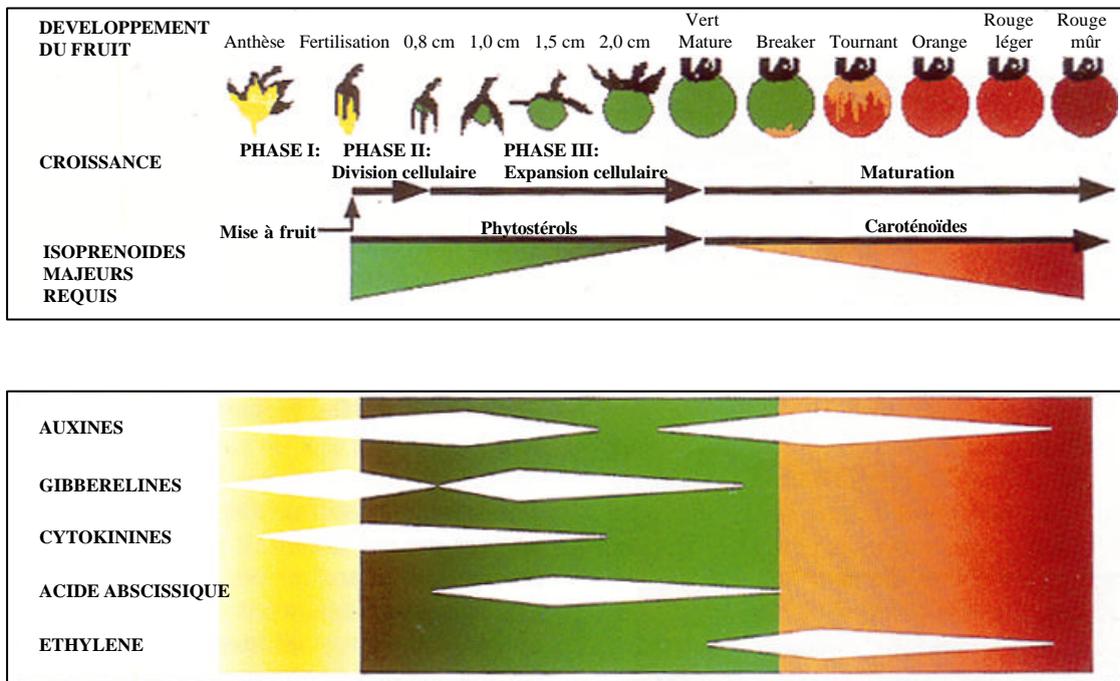


Figure 4: Description schématique du développement du fruit de tomate. Représentation des changements hormonaux au cours du développement du fruit de tomate. (d'après Gillaspay *et al.*, 1993)

La première partie du schéma représente les différents stades du développement du fruit de tomate ainsi que les différentes phases: les phases I, II et III correspondent au développement précoce du fruit. Les variations des quantités d'isoprénoïdes majeurs intervenant dans la pigmentation du fruit sont également reportées.

La deuxième partie du schéma résume les variations des quantités des différentes hormones végétales au cours du développement du fruit de tomate.

les cytokinines présentes dans les graines migrent dans les tissus du fruit où elles activent directement les divisions cellulaires, soit elles activent la synthèse d'un régulateur positif de la division capable de migrer dans les tissus du fruit.

1.4.2.1.c. La phase d'expansion cellulaire.

Les vagues successives de divisions cellulaires, avant et après anthèse, définissent la taille potentielle du fruit, mais c'est l'expansion des cellules qui détermine la taille finale du fruit (Ho, 1996). Au cours de cette phase du développement du fruit, qui s'étend de 10 à 40 jours après anthèse, le volume des cellules en expansion est augmenté de plus de dix fois. Les vacuoles occupent une grande partie du volume cellulaire au détriment du cytoplasme. En plus, les cellules sont caractérisées par une forte augmentation de leur contenu en ADN nucléaire (polyploïdie) (Joubès *et al.*, 1999) qui résulte de la capacité des cellules à entrer dans un cycle d'endoréplication de l'ADN qui est constitué d'une succession d'une phase de synthèse d'ADN et d'une phase G, en absence de mitose (Joubès et Chevalier, 2000). L'augmentation de la taille des vacuoles est due à une forte accumulation de sucres et d'acides organiques qui crée un gradient de pression osmotique et une entrée d'eau massive qui permet le grandissement des cellules. Les hormones jouent également un rôle important dans l'expansion cellulaire. En effet, les auxines paraissent initier l'expansion cellulaire en activant les mécanismes d'expansion de la paroi qui font intervenir plusieurs familles de protéines comme les expansines, les β -glucanases et les xyloglucanes-endotransglycosylases. Les gibbérellines semblent permettre le maintien de l'expansion cellulaire au cours de la phase de grandissement tandis que l'acide abscissique, qui est synthétisé par les racines et s'accumule dans les graines pendant l'expansion cellulaire régule la dessiccation des graines et induit la dormance de l'embryon empêchant ainsi toute germination précoce (Abdel-Rahman, 1977). C'est pendant la phase d'expansion cellulaire que le fruit atteint sa vitesse de croissance et sa teneur en eau maximales (5 à 7% du poids frais, contre 17% avant fécondation ; Ho et Hewitt, 1986). A la fin de cette période, le fruit a quasiment atteint son poids définitif.

1.4.2.2. La maturation du fruit de tomate.

La tomate fait partie des fruits climactériques, comme l'abricot, la pêche, la banane, la mangue, la pomme et la prune, qui sont caractérisés par une augmentation de la vitesse de respiration dans les stades précoces de la maturation ("pic" ou "crise climactérique") associée à une augmentation transitoire de la production d'éthylène (Giovannoni, 2001). La maturation du fruit est initiée après la maturation des graines, lorsque le fruit a quasiment atteint sa taille finale (stade "vert mature"). Au cours de la maturation, de nombreux changements physiologiques et biochimiques se produisent et aboutissent à un fruit "rouge mûr" propre à la consommation (**figure 5**). Pour les consommateurs que nous sommes, la

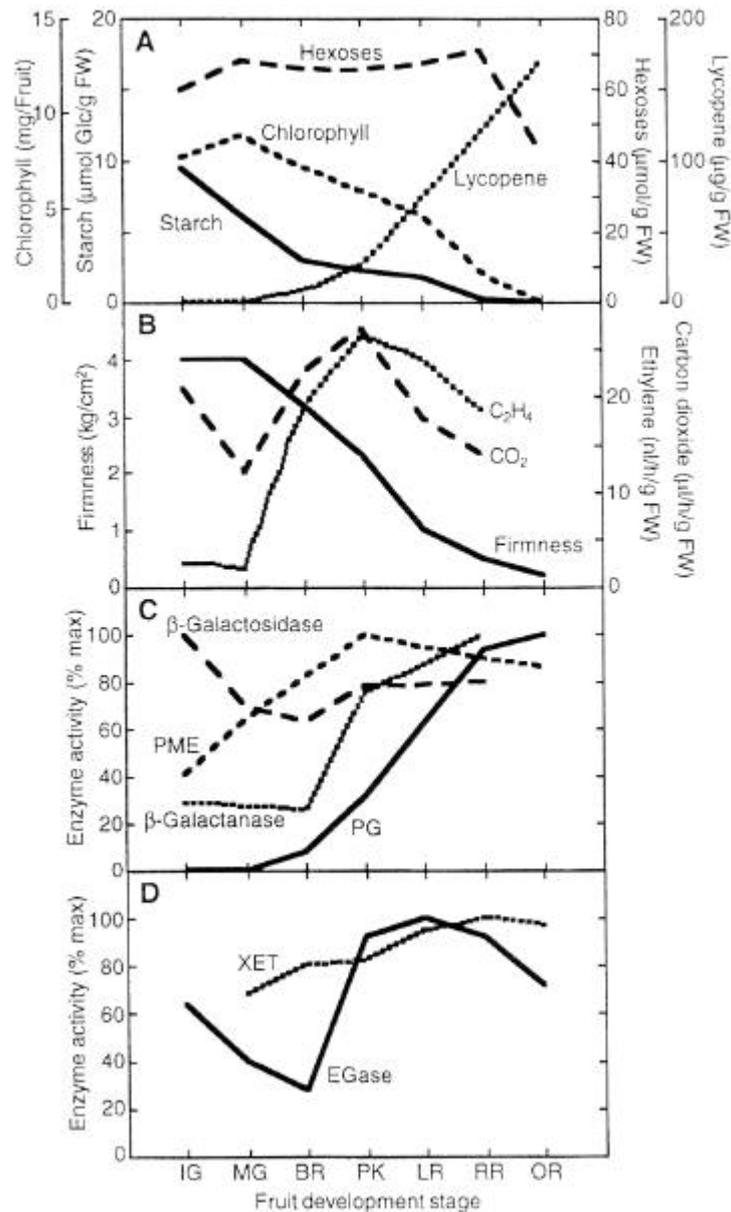


Figure 5 Principales modifications associées à la maturation du fruit de tomate (d'après Brummell et Harpster, 2001).

A. Modifications de la composition en hexoses, amidon, chlorophylle et lycopène au cours de la maturation du fruit de tomate.

B. Variation de la fermeté et des taux de dioxyde de carbone et d'éthylène au cours de la maturation.

C. Variation de l'activité enzymatique des principales enzymes de dégradation des pectines. PME, pectine méthyl-estérase; PG, polygalacturonase.

D. Variation de l'activité enzymatique des principales enzymes de dégradation du réseau cellulose/hémicellulose. XET, xyloglucan endotransglycosylase; EGase, β -glucanase.

IG, immature green (vert immature); MG, mature green (vert mûr); BR, breaker (rouge tournant); PK, pink (30 à 70% rouge léger, suivant les espèces de tomate); LR, light red (rouge léger); RR, red ripe (rouge mûr); OR, over ripe (très mûr).

maturation confère aux tomates les attributs organoleptiques qui les rendent attractives. Les modifications majeures de la maturation sont les suivantes (Hobson et Grierson, 1993) :

Couleur : les chloroplastes sont transformés en chromoplastes, avec dégradation concomitante de la chlorophylle et synthèse de caroténoïdes, en particulier le lycopène.

Goût : l'acidité du fruit diminue suite à la dégradation de l'acide malique. Les teneurs en sucres (hexoses) augmentent du fait du stockage vacuolaire des sucres importés et de la dégradation des réserves d'amidon.

Arômes : de nombreux composés aromatiques (esters, aldéhydes) sont synthétisés.

Texture : la perte de fermeté du fruit est due à la dégradation de certains constituants des parois cellulaires (hémicellulose, cellulose, pectines).

La maturation du fruit de tomate est donc en grande partie due à des modifications biochimiques de la composition des cellules de la tomate et à des modifications profondes de la structure des parois des cellules (**figure 5**).

2- La Vitamine C : Structure, biosynthèse et fonction dans la cellule

2.1- Structure de la vitamine C

L'acide L-ascorbique ($C_6H_8O_6$) est le nom donné par la Commission d'IUPAC-IUB pour désigner la vitamine C. D'un point de vue chimique, la vitamine C est le 2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol dont la structure est donnée en **figure 6**. Sous le terme générique de vitamine C on trouve aussi plusieurs composés dont la structure comprend une molécule d'ascorbate associée à un autre composé de nature très variée. Par exemple, les esters d'ascorbate tels que le palmitate d'ascorbate mais aussi l'ascorbate sous sa forme oxydée, l'acide déhydroascorbique (DHA) ou encore sous forme synthétique telle que l'acide 6-déoxy-ascorbique. Tous ces composés possèdent une activité biologique qui varie de 100%, 80% et 33% respectivement par comparaison avec l'acide ascorbique seul. L'acide ascorbique possède deux centres chiraux sur les carbones 4 et 5. Quatre stéréoisomères existent : le L- et le D-acide ascorbique et le L- et le D- acide arabo-ascorbique.

Chez l'homme la déficience en vitamine C provoque le scorbut, affection qui a été identifiée bien avant que l'acide ascorbique soit connu. Au plan étymologique, scorbut et scurvy, traduction anglaise du scorbut, sont probablement dérivés de deux termes scandinaves, skjoerberg et skorbjugg, désignant la peau rugueuse. Au travers des siècles, cette maladie a fait de nombreux ravages chez l'homme, comme par exemple, en 1628, où environ la moitié de la population de 60 colonies de Plymouth (USA) sont mortes des suites du scorbut. Pendant la guerre de Sécession américaine, la malnutrition et le scorbut qui s'en suivit provoquèrent la mort d'un nombre phénoménal d'individus (Johnston *et al.*, 2001).

Le lien entre le scorbut et le régime alimentaire n'a été établi qu'au milieu du XVIII^{ème} siècle. Cette découverte importante est celle d'un médecin de la marine britannique, James Lind, qui en 1747, rapporte que la consommation d'agrumes est capable d'éviter le scorbut et même de guérir les marins atteints de scorbut. Entre 1907 et 1917, des travaux réalisés sur le cobaye démontre qu'il est possible de provoquer le scorbut et ceci va permettre d'examiner la réponse de l'animal à l'activité "anti-scorbut" des aliments. En 1915, Zilva et ses associés de l'institut de Lister à Londres isolent cette activité anti-scorbut dans une fraction brute de jus de citron (Ronald *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2001). Ce n'est qu'en 1932 qu'Albert von Szent-Györgyi Nagyrapolt associé à Sir Norman Haworth et ses collaborateurs isolent pour la première fois la molécule responsable de l'activité anti-scorbut en l'appelant acide ascorbique par analogie au terme scorbut et caractérisent sa structure chimique. En 1934, Reichstein et Grussner mettent au point le procédé chimique qui permet de produire de l'acide ascorbique de synthèse, trois ans plus tard Szent-Györgyi Nagyrapolt et Haworth reçoivent respectivement le prix de Nobel de physiologie & médecine et le prix de Nobel de chimie pour leur recherche sur l'acide ascorbique (Ronald *et al.*, 1999).

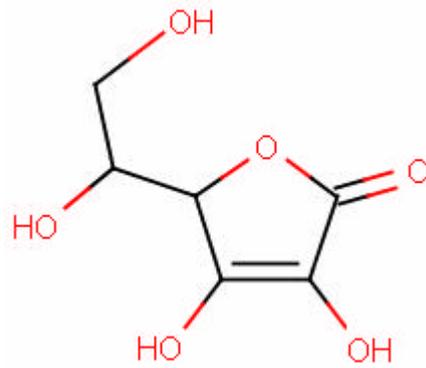


Figure 6. Structure chimique de l'acide L-ascorbique

2.2. Production d'acide ascorbique.

2.2.1. Synthèse chimique

La production mondiale annuelle de vitamine C de synthèse est évaluée à environ 80000 tonnes avec une augmentation annuelle constante de 3-4%. La moitié de la production est employée dans les suppléments de vitamines et les préparations pharmaceutiques, 25% sont employés dans la transformation des produits alimentaires pour la protection des arômes et pigments. Environ 10% sont employés comme supplément dans l'alimentation animale pour améliorer la croissance et la santé des élevages. Enfin, 15% rentrent dans la composition de divers produits tels que les produits cosmétiques (Hancock *et al.*, 2002).

Depuis 1934, la synthèse de Reichstein et Grussner est la seule méthode de production de l'acide ascorbique de synthèse (Reichstein and Grussner, 1934). Pour synthétiser l'acide ascorbique 7 réactions chimiques, dont une étape de fermentation, sont nécessaires (**figure 7**). Cependant, cette méthode présente deux inconvénients : 1) elle consomme une quantité importante d'énergie car le processus nécessite de fortes températures et pressions. 2) elle nécessite une grande quantité de solvants organiques.

2.2.2. La biosynthèse de l'acide ascorbique.

Chez les plantes et les animaux, le L-ascorbate (vitamine C) est produit par des voies de biosynthèse distinctes. Chez la levure, le D-érythroascorbate, un analogue en C₅ de l'ascorbate est synthétisé. En revanche, les procaryotes ne synthétisent généralement pas l'ascorbate car ils utilisent majoritairement le glutathion comme antioxydant.

2.2.2.1 Biosynthèse du D-érythroascorbate chez la levure.

Chez la levure, il n'y a pas de biosynthèse d'ascorbate mais de D-érythroascorbate et la voie proposée (**figure 8**) implique deux étapes. La première consiste en l'oxydation du D-arabinose en D-arabinono-1,4-lactone, réaction catalysée par la D-arabinose déshydrogénase (Kim *et al.*, 1996), suivie de l'oxydation du D-arabinono-1,4-lactone en D-érythroascorbate catalysée par la D-arabinono-1,4-lactone oxydase (Huh *et al.*, 1994, 1998). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le gène de la D-arabinono-1,4-lactone oxydase a été cloné et l'enzyme purifiée (Huh *et al.*, 1998). Ces mêmes auteurs ont également montré que la surexpression de cette enzyme conduit à une augmentation de la teneur en D-érythroascorbate chez *S. cerevisiae*.

2.2.2.2 Biosynthèse de l'ascorbate chez les animaux.

La voie de biosynthèse de la vitamine C chez les mammifères est présentée dans la **figure 9**. Elle a été établie suite à des études de marquage radioactif des précurseurs, et

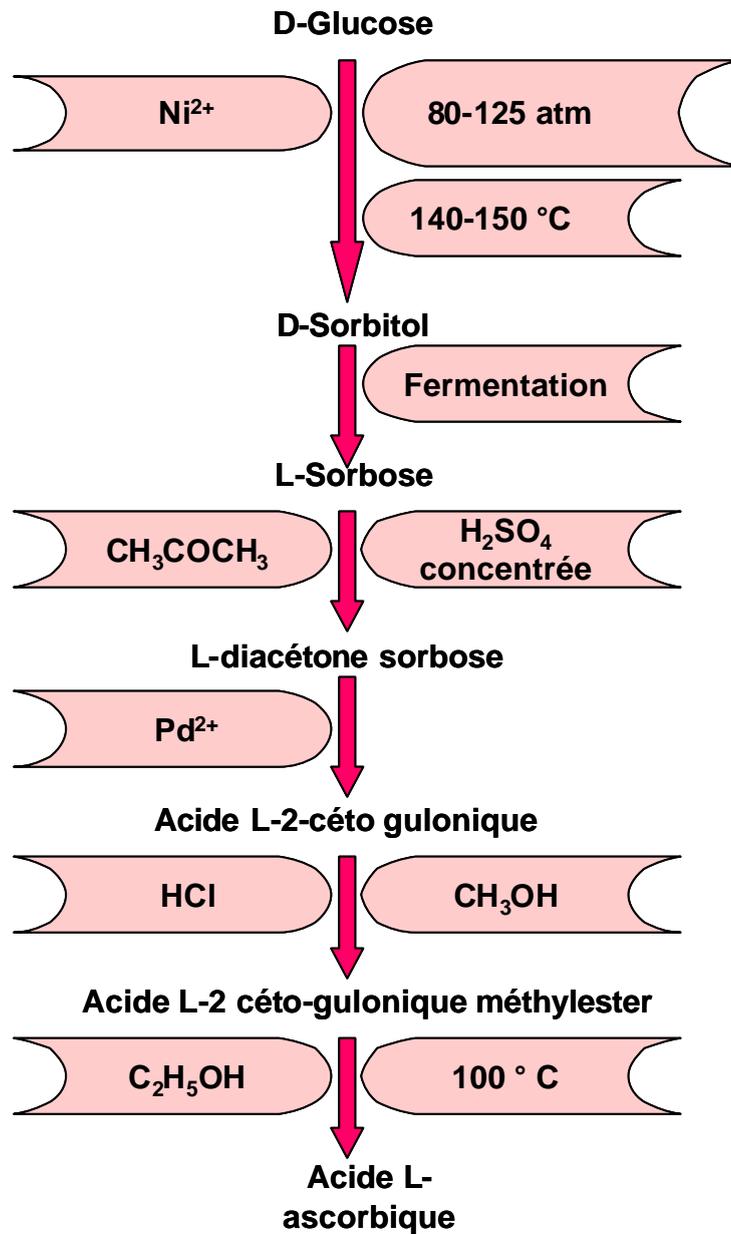


Figure 7. Processus de Reichstein pour la production d'acide L-ascorbique (L-AsA). (D'après Reichstein et Grussner, 1934).

Le D-glucose est converti en L-AsA *via* une série d'étapes chimiques associées à une fermentation bactérienne pour la conversion du D-sorbitol en L-sorbose.

grâce à l'isolation des enzymes à partir de foies de rats (Burns 1960). L'UDP-D-glucose semble être le point de départ de la voie, il est oxydé en C6 par l'UDP-glucose déshydrogénase (étape 1) pour former l'acide UDP-glucuronique. L'étape suivante conduit à la formation du D-glucuronate-1-P, (étape 2), mais l'enzyme qui catalyse cette réaction n'a pas encore été identifiée. Le glucuronate-1-P est déphosphorylé pour donner de l'acide glucuronique (étape 3) qui va alors subir une inversion au sein de son squelette carboné (étape 4) et donner la L-gulono-1,4-lactone. Lors cette inversion, le groupement carboxylate du carbone C1 est transformé en un groupement hydroxyméthyl changeant ainsi la position du carbone C1 qui passe en position C6. La L-gulono-1,4-lactone est alors oxydé (étape 5) en C2 par la gulono-1,4-lactone déshydrogénase, et le produit de cette réaction, la 3-céto-L-gulono-1,4-lactone, se transforme spontanément en L-ascorbate. Parmi les animaux, l'homme ainsi que les primates, les cobayes et d'autres mammifères ont perdu la capacité de produire l'ascorbate car l'enzyme gulono-1,4-lactone oxidase est non fonctionnelle (Nishikimi et Udenfriend, 1976).

2.2.2.3 Biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes.

2.2.2.3.1 Voie "Smirnoff"

Il est surprenant de constater que la voie de biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes n'a été élucidée que très récemment. En 1998, l'équipe de Smirnoff propose une voie de biosynthèse qui actuellement est la voie majeure admise par la communauté scientifique (**figure 10**). L'établissement de cette voie découle d'une série de résultats obtenus chez différentes plantes au cours des 40 dernières années. Très tôt, Isherwood *et al.* (1954) montrent que les plantes comme les animaux sont capables d'oxyder les aldonolactones pour donner de l'ascorbate, ceci laissait présager que la voie était la même dans les deux règnes. L'incubation *in vitro* de tissus de plantes en présence de galactono-1,4-lactone (ou gulono lactone) induit une augmentation de la teneur en ascorbate (Loewus, 1963). Cependant, par des expériences de marquage à partir de [¹⁴C]-glucose, Loewus (1963) a démontré qu'à l'inverse des animaux, chez les plantes il n'y a pas d'inversion du squelette carboné *i.e.* le C6 du glucose reste le C6 de l'ascorbate. Plus récemment, Wheeler *et al.* (1998) a démontré que des extraits de plantules de pois et de feuilles d'*A. thaliana* convertissent le L-galactose en ascorbate, de même qu'ils sont capables de métaboliser le GDP-D-mannose en GDP-galactose, L-galactose, et L-galactose-1-phosphate. Ainsi l'ensemble des précurseurs de l'ascorbate était identifié (**figure 10**). Dans le même temps, Conklin *et al.* (1999), grâce à l'utilisation d'un mutant d'*A. thaliana* (*vtc1*) qui présente une réduction de 70% d'ascorbate comparé au sauvage, conforte l'hypothèse du mannose en tant que précurseur de la voie. Les enzymes qui participent à la voie de Smirnoff sont détaillées ensuite.

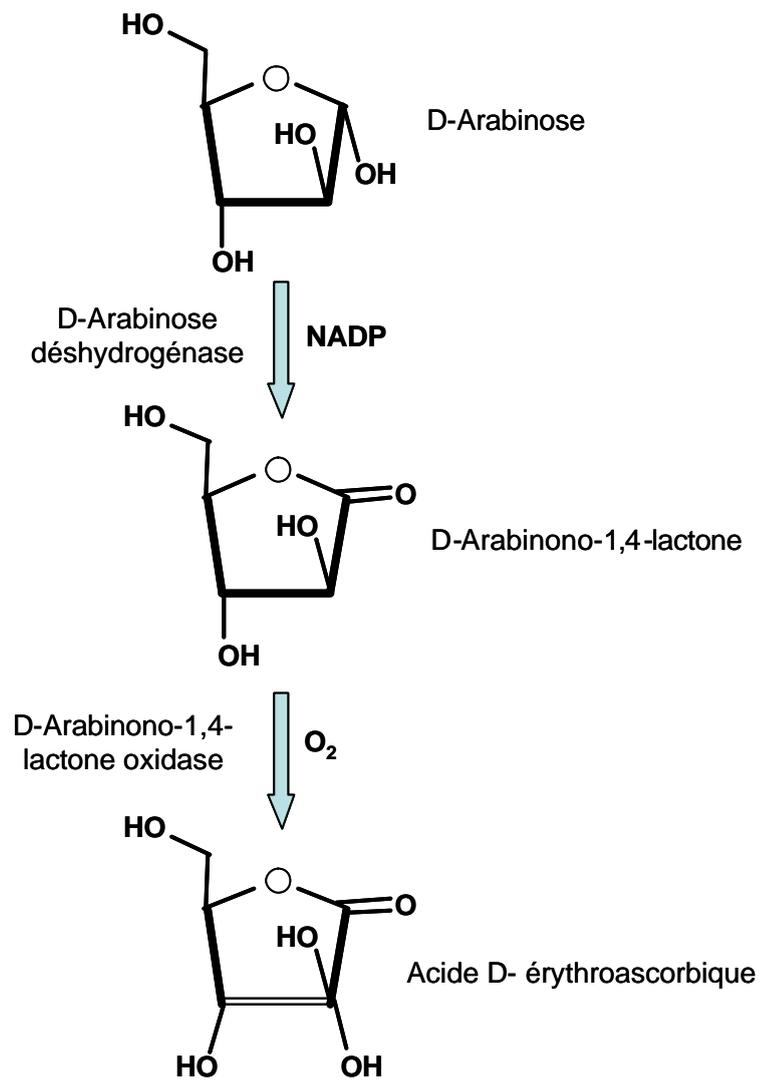


Figure 8. Biosynthèse de D-érythroascorbate chez la levure.

Les trois premières étapes ne sont pas spécifiques à la voie de biosynthèse de l'ascorbate (**figure 10**), elles sont impliquées dans des voies qui participent au métabolisme primaire du carbone. En conséquence, elles ne seront pas détaillées dans ce paragraphe. La première étape utilise comme substrat le D-glucose-6-phosphate qui est converti par la glucose phosphate isomérase (EC 5.3.1.9) en D-fructose-6-phosphate. La seconde réaction consiste en l'isomérisation du fructose-6-phosphate en D-mannose-6-phosphate par la mannose-6-phosphate isomérase (EC 5.3.1.8). L'étape suivante catalysée par la phosphomannose mutase (EC 5.4.2.8) converti le D-mannose-6-phosphate en D-mannose-1-phosphate, le précurseur du GDP-D-mannose.

2.2.2.3.1.a GDP-D-Mannose pyrophosphorylase.

Le point de départ pour l'élucidation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes est l'identification d'une série de mutants ascorbate-déficients chez *Arabidopsis thaliana* (notés *vtc1*, *vtc2* etc...) par Conklin *et al.* (1999 ; 2000). Chez le mutant *vtc1*, la teneur en ascorbate ne représente plus que 30% de la teneur chez les plantes sauvages. Le clonage et le séquençage du locus *vtc1* a permis d'identifier le gène muté. Celui ci code pour la GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP EC 2.7.7.22), enzyme qui catalyse la conversion du D-mannose-1-P en GDP-D-mannose (Conklin *et al.*, 1999). Ils ont montré que les extraits foliaires de plantes *vtc1* présentent une réduction de l'activité GMP équivalente à la réduction de la teneur en ascorbate. Ces résultats suggèrent un rôle du GDP-D-mannose et de l'activité GMP dans la biosynthèse de l'ascorbate et ont été confirmés par la suite dans la voie de biosynthèse proposée par Wheeler *et al.* (1998). Par ailleurs, un travail de transgénèse a montré que la sous-expression de ce gène diminuait le pool d'ascorbate chez la pomme de terre (Keller *et al.*, 1999). L'absence de séquence d'adressage dans le gène de la GMP chez *Arabidopsis*, suggère que cette enzyme est cytosolique (Conklin *et al.*, 1999).

De nombreuses bactéries telles que *Pseudomonase aeruginosa* (Sa-Correia *et al.*, 1987), *Escherichia coli* (Sugiyama *et al.*, 1994), *Acetobacter xylinum* (Griffin *et al.*, 1997), et chez la levure *S cerevisiae* (Hashimoto *et al.*, 1997) possèdent le gène codant pour la GMP. Le gène d'*Arabidopsis thaliana* (*vtc1*) présente une homologie de séquence significative avec son homologue chez les mammifères, la levure, et les bactéries (Conklin *et al.*, 1999). L'*Arabidopsis thaliana* possède 3 gènes codant pour la GMP. Chez la tomate, les bases de données du TIGR suggèrent l'existence de quatre gènes codant pour cette enzyme qui présentent une homologie de séquence élevée avec d'autres plantes telles que l'arabette, le riz et le coton.

A côté de sa fonction en tant que précurseur à l'ascorbate, le GDP-D-mannose, produit de la GMP, participe à un certain nombre de processus cellulaires tels que la biosynthèse de parois et la glycosylation des protéines. Le GDP-D-mannose est également le précurseur de

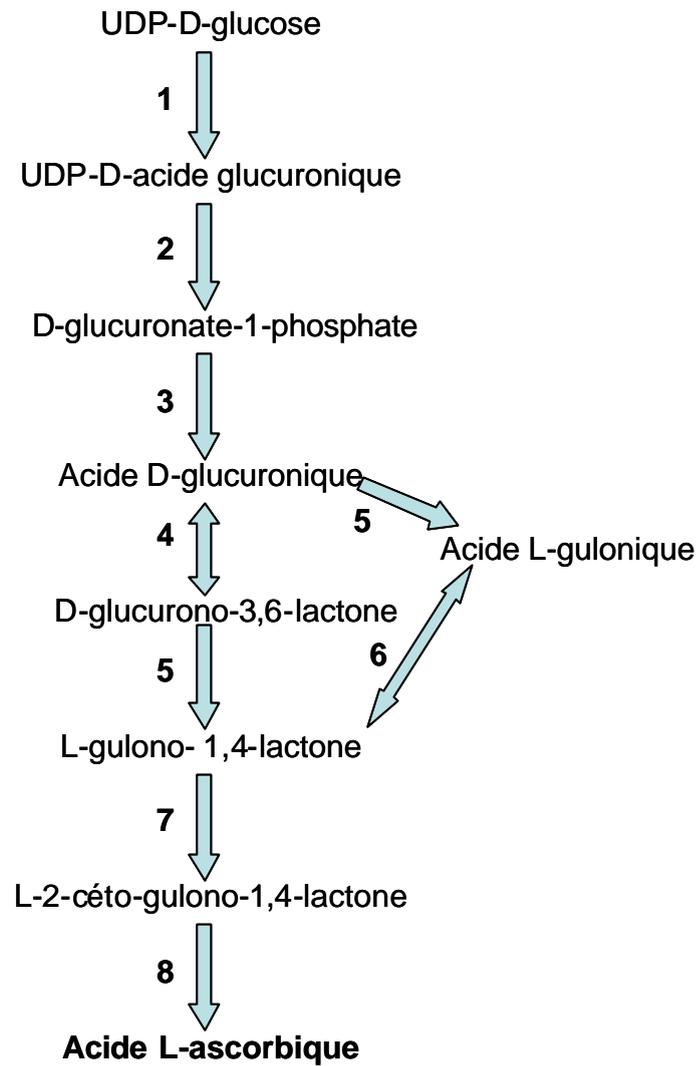


Figure 9. Voie de biosynthèse de l'acide L-ascorbique chez les mammifères.

1, UDP-glucose déshydrogénase ; 2, acide UDP-glucuronique pyrophosphatase ; 3, acide glucuronique réductase ; 4, D-glucuronolactonase ; 5, acide L-glucuronique réductase ; 6, gulono-1,4-lactone hydrolase ; 7, L-gulono-1,4-lactone oxydase ; 8, Non enzymatique.

trois sucres nucléotides, le GDP-D-rhamnose, le GDP-L-galactose et le GDP-L-fucose (Barber, 1968; Baydoun et Fry, 1988 ; Reiter, 1988). Le GDP-D-mannose est le substrat de la GDP-D-mannose-4,6-dehydratase, enzyme qui catalyse la première étape dans la biosynthèse de GDP-L-fucose. Le L-fucose est présent dans la paroi cellulaire et les glycoprotéines. Le D-mannose, produit à partir de GDP-D-mannose, contribue à la structure des polysaccharides, il est présent dans les polymères d'hémicellulose sous forme de galactomannanes et de glucomannanes (Bewley *et al.*, 1997). Le L-galactose, qui est synthétisé à partir de GDP-D-mannose est également un composant mineur des parois cellulaires (Barber, 1971).

2.2.2.3.1.b. GDP-D-Mannose 3,5-épimérase .

Lors de la démonstration de la participation du GDP-D-mannose dans la biosynthèse de l'ascorbate chez la plante par Wheeler *et al.* (1998), il a été également démontré l'existence d'une activité GDP-D-Mannose-3,5-épimérase (GME) qui catalyse l'épimérisation du GDP-D-mannose en GDP-L-galactose. L'activité de la GME a aussi été détectée chez quelques organismes photosynthétiques comme l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*, chez certaines plantes supérieures comme *Linum usitatissimum* (Barber, 1971), et chez le pois et *Arabidopsis thaliana* (Wheeler *et al.*, 1998). L'enzyme GME a été purifié à partir de suspensions de cellules d'*Arabidopsis thaliana*. Le gène correspondant a été identifié et existe en copie unique dans le génome d'*Arabidopsis* (Wolucka *et al.*, 2001). Chez la tomate, les données du TIGR suggèrent l'existence de 2 gènes pour la GME. Récemment, Wolucka et Van Montagu (2003) ont démontré que la GDP-D-mannose épimérase d'*Arabidopsis thaliana* surexprimée chez *E. coli* et purifiée peut catalyser in vitro deux épimérisations distinctes qui mènent à la synthèse de GDP-L-galactose et de GDP-L-gulose. Watanebe *et al.* (2006) a également confirmé une telle dualité de réaction de la part de cette enzyme chez *Oryza sativa*. Wolucka et Van Montagu (2003) suggèrent que le GDP-L-gulose pourrait être précurseur majeur de la biosynthèse *de novo* de la vitamine C chez les plantes. Chez les plantes, la GME semble être une enzyme clé dans la régulation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate car elle pourrait contrôler le flux de carbone dirigé vers la synthèse d'ascorbate en fonction de l'état redox de la cellule, de la disponibilité des sucres pour la biosynthèse des glycoprotéines des parois cellulaires, et des conditions de stress (Wolucka et Van Montagu, 2003).

2.2.2.3.1.c. L-galactose déshydrogénase

Il est important de noter que suite à la synthèse du GDP-L-galactose deux intermédiaires ont été identifiés, le L-galactose-1-phosphate et le L-galactose. En revanche, les activités enzymatiques correspondantes, phosphodiéstérase et sucre phosphatase, et qui sont

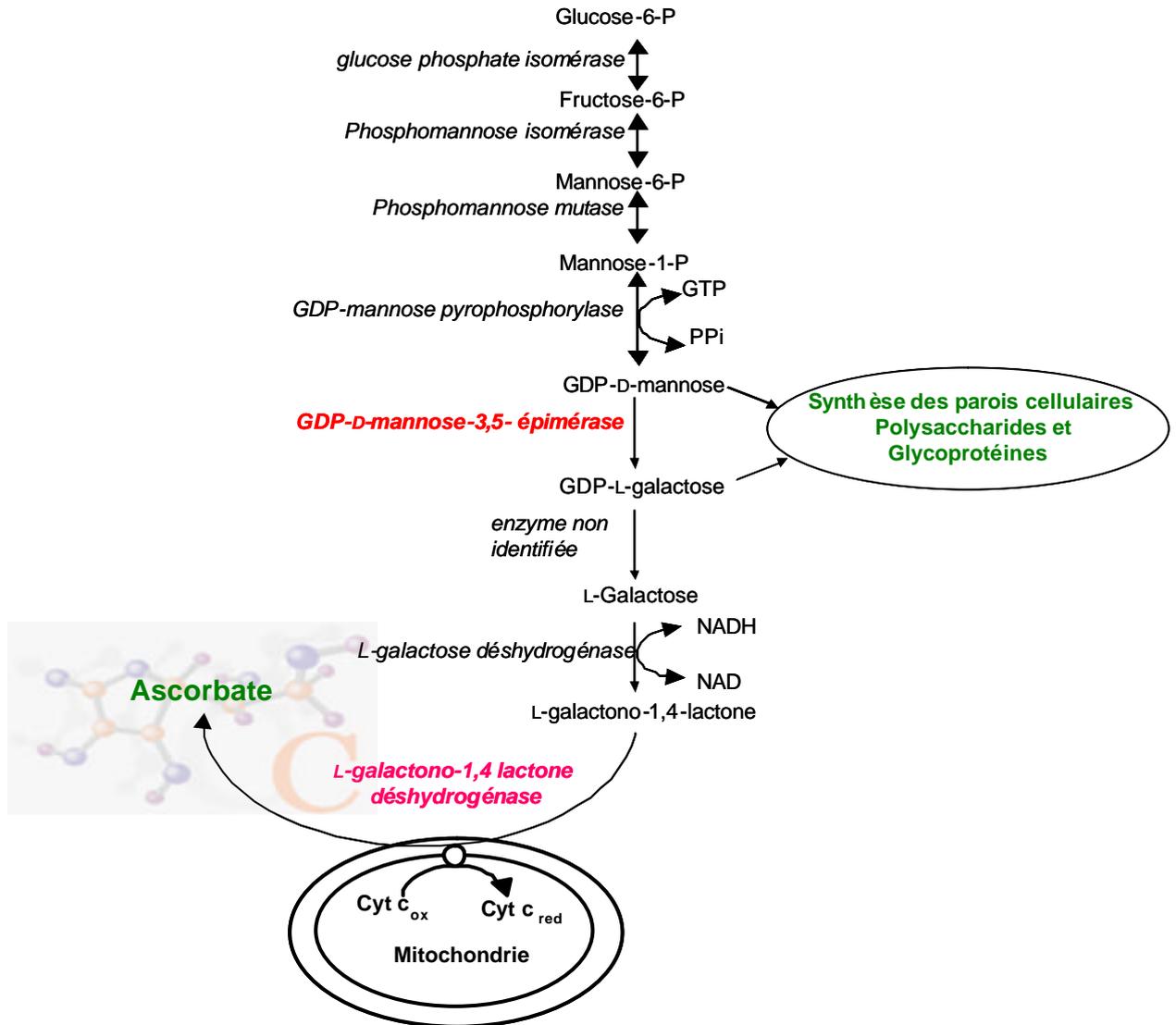


Figure 10. Voie de biosynthèse de l'acide L-ascorbique chez les plantes supérieures proposée par Wheeler *et al.*, (1998).

nécessaires à la conversion du GDP-L-galactose en galactose-1-phosphate puis en L-galactose, n'ont à ce jour jamais été caractérisées chez les plantes. Le L-galactose est ensuite converti par la L-galactose déshydrogénase en L-galactono-1,4-lactone.

L'ADNc codant pour une galactose déshydrogénase (GalDH) a été isolé et caractérisé chez l'*Arabidopsis thaliana* et l'épinard (Gatzek *et al.*, 2002 ; Mieda *et al.*, 2004). Le gène correspondant a été identifié et existe en copie unique dans le génome d'*Arabidopsis* et chez l'épinard (Gatzek *et al.*, 2002 ; Mieda *et al.*, 2004). La caractérisation biochimique de la GalDH chez l'épinard démontre qu'il s'agit d'une protéine cytosolique et la réaction est irréversible (Mieda *et al.*, 2004). Ces auteurs ont ainsi suggéré que l'étape de déshydrogénation du galactose pouvait être un point de contrôle de la voie « Smirnof » . Mieda *et al.* (2004) ont montré que chez l'épinard, la GalDH est inhibée de manière compétitive par le produit final de la voie, l'ascorbate, suggérant un rétrocontrôle de cette voie par l'ascorbate chez les plantes. Par ailleurs, des travaux de transgénèse ont montré que la sur-expression de la GalDH n'induit pas d'augmentation d'ascorbate dans les feuilles chez les plantes de tabac. De même que chez *Arabidopsis*, la suppression de cette activité par stratégie antisens, ne provoque pas de diminution du pool d'ascorbate lorsque les plantes sont cultivées sous faible luminosité (Gatzek *et al.*, 2002). Ces données démontrent que la régulation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes est certainement plus compliquée qu'il n'y paraît.

2.2.2.3.1.d. L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase.

La dernière étape de la voie de biosynthèse d'ascorbate proposée par Wheeler *et al.* (1998) est catalysée par la L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH, EC 1.3.2.3), qui convertit la L-galactono-1,4-lactone (L-GaL) en ascorbate. Cette enzyme est connue chez les plantes depuis 1958 par les travaux de Mapson et Breslow. Dès 1970, les travaux de Baig *et al.* ont démontré que la fourniture d'une solution à 0.25% de L-galactono-1,4-lactone pendant 6h à des pousses de haricot induit une augmentation par 3 de la teneur en ascorbate et suggèrent que la L-GaL est le substrat direct de l'ascorbate. Bien plus tard et dans le même type d'expérience, Pallanca et Smirnof (1999) ont démontré que la L-GaL est rapidement convertie en ascorbate par des axes embryonnaires de pois. Enfin, Siendones *et al.*, (1999) ont montré que les hypocotyles de haricots pré-incubés en présence de L-GaL pendant 48 h accumulent 6fois plus d'ascorbate et présentent une augmentation similaire de l'activité GalLDH en comparaison avec des hypocotyles incubés dans de l'eau distillée.

Une corrélation étroite entre le niveau d'expression de la GalLDH et la teneur en ascorbate a été montrée chez des cultures de cellules de tabac et le melon (Tabata *et al.*, 2001; Pateraki *et al.*, 2004). Enfin, Tamaoki *et al.* (2003) révèlent qu'il existe une relation directe entre le niveau d'expression, l'activité enzymatique et le contenu d'ascorbate chez

Arabidopsis thaliana. De même, pour les cellules de tabac BY-2 transformées avec l'ARNm de la GalLDH en orientation anti-sens, la réduction de l'accumulation des transcrits GalLDH, de la quantité de protéine GalLDH et de l'activité correspondante, sont parallèlement associées à une réduction de 30% de la teneur en ascorbate par rapport aux cellules BY-2 sauvage (Tabata *et al.*, 2001).

Chez beaucoup de plantes, l'enzyme GalLDH est localisée dans la mitochondrie. Østergaard *et al.* (1997) ont rapporté que chez le chou-fleur, le produit de traduction des transcrits GalLDH possède un peptide d'adressage mitochondrial putatif. Ce peptide signal est riche en résidus alanine, leucine, arginine et serine, aux nombre de 11, 10, 8 et 10, respectivement, et présente peu ou pas du tout de résidus aspartate, glutamate, isoleucine et valine (0, 3, 2, et 0, respectivement), ce qui est caractéristique d'une séquence d'adressage mitochondriale (Von Heijne, 1986). Des résultats similaires sont observés pour la protéine de patate douce, de tabac, d'arabidopsis et de melon (Imai *et al.*, 1998; Yabuta *et al.*, 2000; Tamaoki *et al.*, 2003 et Pateraki *et al.*, 2004). D'ailleurs, un site de maturation putatif (FR/YA) dans la séquence peptidique de la GalLDH est présent chez le chou-fleur (Østergaard *et al.*, 1997) et aussi chez les espèces citées précédemment (Imai *et al.*, 1998 ; Yabuta *et al.*, 2000 et Tamaoki *et al.*, 2003). L'étude biochimique de la GalLDH chez le haricot démontre qu'il s'agit d'une protéine liée à la membrane interne mitochondriale (Siendones *et al.*, 1999). Ce résultat a été confirmé par la suite (Bartoli *et al.*, 2000 ; Yabuta *et al.*, 2000). Selon Bartoli *et al.* (2000), environ 80% de l'activité totale GalLDH est associée à la membrane interne mitochondriale et le site catalytique de l'enzyme serait orientée vers la face externe de la membrane interne *i.e.* dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. De plus, ces auteurs ont suggéré que lors de la conversion du L-GaL en ascorbate, l'enzyme GalLDH fournit des électrons au cytochrome c (Cyt c) entre les complexes III et IV (**figure 11**). Cela laisse penser que la biosynthèse d'ascorbate est reliée à la chaîne de transport d'électron dans la mitochondrie. D'un point de vue mécanistique et physiologique, il paraît avantageux que le cytochrome c serve d'accepteur d'électron unique pour la GalLDH (Mutsuda *et al.*, 1995; Ôba *et al.*, 1995; Østergaard *et al.*, 1997). En effet, le cytochrome c est orienté vers la face externe de la membrane interne de la mitochondrie; par conséquent, lors de la catalyse, cet arrangement spatial favorise fortement l'efficacité du transfert d'électrons entre les deux partenaires protéiques, puis les électrons du cytochrome c sont transférés à l'oxygène moléculaire par le complexe cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire, produisant l'ATP. Récemment, Millar *et al.*, (2003) ont suggéré que la biosynthèse d'ascorbate pouvait être contrôlée par la respiration. Dans ce cas, l'activité GalLDH serait régulée par le flux des électrons qui transitent par le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'ADNc codant pour la GalLDH a été isolé et caractérisé chez plusieurs plantes comme le chou-fleur (Østergaard *et al.*, 1997), la patate douce (Imai *et al.*, 1998), le tabac

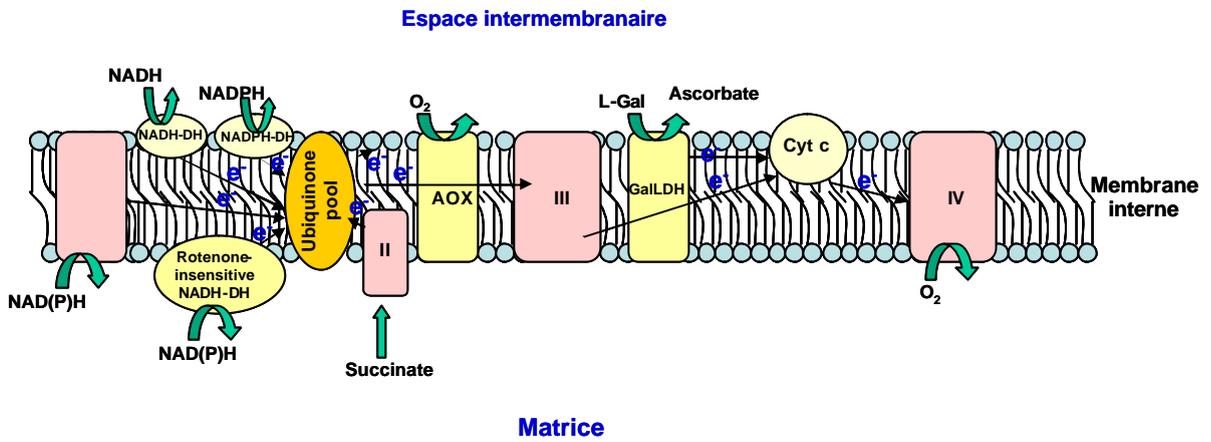


Figure 11. Interaction hypothétique entre la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (**GalLDH**) et la chaîne de transport d'électron mitochondrial. (Adapté de Bartoli *et al.*, 2000). Les électrons fournis par le GalLDH à la Cyt c entre complexes **III** et **IV**, pendant que galactono-1,4-lactone (L-Gal) converti en ascorbate.
Abréviation : **AOX**, oxydase alternative; **DH**, déshydrogénase.

(Yabuta *et al.*, 2000) et *Arabidopsis* (Tamaoki *et al.*, 2003). Cette enzyme est codée par un seul gène chez la patate douce et le tabac (Imai *et al.*, 1998 ; Yabuta *et al.*, 2000), ce qui est également le cas chez la tomate (cf mes résultats). Selon les plantes, la GalLDH est une protéine de masse moléculaire comprise entre 56-57 kDa (Ôba *et al.*, 1995 ; Mutsuda *et al.*, 1995 ; Østergaard *et al.*, 1997 ; Imai *et al.*, 1998 ; Yabuta *et al.*, 2000 ; Tamaoki *et al.*, 2003). L'ascorbate synthétisé dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie est alors disponible pour le cytosol et les autres compartiments de la cellule (vacuoles, chloroplastes) et l'apoplaste. En effet, à ce jour, aucun transporteur d'ascorbate n'a été mis en évidence, et selon Rautenkranz *et al.*, (1994), le processus suivrait un gradient de concentration. Dans le cas du chloroplaste, la translocation de l'ascorbate se produirait par diffusion facilitée (Foyer et Lelandais, 1996).

2.2.2.3.2. Autres voies de biosynthèse de l'ascorbate.

A côté de la voie majeure dite de "Smirnoff", d'autres voies de biosynthèse de l'ascorbate ont été proposées depuis une dizaine d'année. Ainsi, dans leurs travaux, Saito *et al.* (1990) et Loewus *et al.* (1990) ont proposé une autre voie qui impliquerait comme précurseur de l'ascorbate le D-glucosone et le L-sorbosone. Cette hypothèse repose uniquement sur le fait que ces auteurs ont observé une légère incorporation de radioactivité issue de ¹⁴C-glucosone et ¹⁴C-sorbosone dans l'ascorbate.

Plus tard, Jain et Nessler (2000) ont suggéré que la voie animale pouvait contribuer à la biosynthèse de l'ascorbate chez les plantes (**figure 12**). Ces auteurs ont observé une augmentation de 4 à 7 fois de la teneur en ascorbate chez des plantes de salade et de tabac ayant intégré dans leur génome l'ADNc codant pour la L-gulonono-1,4-lactone oxidase de rat. Chez les animaux, cette enzyme catalyse la dernière étape de la voie entre la L-gulonono-1,4-lactone et l'ascorbate. Néanmoins, il n'a pas été démontré que cette enzyme puisse être produite normalement par la plante, ni qu'elle soit capable d'utiliser les précurseurs de l'ascorbate chez la plante. Récemment, une analyse du métabolome d'*Arabidopsis* a montré la présence d'acide gulonique dans les cellules, ce qui soutient la possibilité d'une voie de type animale chez les plantes (Wagner *et al.*, 2003)

En 2003, les travaux de Wolucka et Van Montagu ont suggéré l'existence d'une voie alternative qui impliquerait un isomère du GDP-L-galactose : le GDP-L-gulose. Dans leur étude ces auteurs ont étudié les propriétés enzymatiques de la GDP-D-mannose épimérase d'*Arabidopsis* surexprimée dans *E. coli* et purifiée à homogénéité. Ils ont démontré que cette enzyme est capable de réaliser deux épimérisations distinctes du GDP-D-mannose qui conduisent à la formation du GDP-L-galactose (voie de Smirnoff) et du GDP-gulose (**figure 12**). L'existence de GDP-L-gulose n'a jamais été rapportée chez les plantes. Wolucka et Van Montagu ont émis l'hypothèse que la GDP-D-mannose épimérase serait une enzyme clé

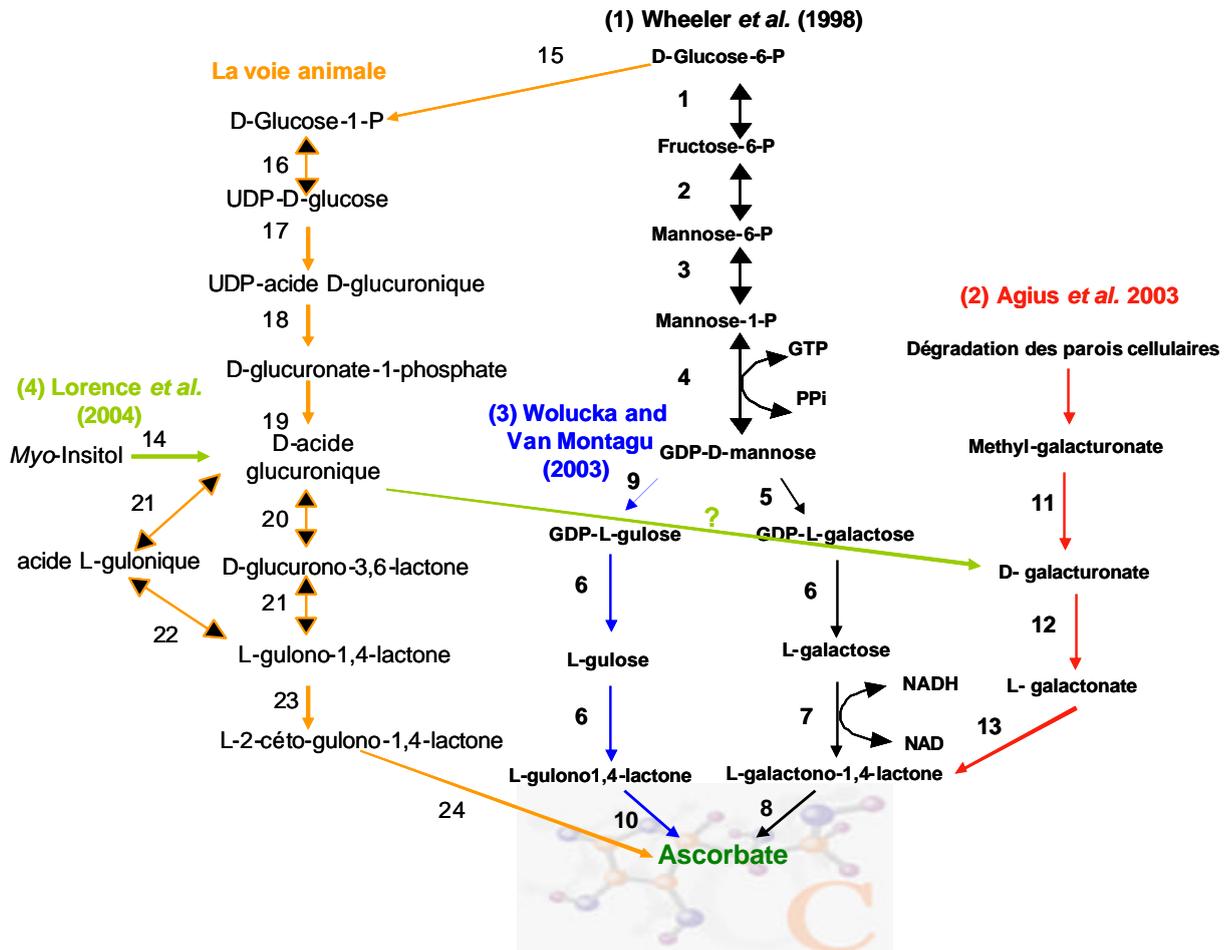


Figure 12. Schéma décrivant les interconnexions hypothétiques entre les voies de biosynthèse de l'acide L-ascorbique chez les plantes (réaction 1-14) et chez les animaux (réaction 15-24). Quatre voies fonctionneraient chez les plantes, Wheeler *et al.*(1998), Agius *et al.* (2003), Wolucka Van Montagu. (2003), et Lorence *et al.* (2004). Les enzymes qui catalysent les réactions sont: 1-glucose phosphate isomérase; 2, Phosphomannose isomérase; 3, Phosphomannose mutase; 4, GDP-mannose pyrophosphorylase; 5, GDP-mannose-3,5- épimérase; 6, enzyme non identifiée; 7, L-galactose déshydrogénase; 8, L-galactono-1,4 lactone déshydrogénase; 9, GDP-mannose-3-épimérase; 10, L-gulono-1,4-lactone déshydrogénase/ Oxydase; 11, méthyl-estérase; 12, D-galacturonate réductase; 13, aldono-lactonase; 14, *myo*-inositol oxygénase; 15, phosphoglucomutase; 16, UDP-glucose pyrophosphorylase; 17, UDP-glucose déshydrogénase; 18, acide UDP-glucuronique pyrophosphatase; 19, acide glucuronique réductase; 20, D-glucuronolactonase; 21, acide Lglucuronique réductase; 22, gulono-1,4-lactone hydrolase; 23, L-gulono-1,4-lactone oxydase; 24, Non enzymatique. Le point d'interrogation indique que l'enzyme de cette réaction n'est pas encore connue.

dans la biosynthèse de l'ascorbate. La synthèse de GDP-gulose et des étapes enzymatiques qui en découlent correspondraient à la voie majeure de biosynthèse *de novo* de l'ascorbate alors que la réaction qui conduit à la production du GDP-galactose serait une alternative pour diriger le flux de carbone à la fois vers la biosynthèse des parois et vers l'ascorbate proprement dit. Ainsi, lorsque l'on fournit du GDP-L-gulose à une suspension de cellules d'*Arabidopsis*, une augmentation du contenu d'ascorbate du même ordre de grandeur que celle obtenue lors de l'ajout de L-galactose est observée.

Dans la même période, une autre voie a été proposée par Agius *et al.* (2003). Ces auteurs ont étudié la synthèse d'ascorbate au cours de la maturation de la fraise. Comme dans beaucoup de fruits, chez la fraise, l'accumulation d'ascorbate est maximale au cours de la maturation, phase durant laquelle le fruit subit des changements de texture importants et notamment une réduction de sa fermeté. Ainsi, lors de la maturation de la fraise, l'ascorbate n'est pas synthétisé selon la voie classique de "Smirnoff" mais à partir des produits d'hydrolyse des polysaccharides pariétaux qui résultent des modifications des propriétés physico-chimique du fruit et conduisent à son ramollissement (**figure 12**). Le composé majeur issu de la dégradation des parois est l'acide D-galacturonique, qui est dans cette voie le précurseur de l'ascorbate. L'acide galacturonique est par la suite réduit par l'acide D-galacturonique réductase (GalUR) pour devenir l'acide L-galactonique, qui est ensuite converti par une aldono lactonase en L-galactono-1,4-lactone, précurseur direct de l'ascorbate. La dernière étape est identique à la voie de "Smirnoff" et nécessite la L-galactono-lactone déshydrogénase. Agius *et al.* (2003) ont également montré que la surexpression de GalUR de fraise chez *Arabidopsis* induit une augmentation d'un facteur 2-3 de la teneur en ascorbate.

Récemment, Lorence *et al.* (2004), ont proposé l'existence d'une autre alternative pour la synthèse de l'ascorbate. Cette voie utiliserait comme précurseur le myo-inositol, substrat d'une myo-inositol oxygénase qui produirait l'acide glucuronique, un des intermédiaires de la voie animale (**figure12**). En effet, l'expression ectopique de la myo-inositol oxygénase d'*Arabidopsis* induit une augmentation significative de la teneur en Ascorbate dans des plantes d'*Arabidopsis* transgéniques. Cependant, la contribution du myo-inositol dans la biosynthèse de l'ascorbate *in vivo* n'a encore jamais été démontré chez les plantes.

L'ensemble de ces travaux semble indiquer que de multiples voies de biosynthèse de l'ascorbate sont fonctionnelles chez les plantes. Même si la voie de "Smirnoff" est actuellement la voie majoritairement admise et si l'existence de telles voies alternes reste à démontrer, ceci prouve que la biosynthèse de la vitamine C chez les plantes implique un métabolisme complexe qui n'est pas encore totalement établi et que des efforts considérables doivent être réalisés dans ce sens.

2.3. Rôle de la vitamine C dans la cellule.

2.3.1. La vitamine C et la nutrition humaine

L'étude du scorbut, une des maladies les plus anciennement connues, marque le point de départ des recherches sur la vitamine C. L'histoire de la vitamine C aurait pu s'arrêter aux travaux de Szent-Györgyi Nagrapolt et Haworth des années 1930, si en 1970, le professeur Linus PAULING n'avait pas déclenché la polémique en lui associant des propriétés de protection contre le rhume. Dès lors, les travaux sur l'acide ascorbique se sont multipliés d'autant plus que la molécule semble jouer un rôle dans des mécanismes aussi diversifiés qu'importants au niveau de la santé humaine : réactions immunitaires, oxydation cellulaire, cancer, hypertension, risques cardiovasculaires, cataracte, etc.... (Naidu, 2003).

Actuellement les avantages santé de l'acide ascorbique sont très controversés. Par exemple, certaines des études cliniques et épidémiologiques menées sur les effets anticarcinogènes de l'acide ascorbique chez l'homme n'ont montré aucun effet bénéfique concluant pour plusieurs types de cancer excepté le cancer de l'estomac. Une étude de l'action des dérivés de l'acide ascorbique sur des cellules de cancer humain a montré que seul l'ascorbyl stéarate empêche la prolifération des cellules cancéreuses. L'ensemble des résultats est encore insuffisant pour définir le rôle de l'acide ascorbique et de ces dérivés dans la biologie et la santé humaine. Afin de mieux comprendre la fonction de l'acide ascorbique chez l'homme, il paraît indispensable que des études d'ordre pharmaceutique et clinique plus poussées soient menées en parallèle dans le futur (Naidu, 2003).

Suite à des mutations au sein de la voie de biosynthèse de la vitamine C, certains mammifères, comme les primates et les êtres humains, ont perdu la capacité de la synthétiser. Puisque la vitamine C est vitale pour ces mammifères, c'est au travers de leur alimentation qu'ils doivent se la procurer. Chez l'homme, les végétaux constituent la principale source de vitamine C (**tableau 1**), principalement les légumes verts feuillus et les fruits comme ceux de la famille des agrumes, les baies (cassis, groseille), les kiwis etc..... Parmi les fruits disponibles pour l'homme, l'acérola (*Malpighia puniceifolia*) aussi connue sous le nom de cerise des Indes Occidentales qui pousse en Amérique du Sud est le fruit le plus riche en vitamine C (1745 mg/100 g). Seuls les aliments consommés crus et frais apportent la vitamine C directement disponible pour l'organisme. La vitamine C est très sensible à la chaleur et la lumière, et un milieu acide préserve son activité. Les viandes, les produits laitiers et les céréales sont des sources faibles en vitamine C d'autant plus qu'ils subissent souvent une transformation (cuisson, fermentation, traitement UHT, etc....) avant d'être consommés. La quantité de vitamine C quotidienne recommandée pour un enfant est d'environ 50 mg, pour un adulte 60 mg, 70 mg pendant la grossesse et 95 mg pendant la lactation (Ronald *et al.*, 1999). En France, selon la Section de Nutrition de l'INSERM (Institut

Table 1. Teneur en ascorbate dans les fruits, les légumes et les produits animaux

Fruits	mg/100g	Légumes	mg/100g
Pomme	2-30	Asperge	15-30
Banane	8-16	Avocat	10
Mûre	8-10	Brocoli	80-90
Cerise	15-30	Betterave	6-8
Raisin sec rouge	20-50	Haricot	10-15
Raisin sec noir	150-200	Choux de Bruxelles	100-120
Raisin	2-5	Choux	30-70
Pamplemousse	30-70	Carrote	5-10
Kiwi	80-90	Concombre	6-8
Citron	9-60	Chou-fleur	50-70
Mangue	10-15	Audergine	15-20
Orange	30-50	Ciboulette	40-50
Poire	2-5	Salade frisée	70-100
Ananas	15-25	Salade	10-30
Prune	2-3	Onion	10-15
Fruit de l'églantier	250-800	Pois	8-12
Fraise	40-70	Pomme de terre	4-30
Tomate	10-20	Potiron	15
Acérola	1745	Radis	25
Produits animaux		Poivron	150-200
Lait vache	0.5-2	Endive	33
Lait humain	3-6	Coriandre	90
Bœuf	1-2	Ail	60
Veau	1-1.5	Raifort	45
Foie de poulet	15-20	Poireau	15
Foie de bœuf	10	Persil	200-300
Rein des poulets	6-8	Papaye	39
Cœur de poulet	5		
Gésier de poulet	5-7		
Crabe	1-4		
Homard	3		
Crevette	2-4		

Teneur en ascorbate dans les fruits, légumes et produit d'origine animale exprimée en mg/100g matière fraîche. (Adapté de Johnston *et al.*, 2001).

National de la Santé et de la Recherche Médicale), la consommation quotidienne d'acide ascorbique varie entre 56 mg et 91 mg pour un adulte (Mareschi *et al.*, 1980).

2.3.2. Rôle de l'ascorbate chez les plantes :

Dans la plante, l'ascorbate fait partie des métabolites les plus abondants, présents à la fois dans les tissus photosynthétiques et non-photosynthétiques. Parmi les nombreux rôles qui lui sont attribués, relativement peu ont bien été caractérisés. Il est cependant clair que dans la cellule végétale, l'ascorbate est l'antioxydant hydrosoluble majeur qui participe aux mécanismes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le superoxyde (O_2^-) et les radicaux d'hydroxyle (OH). Ces formes actives de l'oxygène sont formées à partir de réactions métaboliques spécifiques, telles que la chaîne de transfert des électrons lors de la photosynthèse et la respiration mais aussi proviennent de diverses réactions d'oxydation. En condition optimale, ces espèces réactives d'oxygènes sont maintenues à un niveau suffisamment faible pour ne pas provoquer d'importants dégâts dans la cellule grâce à des mécanismes enzymatiques telles que le cycle de Mehler-peroxydase (**figure 14**) au niveau du chloroplaste (Asada, 1999) et le cycle ascorbate-glutathion (**figure 13**) présent dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries, l'apoplaste et les peroxisomes (Millter, 2002).

2.3.2.1. L'antioxydant : acide ascorbique

Le terme antioxydant décrit tout composé capable de neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sans lui même subir de conversion en radical nocif pour la cellule. L'ascorbate joue un rôle important contre le stress oxydatif provoqué par les espèces réactives de l'oxygène. En effet, dans les plantes cultivées en conditions normales, les ERO sont produites lors de la photosynthèse sous forme d'oxygène singulet et lors de la photoréduction de l'oxygène sous la forme de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). De plus, dans de nombreuses conditions, le niveau des ERO peut augmenter considérablement, par exemple lorsque la plante est soumise à des stress abiotique et biotique tels que l'exposition à de fort rayonnement (lumière, UV), la sécheresse, des températures extrêmes, une carence nutritive, un excès de salinité, une exposition à des polluants de l'air (l'ozone et le dioxyde de sulfure), des herbicides (Paraquat), des métaux phytotoxiques (zinc, cuivre, cadmium, etc) et aussi un stress de blessure comme lors d'attaque de pathogène (insecte, champignons) ou l'action des herbivores. Dans tous ces cas, l'ascorbate participe aux mécanismes antioxydants de défense qui vont réduire le niveau intracellulaire des ERO (Foyer *et al.*, 1994). L'ascorbate réagit directement avec plusieurs ERO tels que les radicaux d'hydroxyle (OH) et l'oxygène singulet (1O_2) (Padh, 1990) et indirectement dans le cas de l' H_2O_2 grâce à des enzymes antioxydantes telles que l'ascorbate peroxydase (Asada

1992). Enfin, l'ascorbate permet la régénération de l' α -tocophérol sous sa forme réduite après qu'il ait joué son rôle d'antioxydant dans la réduction des groupements peroxy formés lors de la peroxydation des lipides.

Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux ont décrit les conséquences d'un stress oxydatif sur l'état redox du pool d'ascorbate chez les plantes. Des plantes de tabac *Nicotiana glauca* cultivées en présence de concentration toxique en NaCl ou CuSO₄ pendant 5 jours, présentent une oxydation complète du pool d'ascorbate en radicaux de MDHA (Savouré *et al.*, 1999). Des jeunes plantules de blé *Triticum durum* cultivées à des températures élevées pendant un mois présentent une réduction significative du rapport AsA/DHA (Paolacci *et al.*, 1997). Le même résultat est observé chez le mutant ascorbate-déficient d'*Arabidopsis thaliana* (*vtc1*) en condition standard de culture (Conklin *et al.*, 1996). C'est lors du criblage d'une collection de mutants EMS (éthyl méthanesulfonate) pour leur sensibilité au traitement par un oxydant très puissant, l'ozone, que Conklin *et al.* (1995) ont isolé des plantes qui présentaient une sensibilité accrue vis-à-vis de l'ozone. Ainsi, 8 h d'exposition à 250 ppb d'ozone entraînaient la mort prématurée de ces mutants. Par la suite, la caractérisation des mutants a montré que la teneur en ascorbate dans les tissus foliaires était réduite de 70% par rapport aux plantes sauvages (Conklin *et al.*, 1996). L'ajout d'ascorbate au milieu de culture a permis de supprimer l'hypersensibilité à l'ozone. De cette étude, Conklin *et al.* ont également observé que ces mutants sont plus sensibles aux irradiations d'UVB et au dioxyde de soufre. Ces résultats démontrent le rôle antioxydant de l'ascorbate chez les plantes lorsqu'elles doivent faire face à divers stress environnementaux (Conklin *et al.*, 1996).

Au cours de son oxydation, l'ascorbate réduit (AsA) perd un électron et devient le monodéhydroascorbate (MDHA). Le MDHA est très instable et peut être réduit grâce à la MDHA réductase pour redonner de l'AsA. S'il n'est pas rapidement réduit, il se combine à une autre molécule de MDHA pour donner une molécule d'AsA et une molécule de déhydroascorbate (DHA). Ainsi, dans la réaction catalysée par l'ascorbate peroxydase, deux molécules d'AsA sont utilisées pour réduire l'H₂O₂ en H₂O, et deux molécules de MDHA sont produites. La régénération de l'AsA se fait donc de façon enzymatique ou non enzymatique à partir des radicaux MDHA et DHA grâce au cycle ascorbate-glutathion qui implique plusieurs enzymes ainsi que plusieurs compartiments cellulaires (**figure 13**). Un dysfonctionnement des mécanismes antioxydants va conduire à une accumulation des ERO. L'excès de ERO est préjudiciable pour l'intégrité cellulaire car ils provoquent la peroxydation des lipides membranaires, processus dans lequel les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet réagissent avec les groupements méthylène des chaînes lipidiques poly-insaturées pour former des diènes conjugués, des radicaux lipidiques et des ions hydroperoxydes. Cette première étape est suivie d'une série de réactions de peroxydation en cascade dans

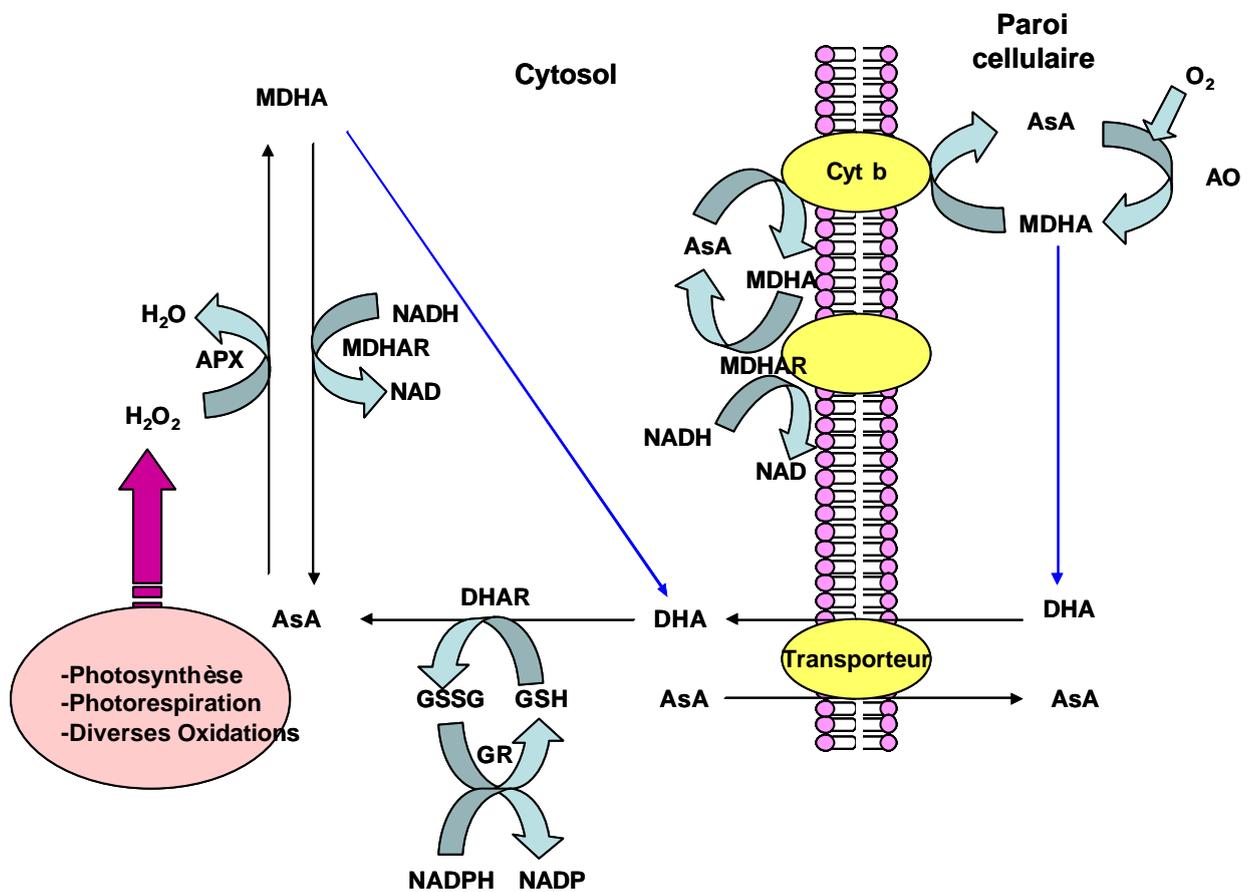


Figure 13. Schéma présentant les voies du recyclage de l'ascorbate impliquant plusieurs réactions d'oxydation/réduction associées à son transport au travers de la membrane plasmique (d'après Smirnoff, 2000).

AO, ascorbate oxidase; APX, ascorbate peroxydase; DHA, déhydroascorbate; DHAR, Déhydroascorbate réductase; GR, glutathion réductase; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; H₂O₂, Peroxyde d'hydrogène; MDHA, monodéhydroascorbate; MDHAR, monodéhydroascorbate réductase

lesquelles les radicaux peroxydes vont venir arracher les atomes d'hydrogène d'autres acides gras insaturés (Smirnoff, 1995). De plus, les aldéhydes formés par peroxydation des lipides peuvent se conjuguer aux protéines et les inactiver. Les radicaux hydroxyles peuvent également dénaturer les protéines, réagir avec l'ADN et induire des mutations (Wolff *et al.*, 1986). L'hydrogène peroxyde H_2O_2 peut inactiver certaines enzymes, comme celles du cycle de Calvin régulées par la lumière (Kaiser, 1979 ; Charles et Halliwell, 1980). Tous ces phénomènes peuvent être minimisés par l'action antioxydante de l'ascorbate.

2.3.2.2 Le rôle de l'ascorbate dans la photosynthèse.

Dans leurs travaux, Marré *et al.*, (1959) ont suggéré l'implication de l'ascorbate dans la photosynthèse. Ces auteurs ont observé que les chloroplastes pouvaient oxyder l'AsA en MDHA et inversement réduire le MDHA en ascorbate. Ces processus étaient dépendants de la réaction de photolyse de l'eau et du flux d'électron et nécessitaient la participation de l'enzyme MDHA réductase. Plus tard, la caractérisation de la chaîne de transport des électrons lors de la photosynthèse a permis de montrer que dans le chloroplaste, l'ascorbate et le glutathion sont impliqués dans les mécanismes de réductions des ERO produits par la réaction de Mehler qui a lieu au niveau des photosystème I et II (Foyer et Halliwell, 1976 ; Anderson *et al.*, 1983 ; Asada, 1999). La **figure 14** résume l'état des connaissances actuel sur les rôles de l'ascorbate au cours de la photosynthèse. Les ERO formés pendant la photosynthèse, les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet sont directement neutralisés par l'AsA. Lors de la réaction catalysée par la superoxyde dismutase, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit à partir de l'oxygène superoxyde (O_2^-), peut être réduit ensuite par l'ascorbate peroxydase associée à la membrane des thylacoïdes et présentes aussi dans le stroma (Asada, 1999).

En plus de son rôle direct dans la régulation de la photosynthèse, l'ascorbate possède un rôle de photo-protecteur puisqu'il participe au maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurale de la cellule photosynthétique. Ceci est d'autant plus vrai que généralement la concentration d'ascorbate dans les feuilles est directement proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue (Grace et Logan, 1996). La gamme de concentration mesurée dans les feuilles varie de 2 à 20 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de poids frais, alors que sa concentration dans chloroplastes varie entre 10 à 300mM (Foyer *et al.*, 1983 ; Rautenkranz *et al.*, 1994 ; Streb *et al.*, 1997) ce qui fait de l'ascorbate l'un des métabolites les plus abondants du chloroplaste avant la chlorophylle.

Enfin, l'ascorbate est un cofacteur dans la voie de biosynthèse des xanthophylles au niveau des chloroplastes. Dans cette voie, l'AsA fournit les électrons à la violaxanthine dé-époxydase, enzyme associée à la membrane des thylacoïdes, qui catalyse la conversion de

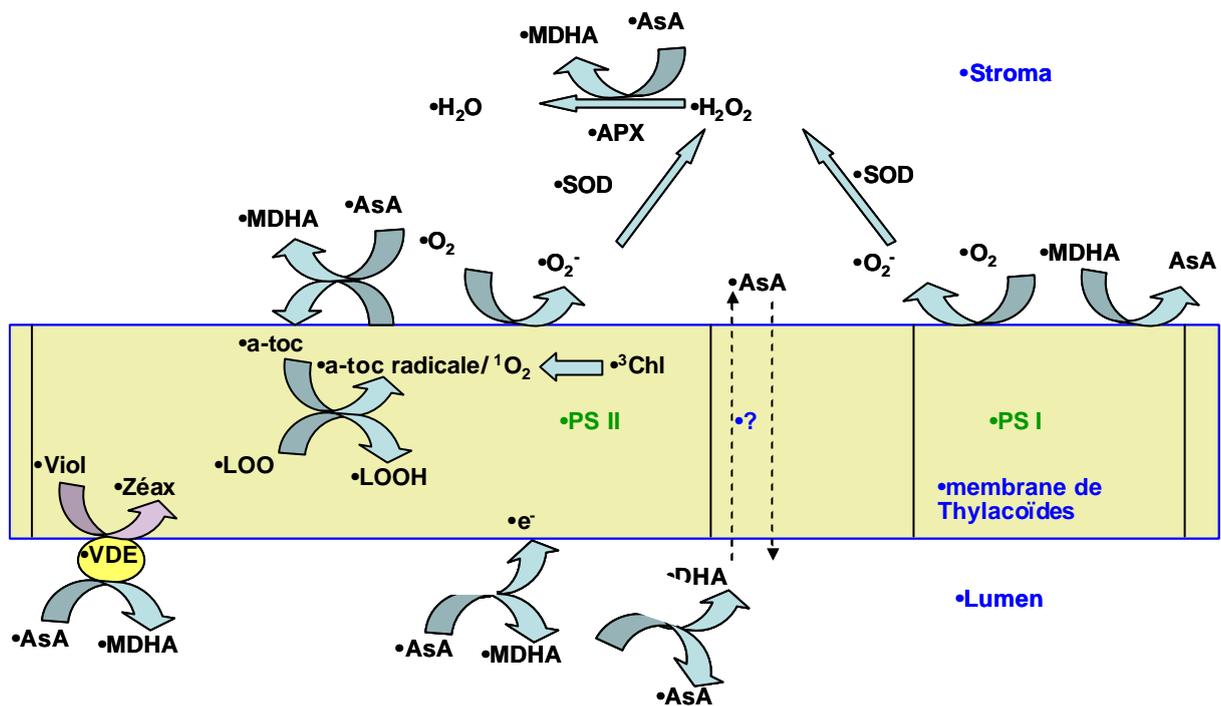


Figure 14. Le rôle de l'ascorbate au cours de la photosynthèse (d'après Smirnoff, 2000b).
APX, ascorbate peroxydase ; **AsA**, ascorbate réduit ; **³Chl**, triplet chlorophylle ; **DHA**, déhydroascorbate ; **LOO**, radical lipide peroxy ; **LOOH**, lipide hydroperoxide ; **MDHA**, monodéhydroascorbate ; **¹O₂**, oxygène singulet ; **PS I**, photosystème I ; **PS II**, photosystème II ; **SOD**, superoxide dismutase ; **a-toc**, a-tocophérol ; **Viol**, violaxanthine ; **VDE**, violaxanthine de-époxydase ; **Zéax**, zéaxanthine.

la violaxanthine en zéaxanthine (Conklin *et al.*, 2001). Cette réaction qui se produit dans les feuilles exposées à un fort rayonnement contribue au processus de dissipation de l'énergie thermique et permet de protéger l'activité du photosystème II (Demming-Adams et Adams 1990). Ainsi le mutant d'*Arabidopsis vtc1* qui possède une teneur réduite en ascorbate présente également une activité violaxanthine dé-époxydase réduite et une forte sensibilité aux fortes luminosités (Conklin *et al.*, 2001).

2.3.2.3. Rôle de l'Ascorbate dans la croissance et le développement des plantes.

Dans la littérature, de nombreux travaux décrivent la relation entre l'ascorbate et la croissance et le développement des plantes. Par exemple, le mutant d'*Arabidopsis thaliana vtc1* dont la teneur en ascorbate est réduite de 70% par rapport à la plante sauvage présente une diminution significative de croissance (Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2001). Dans leurs travaux, Joy *et al.* (1988) ont montré que l'ajout d'ascorbate dans le milieu de culture *in vitro* favorise la croissance et le développement des plantules et augmente la formation des bourgeons. L'application d'ascorbate sur de jeunes plantes *Lupinus albus* stimule l'apparition des racines latérales et ainsi que l'activité des tissus méristématiques primaire et secondaire (Arrigoni *et al.*, 1997). Une corrélation entre la teneur ainsi que l'état rédox de l'ascorbate et la capacité de croissance de différents tissus végétaux a également été montrée. En effet, le niveau et le statut de redox de l'ascorbate dépendent de l'âge de l'organe et du tissu. Par exemple, chez de jeunes plantes de pois *pisum sativum*, De Gara *et al.* (1993) ont montré l'existence d'un gradient décroissant de la teneur en ascorbate entre les tissus méristématiques et les tissus différenciés. Au cours des phases de développement de la graine, le statut redox de l'ascorbate évolue. Ainsi, dans les premiers stades qui présentent une activité mitotique très élevée, 90% de l'ascorbate est sous forme réduite (AsA). Lorsque la phase d'expansion cellulaire débute, la teneur en ascorbate sous forme oxydée est supérieure à celle de la forme réduite (Arrigoni *et al.*, 1992). Cette tendance s'accroît au fur et à mesure que la graine se développe, si bien qu'au moment de la maturation, l'ascorbate est présent uniquement sous forme oxydée DHA (Arrigoni *et al.*, 1992 et De Gara *et al.*, 1997). Ce pool de DHA sera employé au moment de la germination dès les premiers stades de développement de la jeune plantule. Par la suite, la voie de biosynthèse *de novo* de l'ascorbate est activée et participe à la croissance de la plante. L'ensemble de ces travaux permet de conclure que l'ascorbate est fortement liée à la croissance de plantes, qui dépend de deux processus distincts : la division cellulaire et l'expansion cellulaire.

2.3.2.3.a. Rôles de l'ascorbate dans la division cellulaire.

La participation de l'ascorbate dans les processus de division cellulaire a depuis longtemps été proposée. Les travaux de Liso *et al.*, 1984 et Citterio *et al.*, 1994, montrent que dans les cellules possédant la compétence à se diviser, l'ascorbate est essentiel à la progression dans le cycle cellulaire. Chez la plante, nous avons vu précédemment que les niveaux d'ascorbate sont généralement plus élevés dans les régions méristématiques à forte activité de prolifération cellulaire et diminuent progressivement quand l'activité de division cellulaire des tissus ralentie. Dans des cellules au phase G1, *i.e.* en attente d'initiation de la division, l'expression du gène de l'ascorbate oxydase et l'activité enzymatique correspondante sont fortes alors qu'elles diminuent dès que le processus de division est activé (Kato et Esaka 1999).

L'affirmation que l'ascorbate stimule l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire résulte des observations réalisées sur le centre quiescent du méristème racinaire. Les cellules du centre quiescent ont une activité de division quasi nulle et la progression de leur cycle est bloquée en phase G1. Plusieurs travaux chez l'ail *Allium cepa* et le maïs *Zea mays* montrent qu'un traitement du méristème racinaire à l'ascorbate stimule la synthèse d'ADN, entraîne un redémarrage du cycle à partir de la phase G1 pour entrer en phase S, et ce phénomène s'applique à tout le méristème racinaire (Liso *et al.*, 1988 ; Arrigoni *et al.*, 1989 ; Innoceti *et al.*, 1990 ; Kerk et Feldman, 1995). L'utilisation de lycorine, un inhibiteur de la biosynthèse d'ascorbate (Arrigoni *et al.*, 1975), entraîne un blocage de la division cellulaire en phase G1 dans les cellules compétentes. L'ajout d'ascorbate exogène induit le redémarrage du cycle et un passage des cellules en phase S (Liso *et al.*, 1984 ; Innocenti *et al.*, 1990). Deux points de contrôle existent dans le cycle cellulaire, le premier se situe à la transition des phases G1-S, le second à la transition des phases G2-M (Hartwell *et al.*, 1989). C'est au point de contrôle G1-S que la décision de relancer un nouveau cycle est prise par la cellule et au point G2-M, si la cellule est prête à se diviser, elle entre en mitose. Par définition, une cellule compétente à se diviser est une cellule bloquée en phase G1 mais capable de passer le point de contrôle G1-S. Pour que cette transition G1-S se réalise, la cellule a besoin d'une stimulation. Il a donc été proposé qu'une stimulation possible serait l'ascorbate. En fonction de son état redox et de sa concentration, l'ascorbate serait le signal qui induirait le passage de la cellule d'un état compétent en phase G1 à un état de synthèse active de l'ADN en phase S. Le statut redox de l'ascorbate, défini comme le rapport $[AsA]/[AsA+DHA]$ semble avoir une certaine influence sur l'activité du cycle cellulaire. Les travaux de Cordoba-Pedregosa *et al.* (1996) montrent que des concentrations élevées de DHA inhibent la prolifération cellulaire dans les racines bulbes. Kerk et Feldman (1995) ont établi une corrélation directe entre le statut redox de l'ascorbate et le taux de prolifération des cellules du centre quiescent dans les racines de maïs *Zea mays*. Cependant le

mécanisme par lequel l'ascorbate est impliquée dans ce rôle de stimulation des processus de division cellulaire reste encore inconnu.

La première hypothèse pour expliquer l'implication apparente de l'ascorbate dans la division cellulaire est la suivante. L'ascorbate est un cofacteur des prolyl- et lysyl-hydroxylases, enzymes de la synthèse d'hydroxyproline et hydroxylysine (Padh, 1990). Chez les plantes, l'hydroxyproline entre dans la constitution des glycoprotéines riches en résidus hydroxyproline (HRGP pour Hydroxyproline-Rich GlycoProtein), qui sont elles-mêmes des composants majeurs de la paroi cellulaire. Plusieurs études suggèrent que certaines glycoprotéines riches en hydroxyproline jouent un rôle dans la progression des cellules dans le cycle (Vera *et al.*, 1994 ; Ito *et al.*, 1998 ; De Tullio *et al.*, 1999). Ainsi, en participant à la synthèse des glycoprotéines impliquées dans la division, l'ascorbate agirait indirectement sur la progression du cycle (Smirnoff, 1996). Les travaux de Cooper *et al.* (1994) montrent que l'inhibition de l'hydroxylation des résidus proline stoppe la division cellulaire dans des protoplastes de tabac. Chez la racine d'oignon, la même inhibition bloque la majorité des cellules en métaphase (De Tullio *et al.*, 1999). Ces travaux soutiennent cette hypothèse.

La deuxième hypothèse serait que l'ascorbate accélérerait le taux de régénération du centre Fe^{2+} de la ribonucléotide réductase. Cette enzyme est essentielle pour la progression à travers le cycle cellulaire car elle catalyse l'étape limitante de production des désoxyribonucléotides nécessaires pour la synthèse de l'ADN. De plus, son activité est maximale en phase S (McClarty *et al.*, 1990). C'est lorsque les atomes de fer du site catalytique sont à l'état réduit Fe^{2+} (ferrique) que l'enzyme est active. Lorsque l'atome de fer est à l'état ferreux Fe^{3+} (oxydé), l'enzyme est inactivée. En cédant un électron l'ascorbate peut réduire le fer ferreux (Fe^{3+}) en Fe^{2+} et permettre le maintien de l'activité ribonucléotide réductase pendant la phase de S. L'autre possibilité d'action de l'ascorbate sur cette enzyme repose sur les travaux de Citterio *et al.*, (1994). Ces auteurs ont observé que lorsqu'on traite des apex racinaire à l'hydroxyurée, les cellules en phase de prolifération sont bloquées à la transition G1-S. L'addition d'ascorbate exogène provoque un redémarrage du cycle plus rapide dans les tissus traités par rapport aux tissus témoins. En effet, le traitement par l'hydroxyurée va déstabiliser le centre fer car les atomes de fer sont labiles, ce qui va entraîner l'inactivation de la ribonucléotide réductase et le blocage du cycle cellulaire. Hunter *et al.* (1975) ont démontré que l'ascorbate peut augmenter la libération d'atome Fe^{2+} présents dans les protéines contenant des noyaux ferriques comme les ferritines (Crichton *et al.*, 1978) et permettre la régénération du centre fer de la ribonucléotide réductase.

2.3.2.3.b. Rôles de l'ascorbate dans l'expansion cellulaire.

Dans la littérature un certain nombre d'hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle de l'ascorbate dans les processus d'expansion cellulaire. La première hypothèse proposée par Smirnoff (1996) implique l'ascorbate oxydase (AO) et la paroi. Selon cette hypothèse, au niveau de la paroi de cellules il existerait un cycle de réduction-oxydation de l'ascorbate (**figure 13**). Dans une première réaction l'AsA serait oxydé en monodéhydroascorbate (MDHA) par l'AO présente au niveau de l'apoplasme, puis le MDHA serait à nouveau réduit en AsA via un cytochrome b à NAD(P)H associé à la membrane plasmique (Horemans *et al.*, 1994 ; Asard *et al.*, 1995). Au cours du cycle, les électrons seraient transportés à travers la membrane plasmique, ce qui selon la théorie de croissance acide (Rayle et Cleland 1992) pourrait stimuler l'expansion cellulaire. Les travaux de Kato et Esaka (1999) renforcent cette hypothèse, puisqu'ils ont montré que la teneur en ascorbate, l'activité et l'expression de l'ascorbate oxydase apoplastique augmentent dans les cellules de tabac pendant la phase d'élongation.

La seconde hypothèse serait que le MDHA présent dans le cytoplasme pourrait récupérer les électrons par l'intermédiaire d'une protéine associée à la membrane plasmique. La dépolarisation de la membrane plasmique, suite au transport transmembranaire des électrons, pourrait stimuler l'activité de la pompe à proton de la membrane plasmique. Ceci stimulerait l'entrée des ions dans la cellule, par conséquent, modifierait la pression osmotique intracellulaire, et activerait l'expansion cellulaire (Hidalgo *et al.*, 1989, Gonzalez-Reyes *et al.*, 1994). Le MDHA induit aussi une augmentation de la vacuolisation, un processus qui va activer l'expansion cellulaire (Hidalgo *et al.*, 1989)

La dernière hypothèse repose sur la présence d'AsA et de DHA dans la paroi cellulaire. Selon Smirnoff (1996), ces composés pourraient influencer les liaisons croisées entre certaines protéines pariétales et polysaccharides, la lignification et la teneur en calcium, et contribuer au contrôle de l'expansion cellulaire. Lin et Varner (1991) ont proposé que le DHA pourrait interagir avec les résidus arginine et lysine au niveau des chaînes latérales des protéines pariétales, ce qui empêcherait la liaison de ces protéines avec les chaînes d'hémicellulose et de polygalacturonate et conduirait à rendre la paroi cellulaire plus extensible. Ils ont également proposé l'hypothèse selon laquelle le DHA pourrait être converti en acide oxalique, un des produits de dégradation de l'ascorbate, et celui-ci pourrait piéger les ions calcium présents dans l'apoplasme indispensables à la structuration des chaînes de polygalacturonate. L'appauvrissement en ions calcium au niveau de l'apoplasme pourrait alors entraîner un relâchement de la paroi.

2.3.2.4. Rôles de l'ascorbate dans la réponse hypersensible et les interactions plante-pathogène.

Chez la plante, l'attaque d'un agent pathogène conduit à l'activation coordonnée de mécanismes de défense comme la mise en route des processus de mort cellulaire programmée (PCD, pour programmed cell death) et la réponse hypersensible (HR) qui est associée aux processus de résistance aux maladies et correspond à une mort rapide des cellules.

L'activation du PCD entraîne la formation d'une zone des cellules mortes autour de l'emplacement de l'infection afin d'empêcher la prolifération du pathogène (Mittler *et al.*, 1996). Si les mécanismes de défenses antioxydant sont affaiblis, une des conséquences de l'activation de PCD est l'accumulation d' H_2O_2 dans les cellules. Bien que très peu d'information soit disponible sur les mécanismes d'action des antioxydants face à l'attaque de pathogène, la mort cellulaire s'accompagne généralement d'une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène, principalement l' H_2O_2 , qui est considéré comme facteur essentiel dans le déclenchement de la réponse hypersensible (Chen *et al.*, 1993 ; Lavine *et al.*, 1994). A longue distance, l' H_2O_2 pourrait agir comme un agent systémique pour les parties non infectées de la plante (Chen *et al.*, 1993). Bowles (1990) a montré que l' H_2O_2 est un des composants de la voie de transduction du signal qui induit l'expression des protéines reliées aux pathogènes (PR-protéines pour pathogenesis-related protien).

Gabriela *et al.* (2003) ont montré que l'ascorbate joue un rôle très actif dans la modulation du système de défense, puisque qu'une faible teneur en ascorbate induit l'expression des PR-protéines, alors qu'une teneur élevée réprime leur expression. Chez le mutant d'*Arabidopsis vtc1*, les gènes de défenses sont plus fortement exprimés mais que ce n'est pas le cas des gènes codants pour les protéines du système antioxydant. Ainsi, l'ascorbate agirait en tant que signal médiateur pour coordonner l'activité des réseaux de défense au système antioxydant. Barth *et al.* (2004) ont démontré que chez le mutant d'*Arabidopsis vtc1* infecté par *Pseudomonas syringae* ou *Peronospora parasitica*, la croissance des pathogènes était considérablement plus faible que dans la plante sauvage. Dans ces plantes infectées, l'expression de deux PR-protéines, PR-1 et PR-5, se trouve fortement augmentée, de même que les niveaux d'expression de quelques gènes associés à la sénescence et la teneur en acide salicylique. Ce résultat indique que la réduction du niveau d'ascorbate chez les mutants *vtc1* induit l'entrée prématurée des tissus en sénescence, de même que l'accumulation d'acide salicylique entraîne une réponse plus rapide des mécanismes de défense.

Dans leurs travaux, Thordal *et al.* (1997) ont montré que l'accumulation d' H_2O_2 est à l'origine de la mort cellulaire. En revanche, le mode d'action de l' H_2O_2 dans le déclenchement

de la réponse hypersensible et les processus de résistance systémique n'est pas encore clairement établi. Il a été montré que lors de l'attaque par un pathogène, un pic de production d' O_2 a lieu à la surface de la membrane plasmique de l'apoplasme. Ce pool d' O_2 est converti par la superoxyde dismutase apoplastique en H_2O_2 qui s'accumule dans la zone de contact du pathogène (Thordal *et al.*, 1997). La production d' H_2O_2 induite par le pathogène a plusieurs effets. D'abord, l'environnement fortement oxydant créé par cet enrichissement en H_2O_2 peut retarder la propagation du pathogène en stimulant les réactions de cross-linking de la paroi cellulaire au site de contact; Ensuite, l' H_2O_2 peut tuer directement le pathogène; Enfin, l' H_2O_2 agit en tant que signal qui, diffusé aux tissus qui ne sont pas encore infectés, mène à la résistance systémique acquise (Alvarey et Lamb, 1997). De plus, l'augmentation rapide des espèces réactives de l'oxygène provoque la biosynthèse d'acide salicylique, qui stimule l'expression de gènes de PR-protéines (Malamy *et al.*, 1990), et aussi d'autres composés antimicrobiens comme les protéines riches en cystéines (Terras *et al.*, 1995).

Présentation et objectif du travail de thèse

Malgré l'importance de la vitamine C dans le fonctionnement de la plante et en nutrition humaine, la voie de biosynthèse de cette vitamine n'est pas encore clairement établie, et une partie de la voie n'a été élucidée que très récemment chez les plantes (Wheeler *et al.* 1998, Smirnoff 2001). Par ailleurs, le métabolisme de la vitamine C et sa régulation restent encore inconnus chez le fruit. Parmi les fruits, la tomate est un produit à forte image traditionnelle et à valeur nutritionnelle reconnue, dont les qualités sont aujourd'hui contestées par les consommateurs. Parmi les paramètres qui participent à l'élaboration de la qualité nutritionnelle de la tomate, la vitamine C présente un intérêt majeur. En effet, si la tomate n'est pas d'une richesse exceptionnelle en vitamine C, la quantité globale consommée durant toute l'année en fait une source importante. De plus, la voie de biosynthèse de la vitamine C est directement liée au métabolisme des parois et des sucres qui participent à la texture et au goût, composants majeurs de la qualité sensorielle de la tomate.

Afin de pouvoir un jour consommer des fruits enrichis en vitamine C, il paraît essentiel d'approfondir les connaissances sur le métabolisme de la vitamine C et sa régulation, notamment chez le fruit. Pour cela j'ai tenté de répondre à la question suivante :

Quelles sont les conséquences au niveau de la plante et aussi du fruit lorsque l'on perturbe fortement la voie de biosynthèse de la vitamine C ?

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse sont présentés en trois parties dans le chapitre II Résultats – Discussion. Chaque partie correspond à la caractérisation fonctionnelle d'une enzyme impliquée dans le métabolisme de la vitamine C au travers d'une démarche de transgénèse réalisée chez la tomate.

La première partie du chapitre II correspond à l'étude fonctionnelle de la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH). Plusieurs constructions ont été réalisées, selon une approche de sur-expression de ce gène ainsi que selon deux stratégies (stratégie de RNAi) visant à éteindre l'expression de ce même gène dans les plantes. Dans un premier temps, j'ai caractérisé de façon globale les phénotypes observés chez toutes les plantes transgéniques de la première génération pour les deux approches (sur-expression et sous-expression). J'ai ensuite approfondi le travail de caractérisation sur les lignées RNAi-GalLDH pour les générations suivantes. L'ensemble des résultats issus de cette étude est présenté sous la forme d'un projet de publication.

La seconde partie du chapitre II correspond à la caractérisation fonctionnelle de la GDP-D-mannose épimérase (GME). Comme pour la GalLDH, deux approches de

transgénèse, sur- et sous-expression, ont été réalisées. J'ai présenté tout d'abord la caractérisation de l'ensemble des transformants de première génération. Dans un deuxième temps, la caractérisation approfondie des lignées RNAi-GME a été réalisée et l'ensemble des données issues de ce travail est présenté sous la forme d'un projet de publication.

La troisième partie du chapitre II comprend la caractérisation de la GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) et de l'ascorbate oxydase (AO), enzyme impliquée dans le recyclage de l'ascorbate. Comme précédemment, les deux approches de transgénèse visant à sur- et sous-exprimer ces deux enzymes ont été réalisées et seule la caractérisation des lignées transgéniques de première génération est présentée dans cette partie des résultats.

CHAPITRE II

RESULTATS - DISCUSSION

RESULTATS - DISCUSSION

Transgénèse pour des enzymes du métabolisme de l'ascorbate chez la tomate

Au début de ce travail de thèse, chez la tomate, seules les séquences de 4 gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate selon Wheeler *et al.* (1998) étaient présentes dans les banques de données du TIGR sous forme de TC (tentative consensus) qui correspondaient aux cDNA plus ou moins complets de chaque gène. Il y avait la GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP), la GDP-D-mannose épimérase (GME), la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH), trois enzymes qui participent à la synthèse de l'ascorbate et l'ascorbate oxydase (AO) qui appartient au processus de régulation de l'état redox de l'ascorbate et catalyse son oxydation en monodéhydroascorbate (MDHA). La disponibilité de ces séquences m'a permis d'envisager une approche de transgénèse afin de sur-exprimer ou sous-exprimer chacune de ces 4 enzymes dans des plantes de tomate.

- 1) La stratégie de sur-expression a consisté à introduire l'ADNc de tomate pleine longueur de chaque gène dans le génome de la tomate (construction homologue) grâce à l'utilisation de la technologie GatewayTM (cf Matériels et Méthodes). Les transformants de sur-expression obtenus sont désignés par les initiales de chaque enzyme/gène suivi du chiffre 2, par exemple GMP2. Dans le cas de la GME, en plus de la sur-expression de l'ADNc de tomate noté GME2, j'ai également construit un système hétérologue en utilisant l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*, noté GMEAt2.
- 2) La stratégie de sous-expression a été réalisée selon la technique du RNAi avec deux variantes (cf Matériels et Méthodes). La première dite RNAi codant a consisté à choisir comme séquence cible une séquence située dans la partie 5' codante de l'ADNc, ceci dans le but de pouvoir réduire l'expression de plusieurs gènes d'une même famille. En effet, pour une famille multigénique, les gènes présentent souvent une très forte homologie de séquence dans leur partie codante. C'est le cas de la GMP pour laquelle il existe à ce jour 4 gènes chez la tomate. Les transformants de sous-expression RNAi codant sont désignés par les initiales de chaque enzyme/gène suivi du chiffre 3, par exemple GMP3.

La seconde variante dite RNAi non codant a consisté à cibler une séquence dans la partie 3' UTR de l'ADNc, qui caractérise très souvent la spécificité tissulaire d'un gène. Par exemple, selon les profils d'expression définis dans les bases du TIGR, le TC 154035 semble correspondre à une GMP spécifique du fruit de tomate en expansion tandis que le TC 154036 correspondrait plus à une forme de

la GMP du fruit en maturation. Par cette approche RNAi non codant on peut donc choisir ou cibler une forme spécifique de l'enzyme. Les transformants de sous-expression RNAi non codant sont désignés par les initiales de chaque enzyme/gène suivi du chiffre 4, par exemple GMP4.

Comme le montre le **tableau 2**, certaines constructions n'ont pas abouti malgré plusieurs tentatives utilisant soit la technologie GatewayTM, soit des techniques de clonage classiques disponibles au laboratoire. Ainsi, pour GLD2 et AO2, l'intégration de l'ADNc soit dans le vecteur d'entrée (pDONRTM 201) soit dans le vecteur pADI, a toujours échoué. La raison apparente de cet échec semble être due à la taille du fragment, le vecteur (pDONRTM 201) semble incapable d'intégrer des fragments de taille supérieure à 1.5 kb. Pour les autres constructions et gènes candidats, la technologie GatewayTM a été une réussite.

En moyenne, le nombre de transformants de première génération, notés T0, varie entre 2 et 20 plantes par construction. Ces transformants sont obtenus à partir de cals régénérant indépendants, puis sont transférés en serre (cf Matériels et Méthodes) pour être soumis à une analyse préliminaire comprenant :

- 1) Amplification PCR du transgène pour confirmer le statut transgénique de ces plantes. Les plantes qui ne possèdent pas le transgène sont éliminées.
- 2) Analyse de la ploïdie des plantes. Toutes les plantes polyploïdes ont été éliminées (environ 25% de transformants).
- 3) Evaluation du phénotype sur la base de plusieurs critères comme la croissance des plantes, la taille du fruit et divers symptômes pouvant être reliés à un déficit en ascorbate, par exemple une sénescence et nécrose foliaire accrue, le blanchiment des feuilles.
- 4) Quantification de l'ascorbate réduit et total dans les feuilles (4^{ème} feuille en partant de l'apex) et dans les fruits au stade rouge mûr (42 JAA).
- 5) Analyse par Southern blot pour confirmer l'intégration et le nombre de copie du transgène présent dans l'ADN génomique.
- 6) Analyse d'expression du gène d'intérêt par RT-PCR semi-quantitative. Cette analyse ainsi que l'analyse Southern blot ont été réalisées seulement pour les transformants choisis pour la poursuite de leur caractérisation plus approfondie.

Seuls les transformants ayant été confirmés par ces analyses préliminaires ont été conservés et maintenus en culture en serre afin d'être caractérisés de manière plus approfondie.

Construction	taille du fragment	localisation	N° accession	Nombre de plantes (T0)
GMP2	1092 pb	165-1256	AY605668	11
GMP3	482 pb	165-646	AY605668	3
GMP4	133 pb	1340-1472	AY605668	6
GME2	945 pb	44-988	TC 154450	2
GME2At	1140 pb	59-1198	AY057660	9
GME3	511 pb	44-554	TC 154450	15
GME4	123 pb	1007-1129	TC 154450	10
GalLDH2	1772 pb	62-1833	AB080690	0
GalLDH3	517 pb	62-578	AB080690	9
GalLDH4	133 pb	1837-1969	AB080690	12
AO2	1740 pb	62-1801	AY971876	0
AO3	503 pb	62-564	AY971876	10
AO4	163 pb	1802-1964	AY971876	3

Tableau 2. Définition des constructions réalisées pour l'altération des teneurs en vitamine C chez la tomate par une stratégie d'ARN interférence (RNAi) ou par sur-expression. Pour chaque gène candidat, la stratégie de sur-expression est désigné par les initiales du gène suivi du chiffre 2, la stratégie de sous-expression (RNAi) est désignée par les initiales de chaque gène suivi du chiffre 3 et 4, selon que le fragment est respectivement dans la partie codante ou dans la partie non codante de l'ADNc.

1^{ère} Partie. Caractérisation des transformants pour la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH)

1^{ère} partie. Caractérisation des transformants pour la galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH).

I. GalLDH2

Comme je l'ai précisé auparavant, aucun transformant contenant la construction de sur-expression de la GalLDH n'a été obtenu.

II. GalLDH3

Neuf plantes GalLDH3 ont été transférées en serre. Dans l'ensemble, ces transformants avaient une taille réduite, présentaient des signes de sénescence au niveau de jeunes feuilles et produisaient des fruits de plus petite taille (**figure 15**). Cet effet était dans une certaine mesure corrélée avec la teneur en ascorbate. Il est important de préciser que pour cette construction, deux transformants, numérotés 30 et 33, issus de cals indépendants présentaient un phénotype très affecté identique. Leur croissance était fortement réduite (hauteur maximale des plantes : 40 cm), les feuilles étaient mal formées, épaisses et racornies et aucun bouquet ne se formait. De plus, la teneur en ascorbate des feuilles était diminuée de 60 à 80% par rapport au témoin (**figure 15**).

III. GalLDH4

Douze transformants GalLDH4 ont été transférés en serre. Leur observation approfondie a permis de définir des phénotypes récurrents chez les différentes lignées. Tout d'abord, comme représenté dans la (**figure 16**), les plantes présentaient un retard de croissance, surtout les lignées 5 et 8, et les fruits étaient de taille réduite par rapport à la plante sauvage. Le teneur en ascorbate était réduit de 5 à 30% selon les lignées, que ce soit dans le fruit ou dans les feuilles. La lignée 36 n'a pas été retenue pour la suite de l'étude car elle ne donnait pas de fruit, de même que la lignée 11 qui produisait des fruits dépourvus de graine. L'impact de la transgénèse sur l'expression du gène *GalLDH* chez les transformants a été analysé par RT-PCR semi-quantitative (**figure.16**). Cette analyse n'a été réalisée qu'une seule fois. Les profils d'expression présentent une réduction de la quantité de transcrits allant jusqu'à 70% d'expression en moins pour la lignée 5. Une sous-estimation de la quantité de transcrits chez le sauvage peut expliquer l'augmentation dans les lignées 6, 36 et 39. Ces données d'expression ajoutées à celles des analyses biochimique et phénotypique, ont permis de sélectionner les plantes pour la génération T1.

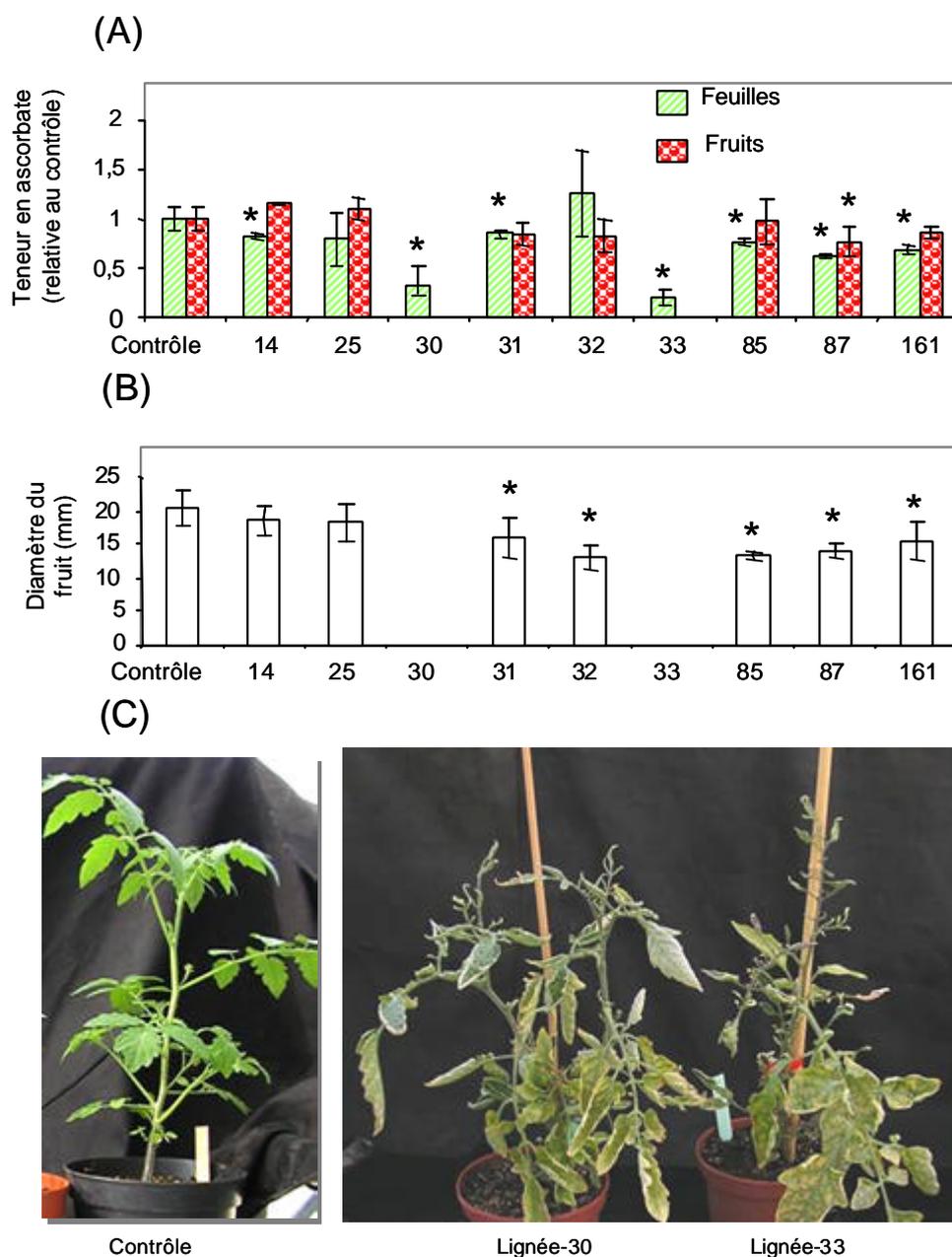


Figure 15. Effet du silencing de la Galactono lactone déshydrogénase (construction *GaILDH3*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque transformant. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard. Les histogrammes sont surmontés d'une astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (C) Quelques phénotypes marquants chez certaines plantes.

Suite à ce travail de caractérisation des transformants T0 GalLDH3 et 4 qui montre que les effets de la transgénèse sont très proches pour les deux constructions RNAi codant et non codant, j'ai fait le choix de poursuivre l'étude uniquement dans le cas des lignées GalLDH4. En effet, lors de ce choix je n'étais pas encore certain du nombre de copie de ce gène chez la tomate. L'analyse par Southern a par la suite confirmé l'existence de ce gène en copie unique chez la tomate WV106 (cf résultats complémentaire). Les observations phénotypiques, les dosages d'ascorbate et les analyses d'expression ont permis de choisir 4 lignées GalLDH4: Les lignées 5 et 8 qui sont fortement affectées, la lignée 38 qui est moyennement affectée et la lignée 2 qui est très proche des plantes sauvages. Pour chacune des 4 lignées, la population T1 composée de 15 plantes, a été produite à partir des graines issues de fruits des plantes T0. Par la suite, les fruits issus de chacun des 15 transformants ont été utilisés pour réaliser une expérience de ségrégation sur la population de transformants T2. Pour cela, cinquante graines de fruits de chaque lignée T1 ont été semées sur milieu sélectif. Lorsque 100% de germination était obtenue, la plante T1 était définie comme homozygote pour le transgène. En dessous de ce taux de germination, les plantes T1 étaient définies comme hétérozygotes pour le transgène.

L'étude approfondie de ces quatre transformants s'est poursuivie pour les lignées homozygotes et leur caractérisation par des approches classiques mais aussi nouvelles comme les analyses du métabolome et du transcriptome des fruits et des feuilles a conduit à des résultats originaux dont une partie est présentée sous forme d'article dans le chapitre qui suit.

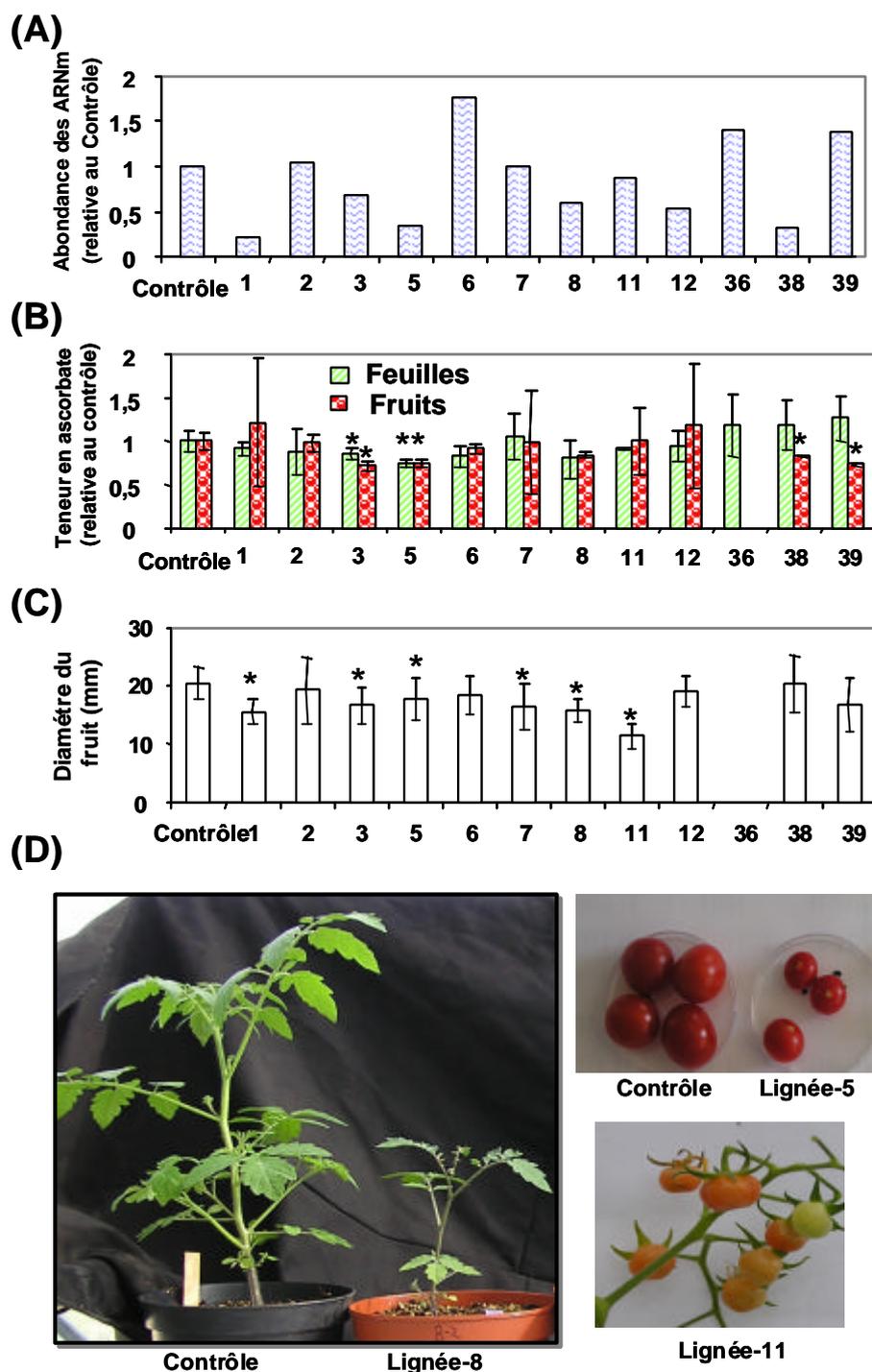


Figure 16. Effet du silencing de la Galactono lactone déshydrogénase (construction *GalLDH4*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) Analyse de l'expression du gène *GalLDH* par RT-PCR semi-quantitative dans de jeunes feuilles des transformants T0. Le fragment spécifique *GalLDH4* a été utilisé comme sonde pour la détection du fragment amplifié par hybridation. Le taux d'expression des transcrits *GalLDH* est normalisé par rapport à l'expression des transcrits du gène de l'actine utilisé comme témoin et exprimé en valeur relative par rapport au contrôle. La quantification du signal a été réalisée selon le protocole décrit dans la section Matériel et Méthodes. (B) Teneur relative en ascorbate total des jeunes feuilles et fruits au stade rouge mûr (42 JAA) pour chaque lignée étudiée, exprimée par rapport aux plantes témoins. (C) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque transformant. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (D) Quelques phénotypes marquants au niveau des plantes et des fruits.

**ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA GALACTONO-
1,4-LACTONE DESHYDROGENASE DE TOMATE**

ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA GALACTONO-1,4-LACTONE DESHYDROGENASE DE TOMATE

Résumé de l'article :

La L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH, EC 1.3.2.3), est l'enzyme qui catalyse l'ultime étape dans la biosynthèse de l'acide L-ascorbique (vitamine C) chez les plantes. Afin d'approfondir les connaissances sur les fonctions biologiques de l'ascorbate dans les cellules végétales, une approche de transgénèse visant à supprimer l'expression du gène *GalLDH* par la stratégie RNAi a été conduite chez la tomate. L'analyse des lignées transgéniques RNAi-GalLDH a montré une forte réduction de l'abondance des transcrits *GalLDH*, de la protéine et de l'activité enzymatique chez la feuille et le fruit. De façon surprenante, le pool d'ascorbate total de ces tissus était inchangé et équivalent à celui mesuré dans les plantes sauvage; En revanche, nous avons constaté que l'état rédox de l'ascorbate défini par le rapport ascorbate réduit/oxydé était fortement modifié dans la feuille et le fruit, en particulier l'ascorbate apoplastique. Chez tous les transformants, l'effet le plus remarquable est obtenu sur le développement des plantes. Depuis la germination, la vitesse de croissance des transformants est réduite. Chez les lignées les plus affectées, la réduction de la surface foliaire et du diamètre des fruits provenait essentiellement d'une réduction de la taille des cellules épidermique et des cellules du péricarpe. Afin de comprendre quels sont les mécanismes biologiques induits par une variation de l'état rédox de l'ascorbate en relation avec les processus de développement chez les plantes RNAi-GalLDH, nous avons réalisé une approche intégrative associant l'analyse de transcriptome et du métabolome chez un organe source, la feuille et un organe puits, le fruit. L'ensemble des données métaboliques obtenues démontre clairement que le métabolisme primaire et secondaire des cellules sont fortement perturbés, notamment certaines voies majeures comme le cycle de Krebs, le métabolisme des glucides ainsi que celui relié à la biogénèse des parois, les voies de biosynthèse des principaux acides aminés. En parallèle, l'analyse de transcriptome révèle l'activation de nombreux gènes codant soit pour des protéines directement impliquées dans les mécanismes de défense ou de stress soit des protéines de régulation induites en réponse à un stress, comme par exemple les protéines impliquées dans la transduction du signal ou des facteurs de transcription. Chez la feuille, plusieurs gènes reliés à la photosynthèse sont également activés de même que des gènes du métabolisme secondaire (lipides, xanthophylle) en relation avec divers mécanismes de réponse au stress.

L'ensemble de nos résultats démontre qu'en plus de son rôle antioxydant majeur dans la

plante, l'ascorbate peut jouer un rôle majeur dans la régulation des processus de prolifération et d'expansion cellulaire dans la feuille et le fruit. De plus, ces résultats indiquent qu'une perturbation de la voie de biosynthèse de l'ascorbate a de profonds effets sur le métabolisme cellulaire, primaire et secondaire, qui est fortement régulée au travers de l'ajustement du turn-over de l'ascorbate et/ou des voies de biosynthèse alternatives.

Silencing of the key ascorbic acid enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) affects plant and fruit development in tomato.

Moftah Alhagdow, Christophe Rothan, Johann Petit, Fabien Mounet, Daniel Just, Virginie Garcia, Adriano Nunes-Nesi¹, Alisdair R. Fernie¹, and Pierre Baldet*

Unité Mixte de Recherche 619, Physiologie et Biotechnologie Végétales, Institut de Biologie Végétale Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Universités Bordeaux 1 et Victor Ségalen Bordeaux 2, Centre de Recherche de Bordeaux, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

²Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, 14467 Golm, Germany.

*Corresponding author; e-mail baldet@bordeaux.inra.fr; fax 33 (5) 57122541

Abstract

In the present work, we first analyzed the spatial and temporal expression of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH, EC 1.3.2.3), the last enzyme of L-ascorbic acid biosynthesis, in tomato plants. Secondly, we investigated the effect of a reduction of ascorbate biosynthesis in tomato, with a reverse genetic approach by suppressing the *GalLDH* gene expression using RNAi strategy. In transgenic *RNAi-GalLDH* plants, the growth rate decreased and, in the most affected lines, leaf and fruit size were reduced, mainly as a result of reduced cell growth. The accumulation of *GalLDH* transcripts and GalLDH activity were highly reduced, and surprisingly, the total ascorbate content remained unchanged in leaf and fruit. However, ascorbate redox state was significantly altered in these tissues, especially in the apoplastic compartment. Using integrative transcriptomic and metabolomic approaches, we demonstrated that ascorbate redox state changes may affect cell growth through change in the regulation of several primary and secondary metabolic pathways in fruit and leaf. Taken as a whole, our results demonstrate that in addition to its crucial anti-oxidant role, ascorbate may play an important role in the regulation of the cell growth processes, at the whole plant and fruit levels. At last, the discrepancy in the effects on ascorbate content in the *RNAi-GalLDH* transgenic plants, despite the strong effect on cell development, is in favour of (1) changes in the ascorbate turnover pathway and/or (2) the existence of alternative pathways for ascorbate biosynthesis in tomato plants.

Key words: Ascorbic acid biosynthesis, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, *Solanum Lycopersicum*, RNAi strategy, fruit development.

Introduction:

Ascorbic acid has a huge importance for all eukaryote living cells. In higher plants, ascorbate is the most abundant water-soluble antioxidant, acting to scavenge reactive oxygen species that are generated during photosynthesis, oxidative metabolism and a wide range of stress. In addition, ascorbate is involved in the regulation of several fundamental cellular processes of photoprotection, cell cycle, cell expansion, and in secondary metabolism pathway like the recycling of the lipid-soluble α -tocopherol and ethylene biosynthesis. Although generally accepted, the mechanism by which ascorbate participates to the cell development processes is not clearly established (for review, see Smirnoff, 2000). Many evidences also supported the correlation between cell division and/or cell expansion and ascorbate content and its redox state (Horemans *et al.*, 2003 and ref therein).

Micro-organisms, plants, and most animals produce ascorbate. On the other hand, a loss of the ability to synthesize ascorbate has occurred in primates, including human, and some other animals. The animal pathway has been completely characterized since long time, it involves D-glucose is the first committed precursor and the last step is catalysed by a microsomal L-gulono-1,4-lactone oxidase, which oxidizes L-gulono-1,4-lactone to produce ascorbate. In plants, the ascorbate pathway is different from that in animals and has remained unsolved until recently, when convincing evidence in support of a novel putative pathway was established (Wheeler *et al.*, 1998). To date the pathway proposed by Wheeler *et al.* (1998) is the most commonly admitted pathway in plants; Although many steps remain to be completely elucidated, the last step in this pathway involves the conversion of L-galactono-1,4-lactone (GL) to ascorbic acid, a reaction catalysed by the L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, an enzyme located in the inner-membrane of the mitochondria (Bartoli *et al.*, 2000). This reaction requires cytochrome c as a second substrate that is reduced as GL is converted into ascorbate (Ôba *et al.*, 1995).

Besides, alternatives ascorbate biosynthesis pathways have been proposed in plants. Agius *et al.*, (2003) showed that during the ripening phase of strawberry fruit, ascorbate is produced via the reduction of D-galactoronic acid to L-galactonic acid, which in turn is spontaneously converted to L-galactono-lactone, the last precursor of ascorbate. However, this pathway needs the GalLDH activity to end the synthesis. In 2003, Wolucka and Van Montagu suggested an alternative pathway involving GDP-L-gulose as intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. They showed that in vitro, GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) is capable to catalyse two distinct epimerization reactions that lead beside GDP-L-galactose to a novel intermediate, GDP-L-gulose. Nevertheless, the existence of the enzyme machinery of this putative pathway has to be confirmed in vivo. Recently, Lorence *et al.* (2004), presented molecular and biochemical evidences proposing another possible

biosynthetic route using *myo*-inositol as precursor. By overexpressing *myo*-inositol oxygenase in *Arabidopsis* they observed a 2- to 3-fold increase in ascorbate content in the leaf. At last, some works have suggested the contribution of the animal pathway in plants. Thus, Jain and Nessler (2000) achieved a 4-fold and 7-fold increase of ascorbate content in lettuce and tobacco plants, respectively, after constitutive expression of the rat gene encoding gulono-lactone oxidase. To date, there is no evidence of the existence of such an enzyme in plants.

In plant cell ascorbate homeostasis must be tightly regulated. In order to preserve the optimal ascorbate redox state defined as the ratio of the concentration of the reduced form (AsA) to the total ascorbate corresponding to reduced form plus oxidised forms (MDHA+DHA), cell machinery must proceed through the ascorbate recycling pathway. This complex process involves several enzymes, MDHAR, GR, APX, DHAR using different co-factors, plasma-membrane cytochrome b, glutathione, NAD, NADP, and located in a range of cell compartments, cytosol, chloroplasts, cell-wall (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 2000).

Plant ascorbate catabolism pathway is not clearly established; two possible pathways have been proposed. According to plant species, in the first pathway, ascorbate is degraded to a four-carbon product, tartrate and in the second pathway; it degrades via dehydroascorbate, yielding two-carbon products, oxalate plus threonate (Loewus, 1980; Green & Fry, 2004).

Ascorbate-deficient mutants provide valuable tools to investigate both the metabolism and physiological roles of ascorbate in plants. Conklin *et al.* (1999) analysed ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis*, *vtc1*, and demonstrated that *VTC1* locus encodes for the GDP-mannose pyrophosphorylase, the first committed step in the pathway and since then, this ascorbate-deficient mutant has been thoroughly characterized. The *vtc1* plants contain 70% less ascorbate in the leaves compared to the wild type, and in the apoplast, total ascorbate was decreased to 23% of wild type value. This mutant displayed much slower shoot growth than the wild type, leaves were smaller, plant weight was reduced and flowering was delayed (Velovic-Jovanovic *et al.*, 2001). In the mean time, Tabata *et al.* (2001) generated ascorbate-deficient transgenic tobacco BY-2 cell lines by antisense expression of the GalLDH cDNA from BY-2 cells. They showed that the transgenic cell lines displayed a 30% reduction of ascorbate content compared to the wild type, resulting in significant change of division, growth processes and structure of plant cell. Recently, using a transcriptomic approach, Foyer and co-workers examined the effects of the physiologically relevant decrease in ascorbate on plant development. They concluded that the change in ascorbate content influences plant growth and development by modulating the expression of specific suites of genes involved in defense and hormonal signalling pathways.

In this paper, first we report the molecular characterization of the GalLDH in tomato plant tissues, including leaf and fruits in relation of their ascorbate content. Second, to investigate the effects of reduced ascorbate pool on plant and fruit development, we generated transgenic tomato plants by RNAi silencing the *GalLDH* expression. We report the characterization of these transgenic plants by using cytological, metabolomic and transcriptomic approaches. In addition, we discuss the effects of changes of ascorbate content and the role in the signalling of the ascorbate redox state during plant and fruit development.

Materials and methods

Materials

All chemicals used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), with the exception of radiolabeled [α - 32 P]dCTP which was from Amersham (Amersham-Pharmacia, Orsay, France), and enzymes RNase-free DNase RQ1 (Promega, Lyon, France).

Plant material and growth conditions

Cherry tomato [*Solanum lycopersicum* Mill. cv West Virginia 106 (WV106)] plants were grown in a greenhouse under a thermoperiod of 25°C/20°C and a photoperiod of 14/10 h (day/night). For in vitro culture, plants were grown on ¼ MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 3% sucrose at 25°C, under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ photon flux density and 14/10 h photoperiod. Tomato fruits were harvested at various developmental stages determined according to DPA and fruit diameter. Before all biochemical and molecular analysis samples were quickly frozen in liquid nitrogen, ground to fine powders and stored at -80°C until use.

Cloning the GaLDH fragment

Total RNA from several tomato tissues was isolated by phenol-chloroform extraction as described by (Verwoerd *et al.*, 1989) and modified by (Chevalier *et al.*, 1995). RNA yield was quantified spectrophotometrically. Reverse transcription (superScript™ II Reverse transcriptase) was performed with 2 μg total RNA according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, life technologies). RT-PCR was performed in a total volume of 25 μl containing 2 units of Ex Taq™ (TaKaRa Bio INC, Japan) DNA polymerase according to the manufacturer's protocol, and gene-specific primers SIGLDF4 as a 5' primer (5'-AAAAAGCAGGCTT**GGTTGGTTTACGTCAACTCTTTA**-3') (at position 1837-1860 of the ORF from GB Accession n°: AB080690) and SIGLDR4 (5'-AGAAAGCTGGGTCCTT**CAACTTAACATTCTGAACAA**-3') as 3' primer (position 1946-1969 of the ORF from GB Accession n°: AB080690) to amplify a fragment of 133 bp in the 3' UTR untranslated region. After denaturation at 94°C for 3 min, amplification was performed by 30 cycles 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C and 1 min at 72°C, followed by 5 min at 72°C. After electrophoresis in 1% agarose gel, the 133 bp fragment was excised and purified from the gel with the QIAGEN, QIAEX® II, Gel Extraction Kit (150). The purified DNA fragment was cloned as inverted repeat under the control of the 35S promoter using the cloning gateway system as described by Karimi *et al.* (2002), first into entrance vector (pDONR™ 201), then in the destination vector (pK7GWIWG2(1)). This construct was introduced into cherry tomato (WV106) plants by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 according to Hamza and

Chupeau (1993). For control, the construct corresponding to the empty destination vector (pK7GWIWG2(1)) was introduced into tomato plants according to the same procedure. The plants of first generation were characterized and screened, and for each construct, 4 lines were chosen for detailed molecular and biochemical analyses.

Southern blot analysis

To determine the number of transgenes in the transgenic plants, genomic DNA was isolated as described by Murray and Thompson (1980). Twenty micrograms of DNA were digested with *Bcl*, *Clal*, *EcoRI*, *HpaI*, *SaC1*, and *XbaI* restriction enzymes, separated on a 1% agarose gel and blotted into a Hybond-XL membrane (Amersham-Pharmacia, Orsay, France). Hybridization was carried out according to Sambrook *et al* (1989) using the ³²P-labelled 517 bp-probe of *GalLDH* cDNA (between position 62 to 578 of the ORF from GB Accession n°: AB080690). The membrane was washed at 65 °C in 0,1 x SSPE-0, 5% SDS under stringent conditions and then scanned with a PhosphorImager (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

In Situ hybridization

In order to use *GalLDH* as a probe, riboprobes were synthesized from plasmids containing fragment of 506 bp of *SiGalLDH* cDNA (between position 1404 to 1909 of the ORF from GB Accession n°: AB080690), with the 5' in the coding region and the 3'-located in the untranslated region. The sense and antisense digoxigenin-labelled riboprobes were generated by run off transcription using T7 and SP6 RNA polymerases according to the manufacturer's protocol (Roch Diagnostics, Meylan, France). For *in situ* hybridization, tomato flower buds, fruit of 7 and 20 DPA, young leaves, and shoot and root tips were sampled and processed as described by Bereterbide *et al.* (2002).

Expression analysis by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA from fruits of different stages and young leaves was extracted as described previously. To determine the relative transcript levels of *GalLDH*, RT-PCR assay was performed using gene-specific oligonucleotides located within the coding region sequence, (5'-TTCAAATGCTCCGTTTCCTT-3') as a 5' primer containing the ATG translation initiation codon combined with (5'-TAACCCTTTTATTCTCCTTATCCA -3') as 3' primer. As an internal control, a 615 bp actin cDNA fragment was amplified by PCR using *Act5'* (5'-TGGCATCATACTTTCTACAATG-3') and *Act3'* (5'-CTAATATCCACGTACATTTTCAT-3') as primers for tomato (Germain *et al.*, 1997). RT-PCR protocol was as described previously. Southern blotting and hybridization were performed using the ³²P-labelled 517 pb-long *GalLDH* cDNA fragment as a probe. The accumulation of *GalLDH* transcripts was quantified by image scanning of the autoradiogram using the Quantity One software from BioRad

Laboratories (Hercules, CA). The relative *GalLDH* mRNA abundance was normalized towards that of *SlActin* and expressed as a ratio of arbitrary units for pixel intensities.

Microarray analysis

Hybridization and Data Acquisition

The cDNA microarrays were purchased from the Center for Gene expression at the Boyce Thompson Institute (<http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>). The TOM1 arrays contains 13400 printed elements corresponding to approximately 8700 unigenes (Alba *et al.*, 2004). The “Cyscribe Post Labelling kit” from Amersham (catalog #RPN5660X, Amersham biosciences corp, NJ USA) was used according to the manufacturer’s recommendations, with 30 µg of total RNA per conditions. Each sample was quantified after reverse transcription and labelling, by scanning from 200 nm to 700 nm with a spectrophotometer Amersham 3100 Pro. The pooled cy3- and cy5-labelled cDNAs were then concentrated on Microcon YM-30 columns (Amicon Bioseparations, Millipore) and mixed with 90 µL of hybridization solution containing 1:1 (v:v) formamide (5X SSC; 0.25% SDS; 5 X Denhardt’solution; 1 µg mL⁻¹ denatured salmon sperm DNA (Stratagene)). Slides were hybridized in an automatic hybridization station HS 4800 (Tecan), with a washing pre-run in 1X SSC; 0.1% SDS, during 1 min. The probe solution was boiled for 1 min and then injected into the hybridization chamber. Slides were incubated at 42°C for 16h, with medium agitation and then washed sequentially at 30°C in 1X SSC; 0.1% SDS for 1 min, this step repeated 3 times, in 0.1X SSC; 0.1% SDS for 1 min, 3 times and finally in 0.1X SSC for 30 sec. Slides were dried in the hybridization station for 3 min, with 2.7 bars of nitrogen gas. Microarray slides were scanned with a genepix 4000 B fluorescence reader (Axon Instruments) using Genepix 4.0 image acquisition software with photomultiplier tube voltage adjusted to 500 V for Cy3 and 600 V for Cy5. Each of the microarray experiments was performed in duplicate with the dyes reversed (4 slides per experiment).

Statistical analysis

Raw data, corresponding to median spot intensity with no background subtraction, were submitted to R/MAANOVA v0.91-3 software (R package for the analysis of microarray) for data visualisation, preprocessing, normalisation and statistical analysis. Raw data were transformed (Cui *et al.*, 2003) using an intensity-based LOWESS function (using a smoother span of 20%). After visual validation of the preprocessing step on Ratio vs Intensity plot for each slide, data were submitted to a two-stage ANOVA (Wolfinger *et al.*, 2001). Replicates were averaged and variance of systematic effects was evaluated by the “normalisation” ANOVA with the following model: $y_{gi,jk} = \mu + A_i + D_j + \varepsilon_{gijk}$. (where $y_{gi,jk}$ is the base-2 logarithm of measurement from gene g , μ is the overall mean signal, A_i the main effect for arrays, D_j

the main effect for dyes and ε the error). Normalised values for each gene ($y_{gi,jk}$ corrected by the subtraction of the fitted values for the main effects $A + D_j$) were used as input for the “gene by gene” model: $r_{gijk} = G_g + (GA)_{gi} + (GD)_{gj} + (GS)_{gk} + e_{gijk}$. For each gene, differences between the gene-specific sample effects $(GS)_{gk}$ were tested using F-tests. Corresponding p values are based upon the hybrid test (F2) of R/MAANOVA v0.91-3 (Cui *et al.*, 2003) that uses a combination of global and gene-specific variance estimates in the denominator of the statistics. To avoid distributional assumptions, the F-test was performed with restricted residual shuffling and 1000 iterations. The calculated p values were adjusted with the linear step-up procedure included in the software, in order to take into account the false discovery rate (FDR). In an additional step, the negative controls were used to define a cut-off of gene expression. For each slide, mean plus 2 S.D. of the negative controls normalized intensities was calculated. Genes having normalized intensities higher than this value on $\frac{3}{4}$ of the slides were considered as expressed. Expression profile data clustering was done on estimates for the tissue term in the gene relative expression values, calculated as mean for all slides of \log_2 (normalized intensity) centred on the \log_2 (mean global intensity).

Assay of GalLDH activity

Fresh young leaves (~ 0.5 g) were homogenized with a mortar and pestle in 1ml of 0,1 M Tris-HCl buffer (pH 7,5) that contains 0.3M sucrose, 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidone, 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), 1 mM DTT and 5 mM EDTA. GalLDH was assayed spectrophotometrically at 27 °C by measuring the increase in absorbance at 550 nm accompanied by the reduction of cytochrome c as described by Ôba *et al* (1995). The reaction mixture (1ml) contains 50 μ M cytochrome c, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.15% (w/v) Triton X-100 and 4.2 mM L-galactono-?-lactone (L-GL) was preincubated 5 min. The reaction rate was proportional to the concentration of the enzyme and linear for at least 10 min. One unit of activity is defined as the amount of enzyme required for oxidized 1 nmol of L-GL per min. A coefficient value of 17 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the differences between oxidized and reduced form of cytochrome c was used. Protein was quantified by the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

Production of a rabbit polyclonal antibody anti-SIGalLDH and IgG purification

For polyclonal antibody preparation, two synthetic polypeptides corresponding to the GalLDH protein were prepared by the Eurogentec Company (Herstal, Belgique). Their sequences deduced from the TC 163697 encoding the GalLDH in the TIGR database (The Genomic for Institute research, <http://www.tigr.org>) were: H2N-MSKEKGPPKNKPKYT+C-CONH2 (aa

321-335) and *H2N-AYNQARKELDPNRIL+C-CONH2* (aa 559-573). The “+C” corresponds to a cystein residue needed for the coupling with the KLH protein carrier. The antibodies were produced by rabbit immunized with a mix of the two peptides. Total immunoglobulins of G type (IgG) were purified on affinity column (AF-amino TOYOPEARL 650M) by Eurogentec.

SDS-PAGE and western analysis

Equal amounts of proteins were analyzed by SDS-PAGE performed in 15% polyacrylamide gels. Proteins were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in methanol/acetic acid/water (9:2:9, v/v/v), and de-stained in the same solution without dye.

Western blotting were performed using a semi-dry blotter (Millipore, Bedford, USA) for 45 min at 2,5 V cm⁻², PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore), and transfer buffer composed of 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glycine, and 10% (v/v) methanol. The membranes were blocked with TBS-Tween, 3% (p/v) bovine Serum Albumin, for 1 h at room temperature. The membranes were incubated for 1 h at room temperature with the purified IgG fraction of the anti-GaILDH antiserum used at a 1:300 dilution. After three washes of 15 min each with TBS-Tween, the membranes were treated with an anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma) for 1 h at room temperature. The membranes were then washed three times with TBS-Tween and once in TBS alone for 15 min each wash. Revelation was performed using Naphtol AS-TR phosphate (Sigma) as a substrate for alkaline phosphatase used in conjunction with Fast Red RC (Sigma) according to the manufacturer' s instructions.

Preparation of intercellular washing fluid (IWF)

IWF was prepared using the method similar to that described by Turcsanyi *et al.* (2000). Leaflets of the fourth leaf (about 1 g) were washed in distilled water and vacuum infiltrated (-70kPa) with 50 ml of 10 mM citrate buffer (pH 3.0) containing 100 mM KCl twice for 3 min to reach maximum infiltration of cellular air spaces. Leaflets were then carefully blotted dry, rolled and inserted into a 5 ml tip placed over a preweighed centrifuge tube containing 50 µl of cold metaphosphoric acid (5%, w/v); The IWF (about 100 µl.g⁻¹ FW) was collected by centrifugation at 1200 g for 10 min at 4°C and immediately used for the measurement of AsA. The time from the harvest of the leaf to the beginning of centrifugation was less than 10 min. Activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49), an enzyme which is located in the cytoplasm and the chloroplast stroma, was absent in the IWF, indicating that IWF was not contaminated by intracellular sap.

Ascorbic acid analysis

AsA analyses were performed according to Leipner *et al.* (1997). Between 0.5 to 1 g of frozen samples homogenized using a polytron in 2.5 ml of cold 3% (w/v) metaphosphoric

acid and 2.5 mM EDTA. The homogenate was then centrifuged at 10000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was filtrated on nylon membrane (pore size, 30 µm, Tetko Inc., New York, USA). An aliquot of the filtrate (200 µl) was incubated for 15 min in 3 ml cuvette at room temperature containing 100 µl of K₂HPO₄ (45%), and either 50 µl of distilled water to measure the reduced AsA, or 50 µl of homocysteine (0,1%) to measure the total AsA. After the incubation, 500 µl of citrate-phosphate buffer (2M, pH 2.3) were added. The absorbance at 524 nm was measured immediately after addition of 500 µl DCIP (0,008% w/v).

Determination of Metabolite levels

Once harvested, leaf and fruit (free of seed and gelly) samples were immediately frozen in liquid nitrogen, and the metabolite extraction was performed as described by Nunes-Nesi *et al.* (2005). The level of all metabolites was quantified by GC-MS exactly following the protocol described by Roessner *et al.* (2001), with the exception that the peak identification was optimized to tomato tissues (Roessner-Tunali *et al.*, 2003).

Cytological analyses

Cell number and size were measured in fruits as described by Cheniclet *et al.* (2005). For 20 DPA fruits, slices approximately 0.5 to 1 mm were immersed in phosphate (0.1 M, pH 7.2) buffer and 2.5% glutaraldehyde for 3 h at room temperature under partial vacuum. After rinsing, the buffer was substituted by water, the slices were dehydrated by an ethanol series and embedded in Technovit 7100 (Kulzer, Wehrheim, Germany). Pericarp sections of 3µm were obtained with glass knives with the help of Reichert 2040 microtome and stained with toluidine blue. In order to measure the leaflet surface, the fourth and fifth leaves were harvested and the leaflets were detached, scanned. On the same leaflet before harvest, a thin layer of collodion 4% resin (Merck, Darmstadt, Germany) of about 2-3 cm² was applied to the ad axial surface, let to evaporate to obtain a print of the epidermis. With the thin layer under a microscope, it is possible to get a quick cytological visualisation of the epidermis cells and its architecture. All the images were photographed on a Zeiss Axiophot microscope with a Spot digital camera (Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI). Leaflet area, epidermis cell size, and fruit pericarp thickness, number of cell layers and mean cell area were measured using the Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MA).

Results

Ascorbate and the galactono-1,4-lactone dehydrogenase in tomato plants

Because ascorbate is a vital physiological metabolite during all the plant development stages, we analyzed its content in all tomato organs, including vegetative tissues as young and mature leaf, stem, root and reproductive tissues as flower and fruit at several stages after anthesis. The ascorbate content varies according to the organ, with a high level in the leaf (young and mature) undoubtedly as a consequence of its role in photosynthesis, and the lowest content observed in root. In reproductive organs, flower and fruit, the total ascorbate content was approximately 30 to 40 mg/ 100g FW and remains constant during all fruit development. A good candidate to correlate the ascorbate accumulation level in all tomato organs and the ascorbate biosynthesis pathway is the galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH), enzyme catalysing the oxidation of galactono-1,4-lactone to produce ascorbate, the last step of the pathway described by Wheeler *et al.*, (1998). First, using a Southern analysis, we showed that the tomato genome contains only one *GalLDH* gene, confirming the prediction of the TIGR tomato (*Lycopersicon esculentum*) Gene Index for the TC 163697. Second, using a population of 75 introgressed lines from *L. pennellii* (Pan *et al.*, 2000), a gene mapping approach revealed that this gene is mapped at locus *bin10-E* on chromosome 10 (see supplementary results). Third, the expression of *GalLDH* gene was analyzed by semi-quantitative RT-PCR in the same tomato organs described above (Fig. 1). Actin cDNA was used as an internal control for the RT-PCR. The *GalLDH* transcripts were detected in all examined tissues. The accumulation pattern of the *GalLDH* transcripts correlated with the ascorbate content in leaves and flower, while root, stem and fruit displayed a discrepancy between these two parameters. Indeed, in the fruit, the *GalLDH* transcripts were highly expressed in the early stages (10 and 20 DPA) and progressively decreased at the maturation stages. In all fruit tissues, including the epicarp, the mesocarp and the gel, *GalLDH* transcripts were detected with expression patterns identical to the entire fruit (Data not shown). Furthermore, the spatial distribution of *GalLDH* transcripts in developing organs was examined by mRNA *in situ* hybridization (Fig. 1). The transcripts were detected in all tissues studied and particularly in tissues displaying a high cell proliferation activity such as shoot apical meristem, root apical meristem, young leaf, flower at the level of ovules and stamens, and young fruit at 10 DPA. The immuno detection of the GalLDH protein was determined by western-blot analysis using a polyclonal antibodies raised against two synthetic peptides deduced from the protein sequence (accession no AB08069). A polypeptide of 56 KD was detected in all vegetative and reproductive organs of tomato plants

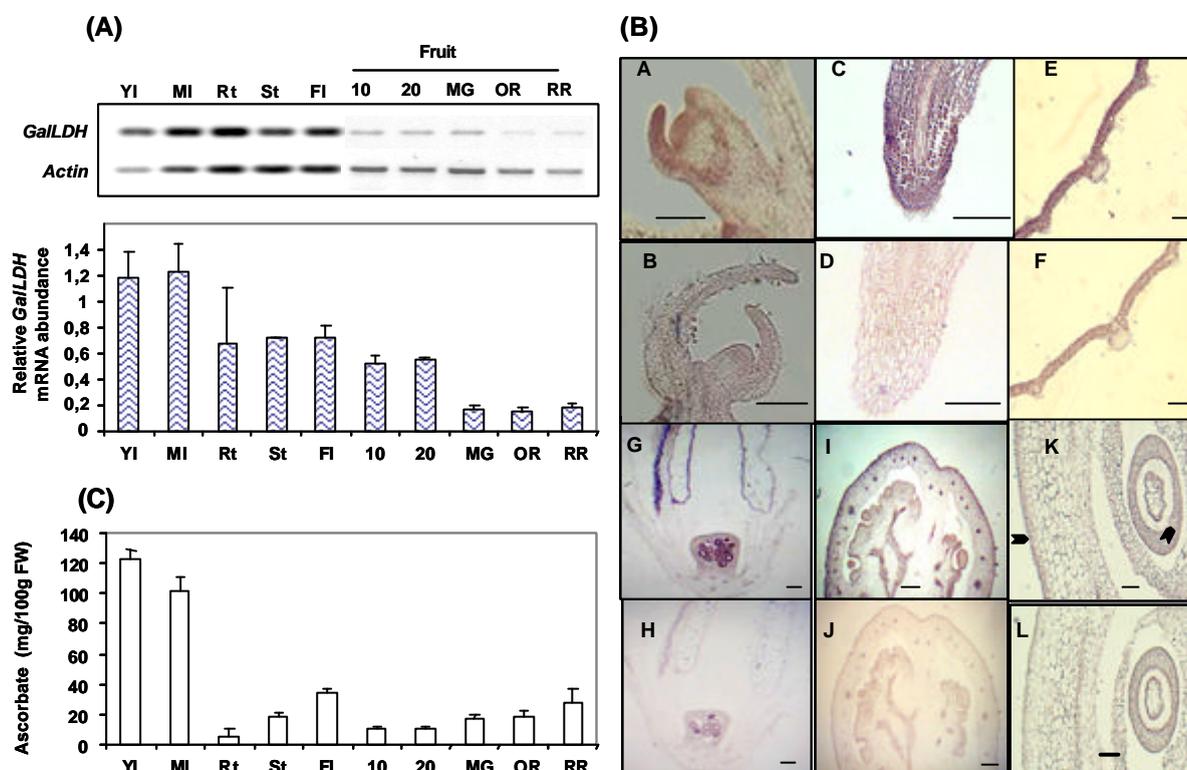


Figure 1. Analysis of *GalLDH* (Accession n°:AB 080690) gene expression in different organs of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* Mill. Cv. WV 106) and their ascorbate content.

(A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *GalLDH* was carried out in different plant organs (YI =young leaves, MI=mature leaves, Rt=Root, St=stem, Fl=flower) and in different tissues of fruit during different fruit developmental stages. Total RNA used for RT was isolated from organs or fruits harvested at the indicated developmental stages (MG=mature green, OR=orange, RR=red ripe). Specific amplification of cDNA fragments was detected after gel electrophoresis, Southern blotting and hybridization to the corresponding ^{32}P -labelled *GalLDH* probe and using *Actin* as a control probe. The accumulation of *GalLDH* transcripts was quantified by image scanning of the autoradiogram using the Quantity One software. The relative *GalLDH* mRNA abundance was normalized towards that of *Actin* and expressed as a ratio of arbitrary units for pixel intensities. **(B)** Detection of *GalLDH* mRNA by *in situ* hybridization of Digoxigenin-labelled *GalLDH*-specific antisense probe (A, C, E, G, I, K). Digoxigenin-labelled *GalLDH*-specific sense probe were used as negative controls (B, D, F, H, J, L). (A and B) Longitudinal section of shoot apical meristem, (C and D) Longitudinal section of root apical meristem, (E, F) Longitudinal section of young leaf, (G and H) Longitudinal section of flower bud, (I and J), Cross-section of 7 DPA fruit, (K and L) Cross-section of 20 DPA fruit. **(C)** Total ascorbate content (mg/100g FW) in plant organs and in the fruit harvested at the indicated developmental stages Bar scale = 500 μm .

(data not shown) and corresponded to the size predicted by the cDNA sequence of TC 163697.

Taken all together, these results indicated that the galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an ideal candidate to investigate through a reverse genetic approach, the role of ascorbate in plant development and more specifically during fruit development.

Transgenic plants display a reduced growth rate

A 133-bp fragment of the cDNA-encoding GalLDH was cloned using RNAi approach, and 15 transgenic tomato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation were transferred to the greenhouse. In all independent primary transformants, the insertion of the two fragments as inverted tandem was confirmed by PCR using a set of specific primers, and Southern analysis revealed the presence of only one RNAi construct in the plants. These lines were screened for phenotypic (plant growth, fruit size), molecular (*GalLDH* expression) and biochemical (ascorbate content, level of GalLDH protein and GalLDH activity) traits. It seems worthwhile to report that among the first generation of transgenic plants, 3 were poly-ploid plants and might be abandoned (data not shown).

Screening based on the whole observed and measured traits for the remaining lines brought to choose four lines, named 2, 5, 8, and 38. Line 5 and 8 were both highly affected, while line 38 and 2 were moderately and less affected, respectively. For these four lines that were then passed to the next generation, namely T1, the different features reported above were confirmed. When the transgenic plants were grown in the green house, it appeared clear that the growth of the aerial parts was reduced compared with control. Thus, the germination rate, the plant growth rate, the fruit weight and diameter were reduced (Fig. 2). In general, lines 5 and 8 revealed the most severe effects compared to the two other lines. The GalLDH transcript as well as the protein accumulation was highly decreased, nevertheless between 15 to 25% of GalLDH activity was still detected in the tissues (Fig 3). The same results were obtained when the transgenic plants were grown either in a growth chamber or in the greenhouse.

Given the reduction in aerial yield in the transformants, we assessed to what extent they exhibited altered photosynthetic rates. The rate of CO₂ assimilation was measured on fully expanded leaf of the transformant and control plants exposed to irradiance ranged from 200 to 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At this light intensity range, the CO₂ assimilation curve was linear and the calculated photosynthetic rate, $16.2 \pm 0.8 \text{ nmol CO}_2 \text{ per } \mu\text{mol photon}$, was unaffected in transformant and control plants (see supplementary data). It is noteworthy to note that the photosynthetic pigment content was not affected (Data not shown). As the final fruit size was reduced up to 40% of wild type in the transgenic plants (Fig.2), we analysed the origin of

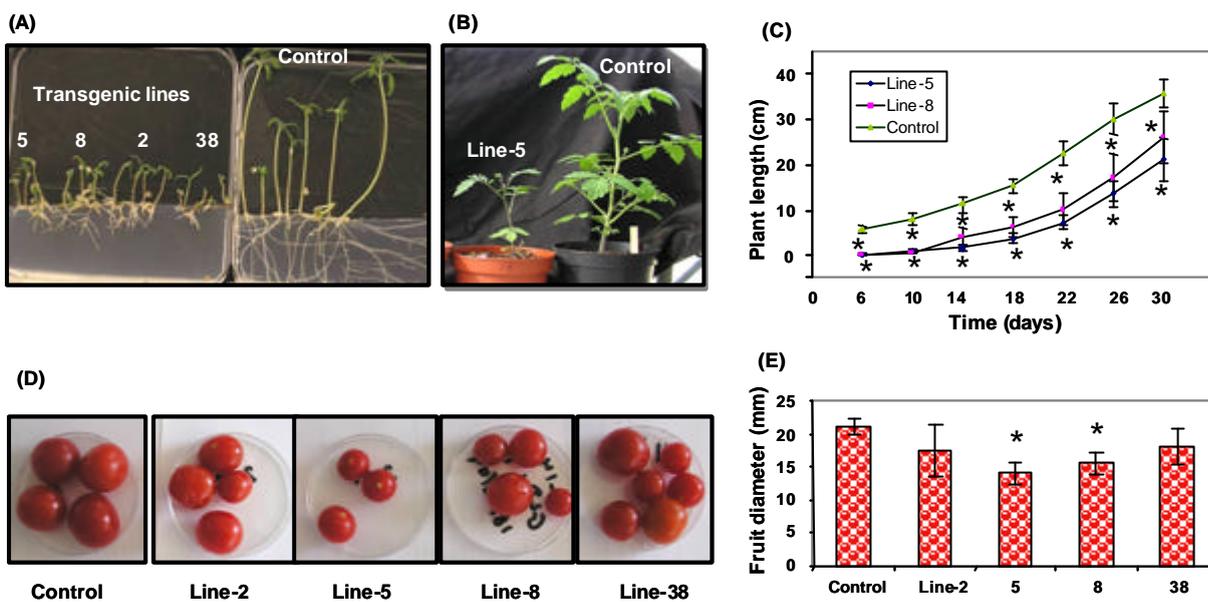


Figure 2. Phenotype characterization of tomato plants expressing *GaILDH* gene silencing (RNAi).

Transgenic plants showed: (A) delay in germination, (B) delay in plant growth, (C) reduction in plant length, (D) reduction in fruit size (at 42 DPA), and (E) reduction in fruit diameter. Values are presented as mean \pm SE of determinations of at least 6 individual plants per line with 10 fruits of each plant; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

such a trend. First, we observed that the fruit development from anthesis up to the red ripe stage lasted the same period for the transgenic lines and the control, which was 42 days in the same culture conditions. Second, observation of red ripe fruit slice at the equatorial area showed that the transgenic lines produced fruits with thinner pericarp. Because it is almost impossible to obtain suitable samples from red ripe fruit for histological analysis (Cheniclet *et al*, personal communication), we compared the thickness of the pericarp in fruits at 20 DPA, when the fruits reached 85% of its final size. Cytological analysis revealed that the fruit pericarp thickness was significantly decreased in all lines, as a result of the reduction of the pericarp cell size but not because of the number of cell layers which remained unchanged (Fig. 4). Furthermore, the respiration activity of the ripening fruit was not modified as well as the ethylene production which displayed the same typical peak between the Breaker and Turning stages in the transgenic and control fruits (see supplementary data).

Reduction in the GalLDH activity does not result in the reduction of ascorbate content but affects the redox state.

Despite the high reduction in *GalLDH* transcript level, which was concomitant with both enzymatic activity and protein level, no effect was observed on content of total ascorbate in young leaves and developing fruits compared to the control, when the plants were cultured in the green house (Data not shown). As it is well established that ascorbate content of the leaf and its redox state depend on many parameters of the culture conditions (light intensity, temperature, and photoperiod), transgenic and control plants were grown in a phytotronic chamber in order to avoid any daily climate changes. Measurements of the total ascorbate content as well as the reduced-ascorbate (AsA) content were carried out in the young leaf of these plants. Because the trend was similar for both transgenic lines, only data obtained for one of the most affected plants, line 8, are presented in Figure 5. From the germination and up to the appearance of the first inflorescence 6 weeks after sowing, total ascorbate contents measured in the seed and in the fourth leaf were comparable in both transgenic and control plants. For all plants, in the germinating seed, 95% of ascorbate was as reduced form (AsA). Difference appeared after 3 weeks; the AsA/Total ascorbate ratio presented a stronger reduction in the leaf compared to control as a result of the decrease by half of the AsA content (Fig.5). In transgenic leaf, the reduction of AsA content was maintained all along the experiment, whereas the level of oxidized ascorbate was very close of that of the control. Reduced ascorbate and oxidized ascorbate were measured in the apoplast from young fully expanded leaves of 6-week-old in line 5 and 8. In the leaf of control plants only 10% of the total ascorbate was found in the apoplast (11.6 ± 2.4 mg/100 g FW),

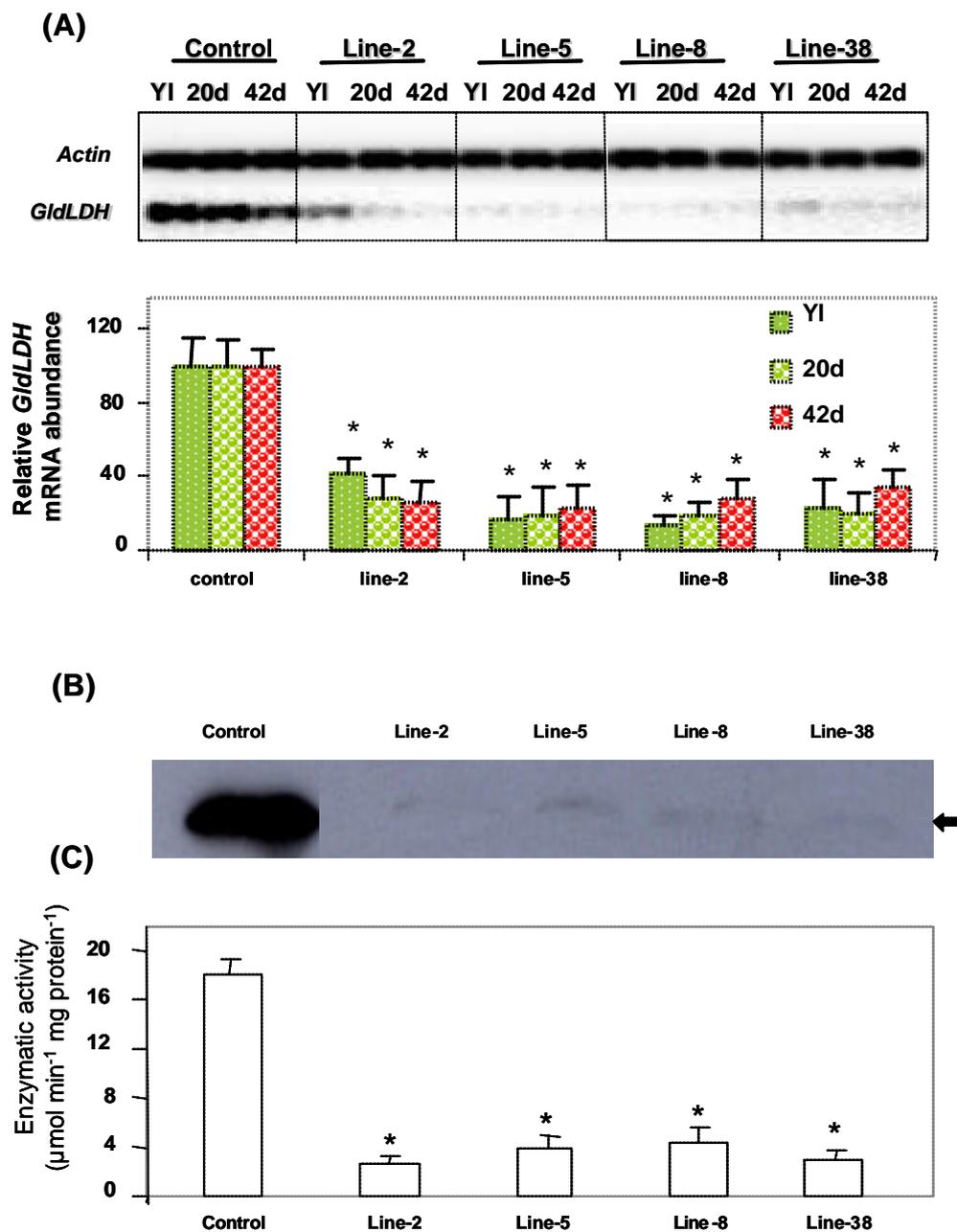


Figure 3. *GaLDH* and ascorbate in RNAi-plants and control tomato plants.

(A) Analysis of *GaLDH* gene expression by semi-quantitative RT-PCR in young leaves (YI) and in fruit of 20 and 42 days post anthesis (DPA) in RNAi-*GaLDH* plants (line-2, 5, 8, and 38) compared to the control. Southern blot and hybridization were carried out using specific amplified fragment of *GaLDH* as probe and *Actin* was used as a control. Quantification was performed by image scanning using the Quantity One software. The relative *GaLDH* mRNA abundance was regularized towards corresponding *Actin* and expressed as a percentage compared to control. (B) Immunoblot analysis of transgenic lines. Crude extracts of young leaves from transgenic lines and control plants were analysed by Western using specific antibodies raised against *GaLDH* from tomato. (C) *GaLDH* activity in young leaves of four RNAi-*GaLDH* transformants in comparison with control plant. Values are presented as mean \pm SE of determinations of six individual plant per line, asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

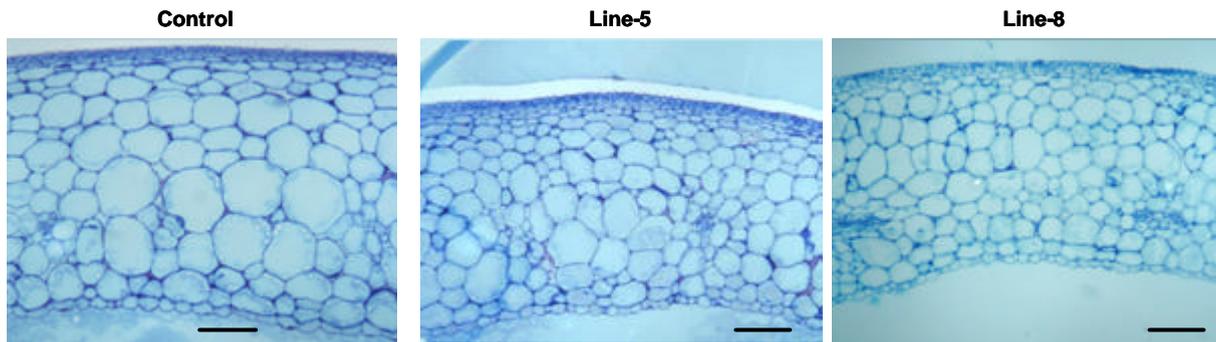
this result was in accordance with the level of apoplastic ascorbate described in whole leaf (Noctor & Foyer, 1998). Moreover, about 90% was oxidized ascorbate. In contrast, the apoplastic ascorbate contained in the leaf of transgenic plants was half reduced (6.6 ± 2.1 mg/100 g FW) as a result of the decline of the oxidised pool without change in reduced ascorbate content (Fig. 6). In the same time, the measure of the leaflet area of the corresponding leaves revealed a significant reduction by 25% in the most affected line 8 and 5 (Fig. 6). When we analysed at the cellular level the epidermis of these leaves, it appeared that the mean area of the cell of the epidermis was reduced in the same order of magnitude in the transgenic lines (Fig. 6).

In the fruit of all transgenic lines, the total ascorbate content was identical to that of fruit of control plants, and remained constant during the whole fruit development, around 40 mg per 100g of FW. The most remarkable result concerns the change of the AsA/Total ascorbate ratio during the fruit development. During the division and expansion phases, 50-80% of ascorbate was as oxidized form, whereas, in contrast, AsA reached as much as 90% during the maturation phase. Furthermore, in the fruits of line 8, the AsA/Total ascorbate ratio was changed in the early stages of development (10, 20 and 30 DPA) and remained similar to the control during the maturation. In line 8, this ratio was increased in the fruit at 10 and 30 DPA, because these fruits contained more reduced ascorbate than the control fruits. It is worthwhile to indicate that in the 20 DPA fruit, the oxidized ascorbate was also significantly decreased compared to the control (Fig. 5).

Changes in metabolic profiles in the RNAi-GaILDH transformants

We analysed the relationship between the phenotypes of the four RNAi-GaILDH lines (2, 5, 8, 38) and the changes in the redox state of ascorbate through two integrated approaches involving transcriptomic and metabolomic analysis. As expected, the metabolomic analysis confirmed the rank order of the line 8 being the most affected at the metabolic level. Furthermore, it is interesting to note that to some extent, expanding leaf and red ripe fruits behave inversely at the metabolic level (Fig. 7 and 8). We analysed the major primary pathways of plant photosynthetic metabolism by using an established gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) method for metabolic profiling (Fernie *et al.* 2004). In leaf, this approach revealed a decrease in levels of the major amino acids whereas some of them, Cys, Pro, Thre and Val increased. With the exception of transcript for proline synthetase (SGN U216788 Table 1) which showed an increase by about 3.7-fold that could be correlated with the increase of the Pro level in the most affected line 8, the other transcripts related to amino acid metabolism were unaffected. In contrast, in red ripe fruits, the levels of amino acids were largely unaffected with exception for Val and Met content that

(A)



(B)

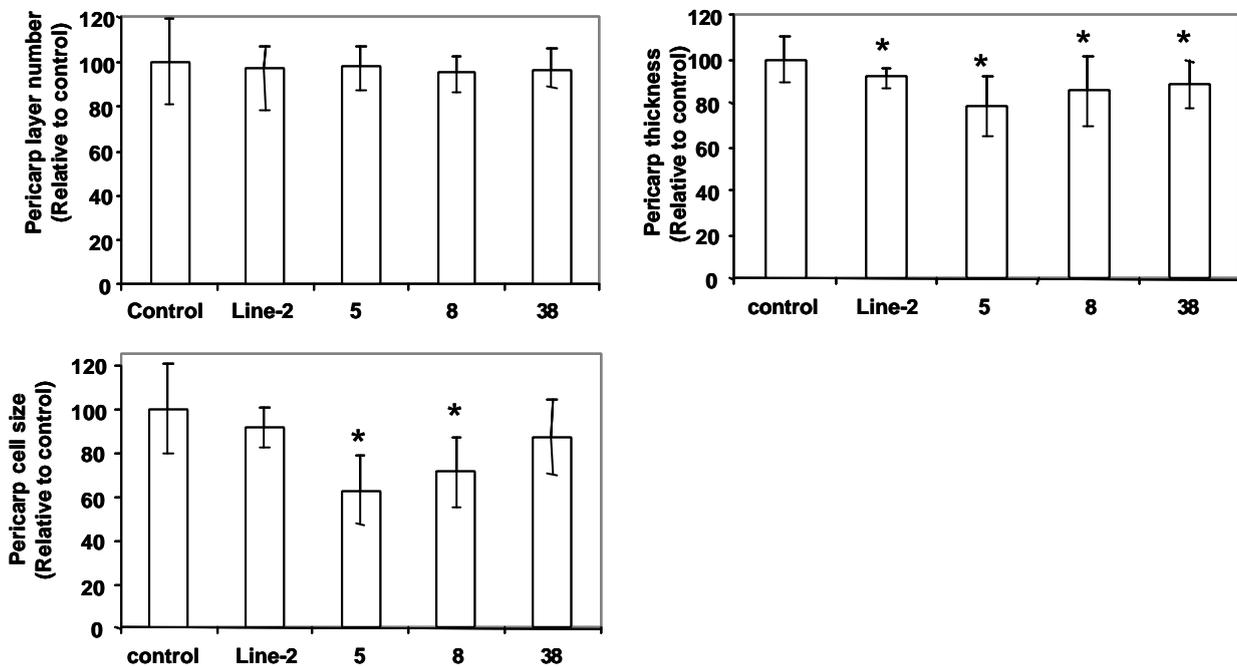


Figure 4. Microscopic analysis of fruit pericarp.

Microscopic analysis of pericarp of tomato fruits (20 DPA) from RNAi-GalLDH plants compared to control plants. (A) pericarp portion of fruit from RNAi-GalLDH line-5 and line-8 compared to control. (B) Relative number of pericarp cell layers, relative pericarp thickness and relative pericarp cell size, were defined by *in situ* observations of a region of interest (ROI). Values are presented as mean \pm SE of determinations of at least 6 individual plants per line with at least 10 fruits per line. *In situ* observations were performed 4 times in each fruit, asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control. Bars = 200 μ m.

increased whereas Pro content decreased by half (significantly in the case of line 8). In the leaf, the level of TCA cycle intermediates was significantly reduced with exception of succinate that displayed a slight but significant increase. Among other organic acids, threonic acid, which corresponds to a degradation product of the ascorbate turn-over pathway, displayed an increase in all transformants, whereas the reverse was observed for the gamma-aminobutyric acid (GABA) content. In red ripe fruits, the content of the TCA cycle intermediates was unchanged; however, the succinate content displayed a similar increase like that observed in the leaf. The most important change was for malate which increased by up to 4.6-fold in line 8. Among the other organic acids, GABA accumulated up to 2.8-fold in line 8 whereas threonate was slightly reduced. Analysis of the leaf carbohydrate content revealed that the transformants were characterised by increases in Fru and Suc, as well as other sugars linked to the cell wall metabolism like arabinose, galactose, mannose and rhamnose and to a great extent raffinose which increased by up to 5-fold in line 8. It is noteworthy that *myo*-inositol increase significantly in both RNAi-GaILDH lines. In fruit, the level of sugars was largely unaffected; however, the levels of some cell wall-related sugars and *myo*-inositol were significantly reduced, whereas sorbitol and mannitol increased. Interestingly, galacturonic acid, an intermediate of the alternative ascorbate biosynthesis pathway (Agius *et al.*, 2003) was decreased significantly in all transgenic plants. Among the other compounds analysed, it is interesting to reveal that intermediates involved in the membrane biogenesis like C16 and C18 fatty acids were increased.

Functional classification of genes expressed in leaf and red ripe fruit of RNAi-GaILDH transformants.

Since there were considerable variations in term of cell growth and metabolite accumulation in the expanding leaf and red ripe fruit of the transgenic lines, we should expect to observe variation of expression of genes related to these cell processes. Therefore, we compared the gene expression profiles of the two tissues of the line 8 transformants with the corresponding ones of the control plants. Among the 13,400 transcripts analyzed, 1269 in the leaf and 93 in the red ripe fruit both were found to be significantly (P value > 0.02 , four independent slide hybridizations, including two dye-swaps and two replicates per slide) differentially expressed between RNAi-GaILDH and wild type tomato plants (see supplemental tables 1 and 2 online). A previously reported (Urbanczyk-Wochniak *et al* (2006), in press) and recently further enhanced annotation of the genes represented on the TOM1 array combined with the MapMan ontology (Thimm *et al*, 2004) was used for analyses (see supplemental data online and <http://www>). We selected 71 genes in the leaf and 35 genes in the fruit by using mean ratio >1.6 as threshold. Many of these

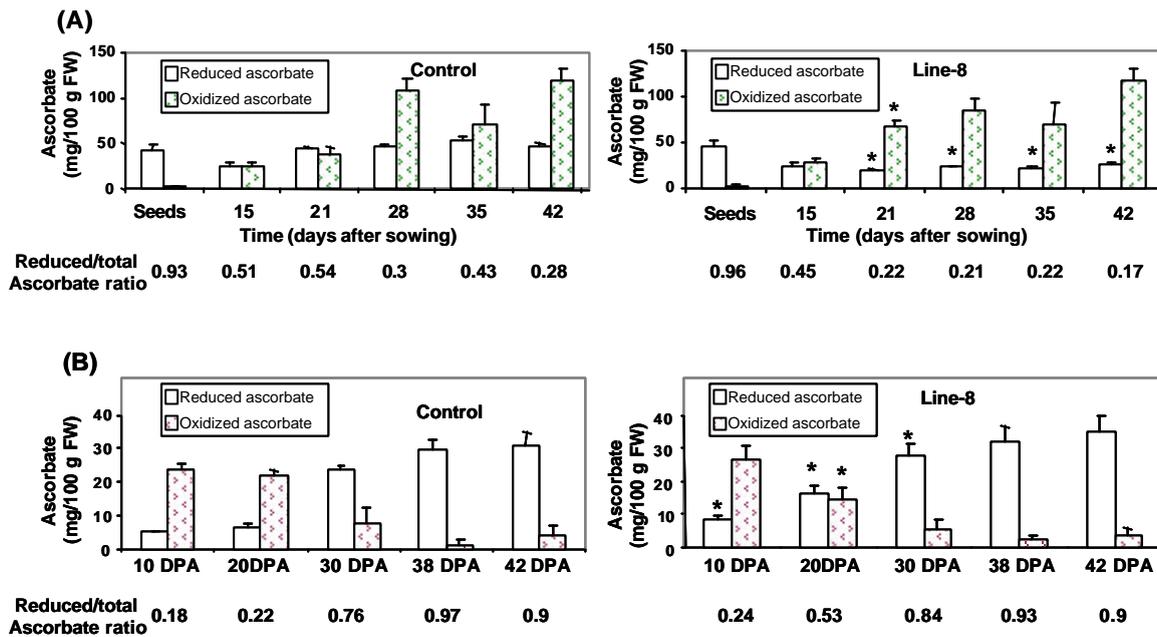


Figure 5. Reduced and oxidized ascorbate in tomato leaf and fruit.

Reduced and oxidized ascorbate content (mg/100g FW) and reduced/total ascorbate ratio in seeds and in young leaves during plant development in RNAi-GaILDH line-8 and in control plants (A). The same analysis was performed in fruit at different developmental stages of line-8 and control (B). Values are presented as mean \pm SE of determinations of six individual plants per line, the experiment were repeated 2 times; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

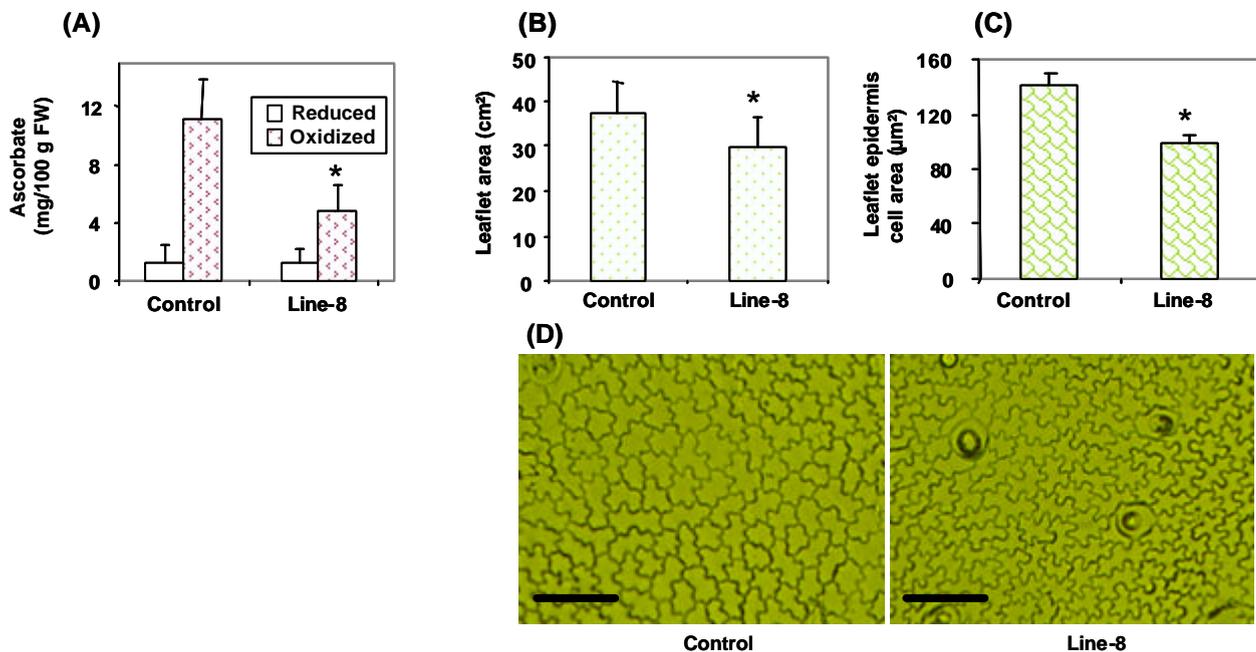


Figure 6. Apoplastic ascorbate related to epidermis cell size.

(A) Assay of reduced and oxidized apoplastic ascorbate content (mg/100g FW) in young leaves from RNAi-GaILDH line-8 and control plants. (B) Analysis of leaflet area (cm²) in line-8 and control plants. (C) Microscopic analysis of leaflet epidermis cell area (µm²) of line-8 and control plants. (D) Microscopic illustration showing the reduction in epidermis cell surface of leaflet from line-8 compared to control. Values are presented as mean \pm SE of determinations of six individual plants per line, the experiment were repeated 2 times; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control. Bar represents 100 µm.

genes (up to 52% and 40% in leaf and fruit respectively) encode proteins with unknown functions or, alternatively, present no homology with known genes. It is worthy to note that most of the genes are overrepresented in leaf and fruits, less than 5% are repressed in the transgenic lines. The repartition of the known genes into different functional categories is very similar between the leaf and fruit tissue (fig 9). In the leaf, the first group contains 15 transcripts strictly related to stress response (Table 1). This group I includes several known genes that were shown to be induced by various stress like wounding, cold, light, including for example, glutamate decarboxylase (Bouché *et al.*, 2004), protein of the glycine cleavage system (Elin *et al.*, 2004), lipid transfer protein (Imin *et al.*, 2006), proline-rich protein (Bradley *et al.*, 1992). Group II contains 20 transcripts that are related to photosynthesis, carbohydrate metabolism and cell wall. For example, the Rubisco activase (Werneke *et al.*, 1988), xyloglucan endotransglucosylase hydrolase (Yokohama *et al.*, 2004), PS-II (or PS-I) proteins and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Hancock *et al.*, 2005). Group III contains 8 transcripts and includes several genes that encode signal transduction components such as the PP2C, MADS box protein TDR3, F-box protein (Rodriguez, 1998; Shore et Sharrocks, 1995; Potuschak *et al.*, 2003). At last, we could defined a group IV that contains few genes encoding proteins related to secondary metabolism, like geranylgeranyl reductase (Giannino *et al.*, 2004), sterol C24-methyltransferase (Holmberg *et al.*, 2002). In the fruit, group I contains four stress-related transcripts like 3 heat shock proteins (Table 2). Group II contains only five transcripts, whose two encode photosystem-II protein and Rubisco which is surprising to be expressed in the red ripe fruit. Group III contains 10 transcripts whose some were only induced in the fruits. Interestingly, several genes encoding ethylene responsive protein (SGN-U215004, SGN-U217359, SGN-U219135, SGN-U229641), were identified as members of this group. In addition, several transcription factors were also found in this group, including serine/threonine protein kinase, PP2C, WRKY type protein (Rodriguez, 1998; Eulgem *et al.*, 2000). At last group IV contains genes encoding proteins related to secondary metabolism, like the coumarate-CoA ligase, the hydroxysteroid dehydrogenase, the gibberellin oxydase (Uhlmann et Ebel, 1993; Bachem *et al.*, 2001; Lange *et al.*, 1994) or the fruit specific ripening regulated protein DDTFR8 (Giovannoni *et al.*, 1999). The putative roles of the proteins encoded by the genes identified with this approach in relation to ascorbate redox state in the expanding leaf and fruit will be addressed more thoroughly in the discussion.

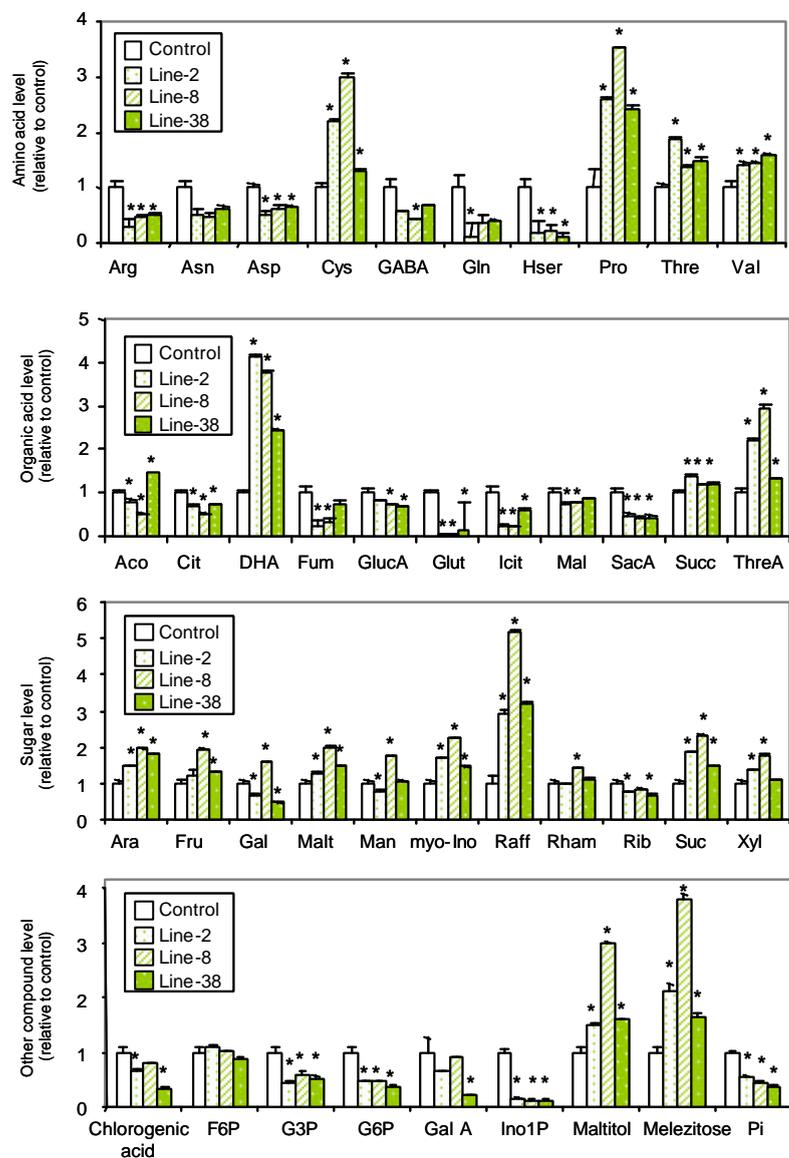


Figure 7. Relative metabolite content of young leaves in RNAi-GalLDH plants.

Metabolites were determined as described in “Materials and Methods”. Data are normalized with respect to the mean response calculated for the control (to allow statistical assessment, individual samples from this set of plants were normalized in the same way). Values are presented as mean \pm SE of determinations of six individual plants per line with 3 leaves of each plant; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from the control.

Discussion

The regulation and mechanisms for which ascorbate is biosynthesised in higher plants is not clearly established despite numerous works on ascorbate metabolism. Up to date, the pathway proposed by Wheeler *et al.* (1998) is generally accepted as the main biosynthetic pathway in higher plants. Other pathways have been proposed in plants. Most of them have been partially characterized and somehow was specific to plant varieties or presented low efficiency in term of biosynthesis. This is the case of the pathway proposed by Agius *et al.* (2003), which has been described only in strawberry fruit during the maturation phase. However, the last reaction step in the two pathways proposed by Wheeler *et al.* (1998) and Agius *et al.* (2003) involves the oxidation of the galactono-1,4-lactone which is catalysed by the enzyme GalLDH. This protein has been characterised in many higher plants as a mitochondrial protein (Østregaard *et al.*, 1997; Imai *et al.*, 1998; Siendones *et al.*, 1999; Yabuta *et al.*, 2000; Tabata *et al.*, 2001.), and its amino acid sequence is highly conserved between several plant species, suggesting that GalLDH is a key enzyme in ascorbate biosynthesis.

We attempted to generate ascorbate-deficient transgenic tomato plants by silencing the *GalLDH* gene using a RNAi strategy. This biotechnology-based approach using transgenesis led to transformants that displayed a reduction in both mRNA expression level, protein level and enzymatic activity of the GalLDH (Fig. 3) without affecting the total ascorbate content of the plants. In the literature, many groups have reported a close correlation between the *GalLDH* transcript level, GalLDH activity and ascorbate content. For example, in *Arabidopsis thaliana* and tobacco leaves as well as in cultured BY-2 cells, these traits evolved the same way and have been shown as being regulated by light (Tabata *et al.* 2002; Tamaoki *et al.*, 2003). In wounded potato tubers GalLDH activity and ascorbate pool were both increased (Ôba *et al.*, 1994). Pateraki *et al.* (2004) showed that ripening-associated increase of *GalLDH* transcript levels was concomitant with an increase in ascorbate content in melon. In all tomato RNAi-GalLDH transformants analysed, the total ascorbate content in fruits and leaf (Fig. 5) were similar to those of control plants. The first hypothesis to explain such a discrepancy may be the existence of other ascorbate biosynthesis pathways induced in the RNAi-GalLDH tomato plants. A possible alternative ascorbate pathway using *myo*-inositol as initial substrate has been proposed by Lorence *et al.* (2004). Only biochemical evidence based on the significant increase of the *myo*-inositol level in leaf is in favour of this hypothesis. Second, it is reasonable to admit that the residual GalLDH activity (Fig. 3) measured in transgenic plants may be capable to sustain a vital synthesis of ascorbate in order to produce equivalent amount of ascorbate in transgenic plants as in the control plants. However, this might be in combination with some molecular and metabolic adjustments such

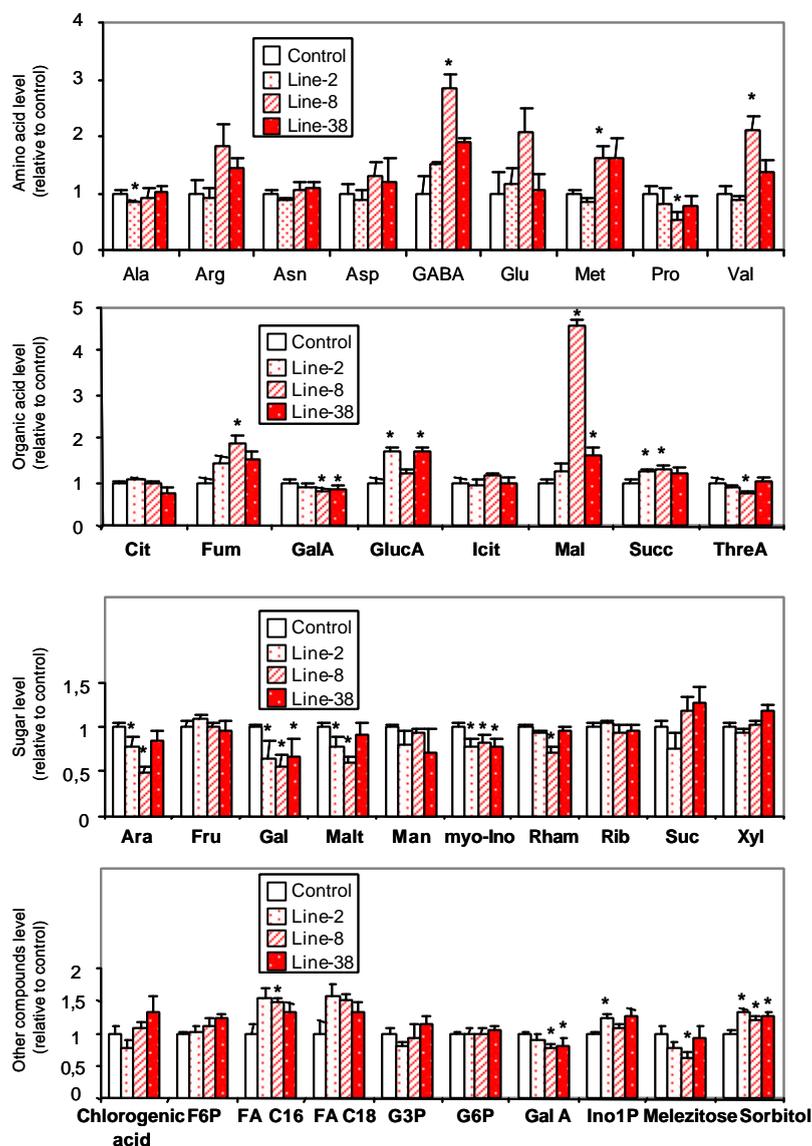


Figure 8. Relative metabolite content of fruit of 42 DPA in transgenic GaILDH-plants.

Metabolites were determined as described in "Materials and Methods". Data are normalized with respect to the mean response calculated for the control (to allow statistical assessment, individual samples from this set of plants were normalized in the same way). Values are presented as mean \pm SE of determinations of six individual plants per line with 10 fruit of each plant; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from the control.

high ascorbate recycling process, and/or a decline in ascorbate degradation pathway. In higher plants, ascorbate degradation is not clearly established. According to plant species, two ascorbate degradation pathways have been described. Ascorbate can either degrade via idonate to threarate (tartrate), or in most plants, via dehydroascorbate, yielding oxalate plus threonate (Green and Fry, 2004). In the red ripe fruit a significant decline of the threonate content was measured suggesting a possible reduction of the ascorbate degradation process. This was not the case in the leaf, in which the increased threonate content could be as a result of the strong accumulation of DHA. Moreover, the remarkable change in term of ascorbate redox state observed in leaf and fruit drive to believe that the ascorbate recycling pathway has been adjusted as a consequence of change in the level *GaILDH* expression and activity. This redox state is defined as the ratio of the concentration of the reduced form (AsA) to the concentration of both the reduced form and the oxidised forms (MDHA+DHA) and involves the ascorbate recycling pathway which is a complex process in which participate several enzymes, cell compartments, (cytosol, chloroplasts and cell-wall) and co-factors (glutathione, NAD) (Smirnoff, 2000). Up to date, regarding the metabolomic level, no change of the glutathione content was observed as well as at the transcriptomic levels, the expression of genes encoding proteins of the ascorbate recycling processes did not seem to be modified.

Beside the possible induction of alternative pathway associated with a reduction of ascorbate degradation that could explain the comparable ascorbate level in the transformants and control plants, the most remarkable effect of the *GaILDH* silencing was the great change in growth observed at the level of the entire plant, as well as in the fruit and leaflet sizes (Fig. 2, and 6). We make the assumption that this effect could be directly related with the change of the redox state of ascorbate in leaf and fruit. Although, ascorbate is believed to play an important role in cell proliferation and expansion, the mechanism by which it contributes to cell development is not yet elucidated in plants (Noctor & Foyer, 1998; Smirnoff, 1996). Firstly, the change in the ascorbate redox state could have an effect on cell division. In that sense, Cordoba-Pedregosa *et al.* (1996) showed that the cell proliferation and expansion of bulbs roots grown in medium containing high level of dehydroascorbate (DHA) were inhibited. Kerk and Feldman (1995) established a direct correlation between ascorbate redox state and cell proliferation rates in cells of the quiescent centre in *Zea mays* root tips. Furthermore, during the growth cycle of a tobacco BY-2 cells suspension, a significant decrease in the level of endogenous reduced ascorbate was observed, accompanied by an overall decrease in the ascorbate redox state (De Pinto *et al.*, 1999; Kato and Esaka, 1999). Horemans *et al.* (2003) provided further evidence for a possible ascorbate-mediated redox control of the cell cycle by demonstrating the existence of a transient peak of DHA accumulation during the M phase and the M/G1 transition. However,

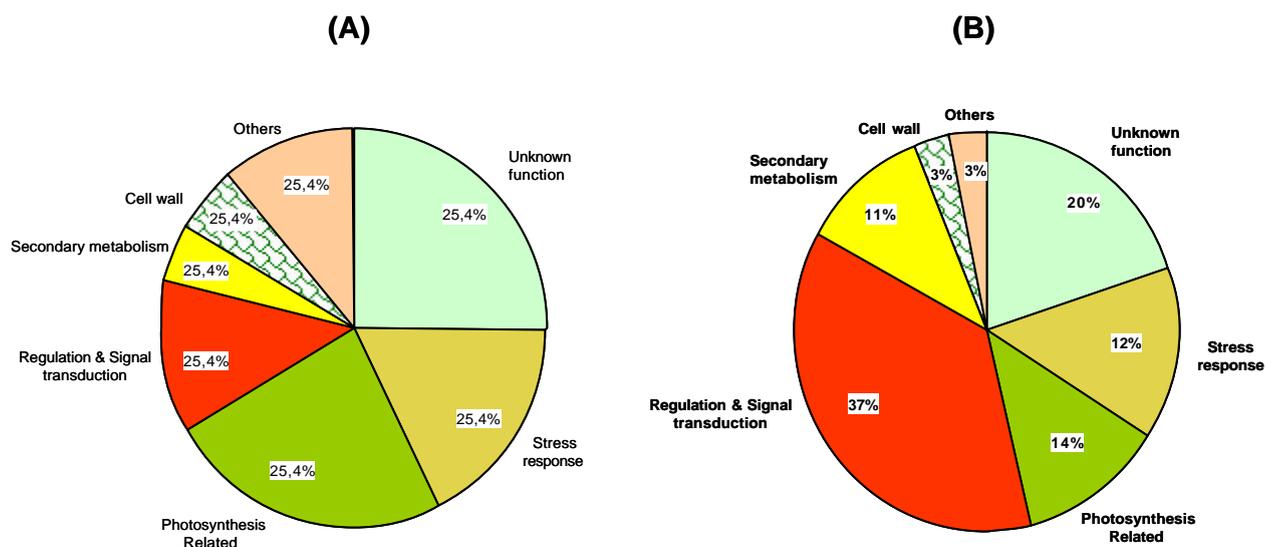


Figure 9. Changes in ascorbate redox state modifies gene expression in leaves and fruit of tomato plants.

Microarray analysis was used to compare leaf (A) or fruit (42 DPA) (B) transcript abundance in tomato plants expressing *GalLDH* gene silencing and the corresponding control plants. 71 transcripts in leaf and 35 in fruit were significantly modified in abundance and assigned to functional groups. The charts show the distribution between functional classes of transcripts that are up-regulated in *GalLDH*-RNAi plants comparatively to control plants. Numbers indicate percentage of total transcripts for which significant abundance were observed in each tissue.

all these works showed only correlation between cell division and ascorbate level and/or redox state, but they did not demonstrate how ascorbate operates in cell division processes. In our transgenic fruit, the number of cell in the fruit pericarp was similar to that in control tissues. We may presume that at least in this tissue, the cell division phase was not affected by the change in the ascorbate redox state. The second hypothesis is that ascorbate redox state could affect cell expansion processes. Regarding the role of ascorbate in cell expansion, Smirnoff (2000) proposed the following hypothesis based on the existence of a ascorbate redox cycle within the cell wall. During this redox cycle, monodehydroascorbate (MDHA) generated via the cell wall ascorbate oxidase is reduced back to AsA via a plasma-membrane cytochrome b, and the electrons produced could be transported across the plasma membrane, stimulating therefore cell expansion through the acid growth theory (Rayle and Cleland 1992). If this hypothesis is true, then it is tempting to suggest that the strong decrease of the oxidised ascorbate pool in the apoplast, could affect the efficiency of this cell wall redox cycle, resulting in the reduction of cell expansion processes in the developing fruit and leaf.

The last point to be discussed is how to explain that by reducing *GalLDH* expression and activity without changing ascorbate content within plant organs, the cell growth processes was impaired. First, we could hypothesize that the ascorbate transport within the cell compartments was modified. Indeed, although ascorbate in the studied tissues was not affected in the tomato transformants, we cannot exclude whether this occurs in all cellular compartments. The enzyme GalLDH is located in the inner mitochondrial membrane facing the outer space (Bartoli *et al.*, 2000), so ascorbate can diffused into the cytosol and be distributed to other cell compartments. In the well characterized *vtc1* mutant from Arabidopsis, the leaf contained 70% less ascorbate compared with the wild type and shoot growth was reduced (Conklin *et al.*, 1999). Moreover, Veljovic-Jovanovic *et al.* (2001) showed that in *vtc1*, the ascorbate depletion had no effect either on photosynthesis or on the redox state of ascorbate and glutathione as a result of maintenance of the stromal ascorbate pool at wild type concentrations in order to avoid the production of harmful oxygen species. Thus, like in the *vtc1* mutant, since photosynthesis was unaffected in RNAi-GalLDH plants, it is tempting to speculate that the transport ascorbate in the chloroplast may be also maintained constant. On the other hand, like in the leaves of the *vtc1* mutant, the apoplastic ascorbate of the tomato leaf was remarkably reduced, suggesting that the transport from the cytosol through the plasma membrane to the apoplastic space was impaired. To date, no membrane-related ascorbate carrier has been characterized at the molecular level in plants (Horemans *et al.*, 2000), and considering together all these results, we cannot rule out the hypothesis of a slowest intra- and extra-cellular ascorbate transport that could affect RNAi-GalLDH plant development.

Table 1. Genes Differentially Expressed in Leaf of Line 8-GaILDH Plants

SGN identity	Description	Biological pathways	Ratio ^a	P-Value ^b	Fold Change ^c
U212549	Glutamate decarboxylase	Stress defense	1.290	0.00859	2.4
U212564	Plastidic aldolase	Calvin cycle	0.728	0.01157	1.7
U212565	Water stress induced protein TIP	Stress response	0.783	0.01316	1.7
U212578	Alcoholacetyltransferase	Hyper sensitive response protein	-0.720	0.00909	-1.6
U212700	Plastidic aldolase	Calvin cycle	0.848	0.01138	1.8
U212854	Calmodulin	Signal transduction	0.708	0.00939	1.6
U212863	Chlorophylla/b-binding protein precursor	Photosynthesis	0.717	0.01157	1.6
U212865	Chlorophylla/b-binding protein precursor	Photosynthesis	1.191	0.00859	2.3
U212870	Polyphenol oxidase chloroplastic	Stress response	0.705	0.01063	1.6
U212874	Wound-induced proteinase inhibitor	Stress response	1.220	0.00859	2.3
U212939	Rubisco activase	Photosynthesis	0.935	0.00909	1.9
U212940	Rubisco activase	Photosynthesis	0.837	0.01430	1.8
U212941	Rubisco activase	Photosynthesis	1.212	0.01063	2.3
U212989	TSF-1 protein	Pathogenesis response defense	0.774	0.01681	1.7
U213031	Plastocyanin chloroplast precursor	Photosynthesis	0.931	0.01444	1.9
U213044	Xyloglucane endotransglucosylase hydrolase	Cell wall metabolism	0.956	0.00909	1.9
U213050	Glycolate oxidase	Photoinhibition regulation	0.853	0.01060	1.8
U213080	Carbonic anhydrase chloroplast precursor	Carbohydrate metabolism	0.762	0.01200	1.7
U213190	Cold-inducedglucosyltransferase	Stress response	0.780	0.01513	1.7
U213214	Photosystem-II core complex proteins	Photosynthesis	0.840	0.01150	1.8
U213287	Photosystem-II core complex proteins	Photosynthesis	0.955	0.01060	1.9
U213381	Photosystem-I reaction center subunit	Photosynthesis	0.939	0.01241	1.9
U213390	Photosystem-I reaction center subunit	Photosynthesis	0.785	0.01122	1.7
U213493	Pectine esterase	Cell wall metabolism	0.776	0.00891	1.7
U213559	Pectine esterase	Cell wall metabolism	0.763	0.01081	1.7
U213588	Protease inhibitor	Lipid transport	1.076	0.01060	2.1
U213604	Inorganic pyrophosphatase	Phosphate metabolism	0.786	0.01477	1.7
U213613	Ethylene-responsive proteinase inhibitor	Stress response	0.914	0.01247	1.9
U213697	Unknown protein		0.841	0.01138	1.8
U213711	Unknown protein		0.873	0.01122	1.8
U213763	Unknown protein		0.774	0.01760	1.7
U213912	Aminomethyltransferase	Glycine catabolism	0.844	0.01083	1.8
U214067	Geranylgeranyl reductase	Xanthophyll biosynthesis	0.860	0.00859	1.8
U214458	RNA binding protein	Transcriptional regulation	0.802	0.01122	1.7
U214524	Unknown protein		0.778	0.01060	1.7
U214617	Acetyl-CoA C-acyltransferase	Lipid metabolism	0.906	0.01395	1.9
U214650	Unknown protein		0.715	0.01339	1.6
U214655	Unknown protein		0.770	0.01157	1.7
U214777	proline-rich protein	Stress response	1.205	0.01060	2.3
U215017	Sterol C-methyl transferase	Xanthophyll metabolism	0.749	0.01069	1.7
U215389	Unknown protein		1.084	0.00875	2.1
U215755	Auxin-binding protein	Hormone response	1.194	0.01213	2.3
U215850	Unknown protein		1.314	0.00859	2.5
U215970	Unknown protein		0.703	0.01083	1.6
U216066	Vacuolar ATP-synthase subunit	Energy metabolism	0.840	0.01093	1.8
U216166	Unknown protein		0.980	0.01060	2.0
U216323	Translation initiation factor	Transcriptional regulation	0.721	0.01122	1.6
U216405	Xyloglucane endotransglucosylase hydrolase	Cell wall metabolism	0.771	0.01430	1.7
U216788	Proline synthetase associated protein	Stress response	1.339	0.00875	2.5
U216923	Lipid transfer protein	Lipid transport	0.784	0.01060	1.7
U217074	Unknown protein		-0.767	0.01122	-1.7
U217125	Unknown protein		0.700	0.01478	1.6
U217914	Metal-transporting P-type ATPase	Transport	0.819	0.01291	1.8
U218204	Unknown protein		0.826	0.01063	1.8
U218272	Serine protease	Protein degradation	0.817	0.01731	1.8
U218653	Sterol C24-methyl transferase	Xanthophyll metabolism	0.710	0.01157	1.6
U220213	MADS box protein TDR3	Transcriptional regulation	0.931	0.01122	1.9
U220516	Unknown protein		0.843	0.01122	1.8

Table 1. (continued).

SGN identity	Description	Biological pathways	Ratio ^a	P-Value ^b	Fold Change ^c
U220600	Unknown protein		-0.726	0.01060	-1.7
U220664	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Photosynthesis -photoinhibition	0.946	0.00859	1.9
U221524	Serine/threonine protein kinase	Signal transduction	1.015	0.01060	2.0
U222333	AP2/Ethylene Response Binding Protein	Transcriptional regulation	0.720	0.01122	1.6
U223492	F-box protein	Cell cycle regulation	-1.064	0.01799	-2.1
U224685	Glucan-1,3-beta-glucosidase	Pathogenesis response defense	1.081	0.01060	2.1
U225515	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Calvin cycle	0.824	0.01122	1.8
U225548	Protein phosphatase 2C (PP2C)	Signal transduction	0.756	0.01122	1.7
U225926	Unknown protein		0.810	0.01150	1.8
U226439	UDP-glucuronosyl transferase	Stress response	0.728	0.01388	1.7
U233918	Unknown protein		0.735	0.01190	1.7
U240467	Developmental protein related	Transcriptional regulation	0.809	0.00875	1.8
U242222	Unknown protein		0.718	0.01184	1.6

^a Signal log value, which measures the change in expression level for a transcript between two conditions. This change is expressed as the log₂ ratio. A log₂ ratio of 1 is the same as a fold change of 2.

^b Change P-Value, which measures the probability that the expression levels of a probe in two different conditions are the same.

^c Data are calculated using the following formula: fold change = $2^{\text{log ratio value}}$. When ratio value is negative, fold change = $(-1) \cdot 2^{-(\text{log ratio value})}$.

Secondly, as regards to our results, the most reasonable hypothesis to explain such an effect on cell growth, is the role in the signalling of the ascorbate redox state. To understand what are the biological mechanisms induced in RNAi-GalLDH plants in response to such redox state changes, we have used an integrative approach on two distinct tomato organs, leaf as source organ, and fruits as sink organ. We report here that such changes in ascorbate redox state affect the regulation of primary and secondary metabolism at the gene expression and metabolite content levels. First, at the metabolic level, our data show that stress-related compounds like proline and GABA displayed a great increase (Hare et Cress, 1997; Narayan et Nair, 1990). Further, one of the most important metabolic changes that could explain cell growth impairment in the leaf was the striking alteration of the Krebs cycle, as shown by the decrease of TCA intermediate content. The mitochondrial inner membrane, in which GalLDH is anchored, is a highly specialized system for oxidative phosphorylation and energy-linked ion translocation (Douce, 1985). In plants, mitochondria participate in photorespiration which involves the transfer of electrons from organic acids to oxygen through four respiratory complexes located in the inner membrane. In addition to this major respiratory pathway, there is an alternative respiratory pathway that drives electrons from ubiquinone to oxygen by-passing the cytochromes in complexes III and IV (Bartoli *et al.*, 2000). This alternative respiration is up-regulated by several types of stress (Mackenzie and McIntosh, 1999) and was believed to prevent excessive production of harmful oxygen species (Wagner et Moore, 1997). First, GalLDH is located in the inner mitochondrial membrane, secondly, L-galactono-lactone, substrate of this enzyme during ascorbate biosynthesis, can be an alternative respiratory substrate that delivers electrons to the mitochondrial electron transport chain between complexes III and IV (Bartoli *et al.*, 2000, Nunes-Nesi *et al.*, 2005). It is thus tempting to speculate that reduced GalLDH activity in transgenic tomato could directly affect the efficiency of the alternative respiratory pathway and its role in stress response, and consequently the function of the mitochondria, resulting in the lessening of the cell growth processes. Another possibility, based on the recent demonstration that several enzymes of the Krebs cycle are redox regulated (Balmer *et al.*, 2004), is to hypothesize that the pathways of energy metabolism are tightly regulated by redox factors, including ascorbate. Thus, changes in the redox state of the leaf ascorbate that resulted from reduced *GalLDH* gene expression could alter the energy metabolism and then affect cell growth.

Secondly at the gene expression level and as expected, the change in ascorbate redox state of tomato plants, especially in the apoplastic compartment, resulted in the constitutive expression of several specific defense transcripts in leaf and fruits. This finding was not surprising since many environmental signals, including pathogen, physical and

Table 2. Genes Differentially Expressed in Red Ripe Fruit of Line 8-GalLDH Plants

SGN identity	Description	Biological pathways	Ratio ^a	P-Value ^b	Fold Change ^c
U212932	Heat shock protein	Stress defense	1,066	0,01283	2,1
U213126	Calreticulin	Signal transduction (Ca ²⁺)	0,714	0,01802	1,6
U213287	Photosystem-II	Photosynthesis	1,521	0,01393	2,9
U213332	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Protein folding	0,992	0,01716	2,0
U213624	Pyruvate decarboxylase	Carbohydrate metabolism	1,180	0,01298	2,3
U213666	Unknown protein		0,766	0,01393	1,7
U213790	Acidic endochitinase	Pathogenesis response defense	0,918	0,01158	1,9
U214174	Coumarate-CoA ligase	Pigment biosynthesis	1,159	0,01298	2,2
U214536	Unknown protein		1,020	0,01193	2,0
U214610	WRKY transcription factor	Transcriptional regulation	-0,699	0,01298	-1,6
U214998	Unknown protein		0,853	0,01193	1,8
U215004	Tomato AGAMOUS 1 protein	Transcriptional regulation	0,715	0,01193	1,6
U215841	Unknown protein		0,996	0,01298	2,0
U216001	Extensin class I	Cell wall	0,719	0,01678	1,6
U216086	pfkB type carbohydrate kinase	Purine salvage	1,308	0,01472	2,5
U216459	Glycine-rich protein	Stress Response	0,988	0,01298	2,0
U216468	Cytosolic heat shock protein	Stress response	2,063	0,01158	4,2
U216554	Hydroxysteroid dehydrogenase	Steroid metabolism	0,969	0,01158	2,0
U216689	Threonyl-tRNAsynthetase	Protein synthesis	0,857	0,01947	1,8
U216991	Serine/threonine protein kinase	Signal transduction	1,191	0,01810	2,3
U217359	Multiprotein Bridging Factor MBF1	Ethylene signal transduction	2,175	0,01393	4,5
U217998	Metal transporter	Transport	0,856	0,01158	1,8
U218323	Heat shock protein	Stress response	1,361	0,01193	2,6
U219135	Ethylene-responsive protein ERF1	Transcriptional regulation	0,695	0,01810	1,6
U219138	Unknown protein		0,688	0,01193	1,6
U219631	Gibberellin 20-oxidase	Gibberellin biosynthesis	0,912	0,01716	1,9
U219908	Ripening regulated protein DDTFR8	Ripening	2,174	0,01393	4,5
U221533	Protein phosphatase 2C (PP2C)	Signal transduction	0,870	0,01158	1,8
U223066	AP2/ERF type protein	Transcriptional regulation	-0,823	0,01810	-1,8
U225322	Serine/threonine protein kinase	Signal transduction	0,740	0,01611	1,7
U225512	Rubisco	Photosynthesis	1,083	0,01158	2,1
U225539	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase	Carbohydrate metabolism	0,776	0,01611	1,7
U227863	Unknown protein		1,429	0,01664	2,7
U229641	Ethylene-response protein ETR1	Signal transduction	0,683	0,01633	1,6
U232338	Unknown protein		0,710	0,01842	1,6

^a Signal log value, which measures the change in expression level for a transcript between two conditions. This change is expressed as the log₂ ratio. A log₂ ratio of 1 is the same as a fold change of 2.

^b Change P-Value, which measures the probability that the expression levels of a probe in two different conditions are the same.

^c Data are calculated using the following formula: fold change = $2^{\log \text{ ratio value}}$. When ratio value is negative, fold change = $(-1)^{2^{-(\log \text{ ratio value})}}$.

chemical attacks, trigger an oxidative burst at the plasmalemma level which results in changes in redox state of the apoplast via up-regulation of cell-wall ascorbate oxidase and leads to decrease of the growth signal transduction processes and activate defense processes (Pignocchi & Foyer, 2003). Besides, analysing the transcriptome of the *Arabidopsis vtc1* mutant, Pastori *et al* (2003) demonstrate that plant growth and development may be influenced by the striking decrease of the ascorbate pool associated with the modulation of its redox state, through changes of several defense gene expressions. These authors demonstrated also that ascorbate acts on growth via the activation of ABA/GA signaling pathways, as a great number of ABA-modulated transcripts and the ABA content were increased in *vtc1* compared to wild type leaves. Thus, they proposed that ABA could be an intermediary of the signalling network in which ascorbate could coordinate the activity of defence networks complementary to the antioxidant system. ABA is essentially a cell survival hormone that induces metabolic arrest and sustains stress resistance, mainly drought (Himmelbach *et al.* 1998). It is remarkable that the up-regulated genes in the RNAi-GaLDH plants include many genes encoding proteins that are central components in ABA signal transduction, like the serine/threonine protein kinase, the protein phosphatase PP2C, or the water stress induced protein TIP (Rodriguez, 1998; Maurel *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006). Modulation of the hormonal control of plant growth by the redox state of ascorbate pool is suggest further by the up-regulation of several ethylene-responsive element binding factor/AP2 (Riechmann & Meyerowitz, 1998) as well as the F-box protein which has been shown to stabilise the protein complex involved in the mechanisms of ethylene action (Potuschak *et al.*, 2003). Both ABA and ethylene are stress-linked hormones that inhibit stem elongation, acting antagonistically to auxins and gibberellins (Kende *et al.*, 1998). Our data show the induction of two transcripts encoding gibberellin 20-oxidase, which is involved in gibberellin biosynthesis (Lange *et al.*, 1994) and one that encodes an auxin-binding protein presenting homology with germin-like protein that are involved in defense mechanism (Kim et Triplett, 2004). Together, these observations are in accordance with the hypothesis of Pastori *et al.* (2003) who suggested that the hormonal balance between ABA/ ethylene and GA/auxin could be one link between ascorbate redox state and growth rate.

Besides those effects on expression of genes strictly related to stress response processes, it is noteworthy that in the leaf more than ten of the up-regulated transcripts were directly related to photosynthesis. This finding is surprising, since ascorbate deficient *vtc1* plants displayed trivial changes in the expression of photosynthesis-related transcripts, only a 20% decrease of the *rbcL* transcripts encoding the large subunit of the Rubisco was observed. However, the unaltered photosynthesis of *vtc1* was explained by a higher activation state of the Rubisco. In our data, three transcripts encoding Rubisco activase were up-regulated. It is

then possible that the up-regulation of the group of photosynthesis-related genes, including Rubisco activase, could compensate any oxidative stress effect at the chloroplast level explaining the unaffected rates of photosynthetic CO₂ fixation. Furthermore, several genes indirectly linked to the photosynthetic activity of the leaf were up-regulated. First, transcript encoding the glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which has been proposed to play a role in mediating reactive oxygen species signalling in Arabidopsis (Hancock *et al.*, 2005) and was induced in response to environmental stress (Laxalt *et al.*, 1996). Second, transcript encoding the glycerol-3-phosphate acyltransferase which is involved in the maintenance of the photosynthetic machinery against induced photoinhibition (By *et al.*, 1995) was also up-regulated. Third, transcript encoding the geranylgeranyl reductase that provides phytol groups during chlorophyll and tocopherol synthesis in the chloroplast (Giannino *et al.*, 2004). Fourth, up-regulation of transcripts encoding sterol G methyltransferase, and acetyl-CoA C-acyltransferase two key enzymes in the sterol biosynthesis that are crucial for the preservation of membrane fluidity and permeability and are also precursors of growth regulators such as brassinosteroids (Holmberg *et al.*, 2002). Fifth, transcripts that encode proteins related to lipid metabolism and transport were also induced. Together, these observations suggest that change in the redox state of the ascorbate pool trigger up-regulation of set of transcripts encoding proteins that could play central roles in the maintenance of the leaf photosynthetic apparatus through both the preservation of thylakoid integrity and membrane-related antioxidant system. Analysis of the fruit transcriptome showed the induction of similar stress and hormone-response related genes that those up-regulated in the leaf. Moreover, several transcripts were specifically up-regulated in the fruit, like MADS-box protein, WRKY proteins, and Tomato AGAMOUS 1 protein which belong to the large family of transcriptional factor that regulate the temporal and spatial expression of specific stress genes (Singh *et al.*, 2002). Fruit specific transcripts encoding hormone-related proteins were also induced in response to gibberellin, like steroid dehydrogenase (Bachem *et al.*, 2001) and also to ethylene, like DDTFR8 protein (Giovannoni *et al.*, 1999) and the transcriptional coactivator Multiprotein Bridging Factor 1 (MBF1). Recently, transgenic Arabidopsis plants expressing the MBF1 have been shown to have enhanced tolerance to environmental stress (Suzuki *et al.*, 2005). It is remarkable that in these plants among the up-regulated transcripts, many were the same as those described in the RNAi-GalLDH tomato plants. All together, these data suggest that in the fruit, even in the absence of modulation in the level of ethylene production, changes in the redox state of the ascorbate pool could mimic the hormone-related stress signal triggering the activation of several transcriptional regulation systems which may reduce fruit tissue development.

In conclusion, when these functions are considered together with the phenotype described

for the RNAi-GaLDH plants, it is apparent that perturbation in the ascorbate homeostasis resulting not only from changes in ascorbate content but also with equal importance from changes in ascorbate redox state, represents strong links between the major cell development pathways.

References

- Agius, F., Gonzalez-Lamonthe, R., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, L., Botella, M. A., and Valpuesta, V.** (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol.* **21**: 177-181
- Alba, R., Fei, Z., Payton, P., Liu, Y., Moore, S. L., Debbie, P., Cohn, J., D'Ascenzo, M., Gordon, J. S., Rose, J. K., Martin, G., Tanksley, S. D., Bouzayen, M., Jahn, M. M., and Giovannoni, J.** (2004). ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* **39**: 697-714.
- Bachem, C. W., Horvath, B., Trindade, L., Claassens. M., Davelaar, E., Jordi, W., and Visser, R. G.** (2001). A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development. *Plant J.* **25** :595-604.
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J. P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M. and Buchanan, B. B.** (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2642-2647.
- Bartoli, C. G., Pastorib, G. M., and Foyer, C. H.** (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* **123**: 335-343.
- Bereterbide A, Hernould, M , Farbos, I., Glimelius, K., and Mouras, A** (2002) Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **29**: 607-615.
- Bouché, N., Fait, A., Zik, M., and Fromm, H** (2004). The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **55**: 315-25.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principale of proteins-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P., and Lamb, C. J.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30.
- By, M., Higashi, S., Gombos, Z., and Murata, N.** (1995). Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92** :6215-8.
- Cheniclet, C., Rong, W. Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J. P., and Renaudin, J. P.** (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* **139** : 1984-1994.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Paret, A., and Raymond, P.** (1995) Molecular cloning and characerization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol. Biol.* **28**: 473-485.
- Conklin, P. L., Norris, S. R., Wheeler, G. L., Williams, E. H., and Smirnov, N.** (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin c) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**: 4198-4203.
- Cordoba-Pedregosa, M. C., González-Reyes, M., agrario Canadillas, M., del. Navas, P., and Cordoba, F.** (1996) Role of apoplastic and cell wall peroxidases on the stimulation of root elnogation by ascorbate. *Plant Physiol.* **112**: 1119-1126.
- Cui, X., Kerr, M. K., Churchill, G. A.** (2003). Transformations for cDNA microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol* **2** (1) : Art4.

- De Pinto, M. C., Francis, D., and De Gara, L.** (1999). The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **209**: 90-97.
- Douce, R.** (1985). Functions of plant mitochondrial membranes. *In* Mitochondria in higher plants. AAmerican society of Plant Physiologists Monograph series. Academic Press, London, pp 77-153.
- Elin, J., Olsson, O., and Nyström, T.,** (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the leaf cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 22204-22208.
- Eulgem, T., Rushton, P., Robatzek, S., and Imre, S.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5** :199-206.
- Fernie, A. R., Carrari, F., and Sweetlove, L. J.** (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport chain. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 254-261.
- Germain, V., Raymond, P., and Ricard, B.** (1997) Differential expression of two tomato lactate deshydrogenase genes in response to oxygen deficit. *Plant Mol. Biol.* **35**: 711-721.
- Giannino, D., Condello, E., Bruno, L., Testone, G., Tartarini, A., Cozza, R., Innocenti, A. M., Bitonti, M.B., and Mariotti, D.** (2004). The gene geranylgeranyl reductase of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch) is regulated during leaf development and responds differentially to distinct stress factors. *J Exp Bot.* **55**: 2063-73.
- Giovannoni, J., Yen, H., Shelton, B., Miller, S., Vrebalov, J., Kannan, P., Tieman, D., Hackett, R., Grierson, D., and Klee, H.** (1999). Genetic mapping of ripening and ethylene-related loci in tomato. *Theor Appl Genet* **98**: 1005-1013.
- Green, M., and Fry, S.** (2004). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **344**: 83-87.
- Hamza, S., and Chupeau, Y.** (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and agrobacterium mediated transformation from tomato (*Solanum esculantum*). *J.Exp.Bot* **44**: 1837-1845.
- Hancock, J. T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan. R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J., and Neill, S.J.** (2005). Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem.* **43**: 828-35.
- Hare, P., and Cress, W** (1997). Metabolic implications of stress-induced praline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* **21** : 79-102.
- Himmelbach, A., Iten, M., and Grill, E.** (1998). Signaling of abscisic to regulate plant growth. *Philos Trans R Soc Lond B* **353**: 1439-1444.
- Holmberg, N., Harker, M., Gibbard, C. L., Wallace, A. D., Clayton, J. C., Rawlins, S., Hellyer, A., and Safford, R.** (2002). Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed. *Plant Physiol* **130** :303-11.
- Horemans, N., Foyer, C. H., and Asard, H.** (2000). Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends Plant Sci* **5**: 263-267.
- Horemans N, Potters G, De Wilde L, Caubergs RJ.** (2003). division of tobacco bright yellow-2 cell cultures. *Plant Physiol* **133**: 361-367.
- Imai, T., Karita, S., Shiratori, G., Hattori, M., Nunome, T., Ôba, K., and Hirai, M.** (1998). L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol* **39**: 1350-13
- Imin, N., Kerim, T., Weinman, J. J., and Rolfe, B. G.** (2006). Low temperature treatment at the

young microspore stage induces protein changes in rice anthers. *Mol Cell Proteomics*. **5**: 274-92.

Jain, A. K., and Nessler, C. L. (2000). Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed* **6**: 73-78.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002) Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193-195.

Kato, N., and Esaka, M. (1999). Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol Plant* **105**: 321-329.

Kende, H., Van der Knapp, E., and Cho, H. T. (1998). Deepwater rice: A model plant to study system elongation. *Plant Physiol* **118**: 1105-1110.

Kerk, N. M., and Feldman, L. J. (1995). A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* **121**: 2825-2833.

Kim, H. J., and Triplett, B. A. (2004). Cotton fiber germin-like protein. I. Molecular cloning and gene expression. *Planta* **218**: 516-524.

Lange, T., Hedden, P., and Graebe, J. (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** :8552-8556.

Laxalt, A. M., Cassia, R. O., Sanllorenti, P. M., Madrid, E. A., Andreu, A. B., Daleo, G. R., Conde, R. D., Lamattina, L. (1996). Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol Biol* **30** : 961-972.

Leipner, J., Francheboub, Y., Stamp, P. (1997). Accumulation by sub optimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant Cell Environ* **20**: 366-372.

Loewus, F. A. (1980). L- Ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function. In: *Biochemistry of plants*, Vol 3 (ed. J. Preiss). Academic Press, New York, pp. 77-99.

Lorence, A., Chevone, B., Mendes, P., and Nessler, C. (2004). *Myo*-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* **134**: 1200-1205.

Mackenzie, S., and McIntosh, L. (1999). Higher plant mitochondria. *Plant cell* **11**: 571-585.

Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., and Heyes, J. (2002). Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int Rev Cytol.* **215**:105-48.

Murashige T, and Skoog, S. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plan.* **15**: 473-497.

Murray, H. G., and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic acids Res* **8**: 4321-4325.

Narayan, V., and Nair, P. (1990). Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* **29**: 367-375.

Noctor, G., and Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279.

Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A., Loureiro, M., Ratcliffe, R., Sweetlove, L., and Fernie, A. (2005) Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* **137**: 611-622.

Ôba, K., Fukui, M., Imai, Y., Iriyama, S., and Nogami, K. (1994) L-Galactono- -lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbate

acid in wounded white potato tubers tissue. *Plant Cell Physiol.* **35**: 473-478.

Ôba K, Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., and Yamamoto, T. (1995) Purification and properties of L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem* **117**: 120-124.

Østergaard. J., Persiau, G., Davey, M., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants: purification, characterization, cDNA cloning and expression in yeast. *J. Biol Chem* **272**: 30009-30016.

Pan, Q., Liu, Y., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zamir, D., and Fluhr, R. (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and Arabidopsis. *Genetics* **155**: 309-322.

Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., Noctor, G., and Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant cell* **15**: 939-951.

Pateraki, I., Sanmartin, M., Kalamaki, M., Gerasopoulos, D., and Kanellis, A. (2004). Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J Exp Bot* **55**:1623-1633.

Pignocchi, C., and Foyer, C. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* **6** : 379-389.

Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., and Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**: 679-89.

Rayle, D. L., and Cleland, R. E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271-1274.

Riechmann, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2:EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* **379**: 633-646.

Rodriguez, P. L., (1998). Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol.* **38**: 919-27.

Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., and Fernie, A. (2001) Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* **13**: 11-29.

Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., and Fernie, A. (2003) Metabolic profiling of transgenic tomato plant overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* **133**: 84-99.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Shore, P., Sharrocks, A. D., (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229** :1-13.

Siendones, E., Gonzales-Reyes, J. A., Santos-Ocana, C., Navas, P., and Cordoba, F. (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol* **120**: 907-912.

Singh, K. B., Foley, R. C., and Onate-Sanchez, L. (2002). Transcription factors in plant defence and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 430-436.

- Smirnoff, N.** (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot* **78**: 661-669.
- Smirnoff, N.** (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 229-235.
- Suzuki, N., Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., and Mittler, R.** (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol* **139**: 1313-1322.
- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K. and Esaka, M.** (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* **27**: 139-148.
- Tabata, K., Takaoke, T., and Esaka, M.** (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry* **61**: 631-635.
- Tamaoki, M., Mukai, F., Asai, N., Nakajima, N., Kubo, A., Aono, M., and Saji, H.** (2003). Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **164**: 1111-1117.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S. Y., and Stitt, M.** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**:914-39.
- Turcsányi, E., Lyons, T., Plöchi, M., and Barnes, J.** (2000). Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J Exp Bot* **51**: 901-910
- Uhlmann, A., and Ebel, J.** (1993). Molecular cloning and expression of 4-Coumarate:coenzyme A ligase, an enzyme involved in the resistance response of soybean (*Glycine max* L.) against pathogen attack. *Plant Physiol* **102**: 1147-1156.
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C. H.** (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol* **127**: 426-435.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M., Hoekema, A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids Res* **17**: 2362-2368.
- Wagner, A. M., and Moore, A. L.** (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep.* **17**: 319-33.
- Wolfinger, R. D., Gibson, G., Wolfinger, E. D., Bennett, L., Hamadeh, H., Bushel, P., Afshari, C., and Paules R. S.** (2001). Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol.* **8**: 625-37.
- Werneke, J. M., Zielinski, R. E., and Ogren, W. L.** (1988). Structure and expression of spinach leaf cDNA encoding ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**: 787-91.
- Wheeler, G., Jones, M., and Smirnoff, N.** (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**:365-369.
- Wolucka, B. A., and Van Montagu, M.** (2003) GDP-mannose-3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem* **278**: 47483-47490.
- Yabuta, Y, Yashimura, K., Takeda, T., and Shigeoka, S.** (2000). Molecular characterization of

tobacco mitochondrial L-Galactono 1,4-lactone dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. *Plant Cell Physiol* **41**: 666-675.

Yokoyama, R., Rose, J. K., and Nishitani, K. A. (2004). surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis. *Plant Physiol.* **134**:1088-99.

Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. (2006). Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid- Induced Antioxidant Defense and Acts downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. *Plant Physiol* [Epub ahead of print].

2. Résultats complémentaires.

2.1. Détermination du nombre de copies du gène *GalLDH* par Southern et cartographie.

Afin de déterminer le nombre de copie du gène codant pour la GalLDH chez la tomate, j'ai réalisé une analyse selon la méthode de Southern (1975). L'ADN génomique de feuille de tomate est digéré avec les enzymes de restriction suivantes : *EcoR1*, *Cla1* and *SaC1*. Un fragment de 517 pb correspondant à la partie 5' de l'ADN complémentaire de la *GalLDH* a été utilisé comme sonde d'hybridation lors de l'expérience de Southern (**Figure 17**). L'autoradiographie révèle que pour les digestions *EcoR1* et *Cla1*, une seule bande est détectée alors que dans le cas de la digestion par *SaC1* deux bandes sont révélées par la sonde. Ce résultat indique que vraisemblablement la tomate contient une seule copie du gène *GalLDH* dans son génome. De plus, il confirme les données issues des analyses *in-silico* puisque dans les banques de séquences du TIGR il n'existe qu'un seul TC pour ce gène chez la tomate. Enfin, la cartographie du gène *GalLDH* dans la tomate réalisée par l'équipe de Mathilde Causse (INRA Avignon) sur des lignées d'introgession de la variété *L. pennellii* (Pan *et al.*, 2000) révèle la présence d'un seul locus noté *bin10-E* localisé sur le chromosome 10 (**Figure 17**).

2.2. Caractérisation des profils d'accumulation de l'ascorbate au cours du développement du fruit et d'expression des transcrits *GalLDH* en relation avec la taille du fruit chez plusieurs génotypes de tomate.

J'ai étudié l'existence d'une relation entre la teneur en ascorbate du fruit de tomate et sa taille finale. Pour cela, sept variétés de tomate *Solanum Lycopersicum* Mill. très contrastées en terme de taille de fruit ont été utilisées. Deux variétés produisant des fruits de type cerise : Cervil et MicroTom ; cinq variétés produisant des fruits de calibre moyen (diamètre compris entre 50 et 70 mm) : Ailsa Craig, Peralbo hp, Peralbo hp⁺, Levovil et Ferum. La teneur en ascorbate sous forme réduite et oxydée, a été mesurée dans des fruits entiers à cinq stades de développement, 10, 20, 30 JAA, Orange et Rouge Mûr. Les données montrent qu'on ne peut pas déduire de corrélation entre la teneur en ascorbate et la taille du fruit de tomate (**figure 18**) dans les variétés que j'ai analysées. Il est cependant intéressant de noter que dans tous les cas, sauf pour le mutant MicroTom, l'ascorbate présente une teneur qui augmente au fur et à mesure que le fruit se développe et atteint son maximum

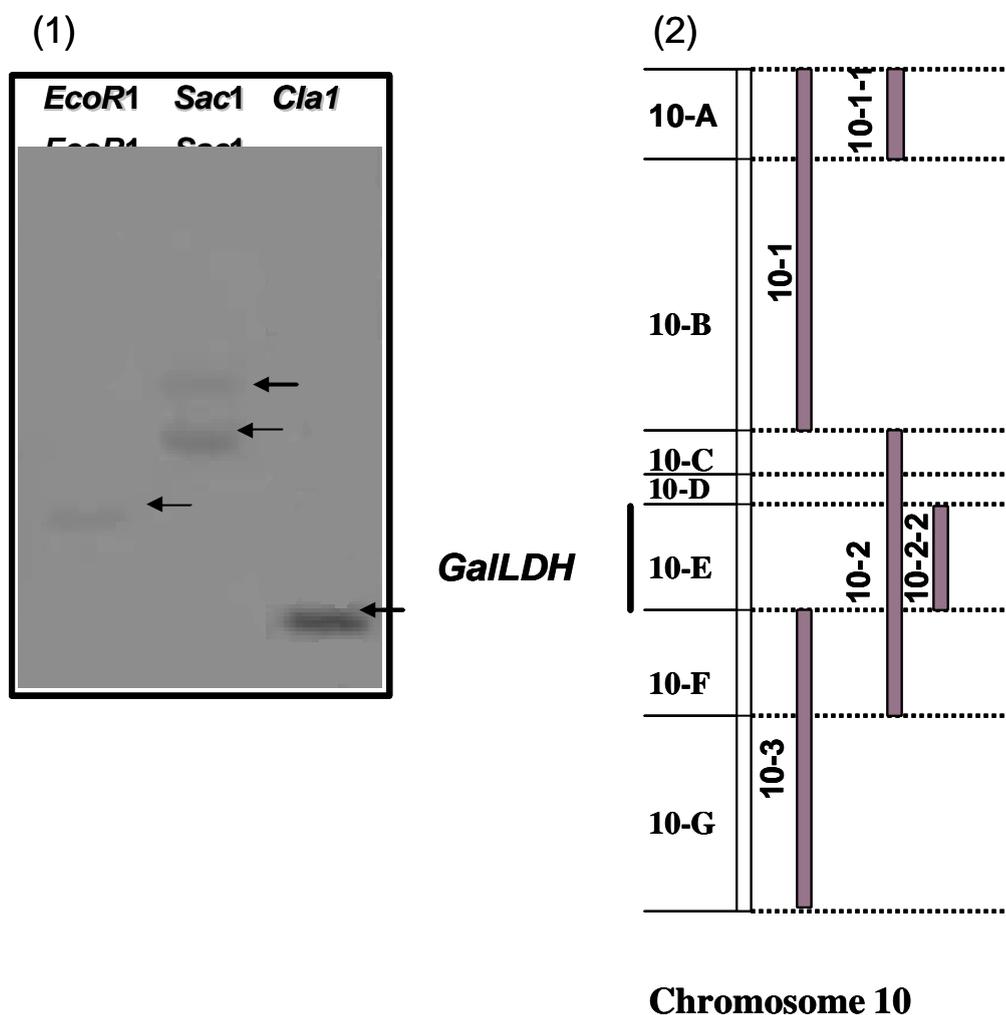


Figure 17. Estimation par Southern blot du nombre de copies du gène *GalLDH* et cartographie.
 (1) Vingt microgrammes d'ADN génomique ont été digérés avec les enzymes de restriction suivantes: *EcoR1*, *SacI* et *ClaI*, séparés par électrophorèse sur gel, transférés sur membrane de nylon et hybridés avec une sonde radiomarquée (^{32}P) correspondant à un fragment de 517 bp de l'ADN complémentaire de *GalLDH*. (2) Cartographie du gène *GalLDH* de tomate. La localisation a été établie à partir de lignées d'introgression qui présentent du polymorphisme dans cette partie du génome.

lors de la pleine maturité du fruit. De plus, dans toutes ces variétés, excepté MicroTom, lors des phases précoces du développement, l'ascorbate contenu dans le fruit est majoritairement sous forme oxydé. A partir du début de la phase de maturation, au stade Vert Mature à 30 JAA, le rapport ascorbate réduit/oxydé s'inverse, l'ascorbate est essentiellement présent sous forme réduite, entre 87 et 96% au stade Rouge Mûr.

Puisque la dernière étape de la voie de biosynthèse de l'ascorbate requière l'oxydation de la galactono-1,4-lactone par la GalLDH, j'ai analysé les profils d'accumulations des transcrits *GalLDH* dans trois variétés : Ailsa Craig, Peralbo hp, Peralbo hp⁺. Comme dans le cas des variétés à petits fruits, WV 106 (Cf l'artici précédent) et Cervil, qui avait été caractérisées dans le cadre d'un projet Aliment-Qualité-Santé (INRA Avignon-Bordeaux), chez les variétés à fruit de calibre moyen, les transcrits *GalLDH* sont fortement exprimés au moment des phases précoces du développement du fruit et son expression diminue progressivement au cours de la phase de maturation (**figure 19**). Il existe donc un décalage entre le profil d'accumulation de l'ascorbate dans le fruit et celui des transcrits *GalLDH*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer un tel résultat. Premièrement, l'enzyme GalLDH serait régulée au niveau post-translationnel. Au cours des stades précoces de développement pendant lesquelles les tissus du fruit présentent une forte activité de prolifération cellulaire associée à des processus d'élongation, l'enzyme GalLDH subirait un turn-over (synthèse-dégradation) très rapide et donc nécessiterait une expression maximale. Au moment de la maturation, le développement du fruit ralenti ainsi que le turn-over de l'enzyme, d'où son expression plus faible. Deuxièmement, il existe deux voies de biosynthèse de l'ascorbate selon les stades de développement du fruit ; une voie spécifique des phases précoces qui nécessite l'activité de la GalLDH et une autre voie spécifique de la maturation qui ne passe pas par l'activité GalLDH.

2.3. Effet de la suppression de l'expression du gène *GalLDH* sur l'accumulation des transcrits de la GDP-D-mannose pyrophosphorylase et la GDP-D-mannose-3,5-épimérase, deux enzymes de la voie de biosynthèse de l'ascorbate.

L'effet du transgène RNAi-GalLDH sur l'expression des gènes codant pour la GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP) et la GDP-D-mannose-3,5-épimérase (GME), deux enzymes situées en amont dans la voie de biosynthèse de l'ascorbate a été analysé par RT-PCR semi-quantitative chez de jeunes feuilles (JF) et dans des fruit en phase d'expansion cellulaire (20 JAA) et rouge mûr (42 JAA) dans toutes les lignées transgéniques RNAi-GalLDH (lignée-2, 5, 8, et 38) ainsi que dans les plantes témoin.

Comme le montre la **figure 20**, les profils d'accumulation des transcrits *GMP* et *GME* sont identiques à ceux du contrôle. On peut toutefois noter une légère réduction de l'accumulation

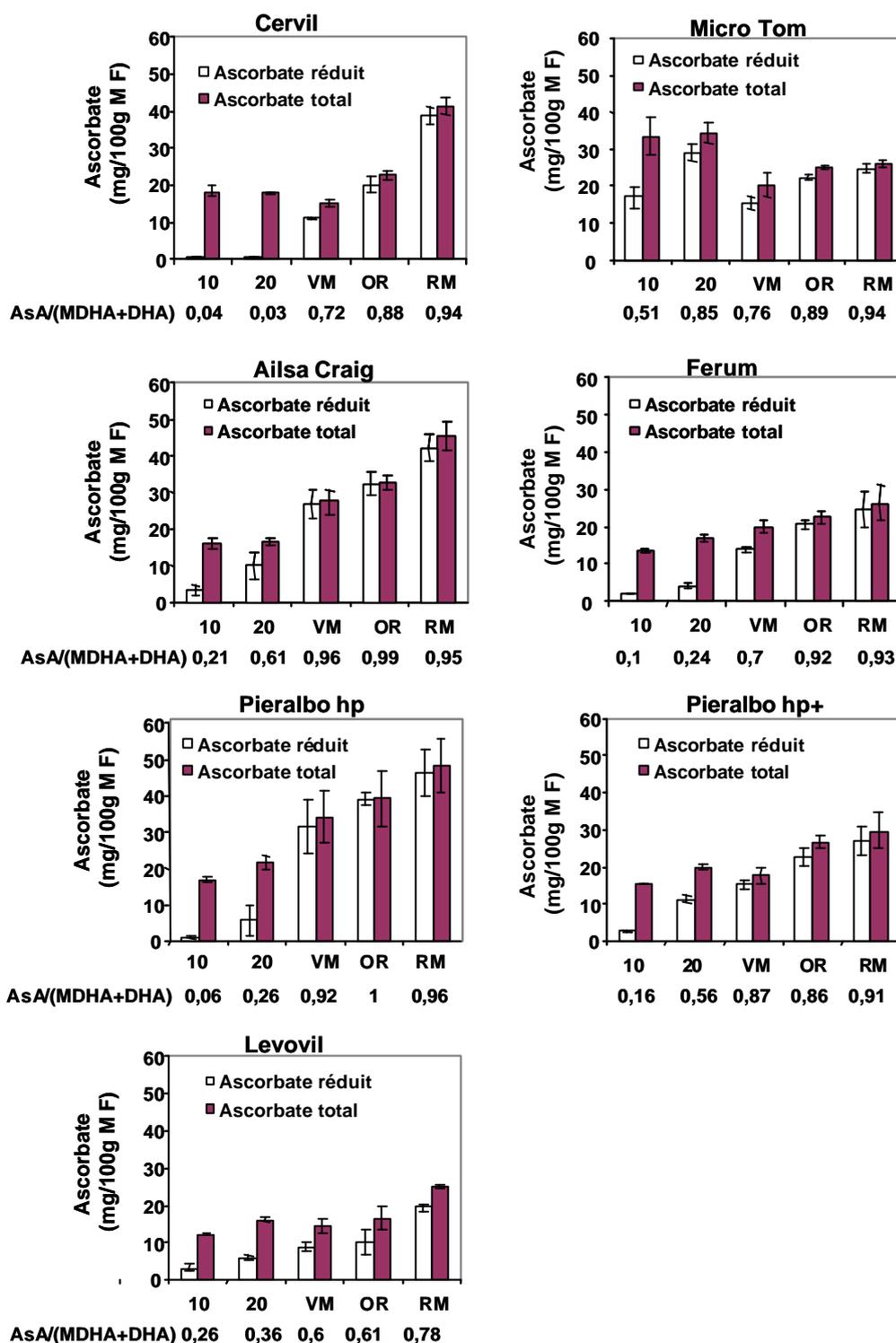


Figure 18. Mesure de la teneur en ascorbate réduit (AsA) et total (AsA+MDHA+DHA) et du rapport ascorbate réduit/ascorbate total des fruits aux stades 10 JAA, 20 JAA, VM, OR, et RM chez sept variétés de tomate *Solanum lycopersicum* Mill. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'erreur standard (ES) des mesures effectuées à partir de 6 fruits issus de 10 plantes et pour chaque stade de développement étudié : 10 et 20 jours après anthèse, vert-mûr (VM), orange (OR) et rouge mûr (RR). Abréviations : AsA = ascorbate réduit; MDHA = monodéhydroascorbate ; DHA = déhydroascorbate

des transcrits *GME* et *GMP* dans les feuilles des toutes les lignées. Généralement, chez les plantes RNAi-GalLDH, l'expression des gènes *GME* et *GMP* dans les fruits ne semble pas être affectée par la suppression de l'expression de la *GalLDH*. Un tel résultat peut s'expliquer par l'implication de ces deux activités GME et GMP dans d'autres voies métaboliques importantes pour la cellule. Ainsi, le GDP-mannose qui est produit par la GMP, participe à un certain nombre de processus tels que la biosynthèse des parois et la glycosylation des protéines. Le GDP-mannose est le précurseur de trois sucres nucléotides, le GDP-rhamnose, le GDP-galactose et le GDP-fucose (Barber, 1968; Baydoun et Fry, 1988 ; Reiter, 1988). De plus, le mannose produit à partir du GDP-mannose contribue à la structure des polysaccharides, il est présent dans les polymères d'hémicellulose sous forme de galactomannanes et de glucomannanes (Bewley *et al.*, 1997). L-galactose, qui est synthétisé à partir de GDP-mannose par la GME dans la voie de biosynthèse de l'ascorbate est également un composant mineur de paroi cellulaire (Barber, 1971). En plus, les deux activités GME et GMP pourraient catalyser la synthèse des intermédiaires de la voie alternative de biosynthèse de l'ascorbate proposée par Wolucka et Van Montagu (2003).

2.4. Etude de la localisation cellulaire de l'ascorbate dans les tissus du fruit de tomate.

J'ai constaté que les fruits issus des plantes T0 RNAi-GalLDH présentaient des tailles réduites par rapport aux fruits témoins. J'ai voulu vérifier s'il existait des différences dans la distribution et la localisation de l'ascorbate dans les tissus du fruit qui pourraient être à l'origine de cette réduction de taille. Pour cela, j'ai utilisé une méthode histo-chimique qui a été établie par Chenoy (1969) pour détecter l'ascorbate dans les cellules végétales. Cette méthode est basée sur l'interaction entre l'ascorbate et les ions Ag⁺. Grâce à sa capacité à donner un électron, l'ascorbate peut réduire les ions Ag⁺ qui précipitent sous forme réduite et sont facilement détectés dans la cellule sous forme de granules noires. Cependant, d'autres composés présents dans les cellules peuvent réduire les ions Ag⁺. Pour éviter ces interactions, les expériences sont réalisées à froid et en milieu acide. Dans ces conditions, seul l'ascorbate est capable de réduire les ions Ag⁺ (Chenoy 1969). Les résultats confirment les analyses de teneur en ascorbate puisqu'ils montrent qu'il n'y a aucune différence de densité de marquage entre les fruits transgéniques et témoins; de plus, la distribution de l'ascorbate dans les tissus du fruit est homogène et identique pour les deux types de fruits (**figure 21**).

2.5. Effet de la suppression de l'expression de la *GalLDH* sur la photosynthèse, la respiration des plantes et la production d'éthylène chez le fruit.

La photosynthèse des feuilles des plantes transgéniques RNAi-GalLDH a été mesurée à

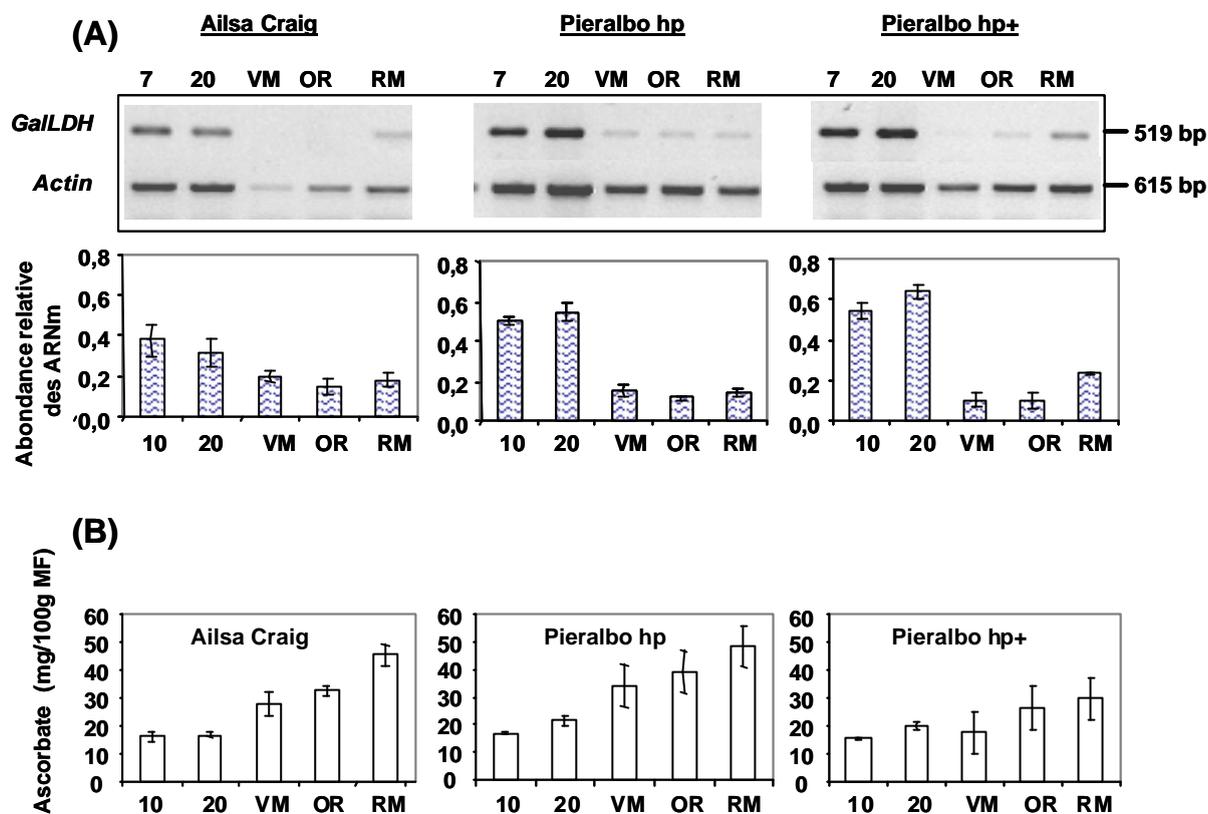


Figure 19. Analyse de l'accumulation des transcrits *GalLDH* et des teneurs en ascorbate au cours de développement du fruit de trois variétés de tomate: Ailsa Craig, Pieralbo. (A) Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression du gène *GalLDH*, réalisée comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. L'abondance relative des transcrits *GalLDH* est normalisée par rapport à l'actine. (B) Teneur en ascorbate total (en mg pour 100g de matière fraîche) dans les fruits récoltés aux stades de développement indiqués. Les stades de développement étudiés sont : 10 et 20 jours après anthèse, vert-mûr (VM), orange (OR) et rouge mûr (RR).

des intensités lumineuses variant de 200 à 1000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, et comparée à celle des plantes témoin. Entre 25 et 50 mesures ont été effectuées pour chaque lignée et les plantes témoin, ce qui a permis de tracer une droite de régression et de déterminer l'activité photosynthétique des plantes. Chez toutes les lignées transgéniques RNAi-GalLDH 2, 5, 8 et 38 la photosynthèse est identique à celle mesurée pour les plantes témoin, soit 16.2 ± 0.8 nmol de CO₂ par μmol de photon. La **figure 22**, montre uniquement l'activité de la photosynthèse pour les lignées les plus affectées (lignée 5 et 8). En utilisant le même type d'appareil, j'ai également mesuré la respiration des feuilles de transformants lors de la période nuit des cultures. Malheureusement, la faible sensibilité de l'appareil dans le cadre de la mesure de l'activité respiratoire des feuilles et les faibles valeurs mesurées ne m'ont pas permis de distinguer de manière significative les lignées transgéniques des plantes témoin. Il ne m'est donc pas possible d'affirmer ou d'infirmer une quelconque effet du transgène sur l'activité respiratoire des plantes RNAi-GalLDH.

Parallèlement, j'ai effectué des mesures de respiration et de production d'éthylène dans les fruits à plusieurs stades de maturation [Vert mûr (VM); Breaker (BR); Tournant (TO); Orange (OR); Rouge léger (RL); Rouge mûr (RM)] chez les lignées 5 et 8 afin de les comparer avec celles des fruits témoin. Comme le montre la **figure 22** il n'y a aucune différence de respiration entre les fruits transgéniques et les fruits témoin. De plus, la production d'éthylène est identique dans les deux types de fruits avec toujours la présence d'un pic de production détecté entre les stades Tournant et Orange. De même que chez les lignées RNAi-GalLDH la durée de développement du fruit ainsi que celle de sa phase de maturation n'est pas affecté, Je peux aussi conclure que la suppression du gène *GalLDH* n'a aucun effet sur la respiration et la production d'éthylène chez ces fruits au cours de la maturation.

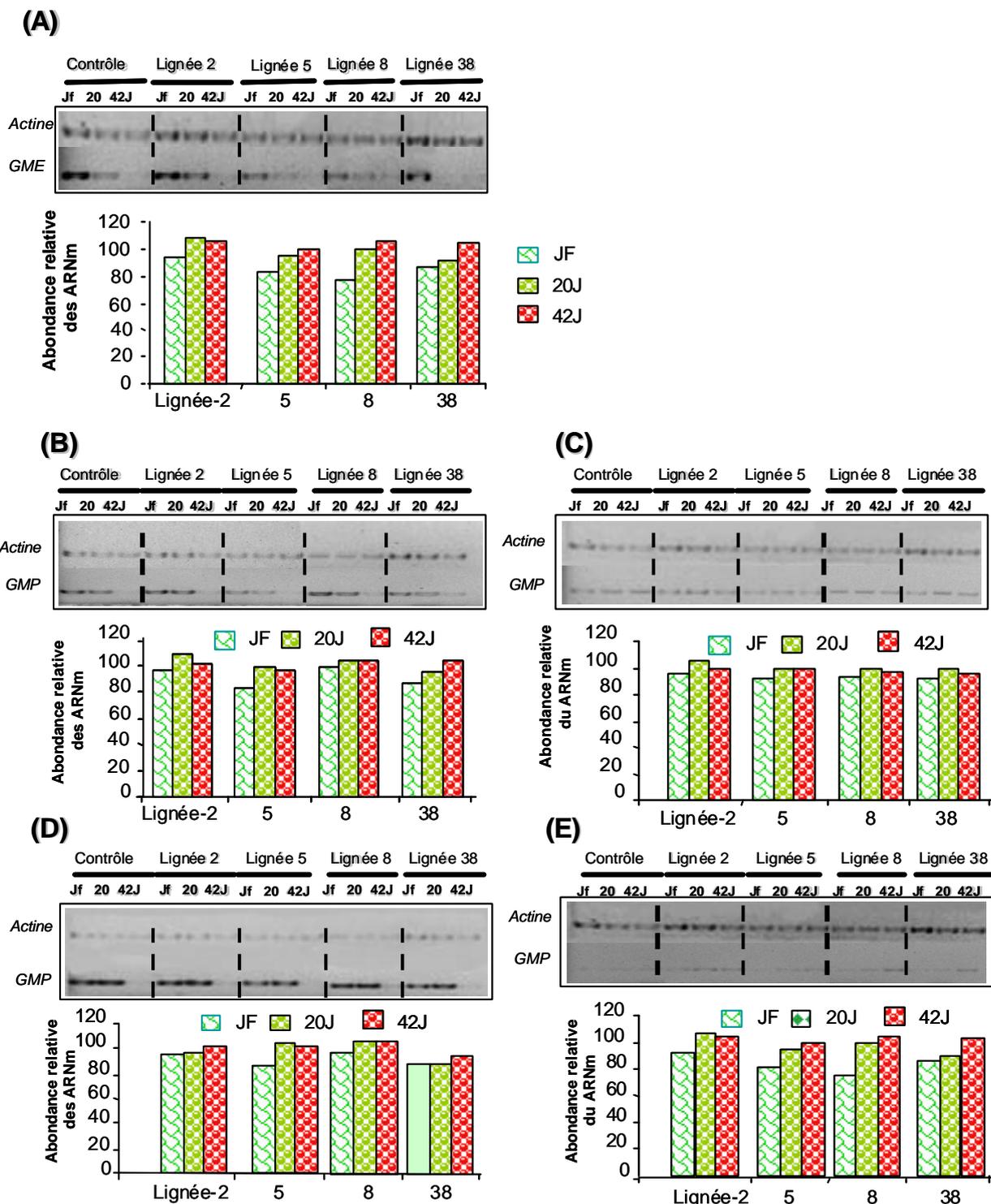


Figure 20. Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'accumulation des transcrits de GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP) et de GDP-mannose épimérase (GME) chez les lignées transgéniques silencées pour la galactono lactone déshydrogénase (GLD ; lignées 2, 5, 8, et 38) et chez le témoin. (A) Analyse des gènes *GME* (TC 153828 et TC 154450) ; (B, C, D, E) analyse des gènes *GMP* (TC 162614, TC 154036, TC 154035, et TC 167158). JF : jeune feuille ; 20 et 40J : fruits à 20 et 45 jours après anthesis. Des fragments spécifiques de chacun des gènes, choisis dans les régions 5' ou 3' non traduites, ont été utilisés comme sondes, comme décrit dans la section Matériel et Méthodes. L'abondance relative des transcrits des gènes étudiés est normalisée par rapport à celle de l'actine et exprimée en valeur relative au contrôle.

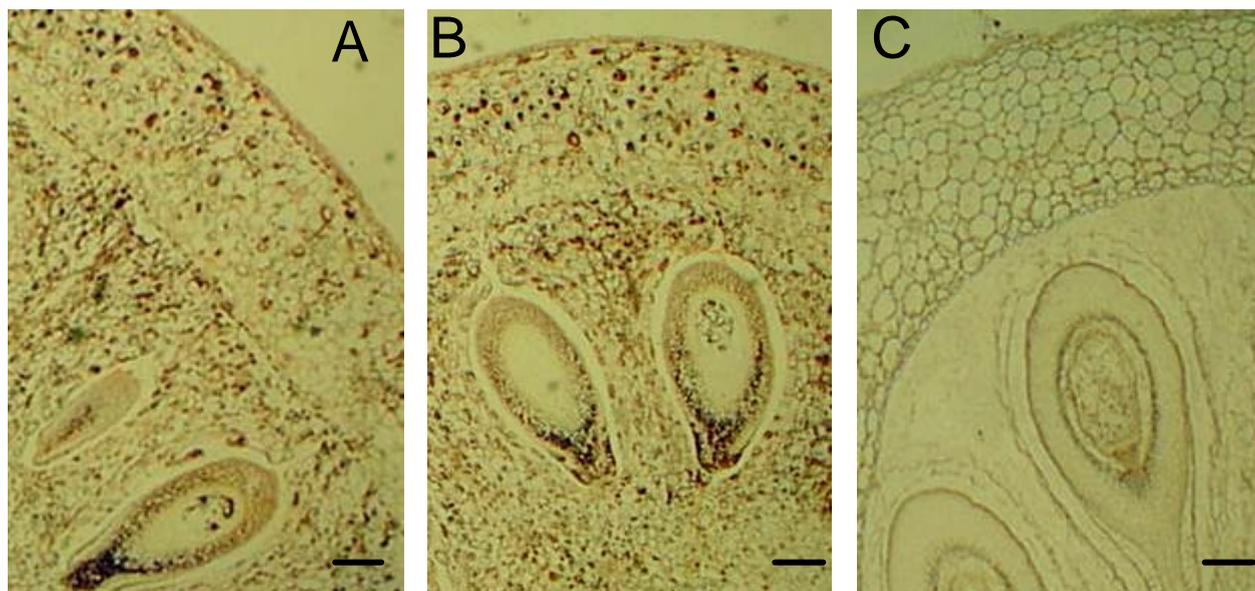


Figure 21. Localisation histo-chimique de l'ascorbate dans une coupe de fruit à 20 JAA. Les granules sombres sur les photos A et B représente le dépôt d'ions d'argent précipités et réduits en présence d'ascorbate. (A) Fruit de plante transgénique. (B) Fruit de plante témoin. (C) Fruit incubé dans de l'eau distillée (contrôle de réaction de marquage). Echelle = 500 µm.

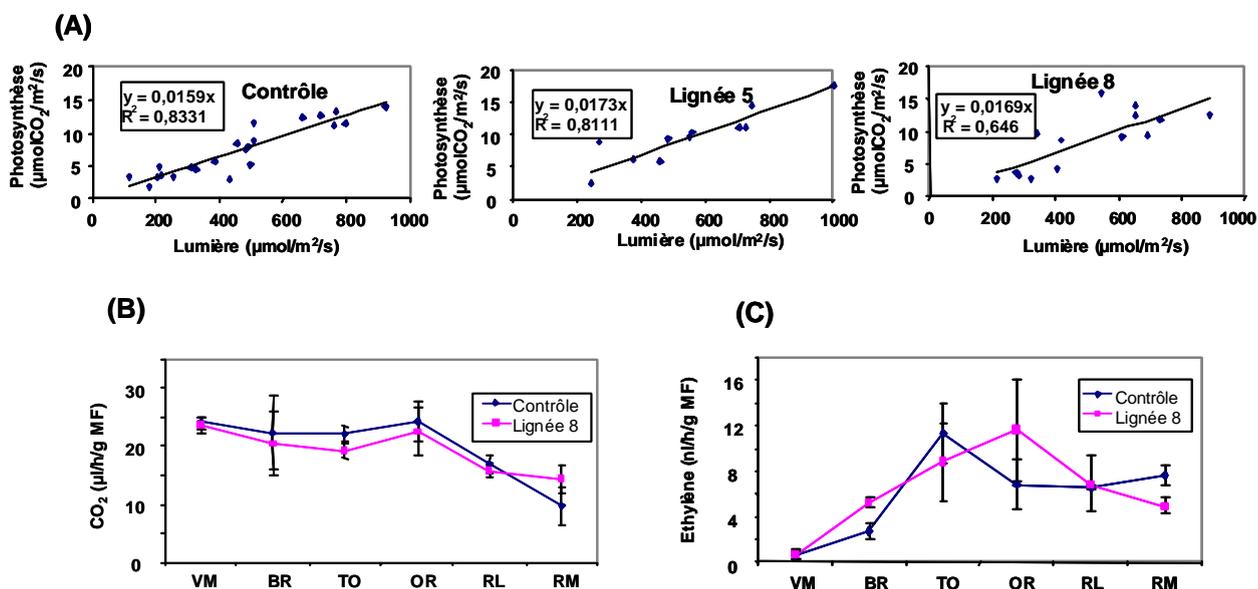


Figure 22. Effet du silencing du gène *GalLDH* sur la photosynthèse ainsi que sur la respiration et la production d'éthylène au cours de la maturation du fruit. (A) Activité photosynthétique dans les feuilles des lignées-5 et 8 par rapport au témoin. (B) Respiration des fruits exprimée en dioxyde de carbone ($\mu l/g$ matière fraîche/h). (C) Production d'éthylène (nl/ g matière fraîche /h). Fruit Vert mûr (VM); Breaker (BR); Tournant (TO); Orange (OR); Rouge léger (RL); Rouge mûr (RM).

**2^{ème} Partie. Caractérisation des transformants
pour la GDP-mannose épimérase (GME)**

II^{ème} partie. Caractérisation des transformants pour la GDP-mannose épimérase (GME).

I. GME 2

La génération de transformants GME2 a été très limitée, et malgré une transgénèse répétée deux fois, seulement deux lignées ont été obtenues. Ces transformants présentaient très peu de différence au niveau développement par rapport au témoin. Seule la lignée 125 produisait des fruits plus petits comparés au fruits témoins. La teneur en ascorbate total était augmentée dans les feuilles mais réduite dans les fruits au stade rouge mûr (**figure 23**).

II. GME2 At

Neuf plantes surexprimant une GDP-mannose épimérase d'*Arabidopsis* notée *AtGME2* ont été transférées en serre. La présence du transgène d'*Arabidopsis* a été vérifiée par RT-PCR et l'expression du cDNA a ainsi été confirmée dans tous les transformants obtenus (**figure 24**). Dans l'ensemble, ces transformants avaient une croissance identique au témoin. Les fruits des lignées 10 et 130 présentaient quelques phénotypes comme l'absence de graines et la formation de loges carpélares multiples. Toutefois, la teneur en ascorbate total n'était pas modifiée dans les fruits tandis que les feuilles présentaient une légère augmentation (**figure 24**).

IV. GME 3

Quinze transformants GME3 ont été transférés en serre. L'impact de la transgénèse sur l'expression du gène de la GME chez les transformants a été analysé par RT-PCR semi-quantitative (**figure 25**). L'accumulation des transcrits *GME* était réduite au minimum de 40% et cette réduction atteignait 85% pour les lignées 66 et 153. Cette réduction d'expression était en général corrélée avec la teneur en ascorbate dans les feuilles et dans les fruits (**figure 25 A et B**). De plus, l'analyse des lignées a montré une relation forte entre la teneur en ascorbate et certaines caractéristiques comme la vitesse de développement des plantes, la taille du fruit ainsi que sa maturation. Ainsi, plus la teneur en ascorbate des transformants était réduite, plus ces caractéristiques étaient affectées. Par exemple, la lignée 105, dont la réduction en ascorbate dans les feuilles était de seulement 20% se développait comme le témoin et les fruits présentaient un léger retard de maturation. A l'opposé, lorsque la réduction d'ascorbate était de 80%, la vitesse de croissance des plantes, la taille des plantes et des feuilles étaient fortement diminuées, les plantes étaient de couleur vert-clair et ne

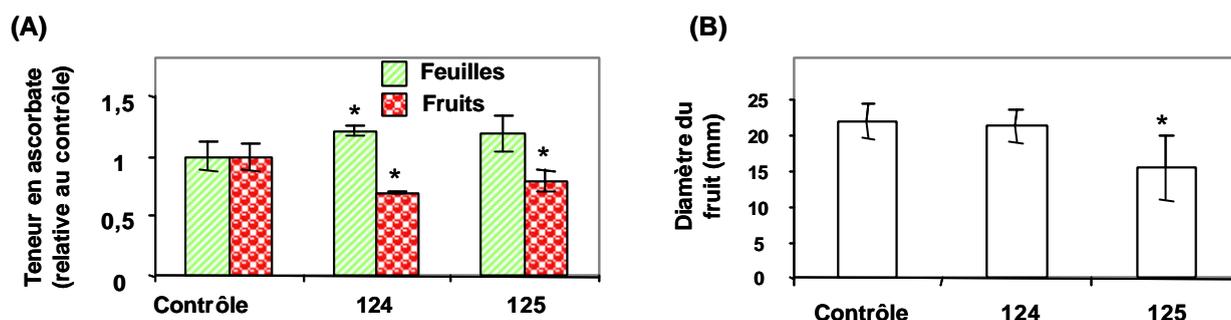


Figure 23. Effet de la surexpression du gène *GME1* de tomate codant pour la GDP-mannose épimérase (construction *GME2*) sur le développement de la tomate (lignées n° 124 et 125, plantes T0).

(A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthesis) chez les lignées transgéniques relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque transformant. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque l'analyse statistique par le test de Student indique que la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$).

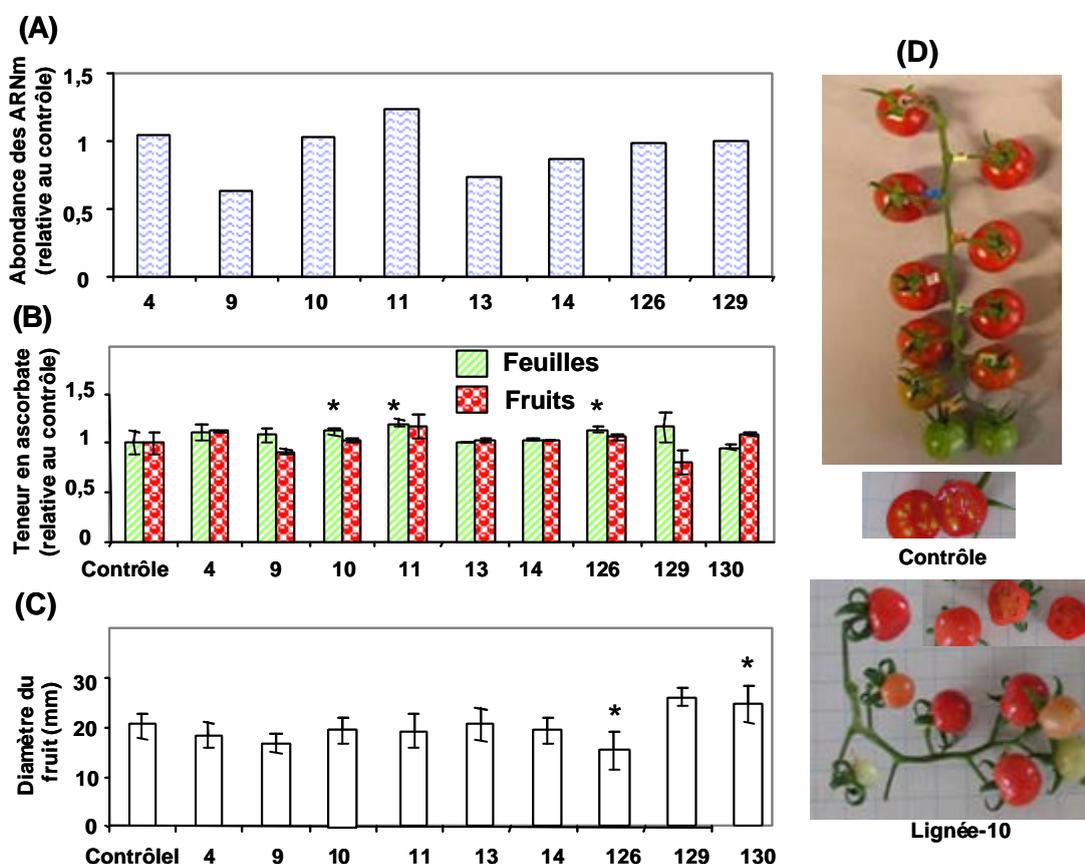


Figure 24. Effet de la surexpression du gène hétérologue de GDP-mannose épimérase d'*Arabidopsis* (*AtGME*) sur le développement de la tomate chez différentes lignées transgéniques (plantes T0).

(A) Analyse de l'expression du transgène *AtGME* par RT-PCR semi-quantitative dans les jeunes feuilles des transformants. Une sonde spécifique de *AtGME* a été utilisée. L'abondance relative des transcrits *AtGME* est normalisée par rapport à celle de l'actine et exprimée sous forme de rapport d'unité arbitraire d'intensité (pixel). (B) Teneur relative en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 JAA) des lignées transgéniques par rapport à celle des plantes témoins. (C) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque transformant T0. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (D) Quelques phénotypes marquants au niveau des fruits.

produisaient pas d'inflorescence. C'est le cas des lignées 71 et 154 (**figure 25D**).

La caractérisation biochimique, physiologique et moléculaire m'a permis de sélectionner 3 lignées T0 GME3 présentant des phénotypes graduellement contrastés et de les passer à la génération suivante: la lignée 66 et 108 qui sont fortement affectée, et la lignée 70 qui est proche du phénotype sauvage. Les graines issues de fruits T1 de ces 3 lignées ont été récoltées, stérilisées puis semées pour obtenir la génération de plantes T1, composée de 15 plantes par lignée. J'ai sélectionné les transformants GME3 pour cette étude car au moment de ce choix l'existence d'une ou deux copies de ce gène dans la tomate n'était pas clairement établie dans les banques d'expression du TIGR. Dans le but d'affecter l'expression de toutes les formes de GME, j'ai opté pour la stratégie de sous-expression par le RNAi codant. La poursuite du travail a consisté à la caractérisation de ces 3 lignées de transformants homozygotes GME3, une partie des résultats fait l'objet d'une publication qui suit ce chapitre.

III. GME 4

Dix transformants GME4 ont été transférés en serre. Ils ont tous montré des caractéristiques phénotypiques semblables à ceux des plantes témoin à l'exception de la lignée 60, qui présentait quelques malformations au niveau de ses feuilles ; la lignée 62 dont certaines feuilles présentaient des zones d'un vert plus pale ; et la lignée 100 dont tous les bouquets ont avorté (**figure 26**). Exceptée la lignée 60, tous les transformants GME4 présentaient une teneur en ascorbate total plus faible que les plantes témoin et ceci chez la feuille et les fruits.

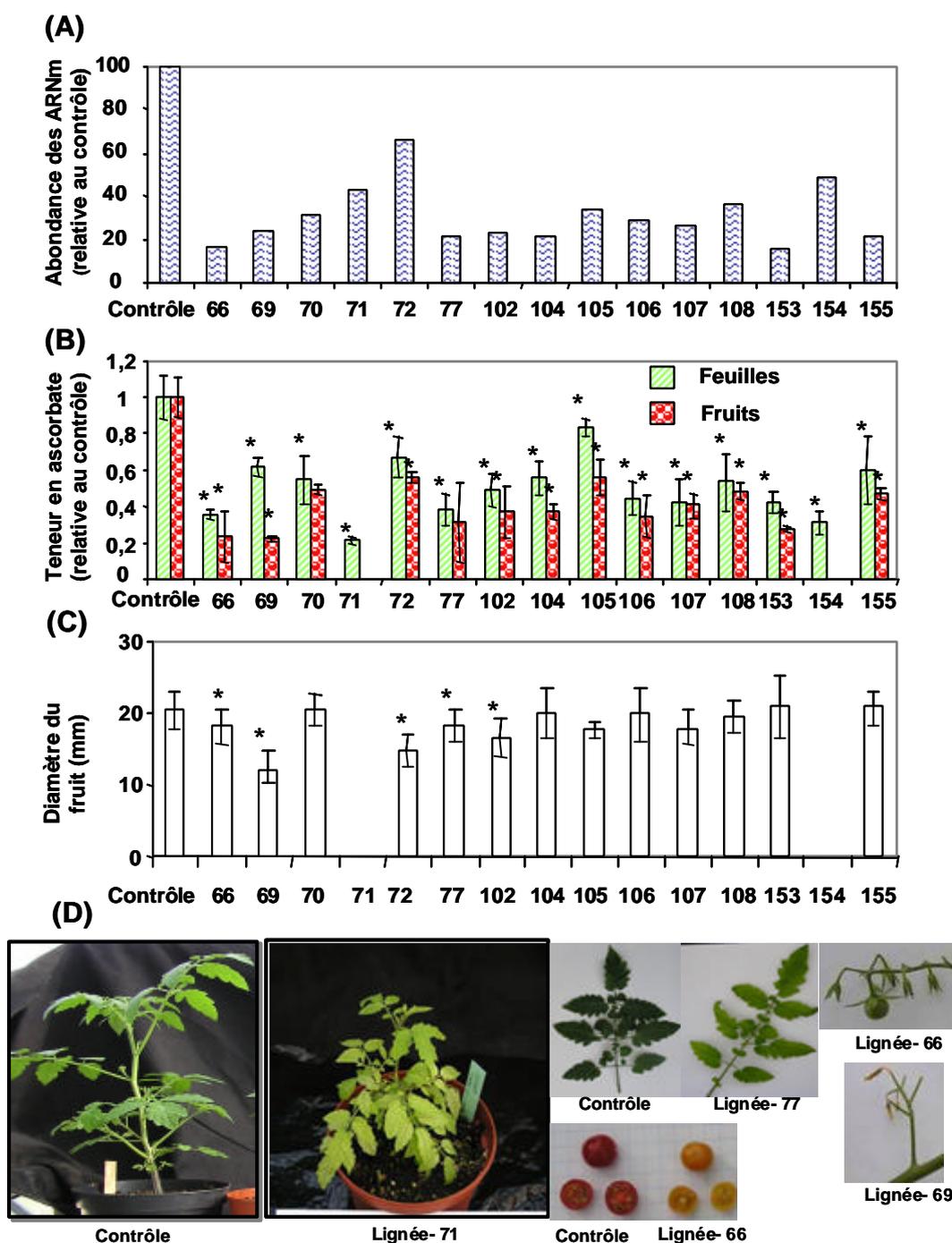


Figure 25. Effet du silencing de la GDP-mannose épimérase (construction *GME3*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) L'analyse de l'expression des gènes *SIGME1* et *SIGME2* (TC 153828 et TC 154450) a été réalisée par RT-PCR semi-quantitative à partir de jeunes feuilles et de fruits à 42 JAA. Le fragment spécifique *GME3* a été utilisé comme sonde lors de l'hybridation. Le taux d'expression des transcrits *GME* est normalisé par rapport à l'expression des transcrits du gène de l'actine utilisé comme témoin et exprimé en valeur relative du contrôle. (B) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (C) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque transformant. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (D) Quelques phénotypes marquants au niveau des plantes et des fruits.

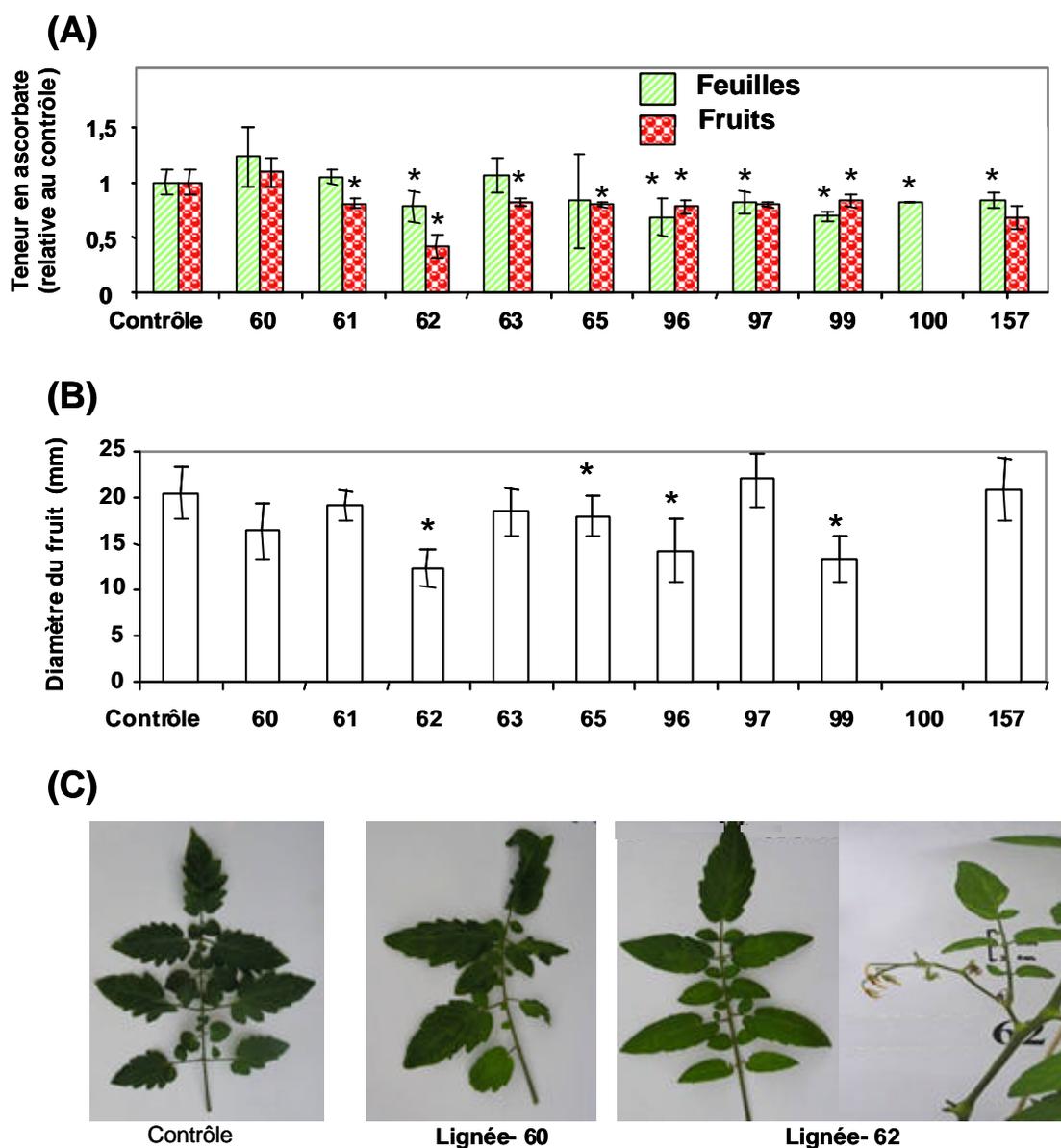


Figure 26 Effet du silencing de la GDP-mannose épimérase (construction *GME4*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0).

(A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque lignée. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (C) Quelques phénotypes marquants au niveau des feuilles.

**ANALYSE FONCTIONNELLE DE LA
GDP-D-MANNOSE-3,5-EPIMERASE DE TOMATE**

The GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) enzyme is essential for ascorbate biosynthesis and plays a key role in the control of cell wall mannan content in tomato

Résumé

L'acide L-ascorbique (vitamine C) joue un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et du développement chez les plantes. Dans ce travail, nous avons étudié chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) la GDP-D-Mannose-3,5-epimérase (GME), enzyme clé de la voie majeure de biosynthèse de la vitamine C chez les plantes. L'analyse par Southern blot suggère l'existence de deux gènes codant pour la GME chez la tomate, en accord avec l'identification par analyse *in silico* des banques d'EST de tomate de deux clusters différents d'EST, que nous avons nommés *GME1* (correspondant au TC n° 154450 du TIGR) et *GME2* (correspondant au TC n° 153828 du TIGR). L'analyse de l'expression par hybridation *in situ* et RT-PCR semi-quantitative du gène (*GME1*), indique que ce gène est exprimé dans tous les tissus examinés et, plus particulièrement, dans ceux montrant une activité élevée de prolifération cellulaire tels que le méristème apical et les tissus du fruit en phase de division cellulaire (10 jours après anthèse, JAA). De plus, les variations de teneur en ascorbate des tissus sont étroitement associées aux variations d'abondance des transcrits de *GME1*, excepté dans les racines ou la tige où la teneur en ascorbate est très faible malgré l'expression de *GME1*.

Afin d'étudier le rôle de la GME chez la plante, nous avons entrepris l'obtention de lignées transgéniques stables de tomate perturbées dans l'accumulation de transcrits de GME par silencing des gènes GME par RNA interference (RNAi), en utilisant le promoteur constitutif 35S et en visant une région conservée entre *GME1* et *GME2*. Trois des lignées montrant une gamme d'altérations phénotypiques plus ou moins sévères liées à la perturbation de la GME ont été plus particulièrement étudiées. Chez les lignées les plus fortement atteintes, l'abondance des transcrits de *GME1* et de *GME2* a été fortement réduite, avec une diminution concomitante de la teneur en ascorbate des tissus analysés. Au niveau phénotypique, les plantes présentant des teneurs réduites en ascorbate montraient des retards de germination et de croissance, une fragilité accrue des plantes, une réduction de la taille des fruits et un retard de maturation du fruit. L'analyse microscopique du péricarpe des fruits (20 JAA) indique que la réduction de taille du fruit est liée à la fois à une réduction du nombre et de la taille des cellules. Par ailleurs, l'analyse par immuno-marquage et empreinte enzymatique de la composition des parois cellulaires des cellules de péricarpe de fruit, a mis en évidence une forte augmentation de la teneur en mannane chez les fruits des lignées transgéniques. Ces résultats suggèrent un rôle majeur de la GME dans le contrôle de l'utilisation du GDP-mannose, précurseur commun aux voies de biosynthèse de l'acide ascorbique et de composés pariétaux tels que les mannanes.

The GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) enzyme is essential for ascorbate biosynthesis and plays a key role in the control of cell wall mannan content in tomato

Moftah Alhag Dow, Christophe Rothan, Philippe Gallusci, Mathilde Causse¹, Johann Petit, Bernard Quemener², Fabienne Guillon², Marc Lahaye², and Pierre Baldet*

Unité Mixte de Recherche 619, Physiologie et Biotechnologie Végétales, Institut de Biologie Végétale Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Universités Bordeaux 1 et Victor Ségalen Bordeaux 2, Centre de Recherche de Bordeaux, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

¹ Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Institut National de la Recherche Agronomique, B.P. 94; 84143 Montfavet cedex, France.

² Unité de recherche des Biopolymères, Interactions Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique, rue de la Géraudière, BP 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

*Corresponding author; e-mail baldet@bordeaux.inra.fr; fax 33 (5) 57122541

Abstract

L-Ascorbic acid plays very important roles in plant growth and development; however, its biosynthesis has not been yet completely elucidated. In this work, we studied GDP-D-Mannose 3,5-epimerase (GME), a key enzyme in the biosynthesis of vitamin C in plant. Genomic DNA Southern analysis indicated that GME is encoded by at least two genes in tomato while *in silico* analysis of tomato EST databases indicated the presence of two clusters of ESTS encoding GME, that we named *GME1* (corresponding to TC n° 154450 from TIGR) et *GME2* (corresponding to TC n° 153828 from TIGR). *In situ* hybridization and semi-quantitative RT-PCR analysis of *GME1*, the most abundant GME transcript found in tomato, indicated that *GME1* expression was detected in all plant tissues analysed, especially in those displaying a high cell proliferation activity such as the shoot apical meristem and the fruit at the cell division stage (10 days post anthesis or DPA). In addition, ascorbate content was strongly associated with *GME1* transcript abundance in all plant tissues analyzed, except in the roots and stem where ascorbate levels were low despite the presence of *GME1* transcripts.

In order to get more insights upon the functional role of the GME enzyme in the context of the plant, we generated transgenic lines altered in GME transcript level through RNA interference (RNAi)-mediated gene silencing targeted to a conserved region of *GME1* and of *GME2*, using the CaMV 35S constitutive promoter. Three of the transgenic lines produced, showing a range of phenotypic variations when compared to the control, were chosen for subsequent detailed phenotypic analysis. In the most severely affected lines, RNAi-mediated gene silencing of GME led to a high reduction in the mRNA abundance of *GME1* and of *GME2* in all tissues studied, with a concomitant reduction in ascorbate content. Transgenic plants exhibited distinct phenotypes that were closely associated with a reduction in ascorbate content, such as delay in germination, reduction in plant growth rate, plant fragility, reduction in fruit size, and delay in fruit maturation. Microscopic analysis of 20 DPA fruit pericarp from transgenic lines revealed a reduction in both cell size and cell number, explaining the reduction in fruit size. Furthermore, cell wall composition of the fruits from transgenic lines was significantly altered, with a strong increase in mannan content, as indicated by immuno-labelling and enzymatic fingerprinting experiments. These results suggest a major role for GME in controlling the fate of GDP-mannose, the common precursor of both ascorbic acid biosynthesis and mannan biosynthesis.

Key words: Ascorbic acid biosynthesis, GDP-D-mannose epimerase, RNA interference, *Solanum lycopersicum*, fruit development, cell wall, mannan, tomato.

Introduction:

Ascorbic acid has a huge importance for human and plant. Its major functions are to scavenge Reactive Oxygen Species (ROS) and to act as an enzyme cofactor. Ascorbate is involved in different processes within the plant cell such as cell growth, photoprotection, stress resistance and cell-wall biosynthesis (Smirnoff and Wheeler 2000). All plants, micro-organisms and most of the animals synthesize ascorbate. Humans, in contrast, neither have the ability to synthesize ascorbate nor to store it in their bodies, making them dependent on external sources, mainly fruits and vegetables, for their vitamin C intake.

Ascorbate may be synthesized through different pathways in animals and in plants. In animals, the pathway has been completely elucidated since a long time. D-glucose is the first committed precursor in the pathway and the last step is catalysed by a microsomal L-gulonolactone oxidase, which oxidizes L-gulonolactone to ascorbate. In higher plants, its biosynthesis has not been completely elucidated. First proposed hypothesis suggested that plants may synthesize ascorbate through a pathway similar to those of mammals (Isherwood *et al.* 1954), but no corresponding enzyme activity was ever demonstrated. In 1990, another pathway was proposed, involving D-glucosone and L-sorbosone (Saito *et al.* 1990; Loewus *et al.*, 1990). The evidence was the slight incorporation of labelled glucosone and sorbosone into ascorbate. In 1998, Wheeler *et al.* proposed a pathway (**Figure 1**) that fits with the previous results obtained with *in vivo* labelling experiments: (i) ^{14}C -labelling of glucose revealed that the carbon skeleton remained intact and that the C6 hydroxymethyl moiety was conserved; (ii) ^3H labelling of GDP-mannose at C5 indicated that an epimerization was necessary for the conversion to the L configuration (Loewus 1963). In this pathway, ascorbate is synthesized from mannose-1-P via five successive steps catalyzed by the GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP), the GDP-mannose epimerase (GME), an unidentified enzyme, the L-galactose dehydrogenase (GalDH) and lastly the L-galactonolactone dehydrogenase (GalLDH). Genetic and biochemical evidences further confirmed that the proposed pathway was active in plants. The involvement of GDP-D-mannose, substrate of GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) in the ascorbate biosynthesis pathway was demonstrated by Conklin *et al.* (1999) and Keller *et al.* (1999). GME was later purified from *Arabidopsis thaliana* cell suspensions and the corresponding gene, present in one copy in *Arabidopsis* genome, was recently identified (Wolucka *et al.*, 2001). However, until the work presented herein, no functional analysis of GME in the context of the plant has ever been published. The involvement of L-galactonolactone (L-GaL), the last precursor of ascorbate in this pathway, has also been proved (Tabata *et al.* 2001; Tamaoki *et al.* 2003). L-GaL is oxidized to ascorbate by L-galactonolactone dehydrogenase (GalLDH, EC 1.3.2.3), an enzyme located on the inner membrane of the mitochondria using cytochrome c as second substrate and electron acceptor (Bartoli *et al.*, 2001). Transgenic tobacco cells

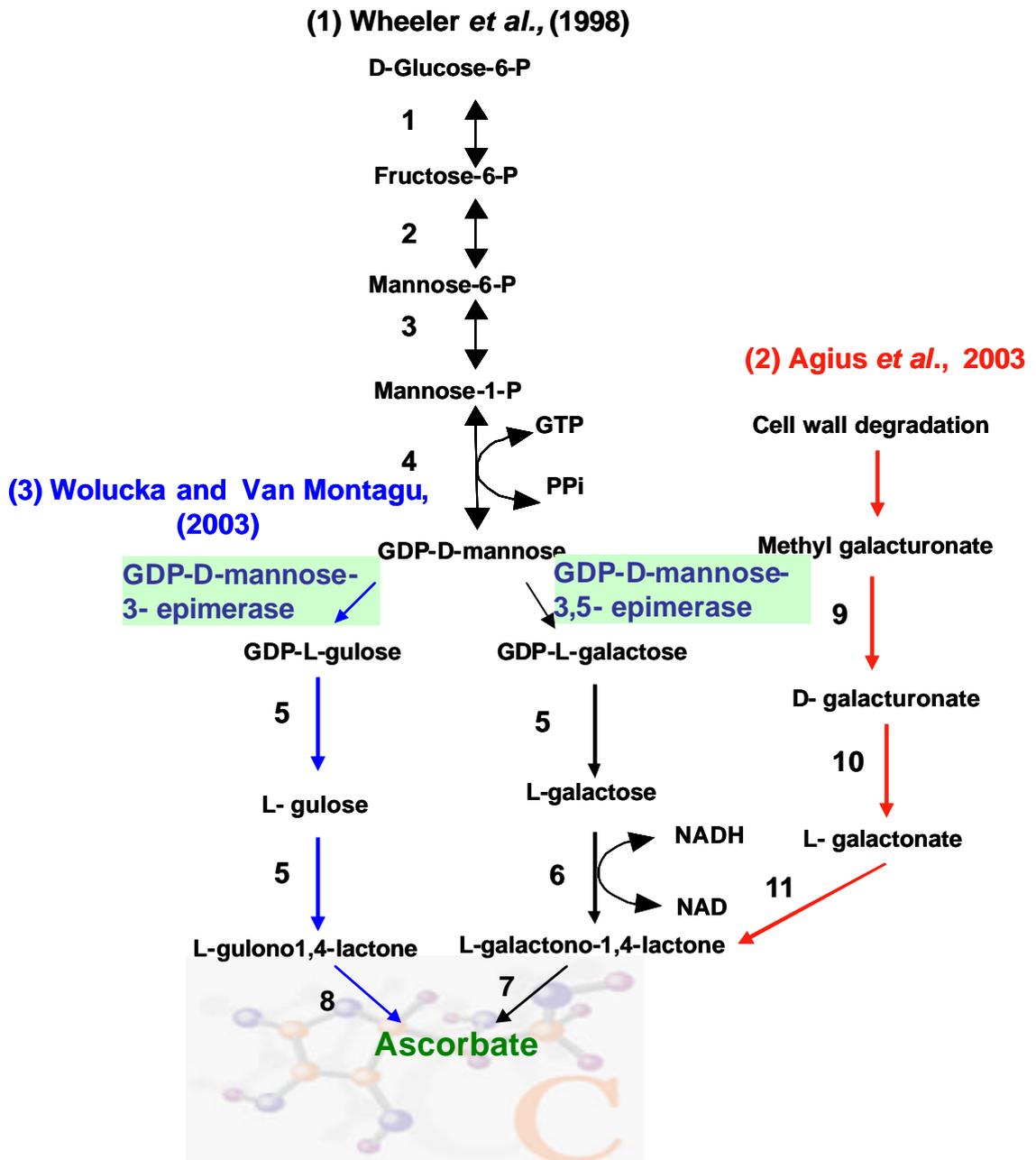


Figure 1. Ascorbic acid biosynthesis pathways in plants.

Pathways proposed by: (1)- Wheeler *et al.*(1998), (2)- Agius *et al.* (2003), and (3)- Wolucka and Van Montagu (2003). The enzyme studied is highlighted: GDP-mannose epimerase. Other enzymes of the pathways are: 1- glucose phosphate isomerase; 2, Phosphomannose isomerase; 3, Phosphomannose mutase; 4, GDP-mannose pyrophosphorylase; 5, not identified enzyme; 6, L-galactose dehydrogenase; 7, L-galactono-1,4 lactone dehydrogenase; 8, L-gulono-1,4 lactone dehydrogenase/ Oxidase; 9, methyl-esterase; 10, Dgalacturonate reductase; 11, aldono-lactonase.

expressing antisense RNA for L-GaLDH showed a significant decline in the activity of this enzyme and a concomitant reduction in ascorbate content of 30% compared to the wild type plant (Tabata *et al.*, 2001). We recently showed in tomato that a reduction in GaLDH activity through a RNAi-mediated strategy induced changes in the redox state of ascorbate in the plant, without affecting total ascorbate pool and correlated with reduced plant growth (Alhagdow *et al.*, unpublished results). Recently, an alternative pathway has been found in ripening strawberry fruits (**Figure 1**). This pathway involves the reduction of D-galacturonic acid to L-galactonic acid, which in turn is spontaneously converted to L-GaL, the last precursor of ascorbate (Agius *et al.*, 2003). Though this pathway could be one possible hypothesis to explain the strong ascorbate accumulation during the ripening phase of tomato fruit when cell wall pectins are degraded to galacturonic acid, to date it has never been confirmed in tomato (M Botella, personal communication).

The major ascorbate biosynthesis pathway presented above appears more complicated than previously thought. Wolucka and Van Montagu (2003) recently showed that the GDP-mannose epimerase catalyzes two distinct epimerization reactions and releases, in addition to GDP-L-galactose, a novel intermediate, GDP-L-gulose. This compound has been also identified as reaction product of the rice OsGME expressed in *E. coli* (Watanabe *et al.*, 2006). Wolucka and Van Montagu (2003) hypothesised that the GDP-L-gulose might be devoted to the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants (**Figure 1**). They further suggested that GME could control the carbon flux into the ascorbate biosynthesis pathway through a complex regulation in response to various factors including the redox state of the cell, the sugar demand for the cell wall/glycoproteins biosynthesis, and the stress conditions. Besides its function as an intermediate for ascorbate biosynthesis, the second product of GME, GDP-L-galactose, is a precursor of L-galactosyle residues in polysaccharides and oligosaccharides in plants (Seifert, 2004; Reuhs *et al.*, 2004).

In order to investigate the role of GME in plants, and the interconnection between the ascorbate biosynthesis pathway and the cell wall biosynthesis, we down-regulated GME in tomato plant through a RNA interference (RNAi) strategy and studied its effect on plant development, including fruits. In this paper, we first report the molecular characterization of GME at the whole tomato plant level. Second, we demonstrated that tomato plants exhibiting silenced *GME* expression displayed a strong reduction in ascorbate content associated with severe phenotypic effects including delay and reduction of plant and fruit growth. Besides, we demonstrated that RNAi-GME tomato plants accumulated more mannan in the cell wall, which may explain the changes in fruit and plant texture and displayed delayed fruit maturation processes.

Materials and Methods

Materials

All chemicals used in this study were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), with the exception of radiolabeled [α - 32 P] dCTP which was from Amersham-Pharmacia (Orsay, France), and the RNase-free DNase RQ1 (Promega, Lyon, France).

Plant material and growth conditions

Cherry tomato [*Solanum lycopersicum* Mill. var. *cerasiforme* cv West Virginia 106 (WV106)] plants were grown in a greenhouse under a thermoperiod of 25°C/20°C and a photoperiod of 14/10 h (day/night). For *in vitro* culture, plants were grown on ¼ MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 3% sucrose, at 25°C and under 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ photon flux density and 14/10 h photoperiod. Tomato fruits were harvested at various developmental stages determined according to the number of days post anthesis (DPA), except for fruits at Orange stage, which were harvested according to both DPA and fruit color determined by the value of the L,a,b parameters measured by the chromameter MINOLTA, CR-200. Before all biochemical and molecular analyses, samples were quickly frozen in liquid nitrogen, ground to fine powder and stored at -80°C until use.

RNA extraction, cDNA synthesis and Cloning

Total RNA was isolated by phenol-chloroform extraction as described by Verwoerd *et al.* (1989) and quantified spectrophotometrically. Reverse transcription (SuperScript™ II Reverse transcriptase) was performed with 2 μg total RNA according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Life technologies). RT-PCR was performed in a total volume of 25 μl containing 2 units of Ex Taq™ DNA polymerase (TaKaRa Bio INC, Japan) and a set of specific primers targetting a conserved coding region between the *GME1* and *GME2* genes: GMEF2, 5'-AAAAAGCAGGCT**GGAGAATGGGAAGCTCTGGTGGTA**-3' (position from 44 to 67 of TC154450) and GMER3, 5'-AGAAAGCTGGGT**GCTCTGCAGGCCATGCATCAGCTT**-3' (position 531-554 of TC154450). After denaturation at 94°C for 3 min, the amplification was performed using 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C and 1 min at 72°C, followed by 5 min at 72°C. After electrophoresis in 1% agarose gel, the amplified 511 bp fragment was excised and purified from the gel with the QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN 150). The purified DNA fragment was cloned as an inverted repeat under the control of the 35S promoter using the Gateway system as described by Karimi *et al.* (2002). The entrance vector was pDONR™ (201) and the destination vector was pK7GWIWG2 (1). This construct was introduced into cherry tomato (WV 106) plants by *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 according to Hamza and Chupeau (1993). The first generation

plants (T0) were characterized and screened. Of the 15 lines studied, 3 lines named 66, 70, and 108 were selected for further detailed analyses.

Southern blot analysis

To determine the number of genes coding to GME in the wild type plants, and the number of transgenic constructs in the transgenic plants, genomic DNA was isolated as described by Murray and Thompson (1980). Twenty micrograms of DNA were digested with *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III and *Xba*I restriction enzymes, separated on a 1% agarose gel and blotted into a Hybond-XL membrane (Amersham-Pharmacia, Orsay, France). Hybridization was carried out according to Sambrook *et al* (1989) using ³²P-labelled 511 bp-probe of GME cDNA (between position 44 to 554 of TC154450). The membrane was washed at 65 °C in 0,1 x SSPE-0, 5% SDS under stringent conditions and then scanned with a PhosphorImager (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Chromosome mapping

The *GME* 511-bp fragment corresponding to conserved coding region between *GME1* and *GME2* was mapped on a population of 75 introgressed lines each containing a single introgression from *Solanum pennellii* (LA716) in the genetic background of the processing tomato variety M82 (Pan *et al.*, 2000). Restriction fragment length polymorphism was first screened between the parental lines M82 and LA716 with four restriction enzymes (*Eco*R1, *Hind*III, *Eco*RV and *Xba*I). The locus was then mapped on the 75 introgressed lines with the enzyme showing polymorphism.

In Situ hybridization

In order to detect *GME1* transcripts, riboprobes were synthesized from plasmids containing the 596 bp-fragment of *GME1* cDNA (between positions 887-1482 of TC154450). The sense and antisense digoxigenin-labelled riboprobes were generated by run off transcription using T7 and SP6 RNA polymerases according to the manufacturer's protocol (Roch Diagnostics, Meylan, France). For *in situ* hybridization, tomato flower buds, fruit of 7 and 20 DPA, young leaves, and shoot and root tips were sampled and processed as described by Bereterbide *et al.* (2002).

Expression analysis by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA from fruits of different stages and various organs was extracted as described previously. To determine the relative transcript levels of *GME1* and *GME2*, RT-PCR were performed using a set of gene-specific oligonucleotides. For *GME1*, forward primer was GMEF1 (5'- GCTGAGATGGTCCTCAGCTT -3', at position 887-906 of TC154450) and

reverse primer was GMER1 (5'- ACCAACAGCACAACAGCAAG -3', at position 1463-1482 of TC154450). For *GME2*, it was GMEF5 (5'- GTGAAGGGTGCCGATGTGTCC -3', at position 2208-2228 of TC153828) and reverse primer was GMER5 (5'- ACTCAGAGAATACCAACAAATG -3', at position 2541-2561 of TC153828). As an internal control, a 615 bp actin cDNA fragment was amplified by PCR using a set of primers previously designed as Act5' (5'-TGGCATCATACTTTCTACAATG-3') and Act3' (5'-CTAATATCCACGTCACATTTTCAT-3') for tomato (Germain *et al.*, 1997). RT-PCR protocol was as described previously. Southern blotting and hybridization were performed using a ³²P-labelled specific probe to each gene. The accumulation of *GME1* and *GME2* transcripts was quantified by image scanning of the autoradiogram using the Quantity One software from BioRad Laboratories (Hercules, CA). The relative *GME* mRNA abundance was normalized towards that of *actin* and expressed as a ratio of arbitrary units for pixel intensities.

Assay of GalLDH activity

Fresh young leaves (~ 0.5 g) were homogenized with a mortar and pestle in 1ml of 0,1 M Tris-HCl buffer (pH 7,5) that contains 0.3M sucrose, 1% (w/v) Polyvinylpolypyrrolidone, 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA), 1 mM DTT and 5 mM EDTA. GalLDH was assayed spectrophotometrically at 27 °C by measuring the increase in absorbance at 550 nm accompanied by the reduction of cytochrome c as described by Ôba *et al.* (1995). The reaction mixture (1ml) contains 50 µM cytochrome c, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.15% (w/v) Triton X-100 and 4.2 mM L-galactono-?-lactone (L-GL) was preincubated 5 min. The reaction rate was proportional to the concentration of the enzyme and linear for at least 10 min. One unit of activity is defined as the amount of enzyme required for oxidized 1 nmol of L-GL per min. A coefficient value of 17 mM¹cm⁻¹ for the differences between oxidized and reduced form of cytochrome c was used. Protein was quantified by the method of Bradford (1976) using BSA as standard.

Ascorbic acid analysis

AsA analyses were performed according to Leipner *et al.* (1997). Between 0.5 to 1 g of frozen samples homogenized using a polytron in 2.5 ml of cold 3% (w/v) metaphosphoric acid and 2.5 mM EDTA. The homogenate was then centrifuged at 10000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was filtrated on nylon membrane (pore size, 30 µm, Tetko Inc., New York, USA). An aliquot of the filtrate (200 µl) was incubated for 15 min in 3 ml cuvette at room temperature containing 100 µl of K₂HPO₄ (45%), and either 50 µl of distilled water to measure the reduced AsA, or 50 µl of homocysteine (0,1%) to measure the total AsA. After

the incubation, 500 µl of citrate-phosphate buffer (2M, pH 2.3) were added. The absorbance at 524 nm was measured immediately after addition of 500 µl DCIP (0,008% w/v).

Enzymatic fingerprinting of cell wall polymers

Alcohol insoluble material (AIM) was sequentially hydrolysed by mannanase, xylanase and glucanase enzymes. Oligosaccharidic fragments were then separated by high performance chromatography anions-exchange chromatography (HPAEC). In order to obtain insoluble material in alcohol, 20-25 mg pericarp of 20 DPA fruit or stem were washed 6 times with 1.2 mL of 70 % (v/v) ethanol, except for the final wash which was performed with 1 mL of pure ethanol. For each wash, the samples were incubated for 10 min at 90°C and the supernatant was eliminated after centrifugation at 12000 rpm for 5 min. After washing, the cell wall samples were air-dried for 1 h at 40°C in oven under vacuum. For subsequent sequential enzymatic hydrolysis, cell walls were suspended in 1 mL of 10 mM acetate buffer at pH 4 for mannanase and at pH 4,5 for glucanase or xylanase. Commercial enzymes used (endo β mannanase from *A. niger*; endo β glucanase from *Trichoderma sp.* and endo β 1-4 xylanase M2 from *T. longibrachiatum*) were from Mégazyme (Wicklow, Ireland). A volume of 15 µL enzyme/ 5 mg of substrate was added to the samples and incubated overnight at 35°C in the oven under shaking. After centrifugation at 12000 rpm for 5 min, the samples were filtered and the inactivation of the reaction was carried out by incubation for 5-10 min at 100°C. The samples were then brought to room temperature for 1 h and filtered using a 45 µm filter. The oligosaccharides fragments from the polysaccharides were then separated by HPAEC.

Immuno-detection of cell wall compounds in fruits and stem.

For 20 DPA fruits and stem, slices approximately 0.5 to 1 mm were immersed in phosphate (0.1 M, pH 7.2) buffer and 2.5% glutaraldehyde for 3 h at room temperature under partial vacuum as described by Cheniclet *et al.* (2005). After rinsing, the buffer was substituted by water, the slices were dehydrated by an ethanol series and embedded in Technovit 7100 (Kulzer, Wehrheim, Germany). Pericarp or stem sections of 3 µm were obtained with glass knives with the help of Reichert 2040 microtom. The sections were treated with 0,1 M Na₂CO₃ for 30 min and then were incubated in blocking buffer containing 0,5% foetal calf serum, 10% goat serum in phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10,9 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂ PO₄) pH 7,2 for 30 min at room temperature. They were subsequently incubated overnight at 4 °C with the anti-mannan antisera diluted 1:100 in the same blocking buffer. The secondary antibody (Cy3-conjugated goat anti-rabbit; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluted at 1:100 was added for 30 min at room temperature. Between each antibodies incubation, sections were washed three

times in PBS-Triton X100 (0.05%) for 30 min. Sections were then stained in Calcofluor white (0.1 mg ml⁻¹ in PBS buffer) for 5 min, and viewed on a Leica confocal TCS-NT-UV microscope.

Extraction, Analysis, and Determination of Isoprenoids

The method used to extract, analyze and quantify isoprenoids has been detailed by Fraser *et al.* (2000). Fruits free of seeds and gel were ground to fine powder in liquid nitrogen and the powder was lyophilized. About 10 mg dry weight of fruit was used for extraction and HPLC analysis was performed on a YMC C₃₀ reverse-phase column (250 X 4.6 mm). The mobile phases consisted in methanol (A), water/methanol (20/80, v/v) containing 0,2% ammonium acetate (B), and *tert*-methyl butyl ether (C). The gradient used was 95% A/ 5% B isocratically for 12 min, a step to 80% A/ 5% B/ 15% C at 12 min, followed by a linear gradient to 30% A/ 5% B / 65% C by 30 min. Isoprenoids were identified by their characteristic absorption spectra, distinctive retention times, and, in some cases, comparison with standards. Quantification was performed using the Chroméléon software (Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France).

Chlorophyll content in leaves

Chlorophyll measurement was performed as described by Wintermans (1965). About 300 mg of fresh leaves were homogenized with a mortar and pestle in 1.4 mL ethanol 95%. The mixture was then strongly agitated and kept 10 min on ice. After centrifugation for 1 min at 20000 g, 1 mL of supernatant was measured at 665 nm for chlorophyll a and at 649 nm for chlorophyll b. Total chlorophyll content was calculated as follows:

$$\text{Chlorophyll (a+b)} = 6,1 \cdot \text{OD}_{665 \text{ nm}} + 20,04 \cdot \text{OD}_{649 \text{ nm}} \text{ (}\mu\text{g/mL)}.$$

Photosynthesis, respiration and ethylene production

Leaf photosynthesis was analysed using an infrared CO₂ analyzer laptop (LCA3 – Analytical Development Corporation) following the recommendation of the manufacturer. For each plant, about 20-40 measures were carried out between 200 to 1000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensity. The respiration of the fruit at six stages of ripening phase (Mature green, Breaker, Turning, Orange, Light Red and Red Ripe) determined by measuring the L,a,b color index with a chromameter (MINOLTA, CR-200) coupled with the fruit age defined as DPA, was measured by using a respirometer (PBI Dansensor, CheckMate 9900, Denmark). For each stage in duplicate, three fruits were placed in 50 ml Falcon tubes, sealed with an airtight septum allowing the use of a needle to withdraw an aliquot gas fraction. The measure was carried out after 1 h incubation at 20°C. For ethylene measurement, we used the same fruit

protocol; an aliquot gas fraction (500 μ l) was analyzed using a GC system (GC DN200, DELSI-NERMAG Instruments) with a PoraPak column (SUPELCO Sigma-Aldrich).

Cytological analyses of fruit pericarp

Cell number and size were measured in fruit pericarp as described by Cheniclet *et al.* (2005). For 20 DPA fruits, pericarp slices were prepared as described above and stained with toluidine blue. All the images were photographed on a Zeiss Axiophot microscope with a Spot digital camera (Diagnostic instruments, Sterling Heights, MI). Fruit pericarp thickness, number of cell layers and mean cell area were measured using the Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MA)

***In Vivo* Detection of H₂O₂ in Plants.**

H₂O₂ was visually detected in the leaves of plants by using 3,3-diaminobenzidine (DAB) as substrate (Thordal-Christensen *et al.* 1997). Briefly, plants were excised at the base of leaves with a razor blade and immersed in a 1 mg/ml solution of DAB, pH 3.8, 12 h in darkness. The experiments were terminated by immersion of the leaves in boiling ethanol (96%) for 10 min several times. This treatment decolorized the leaves except for the deep brown polymerization product produced by the reaction of DAB with H₂O₂. After cooling, the leaves were preserved at room temperature in ethanol and photographed.

Results

GME genes in tomato

In order to determine whether tomato GME enzyme is encoded by a single-copy gene or by a multigene family, genomic Southern blot analysis was carried out. The autoradiography obtained is complex, as the numbers fragments detected varied from 1 up to 5, according to the restriction enzyme used (**Figure 2**), suggesting that tomato GME is encoded by at least two genes. Further investigations carried out by *in silico* analysis of tomato EST databases of the TIGR (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=tomato) permitted the identification of two GME EST clusters or TC (Tentative Consensus) that we therefore named *GME1* (TC 154450) and *GME2* (TC 153828), the last one being still a chimeric TC. As shown in **Figure 2** the tomato *GME1* gene could be mapped on chromosome 1, *bin* 1-G using the population of introgressed lines from *L. pennellii* (Pan *et al.*, 2000).

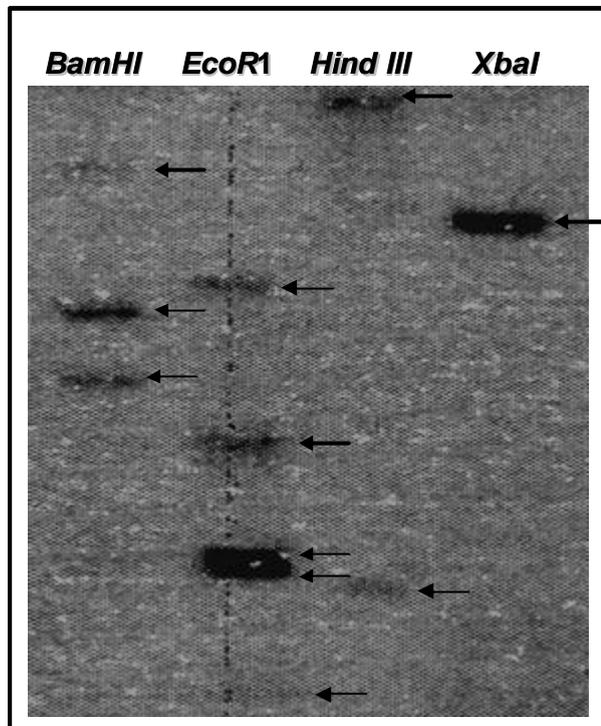
The spatial accumulation of *GME1* transcripts was examined by mRNA *in situ* hybridization (**Figure 3**). *GME1* transcripts were detected in all tissues studied, especially in plant organs displaying high cell proliferation activity such as shoot apical meristem and young leaves as well as stamens, fruit pericarp, and seeds. Analysis of the temporal abundance transcripts showed that *GME1* was expressed in all tomato organs including leaf, roots, stem, flower and fruit at various development stages (**Figure 3D**). During fruit development, the highest *GME1* transcript level was observed at the cell division stage (10 DPA), in all the fruit tissues (epicarp, mesocarp and gel) analysed, and decreased progressively along fruit development to reach the lowest level during ripening stages.

The ascorbate levels were determined in parallel in the same organs used for studying gene expression except for the fruit tissues (epicarp, mesocarp and gel), which were only analyzed at the red ripe stage. Our results revealed that ascorbate content of tomato plant organ and tissues was closely associated with changes in *GME1* transcript level, except in roots and stem where ascorbate level was low compared to the transcript level.

Production of transgenic plants

In order to investigate the function of GME in plant, stable transgenic tomato plants altered in *GME* transcript level were obtained by using RNA interference (RNAi)-mediated gene silencing strategy. This approach is based on the silencing in tomato plant of the endogenous GME gene(s) targeted, induced by the stable integration in the tomato genome by *Agrobacterium*-mediated transformation of inverted repeats corresponding to sense and

(1)



(2)

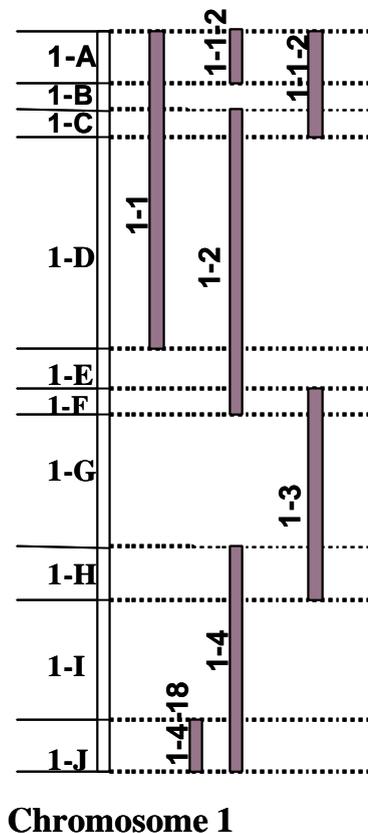


Figure 2. Southern analysis of *GME* genes and chromosome mapping.

Twenty micrograms of tomato genomic DNA were digested with the following restriction enzymes: *Bam*H1, *Eco*R1, *Hind*III and *Xba*I, resolved by gel electrophoresis, transferred to nylon membrane and probed with the ³²P-labelled 511 bp-cDNA fragment specific of *GME1*. (2) chromosome mapping of *GME1* gene in tomato plant. The putative location (in bold) was deduced from the introgression lines showing polymorphism.

antisense strands of a conserved region of both *GME1* and *GME2* under the control of the CaMV 35S constitutive promoter.

Among the 20 independent T0 plants obtained and transferred to greenhouse, five were later shown to be polyploid and rejected from further analyses. First gross phenotypic screens, including ascorbate measurements in the leaves of the transgenic plants, indicated that the more severe the phenotype of the plant observed, the lower was the accumulation of ascorbate content in the plant. For example, line-105, which has a reduction in ascorbate of about 20%, did not differ from control plant with respect to plant growth, excepted for a little delay in fruit ripening whereas in lines 71 and 154, the 80% reduction in ascorbate induced a strong reduction in the development rate, and plant and leaf size with a strong yellowish color of the leaves and the absence of flowers (data not shown).

After phenotypic, molecular and biochemical screening, three lines (66, 70, and 108) showing phenotypes ranging from moderately affected (line 70) to severely affected (lines 66 and 108) were selected out of the 15 remaining T0 plants and brought to F2 generation for detailed physiological analyses. Control PCRs showed that in the three lines selected the inserted repeats were integrated in the tomato genome. Southern blot analyses of the transgenic plants further confirmed that all the lines selected possess only one TDNA containing the inverted repeat (data not shown). We performed semi quantitative RT-PCR on the 66, 70 and 108 transgenic lines using young leaves and 20 and 42 DPA fruit, in order to check to what extent both *GME1* and *GME2* were affected by RNAi-mediated GME gene silencing in tomato. As shown in **Figure 4**, the transcript level of *GME1* was highly reduced in all tissues tested compared with the corresponding tissues of control plant. On the other hand, the expression of *GME2* was somehow less decreased, especially in the leaf tissue.

Effect of GME gene silencing (RNAi) on plant growth and fruit development

To determine whether or not GME plays an important role in the growth and development of tomato plant, several parameters were studied, most of which revealed phenotypic differences from control plants, including germination rate, plant growth rate, fruit number, fruit weight and diameter, and fruit colour as well as a delay in fruit maturation. As shown in **Figure 5**, the most notable effects was on overall growth of the plant, with a strong delay in plant growth and reduction in plant and leaf size (**Figure 5A, B and C**), and a less pronounced reduction in fruit size (**Figure 5D**). Fruit weight and diameter measured in lines 66, 108, and 70 showed a reduction of 52, 41, 32% and 25, 21, 17% respectively, compared to control plants. In addition, a clear effect was observed on leaf colour, with the yellowing of the leaves (**Figure 5C**) and on fruit colour, which was at least partially due to a delay in fruit ripening. One of the most notable phenotype was the fragility of the plant, which could be

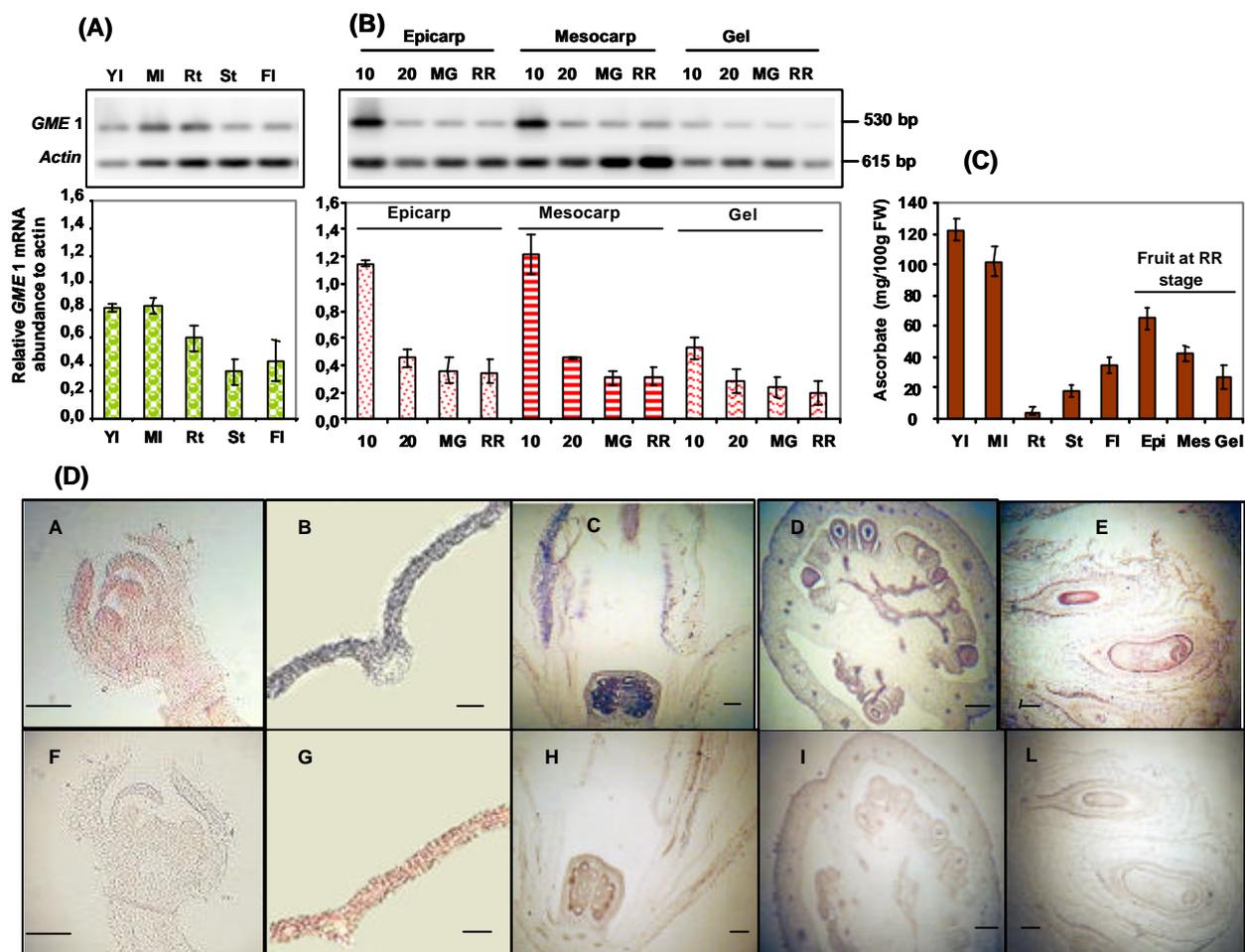


Figure 3. *GME1* transcripts and ascorbate in tomato plants.

Analysis of *GME1* transcript accumulation in vegetative and reproductive organs of cherry tomato (*Solanum lycopersicum* Mill. Cv. WV 106). (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *GME1* transcripts was carried out in different plant organs (YI =young leaves, MI=mature leaves, Rt=Root, St=stem, FI=flower) and (B) in different tissues of fruit during different fruit developmental stages. Total RNA used for RT was isolated from organs or fruits harvested at the indicated developmental stages. Specific amplification of cDNA fragments of *GME* was detected after gel electrophoresis, Southern blotting and hybridization to the corresponding ³²P-labelled *GME1* probe and using *Actin* as a control probe. The accumulation of *GME1* transcripts was quantified by image scanning of the autoradiogram using the Quantity One software. The relative *GME1* mRNA abundance was normalized towards that of *Actin* and expressed as a ratio of arbitrary units for pixel intensities. (C) Total ascorbate content (mg/100g FW) in plant organs or in tissues of fruit (Epi=epicarp, Mes= mesocarp) harvested at the indicated developmental stages. (D) Detection of *GME1* mRNA by *in situ* hybridization of digoxigenin-labelled *GME1*-specific antisense probe (A, B, C, D, E). Digoxigenin-labelled *GME1*-specific sense probe was used as a negative control (F, G, H, I, L). (A and F) Longitudinal section of shoot apical meristem, (B and G) Longitudinal section of young leaf, (C and H) Longitudinal section of flower bud, (D and I) Cross-section of 7 DPA fruit, (E and L) Cross-section of 20 DPA fruit. Bar scale = 500 µm.

very easily broken, especially plant stems and flower trusses. Interestingly, RNAi-GME plants revealed reduction in fruit size, which was found to be correlative to ascorbate content. As it is widely accepted that ascorbate plays an important role in cell division and cell expansion, we investigated the effect of ascorbate content on cell number and cell size, by using a cytological approach on the pericarp of fruit at 20 DPA. Our results showed that pericarp thickness, number of pericarp cell layers, and pericarp cell size were all significantly decreased ($P < 0.05$) in all lines tested (**Figure 6**), suggesting that the reduction in fruit size could be a consequence of the reduction in both cell number and cell size.

L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) activity and ascorbate content

The final step in ascorbate biosynthesis in plants requires the oxidation of L-galactono-1,4-lactone by L-GalLDH (**Figure 1**). In order to determine whether the GME-silencing triggered reduction in ascorbate may regulate GalLDH, its activity was measured in lines 66, 70 and 108. Results presented **Figure 4** clearly indicate that no difference was observed between the control and the different transgenic lines, suggesting that GalLDH activity is not affected by either the reduction of ascorbate precursors due to GME silencing or by the reduction in ascorbate itself. Besides, ascorbate content was highly reduced in lines-66 and 108 revealed (**Figure 4**), while a moderate reduction was observed in line 70 (data not shown). The reduction was about of 40% in fruits of both lines (66 and 108) at all stages of fruit development analysed while the leaves were more affected showing a reduction of 52% and 57% in line 66 and 108, respectively. Interestingly, the reduced ascorbate form was highly decreased in fruit of both lines whereas it was not affected in the leaves. No change in the oxidised form was observed in the fruit in both lines (66 and 68) whereas the oxidised form was severely reduced in the leaves.

Reduction of photosynthesis rate and chlorophyll content associated with increased H_2O_2 content in leaf from RNAi-GME plants

Leaf photosynthesis of RNAi-GME plants was measured in light intensity varying from 200 to 1000 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, and compared to that of control. Between 25 and 50 measures were done for each line and for the control, which allowed us to draw straight regression and to determine the CO_2 assimilation rate of the plants. Transgenic plants showed a reduction in photosynthetic activity compared to that of the control (**Figure 7**). Using the same apparatus, we also attempted to measure the leaf respiration of the transgenic lines during the night. Unfortunately, the weak sensibility of this apparatus and the weak values obtained did not allow us to distinguish the transgenic lines from the control plants. Leaf chlorophyll content was unaffected in line 70, while lines 66 and 108 revealed a decline in leaf chlorophyll

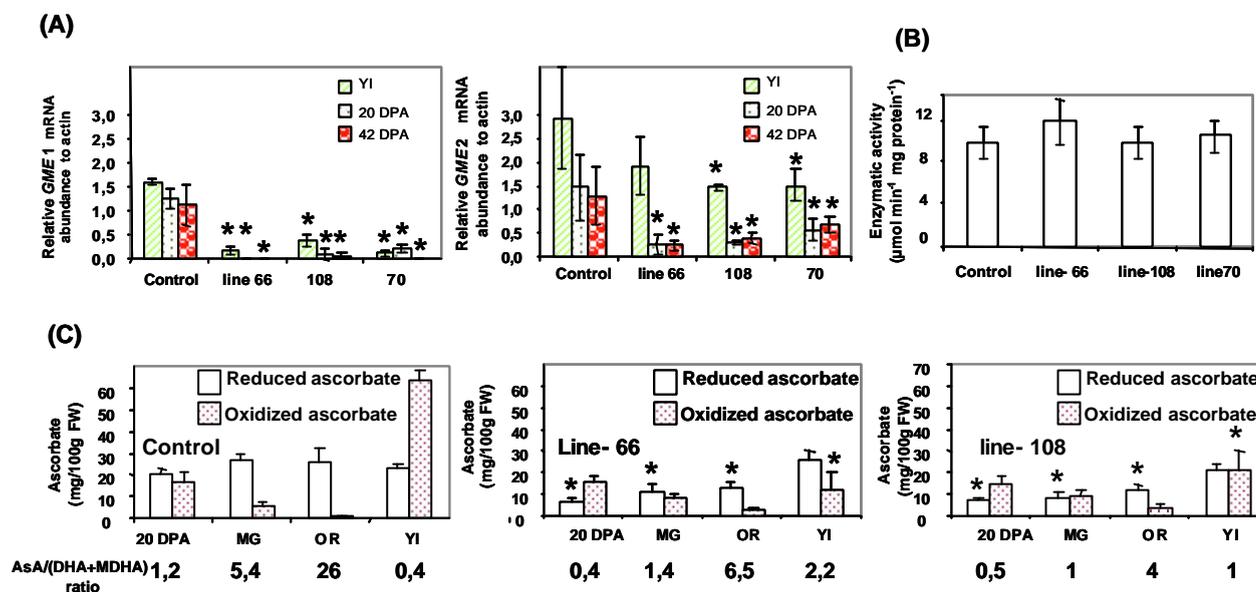


Figure 4 *GME* transcript accumulation, GalLDH enzymatic activity and ascorbate in tomato plants.

(A) Expression analysis of *GME* transcripts by semi-quantitative RT-PCR in young leaves (YI) and in 20 DPA and orange (OR) stage fruits from RNAi-*GME* plants (line-66, 108, and 70) compared to the control plants. Southern blot and hybridization were carried out as described in Materials and Methods. The accumulation of *GME* transcripts was quantified by image scanning of the autoradiogram using the Quantity One software. The relative *GME* mRNA abundance was normalized towards that of *Actin* and expressed as a ratio of arbitrary units for pixel intensities. (B) GalLDH activity in young leaves of the lines 66, 108, and 70 compared with that of control plants. (C) Reduced and oxidized ascorbate contents (mg/100g FW) and ratio (AsA/DHA+MDHA) in fruit at 20 DPA, mature green (MG), and Orange (OR) stages and in young leaves (YI) from RNAi-*GME* lines (line-66 and 108) compared to the control plants. Values are presented as mean \pm SE of determinations of at least 6 individual plants per line with 10 fruits of each plant; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

content of 26 and 23%, respectively, compared to control plants (**Figure 7**). In parallel, to investigate whether these traits were associated with the generation of ROS in leaf tissues, we assayed the production of H₂O₂ for RNAi-GME compared to control plants. In excised leaves DAB polymerizes and turns deep brown in the presence of H₂O₂, and the intensity of the coloration and its localization can be qualitatively assessed and photographed. As shown in **Figure 8**, in the most affected RNAi-GME line 108, H₂O₂ was detectable with the appearance of deepen color in major and minor veins and partially in leaf lamina.

Respiration, ethylene production and isoprenoid content of the fruit from RNAi-GME transgenic lines

Since the fruits from the most severely affected transgenic lines clearly showed changes in fruit ripening (**Figure 5**) and that reduction in ascorbate may affect plant metabolism, including respiration, we performed measurements of respiration and ethylene production in fruit at several stages of fruit ripening in the lines 66 and 108 compared to control plants. Results presented in **Figure 7** clearly show that there is no difference in ethylene production and in respiration between fruits of transgenic plants and those of control.

We assume that fruit ripening was delayed as at 42 DPA fruits of the RNAi-GME remained orange whereas the fruit from control plants had reached the typical red ripe color (**Figure 5**). Nevertheless, when these RNAi-GME fruits were maintained on truss, of between 15 to 20 extra days were needed to reach the red ripe stage (Data not shown). Since most of the colour from the fruit is due to the accumulation of carotenoid pigments, mostly β -carotene and lycopene, we measured the total isoprenoid accumulation in the fruit at different stages of fruit ripening (**Table 1**). At the mature green stage, no significant difference was observed between fruits from transgenic lines and control plants with the exception of the zeaxanthin content, which showed a significant reduction in RNAi-GME lines compared to control plants and chlorophyll, which revealed a reduction in all lines and was significant in line 108 only. At 42 DPA (ripening stage in control fruit), on the other hand, a reduced accumulation of total isoprenoids was observed in transgenic lines compared to control. The partition of isoprenoids showed that lycopene and its precursors (phytoene and phytofluene) did not accumulate in fruits from transgenic lines, in agreement with the observed delay in fruit ripening.

Cell wall analysis by enzymatic finger print and by immuno-detection

Enzymatic fingerprinting is based on the use of cell wall degrading enzymes to free oligosaccharides fragments from the cell wall polysaccharides. These fragments are then

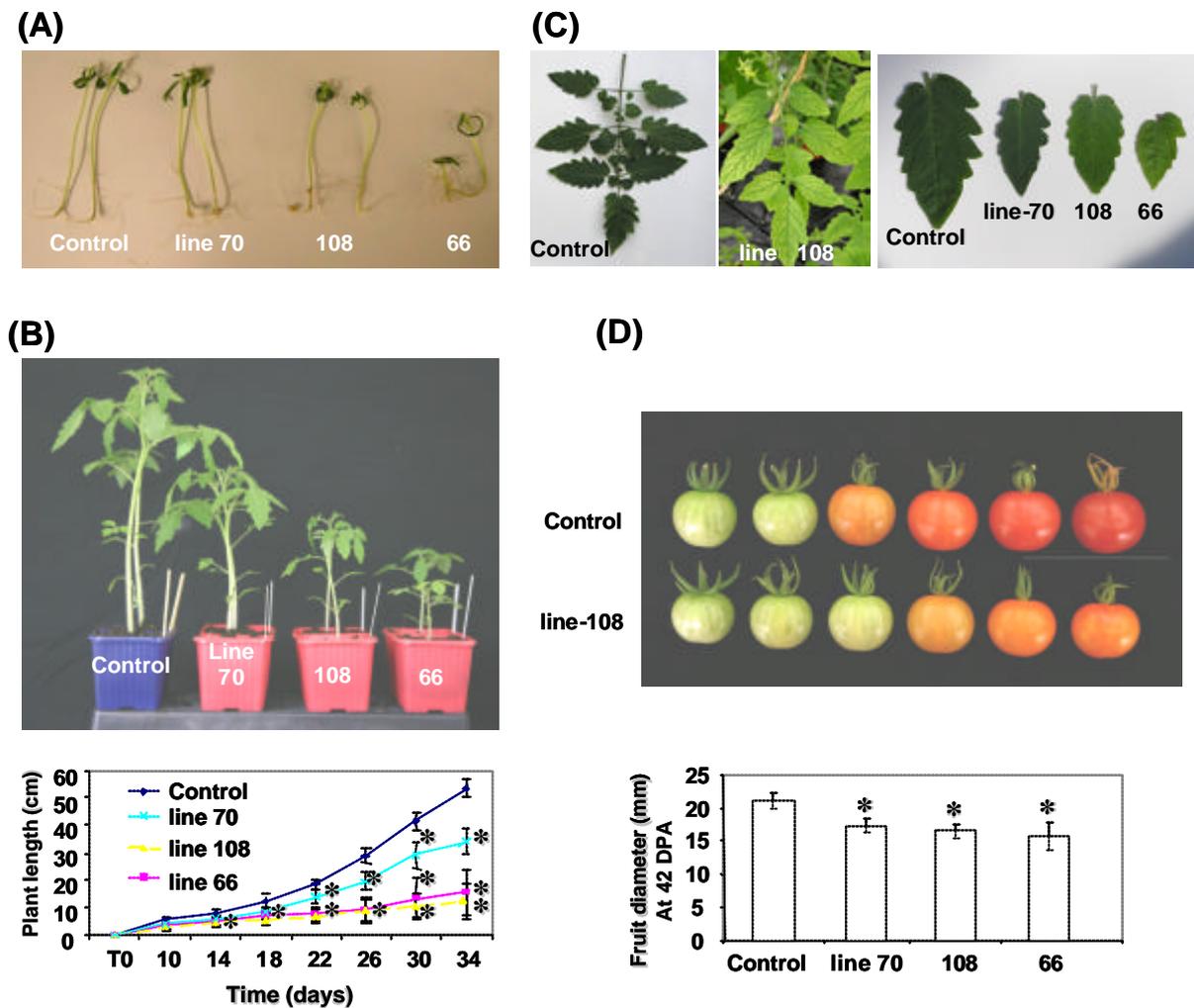


Figure 5. Phenotype characterization of tomato plants expressing *GME* genes silencing (RNAi).

(A) delay in germination, (B) delay in plant growth and plant length, (C) reduction in leaf and leaflet size and change in colour, (D) reduction in fruit size and delay in maturation process. Values are presented as mean \pm SE of determinations of at least 6 individual plants per line with 10 fruits from each plant; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

separated by high performance anions-exchange chromatography (HPAEC). First, fruits at 20 DPA stage, which showed deformation of the cells on Technovit resin-embedded sections (data not shown), and second stems, which displayed high fragility were analysed using this method, since these phenotypes could be potentially attributed to changes in cell wall composition as certain cell wall polymers share common precursors with ascorbate. Two RNAi-GME lines were analysed, the line-66 and 108. Fruit cell walls of both lines (66 and 108) showed no difference in hydrolysed glucans or in glucuronoxylans, the major product of xylanase, compared with control plants (data not shown). The hydrolysed mannans in transgenic plants, however, were significantly affected, and accumulated 1.7 and 2.8 fold more in fruit cell wall of line 66 and 108 respectively than in control plant (**Figure 9**). The analyses performed on stem cell wall were essentially on hydrolysed mannans and glucuronoxylans. A similar result to that of fruit regarding glucuronoxylans has been obtained (data not shown). In stems, cell wall hydrolysed mannans also exhibits an increase by up to 2.4 and 2.1 fold in lines 66 and 108, respectively (**Figure 9**).

In addition, the specific detection of mannan polysaccharides in tomato fruit was done using anti-mannan antisera. This antibody was raised in rabbit against mannan, glucomannan and galactomannan linked to BSA. The mannan accumulation in fruit pericarp and stem was investigated by immunofluorescence light microscopy using the specific antibody mentioned above. In order to reveal the cell wall, the sections were stained with calcofluor white. Our results confirmed the strong accumulation of mannan polysaccharides in cell walls of all transgenic lines (66, 108, and 70) compared to the control fruit (**Figure 9**).

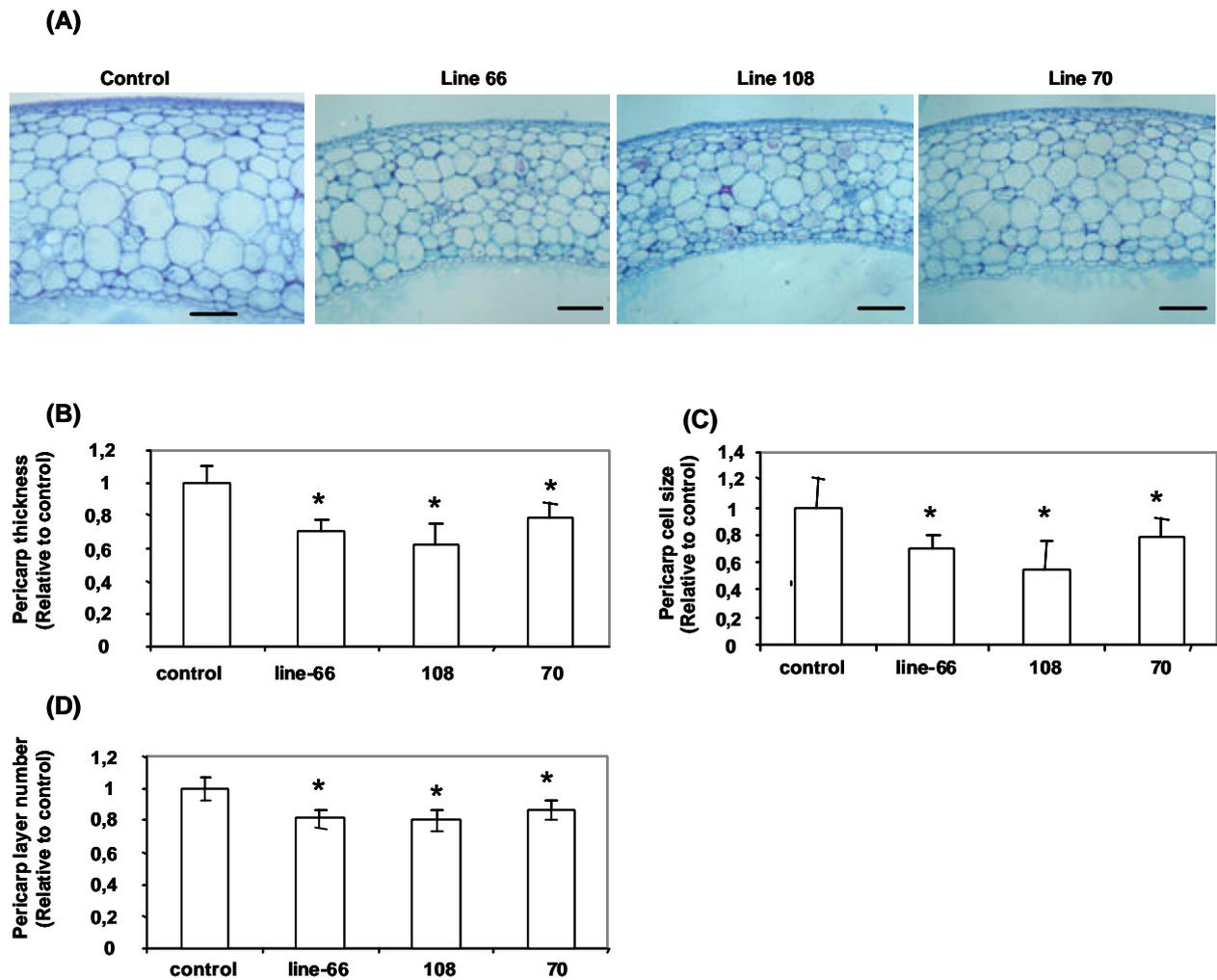


Figure 6. Microscopic analysis of fruit pericarp.

Microscopic analysis of pericarp of tomato fruits (20 DPA) from RNAi-GME plants compared to control plants. (A) pericarp portion of fruit from RNAi-GME (lines 66, 108 and 70) compared to control. Relative pericarp thickness (B), relative pericarp cell size (C) and relative number of pericarp cell layers (D) were defined by *in situ* observations of a region of interest (ROI). Values are presented as mean \pm SE of determinations of at least 6 individual plants per line with at least 10 fruits per line. *In situ* observations were performed 4 times in each fruit, asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control. Bars = 200 μ m.

Discussion

GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) plays a key role in ascorbate biosynthesis

In our previous study, we down-regulated the gene encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH), the last enzyme in ascorbate biosynthesis in plants (Wheeler *et al.*, 1998), by a RNAi-mediated gene silencing. In this experiment, we did not observe any effect on total ascorbate content despite the high reduction in transcript level, protein content and activity of this enzyme but an effect on the redox state of the ascorbate pool. One of the conclusion of this study was that ascorbate biosynthesis is tightly regulated, probably at the level of the turn-over rate, in addition to the synthesis rate. In this study, we attempted to affect ascorbate accumulation in the plant and in the fruit through the down-regulation of an other key enzyme in ascorbate biosynthesis pathway, the GDP-D-mannose-3,5-epimerase or GME. The function of the GME enzyme is to convert GDP-D-mannose to GDP-L-galactose and thus to contribute to ascorbate biosynthesis via GDP-L-galactose and/or via GDP-L-gulose (**Figure 1**). Indeed, in 2003, Wolucka and Van Montagu, suggested an alternative pathway involving L-gulose as intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. They showed that GDP-mannose epimerase catalyzes two distinct epimerization reactions and releases, besides GDP-L-galactose, a novel intermediate: GDP-L-gulose (**Figure 1**). This intermediate was also identified in rice as product of rice GME (*OsGME*) expressed in *E. coli* (Watanabe *et al.*, 2006). Since L-Gulose has never been reported in plant and is not a structural component of plants, Wolucka and Van Montagu (2003) proposed that its fate is to be used in ascorbate biosynthesis. This hypothesis was further substantiated by the fact that *Arabidopsis* cells suspensions supplied with L-gulose synthesized ascorbate as efficiently as when they were supplied with L-galactose.

Whatever the main product of GME activity involved as a precursor for ascorbate biosynthesis, our experiments on transgenic lines showing the down-regulation of GME clearly indicated that a strong reduction in total ascorbate level occurred in response to the reduction in GME transcript, which affected the two genes detected in tomato *GME1* and *GME2* (**Figure 4**). In addition, the probable reduction in GME activity in the transgenic plants was not compensated by the increase in the activity of the last enzyme of the pathway, the GalLDH enzyme, as shown on **Figure 4B**.

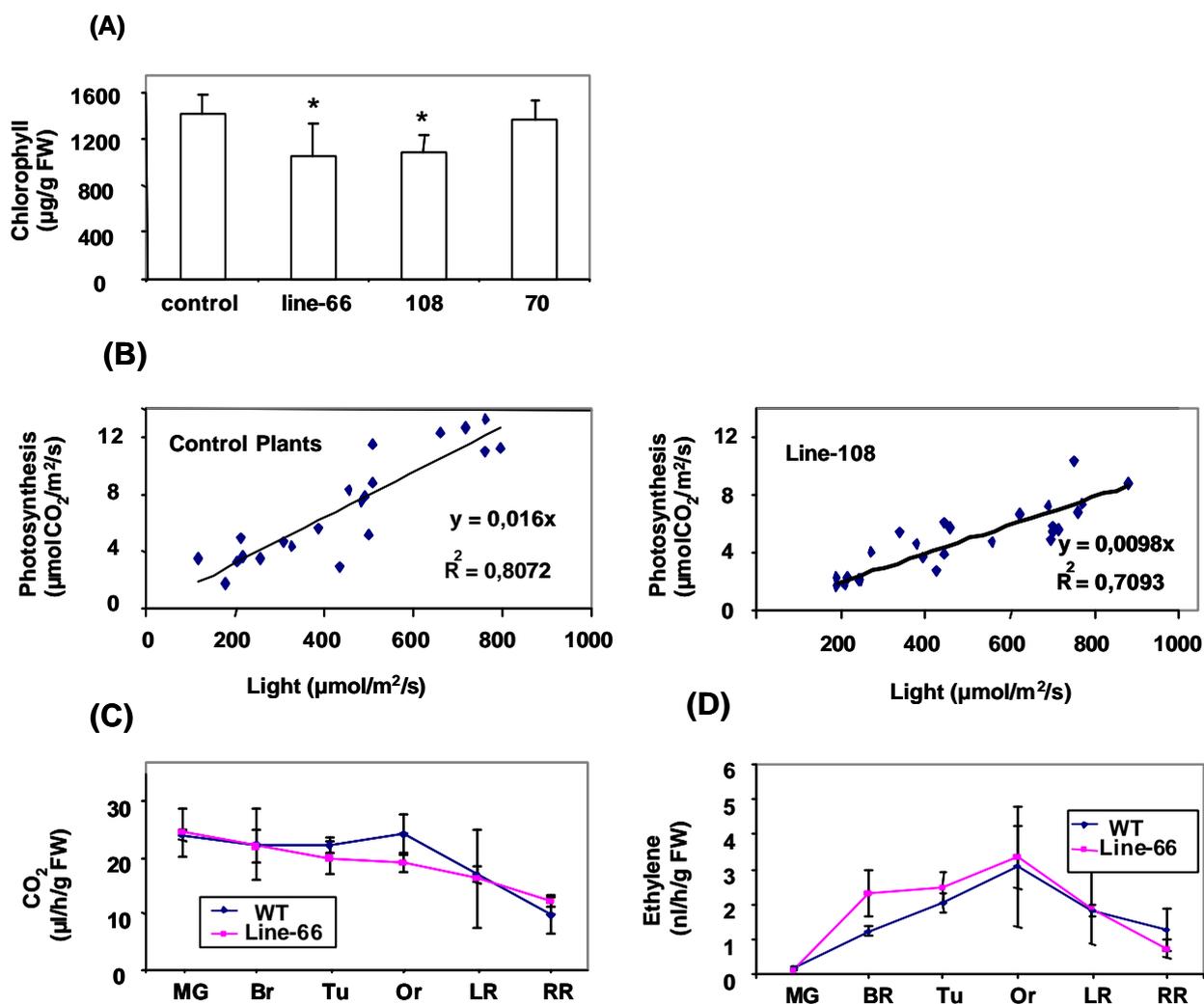


Figure 7 Effect of GME silencing on chlorophyll content, photosynthesis, respiration and ethylene production.

(A) Chlorophyll content of young leaves of RNAi-GME plants compared to control plants. (B) Leaf photosynthesis rate measurement in RNAi-GME plants compared to control plants. Measurement of respiration rate (C) and ethylene production (D) in ripening fruit from RNAi-GME plants compared to control plants. The ripening stages are as follow: Mature green (MG), Breaker (Br), Turning (Tu), Orange (Or), Light Red (LR) and Red ripe (RR). Values are means \pm SE; asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control.

GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) is involved in the interconnection between the ascorbate biosynthesis and the cell wall polysaccharide biosynthesis pathway

As indicated on **Figure 1**, the GME enzyme also connects the ascorbate biosynthesis pathway to the synthesis of the cell wall polymers through its substrate, the GDP-mannose, and its product, the GDP-galactose. Beside its function as intermediate to ascorbate biosynthesis, GDP-L-galactose, is a nucleotide sugar that serves as a biosynthetic precursor of L-galactosyle residues in polysaccharides and oligosaccharides in plant (Seifert, 2004; Reuhs *et al.*, 2004). Actually, very little is known about L-galactosyle residues in plant, which seem to be minor components included in cell wall polysaccharides, glycolipids and glycoproteins (Watanabe *et al.*, 2006).

In agreement with the possible function of GME in controlling the connection between ascorbate biosynthesis and cell wall polysaccharides biosynthesis, RNAi-GME lines displayed distinct phenotypes which could be attributed to changes in the cell wall composition. The first striking phenotype observed is plant fragility, especially for the stem and the truss. Our results of immunocytochemistry and oligosaccharides analysis revealed the accumulation of mannan in cell wall, which proves the involvement of GME into cell wall biogenesis (**Figure 9**). These results may indicate that silencing GME gene may highly reduce the production of GDP-L-galactose residues important to cell wall structure, and conversely channel the substrate of GME, the GDP-mannose, towards the synthesis of mannans, which are important compounds of the cell wall. We hypothesize that these changes in plant structure could result from changes in the cell wall composition, with concomitant changes in tissue structure and texture, as further indicated by the observation of phenotypes similar to those described in the *QUASIMODO1* pectin mutant. This result may have considerable importance in tomato fruit since texture is a major component of fruit quality, together with the other quality parameters, among them the nutritional value (e. g. ascorbate content of the fruit).

Down-regulation of GDP-D-mannose-3,5-epimerase (GME) strongly affects plant and fruit growth

The second striking phenotype observed was the reduction in plant growth including leaf and fruits size. The first hypothesis lies in the reduction of the ascorbate pool within plant tissues. Indeed, many studies demonstrated a strong relationship between ascorbate and plant growth (for reviews, see Smirnoff 1996; Noctor and Foyer 1998). For example, the growth of *vtc1* plants, an ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* mutant that contains only 30% of the

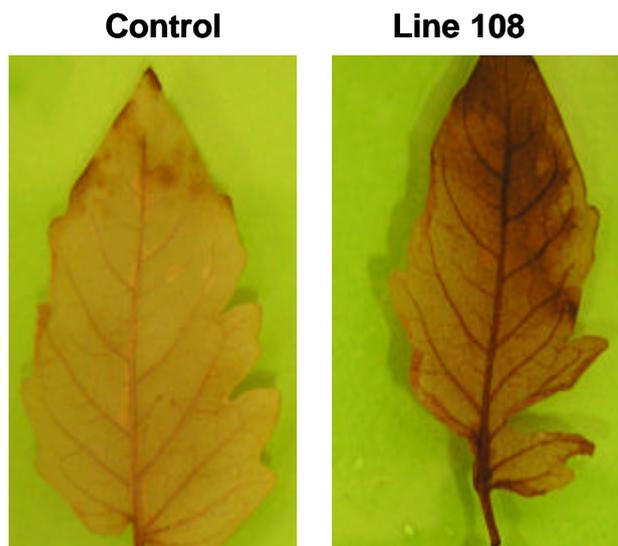


Figure 8. Detection of H_2O_2 in leaves of control and RNAi-GME plants. Leaflets of the fourth leaf 4 starting from the apex of the plant were excised and the H_2O_2 detection was carried out by using DAB reagent as described in materials and methods section.

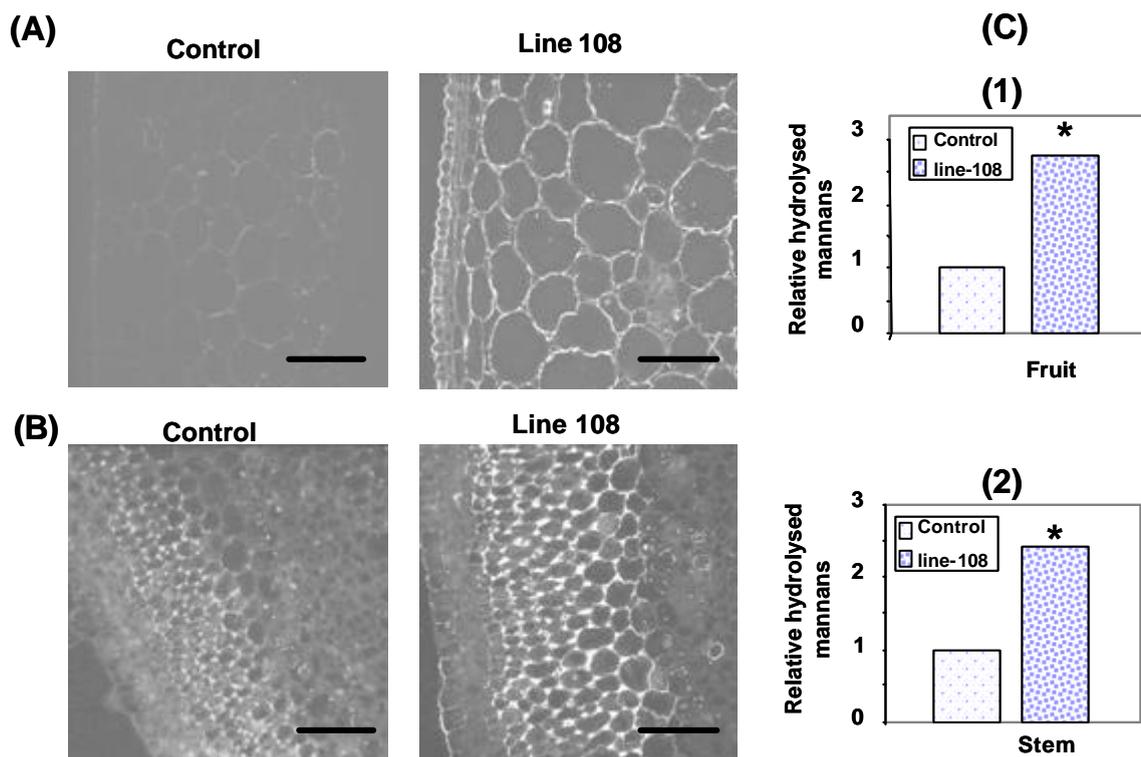


Figure 9. Immuno detection of mannan in tomato plants.

Immuno-fluorescence labelling using antibodies raised against mannan in pericarp of 20 DPA fruits (A) and stem (B) from RNAi-GME line-108 plants compared to control plants. (C) Hydrolysed mannan content of 20 DPA fruits (1) and stem (2) of RNAi-GME line-108 relative to control. Asterisk indicates values that were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from control. Bars = 200 μ m.

ascorbate concentration of wild type, was significantly reduced (Conklin *et al.*, 1999; Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2001). Though the mechanism is still not clearly understood, when ascorbate is supplied to culture medium for *in vitro* plant and cell cultures, it has been shown to promote growth and development and enhance shoot formation (Joy *et al.* 1988). In the same order, application of ascorbate to *Lupinus albus* seedlings increased the production of lateral roots and stimulated the activity of primary and secondary meristematic tissue (Arrigoni *et al.* 1997). Our results indicated a strong correlation between ascorbate content and plant growth, since the less the plant accumulated ascorbate, the more growth was reduced. Plants with less than 20 mg/100g FW ascorbate in leaves were unable to grow normally, since they showed severe reduction in plant length and leaf size and number accompanied by absence of flower truss (data not shown).

A second hypothesis would be that the growth effect of the down-regulation of GME expression could also be ascribed to the change in the redox status of the plant rather than to a change of total ascorbate. Many experimental evidences support this hypothesis. In seeds, for example, the redox status of ascorbate changes along seed development (Arrigoni *et al.* 1992). During the first stage of seed development, corresponding to a very high mitotic activity, 90% of the ascorbate is in the reduced form. Later on, upon the onset of cell expansion, the level of oxidised form rises above that of the reduced form and this goes on until seed maturation. The ascorbate redox status and the presence of the different oxidation forms seem to have a certain influence on the cell cycle. Indeed, Cordoba-Pedregosa *et al.* (1996) showed that the cell proliferation and expansion of bulbs roots grown in medium containing high dehydroascorbate (DHA) were inhibited. Our results are in agreement with the hypothesis of a control of plant growth by the redox status of the plant, since the fruit of transgenic plants exhibiting a reduced size also displayed a very low AsA/DHA ratio, when compared to the control fruits.

The third hypothesis lies in the fact the reduction in plant growth could be related to both reductions in leaf chlorophyll content and in photosynthesis rate (**Figure 7**). Much is known concerning the importance of ascorbate within photosynthesis. Ascorbate acts in the Mehler peroxidase reaction with ascorbate peroxidase to regulate the redox state of photosynthetic electrons carriers and as co-factor for violaxanthin de-epoxidase, an enzyme involved in the xanthophyll cycle-mediated photoprotection (Smirnoff and Wheeler, 2000; Danna *et al.*, 2003). The strong accumulation of H₂O₂ in leaves of RNAi-GME plants (**Figure 8**) may result from a reduction of the processes of ROS scavenging. Thus, this change in the oxidative state of the leaf associated with the reduction of the ascorbate pool could strongly perturb photosynthesis and consequently could affect plant growth.

The last hypothesis to explain the delay and reduction in plant and fruit growth observed in RNAi-GME transgenic lines could be through an effect of ascorbate on cell division and

Table 1. Isoprenoid composition in fruit of RNAi-GME and control plants ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry wt)

	32 DPA				42 DPA			
	line-66	108	70	Control	line-66	108	70	Control
Phytoene	0.3 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3	0.5 \pm 0.9	5 \pm 2	20 \pm 6	47 \pm 11	510 \pm 85
Phytofluene	43 \pm 12	53 \pm 10	45 \pm 9	46 \pm 13	10 \pm 6	30 \pm 7	74 \pm 10	672 \pm 113
d-Carotene	0	0	0	0	0.1 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.2
Lycopene	8 \pm 1	9 \pm 3	9 \pm 1	12 \pm 3	28 \pm 6	106 \pm 15	147 \pm 18	224 \pm 17
Zeaxanthin	4 \pm 4	4 \pm 4	5 \pm 4	10 \pm 6	7 \pm 2	23 \pm 3	15 \pm 1	8 \pm 3
Lutein	15 \pm 2	11 \pm 3	14 \pm 2	14 \pm 3	9 \pm 3	11 \pm 3	9 \pm 0.5	9 \pm 1
Violaxanthin	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
a-Tocopherol	27 \pm 7	30 \pm 8	32 \pm 9	32 \pm 9	40 \pm 15	103 \pm 12	95 \pm 3	74 \pm 7
?-Tocophrol	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	10 \pm 5	18 \pm 3	16 \pm 3	9 \pm 3
Ubiquinone-9	9 \pm 5	11 \pm 5	10 \pm 3	12 \pm 4	16 \pm 10	31 \pm 3	28 \pm 2	16 \pm 0.8
Chlorophyll	227 \pm 33	203 \pm 38	239 \pm 29	242 \pm 45	71 \pm 33	19 \pm 3	23 \pm 5	3 \pm 3
Total	334 \pm 65	323 \pm 45	356 \pm 72	368 \pm 48	197 \pm 43	363 \pm 68	456 \pm 87	1527 \pm 192

Transgenic lines (66, 108 and 70) were compared to control plants. Values are presented as mean \pm SE of determination of two independent analysis on six individual plants per line with at least 10 fruits of each line. Bold values were determined by the *t* test to be significantly different ($P < 0.05$) from the control.

expansion. Indeed, our histological analyses of 20 DA fruit pericarp showed a clear reduction in both cell size and cell number (**Figure 6**), associated with a reduced accumulation of the ascorbate content. Although the processes are still unknown, it is well admitted that ascorbate plays important roles in the control of cell division and of cell expansion. There are many indications suggesting the involvement of ascorbate in cell division, including correlative evidences such as the high ascorbate level in meristematic regions and its low level in regions with little active cell proliferation. In addition, pharmacological approaches using lycorine, an inhibitor of ascorbate biosynthesis, demonstrated that by supplying this inhibitor to cell culture the cells were blocked in the G1 phase of the cell cycle. Conversely, when exogenous ascorbate was added to culture medium, it induced the arrested cells in G1 phase to go on through S phase (Innocenti *et al.*, 1990; Liso *et al.*, 1984). Many hypotheses have been proposed regarding the role of ascorbate in cell division. The most supported one is that ascorbate is required for prolyl-hydroxylation of proteins required for progression through the cell cycle. Inhibition of prolyl hydroxylation inhibits cell division in tobacco protoplasts (Cooper *et al.* 1994) and causes the majority of onion root cells to arrest at metaphase (De Tullio *et al.* 1999). The second hypothesis is that ascorbate increases deoxyribonucleotide reductase activity. This enzyme requires iron to produce deoxyribonucleotides needed for DNA replication. If iron is limited, ascorbate could serve as reductant to release it from the storage protein phytoferritin (Citterio *et al.*, 1994). Some hypotheses have also been proposed regarding the possible involvement of ascorbate in the control of cell expansion. For example, Smirnoff (1996) hypothesized that monodehydroascorbate (MDHA) is generated in cell wall via ascorbate oxidase. MDHA is then reduced back to reduced ascorbate (AsA) via a plasma membrane-bound (NADPH), which involves cytochrome b. The reduced ascorbate is afterwards transported into the apoplastic space. During this cycle, electrons could be transported across the plasma membrane. This mechanism may stimulate cell expansion through the acid growth theory (Rayle and Cleland 1992). Another possibility is that MDHA might cause the cytoplasm to extend. MDHA could accept electrons from a plasma-membrane-bound cytochrome b. Membrane depolarization caused by transmembrane electron transport could stimulate plasma-membrane proton-pump activity, which in turn would stimulate the uptake of cellular nutrients and ions. Consequently, the high osmotic pressure would cause cell expansion (Gonzalez-Reyes *et al.* 1994).

Onset of fruit ripening is delayed in GME silenced plants though ethylene production and respiration of the fruit are not affected

Surprisingly, the onset of fruit ripening was strongly delayed in the GME transgenic lines analysed (lines 66, 70 and 108) as shown in **Figure 5**. Early fruit development was unaffected since the fruits from both transgenic and control plants attained the breaker stage (incipient red colour in the fruit) at the same time after anthesis. However, afterwards, fruit ripening, which involves an array of ripening-associated changes such as the changes in fruit colour due to chloroplast to chromoplast transition accompanied by the accumulation of lycopene in the chromoplast, the decline in fruit firmness linked to cell wall degradation, the accumulation in soluble sugars and the climacteric crisis corresponding to the increased respiration of the fruit (Gray *et al.*, 1994). In tomato, which is a climacteric fruit, the ripening process is triggered and/or coordinated by the phytohormone ethylene which is produced according to an autocatalytic process during fruit ripening. Our investigations on fruits at different stages of ripening revealed no differences between transgenic and control plants in respiration rate or in ethylene content at developmental stages analysed (**Figure 7C and D**).

Thus, neither the lack of hormonal stimulus (i. e. the reduction in ethylene production) nor the impairment of the energy status of the fruit (i. e. the reduction in TCA cycle activity, which would probably have affected fruit respiration) could explain the ripening delay observed in the transgenic lines. And, though, a clear relationship could be observed between the level of ascorbate and the ripening delay in these plants, as evidenced by the accumulation of isoprenoid compounds in the fruit (**Table 1**). The line-66, for example, which was the line accumulating the less ascorbate (**Figure 4C**), showed the lowest lycopene accumulation and the highest chlorophyll content in the fruit at 42 DPA (**Table 1**). Other studies such as that of Jimenez *et al* (2002) reported the correlation between ascorbate level, which increases during fruit ripening, and the antioxidant status of the fruit, estimated by the H₂O₂ content, the lipid peroxidation and the protein oxidation while a wealth of other studies also reported the accumulation of ascorbate during fruit development (e. g. in the Saskatoon fruit; Rogiers *et al.* (1998)). Thus, what is the relationship between tomato fruit ripening and GME activity and/or ascorbate level or redox state? One possible hypothesis is that fruit ripening could be somehow linked to the presence of reactive oxygen species, which are normally kept under control by ascorbate. In the GME-silenced plants, that control would be relieved and the normal ripening process would be altered.

Conclusion

Future studies using global methods of investigation of plant and fruit development such as transcriptome and metabolome analyses, some of them already done but not fully analyzed (transcriptome), should in the very near future yield correlative data helping in the analysis of the links between GME and/or ascorbate and (i) plant and fruit growth, (ii) cell wall synthesis and (iii) ripening delay in tomato. Additional means for understanding the connections between the different pathways that are most probably tightly connected and controlled at the level of GME (ascorbate biosynthesis and cell wall polysaccharides biosynthesis) are, first, the labelling of precursors common to both pathways in order to identify the compounds that are synthesized through these pathways, and, second, the metabolic flux analyses using ^{13}C labelled precursors in order to appreciate the importance of these pathways in global plant metabolism.

REFERENCES

- Agius, F., Gonzalez-Lamonthe, R., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, L., Botella, M. A., and Valpuesta, V.** (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol.* **21**: 177-181.
- Arrigoni, O, De Gara, F., Tommasi, R., and Liso, R.** (1992). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **99**: 235-238.
- Arrigoni, O., Calabrese, L., De Gara, M. B., Bitonti, M., and Liso, R.** (1997). Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *Plant Physiol.* **150**: 302-308.
- Bouton, S., Leboeuf, E., Mouille, G., Leydecker, M-T., Talbotec, J., Granier, F., Lahaye, M., Höfte, H., and Truong H-A.** (2002) *QUASIMODO1* Encodes a Putative Membrane-Bound Glycosyltransferase Required for Normal Pectin Synthesis and Cell Adhesion in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 2577-2590
- Bereterbide A, Hernould, M , Farbos, I., Glimelius, K., and Mouras, A** (2002) Restoration of stamen development and production of functional pollen in an alloplasmic CMS tobacco line by ectopic expression of the Arabidopsis thaliana gene. *Plant J.* **29**: 607-615
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Cheniclet, C., Rong, W. Y., Causse, M., Frangne, N., Bolling, L., Carde, J P, and Renaudin, J P.** (2005). Cell expansion and endoreduplication show a large genetic variability in pericarp and contribute strongly to tomato fruit growth. *Plant Physiol.* **139**:1984-1994
- Citterio, S., Sgorbati, S., Scippa, S., and Sparvoli, E** (1994). Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiol Plant* **92**: 601-607.
- Conklin, P. L., Norris, S. R., Wheeler, G. L., Williams, E. H., and Smirnov, N.** (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin c) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**: 4198-4203.
- Cooper, J. B., Heuser, J. E., and Varner, J. E.** (1994). 3,4-dehydroproline inhibits cell wall assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* **104**: 747-752.
- Cordoba-Pedregosa, M. C., González-Reyes, M., agrario Canadillas, M., del. Navas, P., and Cordoba, F.** (1996) Role of apoplastic and cell wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol.* **112**: 1119-1126.
- Danna, C. H, Bartoli, C. G, Sacco, F., Ingala, L. R, Santa-Maria, G. E, Guiamet, J. J, and Ugalde, R. A.** (2003). Thylakoid-bound ascorbate peroxidase mutant exhibits impaired electron transport and photosynthetic activity. *Plant Physiol* **132**: 2116-25.
- De Tullio, M. C., Paciolla, C., Vecchia, F. D., Rascio, N., D'Emerico, S., De Gara, L., Liso, R., and Arrigoni, O.** (1999). Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* **209**: 424-434.
- Fraser, P.D., Pinto, M. E., Holloway, D. E., and Bramely, P. M.** (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J* **24**: 551-558.
- Gonzalez-Reyes, J. A., Hidalgo, A., Caler, J. A., Palos, R., and Navas, P.** (1994). Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant Physiol* **104**: 271-276.

- Gray, J. E., Picton, S., Giovannoni, J. J., and Grierson, D.** (1994) The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ* **17**: 557-571
- Hamza, S., and Chupeau, Y.** (1993). Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation for tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp. Bot.* **44**: 1837-1845.
- Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., Aggigoni, O., and Liso, R.** (1990). The size of the quiescent center in roots of *Allium cepa* L. grown with ascorbic acid. *New Phytol.* **114**: 507-509.
- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., and Mapson, L. W.** (1954) Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochem. J.* **56**: 1-15
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Verhoeven, M., and Mullineaux, P.** (2002). Change in oxidative processes components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**: 751-758.
- Joy, R. W., Patel, K. R., and Thorpe, T. A.** (1988). Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* **13**: 219-228.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002) Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193-195.
- Keller, R., Springer, F., Renz, A., and Kossmann, J.** (1999). Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J* **19**: 131-141.
- Leipner, J., Francheboub, Y., Stamp, P.** (1997). Accumulation by sub optimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant Cell Environ* **20**: 366-372.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M. B., and Arrigoni, O.** (1984). Relationships between ascorbic acid and cell division. *Exp Cell Res* **150**: 314-320.
- Loewus, F. A.** (1963) Tracer studies of ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **2**: 109-128.
- Loewus, M. W., Bedgar, D. L., Saito, K., and Loewus, F. A.** (1990). Conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. *Plant Physiol* **94**: 1492-1495.
- Murashige T, and Skoog, S.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plan.* **15**: 473-497
- Murray, H. G., and Thompson, W. F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic acids Res* **8**: 4321-4325.
- Noctor, G., Foyer, C. H.** (1998). Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279.
- Ôba K, Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., and Yamamoto, T.** (1995) Purification and properties of L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem* **117**: 120-124
- Pan, Q., Liu, Y., S., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren L. and, Fluhr, R.** (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* **155**: 309-322
- Rayle, D. L., and Cleland, R. E.** (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271-1274.

- Reuhs, B. L., Glenn, J., Stephens, S. B., Kim, J. S., Christie, D. B., Glushka, J., G., Zablackis, E., Albersheim, P., Darvill, A. G., and O'Neill, M., A.** (2004). L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient *mur1* Arabidopsis mutant. *Planta*. **219**:147-157.
- Rogiers, S. Y., Kumar, M. N., and Knowles, N. R.** (1998). Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Ann Bot* **81**:203-211.
- Saito, K., Nick, J. A., and Loewus, F. A.,** (1990). D-Glucosone and L-sorbose, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiol* **94**:1469-1500.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, F.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2d edn. In. Cold Spring Harbor Laboratory, New-York.
- Seifert, G. J.** (2004). Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 277-284
- Smirnov, N.** (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot* **78**: 661-669.
- Smirnov, N., and Wheeler, G. L.** (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35** :291-314.
- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K. and Esaka, M.** (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* **27**: 139-148
- Tamaoki, M., Mukai, F., Asai, N., Nakajima, N., Kubo, A., Aono, M., and Saji, H.** (2003). Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **164**: 1111-1117.
- Thordal-Christensen, H., Shang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B** (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**: 1187-1194
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C. H.** (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol* **127**: 426-435.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M., Hoekema, A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids Res* **17**: 2362-2368.
- Watanabe, K., Suzuki, K., and Kitamura, S.** (2006). Characterization of a GDP-D-mannose 3", 5"-epimerase from rice. *Phytochemistry* **67**: 338-346.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A. and Smirnov, N.** (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369.
- Wintermans, J. F., and Mots, A.** (1965). Spectrophotometric characteristic of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta* **109**: 448-453.
- Wolucka, B. A., Persiau, G., Van Doorselaere, J., Davey, M. W., Demol, H., Vandekerckhove, J., Van Montagu, M., Zabeau, M., and Boerjan, W.** (2001) Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 14843-14848
- Wolucka, B. A., and Van Montagu, M.** (2003) GDP-mannose-3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem* **278**: 47483-47490.

**3^{ème} Partie. Caractérisation des transformants pour
la GDP mannose pyrophosphorylase (GMP) et pour
l'ascorbate oxydase (AO).**

3^{ème} Partie. Caractérisation des transformants pour la GDP mannose pyrophosphorylase (GMP) et pour l'ascorbate oxydase (AO).

A. Caractérisation des transformants pour la GDP mannose pyrophosphorylase (GMP).

I. GMP2

Excepté les transformants 52 et 53, qui n'ont montré aucune différence phénotypique par rapport au témoin, toutes les autres lignées ont montré des caractéristiques distinctes comme une réduction de la taille de la plante et du fruit (**figure 27**). Le nombre de fruit était généralement réduit, plus particulièrement pour les lignées 18 qui n'a pas donné des fruits et la lignée 120 qui ont donné seulement 2 fruits dépourvus de graine. Tôt dans le développement des plantes, les feuilles présentaient des signes de nécrose et de sénescence pour la plupart des lignées. La teneur en ascorbate total des fruits était réduite dans la plupart des lignées, alors que ce n'était pas vrai dans les feuilles excepté pour les lignées 120 et 149, qui ont montré une légère augmentation en ascorbate total ou pour la lignée 27 qui présentait une faible diminution comparée au témoin.

II. GMP3

La génération de transformants GMP3 a été très limitée, malgré une transgénése répétée trois fois. Seulement 3 transformants ont été obtenus, deux n'ont montré aucun phénotype différent du témoin, seule la lignée 75 était fortement affectée. Le transformant 75, présentait une réduction importante de la vitesse de croissance et de la taille de la plante. La taille des feuilles était réduite, leur coloration était d'un vert plus clair que celui du témoin, et des signes de nécrose et sénescence étaient observés au niveau des feuilles jeunes. Le nombre de bouquet était réduit et les bouquets présentaient un fort taux d'avortement des fruits. Les fruits avaient une taille réduite et présentaient aussi une réduction de leur teneur en ascorbate total (**figure 28 (1)**).

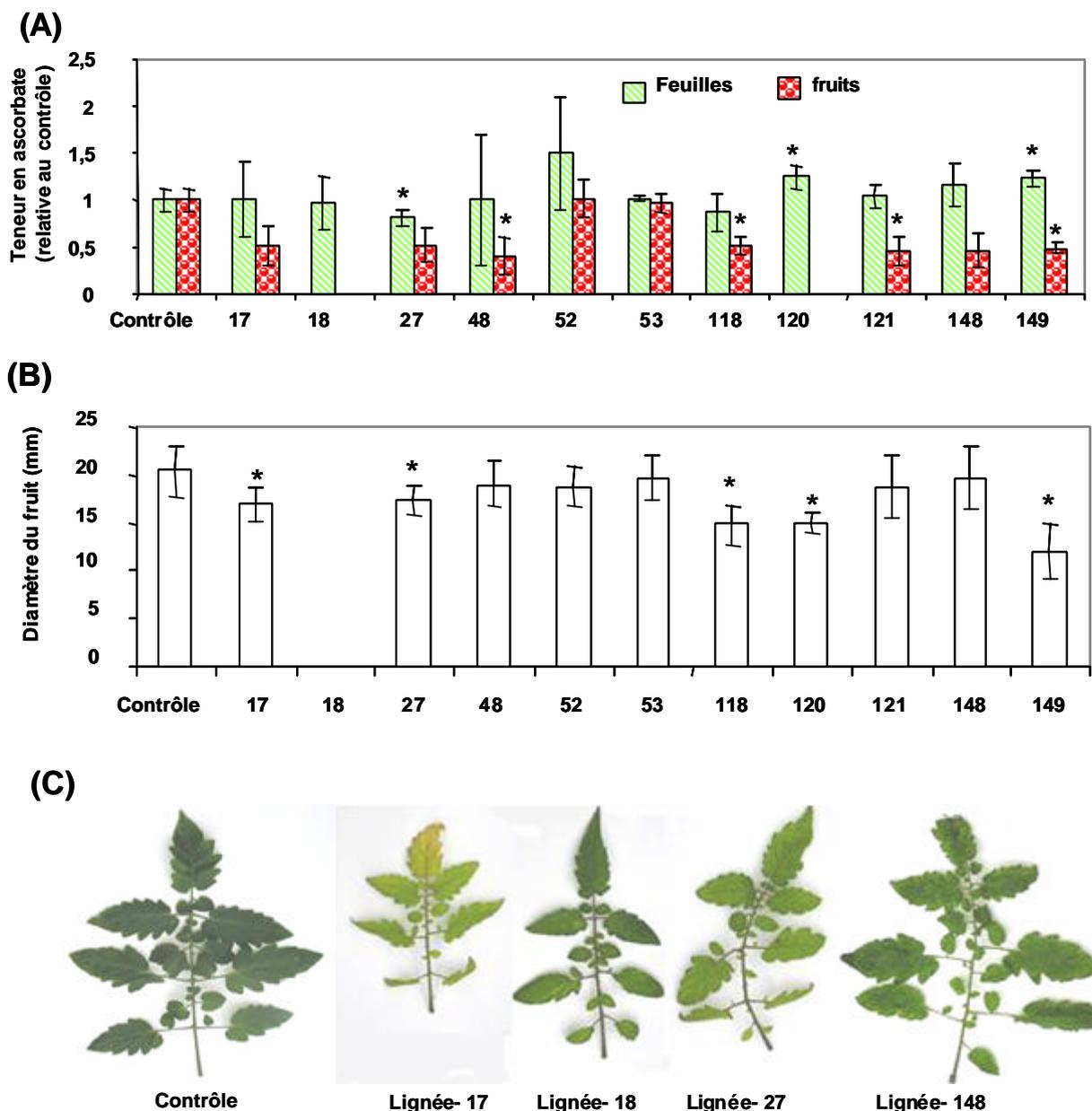


Figure 27. Effet de la surexpression de la GDP-mannose pyrophosphorylase fruit-spécifique (accession Genbank : AY605668, construction *GMP2*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0).

(A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque lignée. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES). Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (C) Quelques phénotypes marquants au niveau des feuilles.

III.GMP4

Tous les transformants GMP4 ne présentaient aucun phénotype différent du témoin. Seule la lignée 111 produisait des fruits de taille réduite. La teneur en ascorbate total était sensiblement réduite dans les feuilles et dans les fruits de la lignée 110, 111 et 114, tandis que pour les autres lignées aucune différence n'a été observée (**figure 28 (2)**).

Les graines T1 obtenues lors de la culture de ces transformants T0 ont été stérilisées comme décrit dans les Matériels et Méthodes pour être stockées à 4°C à l'abri de l'humidité. Actuellement, la caractérisation des transformants GMP est stoppée. Les perspectives d'étude de ces plantes pourraient être entreprises en collaboration avec l'équipe de Marc Lahaye à l'INRA de Nantes dont une des thématiques de recherche porte sur l'étude de la paroi cellulaire et notamment la relation entre la texture et la qualité du fruit de tomate.

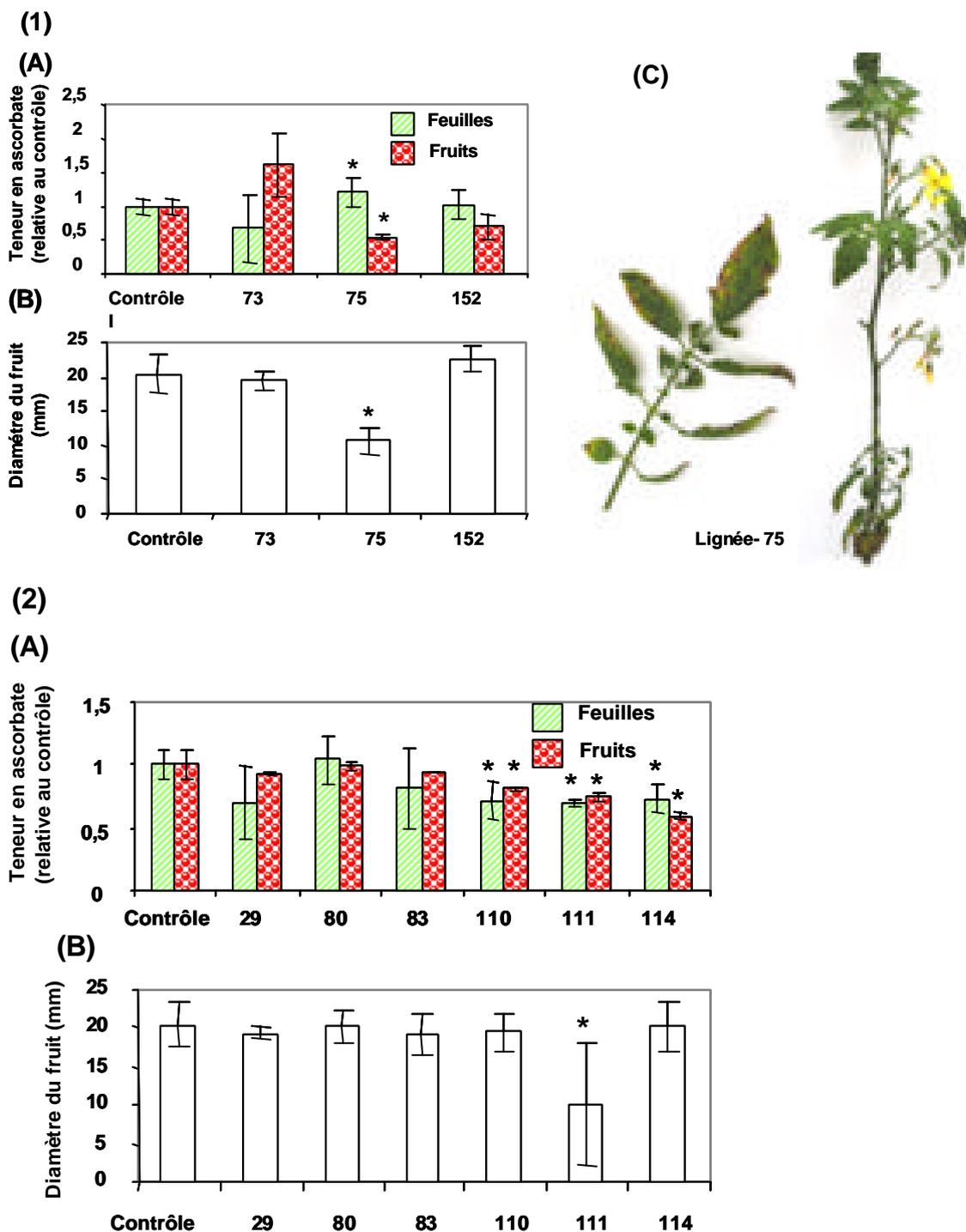


Figure 28. Effet du silencing de la GDP-mannose pyrophosphorylase (constructions (1) *GMP3* et (2) *GMP4*) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque lignée. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES); Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (C) Quelques phénotypes marquants au niveau des plantes.

B. Caractérisation des transformants pour l'ascorbate oxydase (AO).

I. AO2

Comme je l'ai précisé auparavant, aucun transformant contenant la construction de sur-expression de l'ascorbate oxydase n'a été obtenu.

II. AO3

Dix plantes AO3 ont été transférées en serre. Dans l'ensemble, au cours de leur développement, les transformants AO3 étaient difficilement différenciables des plantes témoin. Seules quelques lignées présentaient des caractéristiques distinctes au niveau de la morphologie des feuilles et aussi de la taille des fruits (**Figure 29**). C'est le cas des lignées 15 et 49 qui produisaient des fruits de taille significativement réduite, alors qu'inversement la lignée 145 portait des fruits de calibre plus important que le témoin. Dans les feuilles, l'effet de la transgénèse sur la teneur en ascorbate était variable selon les lignées, c'est à dire présentaient soit une augmentation soit une diminution d'ascorbate. Dans les fruits, la teneur en ascorbate total était réduite chez toutes les lignées excepté pour la lignée 56 qui présentait une faible augmentation d'ascorbate. La lignée 51 n'a pas été retenue pour la suite de l'étude car elle ne donnait pas de fruit.

III. AO4

La génération de transformants AO4 a été très limitée, malgré une transgénèse répétée trois fois. Seulement 3 transformants ont été obtenus. Ces trois lignées n'ont montré aucun phénotype au niveau du développement de la plante et du fruit. Seule une réduction significative de la teneur en ascorbate dans les feuilles et fruits a été observée pour la lignée 138 (**Figure 30**).

Comme dans le cas des transformants GMP, les graines T1 obtenues lors de la culture de ces transformants AO T0 ont été stérilisées comme décrit dans les Matériel et Méthodes pour être stockées à 4°C à l'abri de l'humidité. Depuis Septembre 2004, l'étude des transformants T1 AO3 est poursuivie, au sein de l'équipe Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes dirigée par Mathilde Causse, par Rebecca Stevens à l'INRA d'Avignon. Une des thématiques de recherche de ce laboratoire est d'étudier le rôle de l'ascorbate dans la mise en place de la qualité organoleptique et nutritionnelle du fruit de tomate. Rebecca Stevens, a abordé cette problématique par une approche de transgénèse de type

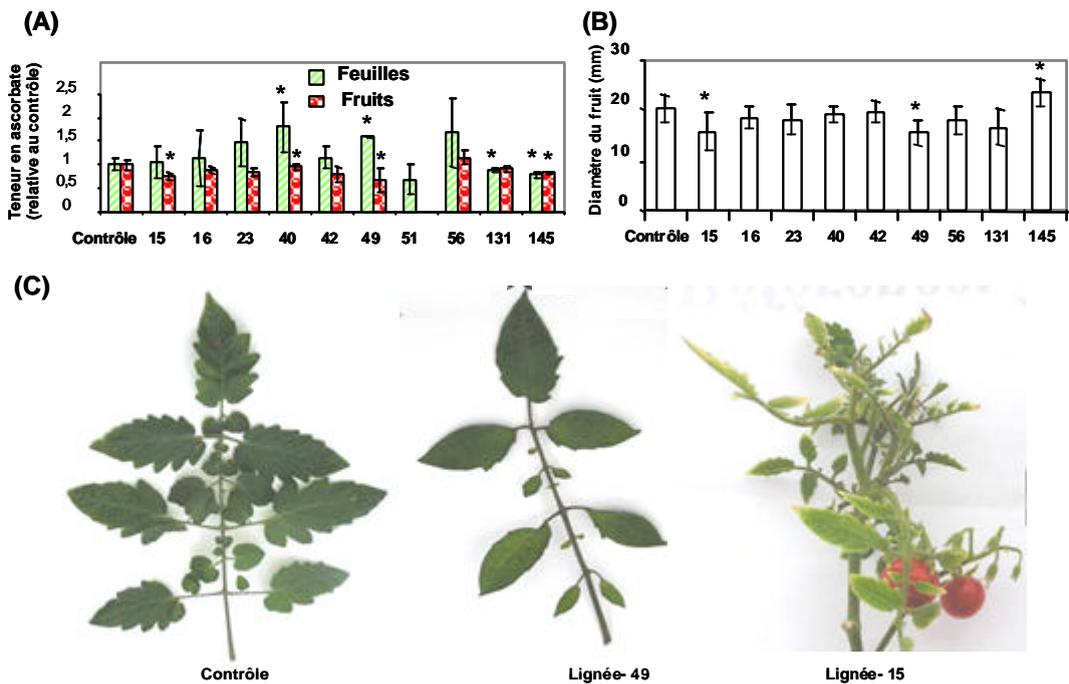


Figure 29. Effet du silencing de l'ascorbate oxidase (AO) (construction AO3) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque lignée. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES); Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student). (C) Quelques phénotypes marquants chez certaines plantes.

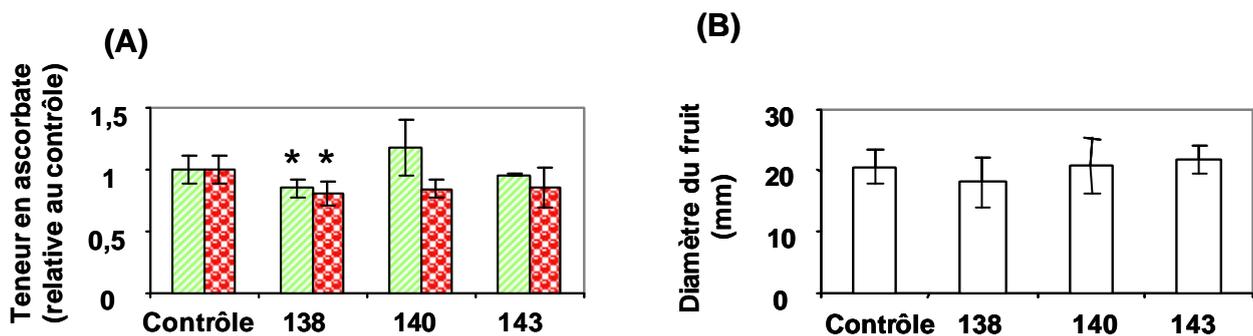


Figure 30. Effet du silencing de l'ascorbate oxidase (AO) (construction AO4) sur le développement de la plante et du fruit chez différentes lignées transgéniques de tomate (transformants T0). (A) Teneur en ascorbate total des jeunes feuilles et des fruits au stade rouge mûr (42 jours après anthèse) relative à celle des plantes témoins. (B) Diamètre de tous les fruits mûrs récoltés sur chaque lignée. Les valeurs représentent la moyenne par plante \pm l'erreur standard (ES); Les histogrammes sont surmontés d'un astérisque lorsque la différence entre un transformant et le témoin est significative à 95% ($P < 0,05$; test de Student).

RNAi ciblée sur certaines des enzymes qui participent aux processus de recyclage de l'ascorbate, telles que l'ascorbate oxydase, la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR). La disponibilité des transformants RNAi AO lui a donc permis de démarrer cette étude rapidement en étroite collaboration avec notre équipe de Bordeaux.

CHAPITRE III
CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES.

CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES

Chez les plantes, la voie de biosynthèse de la vitamine C (ou ascorbate) reste encore conditionnelle malgré les nombreux travaux réalisés dans ce domaine depuis plus de 10 ans. A ce jour, plusieurs hypothèses pour la biosynthèse d'ascorbate ont été proposées. Parmi celles-ci, la voie proposée par le groupe de Smirnoff (Wheeler *et al.*, 1998) est généralement acceptée comme la voie majeure. Un des objectifs de ce travail de thèse était de mieux comprendre le (ou les) rôle(s) de l'ascorbate dans les plantes et d'analyser les effets d'une réduction de la teneur en ascorbate sur leur développement et notamment sur celui du fruit. Cette étude était basée sur la voie de biosynthèse majeure décrite par Smirnoff et utilisait comme modèle végétal la plante de tomate.

La galactono-1,4-lactone déshydrogénase chez la tomate : En plus de son rôle dans biosynthèse de l'ascorbate, a-t-elle d'autres rôles dans la cellule ?

La galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH) est une enzyme clé de la voie de biosynthèse de l'ascorbate pour deux raisons : 1) elle catalyse la dernière étape de la voie de "Smirnoff" mais également celle d'une autre voie alternative décrite par Agius *et al.* (2003); 2) elle est étroitement liée au fonctionnement de la mitochondrie de part sa localisation au sein de la membrane interne de la mitochondrie. La caractérisation de cette enzyme chez la tomate a montré que 1) le gène *GalLDH* existe en copie unique, 2) il est localisé sur le chromosome 10, 3) il est exprimé dans tous les tissus végétatifs et reproductifs, il présente une expression maximale dans les tissus à forte activité de prolifération et d'expansion cellulaire, 4) la protéine est également présente dans tous les organes de la plante et 5) la teneur en ascorbate est variable selon l'organe, avec une teneur maximale dans les feuilles en relation avec son rôle dans la photosynthèse. Chez la tomate, il existe une bonne corrélation entre l'expression de la GalLDH et la teneur en ascorbate ; en revanche chez le fruit, cette relation n'est pas vraie puisque c'est au cours de la maturation du fruit que l'ascorbate s'accumule pour atteindre la valeur maximale à pleine maturité.

Pour ces diverses raisons, la GalLDH semblait un excellent candidat pour envisager un approche de transgénése visant à réduire la teneur en ascorbate dans la tomate afin d'en étudier les effets sur le développement de la plante et du fruit. L'analyse des lignées transgéniques RNAi-GalLDH a conduit à des résultats originaux. Tout d'abord, malgré une forte réduction de l'accumulation des transcrits GalLDH, de la protéine et de son activité, j'ai constaté que le pool d'ascorbate total des plantes de tomate, notamment au niveau des feuilles et des fruits, était comparable à celui des plantes témoin. Ensuite, ce résultat était

surprenant puisque chez les plantes transgéniques mes observations un effet significatif sur la croissance générale des plantes, mais également au niveau des feuilles et des fruits. L'analyse cytologique a montré que la réduction de taille semblait résulter d'un effet sur les mécanismes d'expansion cellulaire plus que sur les processus de division cellulaire. En effet, que ce soit dans la feuille ou dans le péricarpe du fruit, seule la taille des cellules qui constituent ces tissus est affectée. Enfin, lorsque j'ai analysé l'état rédox de pool d'ascorbate dans les plantes transgéniques, j'ai constaté un changement important du rapport ascorbate réduit (AsA) sur ascorbate oxydé (MDHA+DHA) dans la jeune feuille et le fruit en croissance, notamment au niveau de l'apoplaste.

A ce stade de mes recherches, j'ai posé la question suivante : Comment peut on expliquer qu'une réduction de l'expression et de l'activité GalLDH puisse influencer la croissance des plantes sans toutefois affecter le pool total d'ascorbate ?

L'ensemble des résultats que j'ai obtenus m'amène à croire que c'est la perturbation de l'état rédox du pool d'ascorbate associé dans certain cas à une diminution de teneur en ascorbate qui influencent les processus de croissance et développement cellulaire. En effet, dans la littérature, nombreux sont les travaux qui démontrent l'existence d'une corrélation entre teneur en ascorbate et son état rédox avec les processus de division, d'expansion et d'élongation cellulaires. En revanche, les mécanismes par lesquels l'ascorbate influence ces processus liés au développement cellulaire restent encore à déterminer. La disponibilité des lignées transgéniques RNAi-GalLDH m'a paru un modèle biologique pertinent pour approfondir les connaissances sur la relation ascorbate/état rédox et prolifération/expansion cellulaire. Pour apporter des éléments de réponse qui pouvaient expliquer par quels processus biologiques l'état rédox du pool d'ascorbate dans les tissus et surtout celui présent dans l'apoplaste peut influencer le développement des plantes RNAi-GalLDH, j'ai comparé le métabolome et le transcriptome d'un organe source, la feuille, et d'un organe puits, le fruit, chez une lignée transgénique RNAi-GalLDH fortement affectée en terme de croissance avec celui d'une plante témoin. Cette approche intégrative basée sur l'utilisation du logiciel MapMan (Thimm *et al*, 2004) m'a permis de démontrer que chez les transformants de tomate RNAi-GalLDH certaines voies du métabolisme primaire sont fortement perturbées : le cycle de Krebs en tant que voie majeure du métabolisme énergétique de la cellule végétale, le métabolisme de certains acides aminés et acides organiques, la photosynthèse (au niveau transcriptionnel seulement), mais aussi le métabolisme secondaire, comme par exemple le métabolisme des parois, et des lipides. Toutes ces modifications métaboliques peuvent avoir des répercussions sur le fonctionnement cellulaire et expliquer la réduction de croissance des plantes RNAi-GalLDH. Par ailleurs, par analogie au mutant d'*Arabidopsis vtc1* également affecté dans son développement, les

plantes RNAi-GalLDH présentent des modifications importantes au niveau de leur transcriptome. Les changements d'expression d'un grand nombre de gènes de réponse au stress ainsi que des gènes de régulation du développement codant pour des protéines impliquées dans la transduction du signal ou des facteurs de transcription en réponse à des variations du contrôle hormonal peuvent également participer à la régulation, par le statut rédox du pool d'ascorbate, des processus de croissance cellulaire des tissus.

Si je peux proposer un rôle de l'ascorbate et notamment de son état rédox dans le contrôle des processus de croissance cellulaire via une régulation du métabolisme central mais aussi plus finement au niveau de l'expression de gènes clés du développement, certains points restent encore à éclaircir.

La GDP-D-mannose-3,5-épimérase, enzyme clé dans la biogenèse des parois et dans la synthèse de la vitamine C.

Lorsque j'ai débuté ce travail de thèse, la GDP-mannose épimérase (GME) chez les plantes était très peu documentée dans la littérature. La caractérisation fonctionnelle de cette enzyme chez la tomate nous a montré qu'elle présentait une grande homologie en terme d'expression spatio-temporelle et tissulaire avec la GalLDH. Ceci m'amène à penser que la GME possède un rôle clé dans le métabolisme cellulaire. Ainsi, mes données ont montré que 1) il existe deux copies du gène *GME* chez la tomate notés *GME1* et *GME2*, 2). *GME1* s'exprime dans tous les tissus végétatifs et reproductifs et présentent une expression maximale dans les tissus à forte activité de prolifération et d'expansion cellulaire. 3) dans les feuilles, il existe une bonne corrélation entre l'expression de la GME et la teneur en ascorbate; en revanche chez le fruit, comme dans le cas de GalLDH, cette relation n'est pas vraie. Par ailleurs, de récentes études de caractérisation biochimique et enzymatique de la GDP-D-mannose épimérase réalisées chez *Arabidopsis thaliana* (Wolucka et Van Montagu, 2003) et le riz (Watanabe *et al.* 2006) ont suggéré que cette enzyme était un carrefour métabolique qui permettrait à la cellule de réguler et d'orienter la voie de biosynthèse soit vers l'ascorbate soit vers les composés pariétaux, *via* la synthèse de GDP-L-gulose ou de GDP-L-galactose, respectivement.

Toutes ces raisons témoignent de la pertinence du choix de la GME dans une approche de transgénèse visant à supprimer l'expression des deux gènes *GME1* et *GME2*, dans le but d'étudier les effets d'une réduction de la teneur en ascorbate sur le développement de la plante et du fruit de tomate. L'analyse des lignées transgéniques RNAi-GME a conduit à des phénotypes très originaux. Tout d'abord, contrairement aux plantes RNAi-GalLDH, le pool d'ascorbate des plantes RNAi-GME était fortement affecté. Ensuite, le développement des transformants et des fruits, et l'activité de photosynthèse étaient réduits ;

les plantes présentait une fragilité accrues, et la maturation des fruits était retardée; tous ces changements étaient étroitement corrélés avec le taux de réduction d'expression des transcrits et du pool d'ascorbate. L'ensemble de mes données semble donc confirmer l'hypothèse proposée par Wolucka et Van Montagu, du rôle primordial que pourrait jouer la GDP-mannose épimérase dans le contrôle de la synthèse de la vitamine C et celle des parois. Comme dans le cas des plantes RNAi-GaLLDH, la compréhension des mécanismes biologiques dans lesquels l'ascorbate participe soit directement soit indirectement à la régulation des processus de croissance et de développement de la plante passe par l'analyse du métabolome et transcriptome des transformants RNAi-GME. Cette approche intégrative est en cours de réalisation et les données qui en seront issues permettront certainement d'apporter des éléments de réponse aux nombreuses questions soulevées par la caractérisation des transformants RNAi-GME.

Perspectives du travail.

Les perspectives de ce travail de thèse sont multiples et nous porterons notre intérêt sur un certain nombre de questions, essentiellement issues de l'étude des plantes RNAi-GaLLDH et RNAi-GME. Les points suivants pourront être abordés :

1) Puisque le statut rédox du pool d'ascorbate est modifié dans les tissus de tomate étudiés, il paraît indispensable de déterminer l'état d'oxydation de ces tissus par la mesure de la teneur en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , associée à des mesures d'activité telle que l'ascorbate peroxidase qui catalyse la réduction d'une molécule d' H_2O_2 en présence d'AsA pour conduire à une molécule d' H_2O et de MDHA. En parallèle, il serait pertinent de quantifier l'expression par RT-PCR et l'activité des enzymes impliquées dans le système de recyclage de l'ascorbate, telles que les monodéhydroascorbate réductase (MDHAR), déhydroascorbate réductase (DHAR), ascorbate oxydase (AO) et glutathion réductase (GR) chez les lignées RNAi-GaLLDH et RNAi-GME les plus affectées et de les comparer avec les plantes sauvages. Cette étude pourrait être envisagée rapidement puisque les séquences de ces différentes enzymes sont dorénavant et déjà présentes dans les banques du TIGR et aucune mise au point ne serait nécessaire pour la mesure des activités correspondantes car la littérature abonde dans ce domaine.

2) Dans le cas des plantes RNAi-GaLLDH, mes données d'analyse du transcriptome démontrent qu'un certain nombre de gènes de réponse aux hormones, essentiellement l'acide abscissique (ABA) et l'éthylène, sont induits chez les plantes RNAi-GaLLDH. Chez le mutant *vtc1* d'Arabidopsis, l'augmentation de la teneur en ABA dans les plantes associée à

l'activation de gènes du développement dont l'expression est sous le contrôle d'un signal hormonal, notamment l'ABA, ont conduit Bartoli *et al.* (2003) à proposer un modèle dans lequel la variation du pool d'ascorbate influencerait sur les processus de croissance et de développement des plantes via un contrôle de la balance hormonale. Il semble intéressant de confirmer cette hypothèse dans le cas de mes plantes RNAi-GaLLDH en mesurant la teneur en ABA des feuilles et des fruits.

3) Dans le cas des plantes RNAi-GME, il me semble capital de comprendre la relation qui existe entre la réduction du pool d'ascorbate et l'effet sur la maturation du fruit. Lors de la maturation, le fruit subit d'énormes bouleversements d'ordre métabolique et structuraux souvent associés à des processus oxydatifs. Chez la tomate (mes travaux), comme chez d'autres fruits, au cours de la maturation, le fruit présente une augmentation du pool d'ascorbate et de son état redox (Rogiers *et al.* 1998; Jimenez *et al.* 2002). La raison de cette augmentation d'ascorbate réduit en relation avec la maturation de fruit n'est pas encore clairement définie; néanmoins, il est généralement admis que l'accumulation d'ascorbate dans le fruit en cours de maturation serait essentielle pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène. L'étude approfondie de la maturation des fruits des plantes RNAi-GME consisterait à aborder l'aspect "qualité nutritionnelle" du fruit en tant que source majeure en pouvoir antioxydant que ce soit la vitamine C ou bien dans le cas de la tomate, les principaux isoprénoides tels le lycopène et les carotènes. L'analyse par RT-PCR de l'expression des principaux gènes impliqués dans la synthèse des isoprénoides, dont nous disposons au laboratoire déjà des couples d'amorces spécifiques du fruit de tomate, ainsi que l'analyse plus large du transcriptome et du métabolome du fruit en phase de maturation amèneront probablement des éléments de réponse quant au rôle de l'ascorbate et de la GME au cours de la maturation. De plus, il sera très intéressant de comparer les résultats des analyses transcriptome/métabolome obtenus chez les plantes RNAi-GaLLDH avec ceux des plantes RNAi-GME.

4) L'étude des transformants RNAi-GaLLDH et RNAi-GME a démontré clairement qu'une perturbation du métabolisme de l'ascorbate affecte le développement des plantes, mais aussi celui du fruit. Or, deux intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'ascorbate, le GDP-mannose et GDP-galactose sont également des précurseurs essentiels de la biosynthèse des parois. De plus, le "blocage" de cette voie par transgénèse ne s'accompagne pas d'une modification du pool d'ascorbate dans le cas des plantes RNAi-GaLLDH, suggérant l'existence de voies alternatives chez la tomate. Pour élucider ces questions, nous envisageons une collaboration avec l'équipe dirigée par D. Rolin qui a mis en place des approches de mesures de flux dans le fruit de tomate (Rontein *et al.* 2002,

Alonso *et al.* 2005). Cette approche de biologie intégrative permettra de définir les flux *in situ* des voies interconnectées (ascorbate, parois,...) chez les plantes sauvages et de les comparer à ceux présents chez les transformants RNAi-GalLDH et RNAi-GME. La quantification des flux métaboliques dans un tissu nécessite le dosage de composés associé à des marquages isotopiques au moyen de sucre radioactif (^{14}C) ou enrichi en ^{13}C . Les mesures de radioactivité ou d'enrichissement (RMN du ^1H et du ^{13}C) permettront d'obtenir une vision dynamique du réseau métabolique spécifique de la vitamine C. L'aspect intégratif de cette étude sera renforcé par des collaborations étroites déjà initiées avec l'équipe d'A. Fernie (groupe L. Wilmítzer, Max Planck Institute, Golm ; métabolome du fruit et analyse GC-MS de composés marqués au ^{13}C) et avec l'équipe de M. Lahaye (INRA Nantes; métabolisme des composés pariétaux). En particulier, l'ensemble des données déjà acquises (caractérisation phénotypique des transformants, métabolome, transcriptome, biochimie des parois), obtenues au cours de ce travail (flux, réseaux métaboliques) pourront être intégrées et interprétées grâce à un accès privilégié au schéma intégratif des réseaux métaboliques chez la tomate développé par l'équipe d'A. Fernie à Golm.

CHAPITRE IV
MATERIEL ET METHODES

Matériel et Méthodes

I. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

1. Matériel végétal et conditions de culture.

Différentes variétés de tomate ont été utilisées au cours de ma thèse, mais la plus grande partie des travaux portent sur la tomate cerise *Solanum lycopersicum* Mill. var. *cerasiformae* cv. West Virginia 106 (WV106) notamment pour la génération de plantes transgéniques. Les fruits de tomate sont récoltés à différents stades de développement déterminés selon le nombre de Jours Après Anthèse (JAA) et le diamètre des fruits. Les graines, préalablement décontaminées en surface pendant 20 min en présence d'hypochlorite de calcium 4% (p/v) et rincées à l'eau, sont semées sur un milieu de germination (**tableau 3**). Les plantules de tomate sont cultivés en terre (mélange de terreau et de vermiculite dans les proportions 2:1) sous une photopériode de 14h/10h (jour/nuit) à des températures de 25°C/20°C (jour/nuit).

2. Souches bactériennes et milieux de culture.

Les différentes souches de bactéries ainsi que leur génotype respectif sont :

Les souches XL1-blue d'*Escherichia coli* (*recA1*, *hsdR17*, complémentation *lacZa*, Stratagene) et DH5a™ (U169*recA1*, *hsdR17*, complémentation *lacZa*, Invetrogen) sont utilisées pour l'amplification des vecteurs de clonage et des plasmides recombinants utilisés dans cette étude.

La souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* (*Vir*, *chlo*^R, *rif*^R, Hernould (communication personnelle)) est utilisée comme vecteur de transformation pour générer les plantes transgéniques. Elle possède un plasmide Ti « Tumor inducing » désarmé possédant les gènes de virulence *Vir* qui permettent le transfert de l'ADN de transfert (ADN-T) dans le noyau et son insertion dans l'ADN génomique des cellules végétales.

Toutes les souches bactériennes sont cultivées dans du milieu LB [Bactotryptone 1% (p/v) ; extrait de levure 0,5% (p/v) ; NaCl 1% (p/v)] en présence ou non d'antibiotique et à la température de 37°C pour les souches DH5a™ et *E. coli* et de 28°C pour *A. tumefaciens*.

Pour les milieux solides, 15 g.L⁻¹ d'agar bactériologique sont ajoutés. La stérilisation des milieux est effectuée par autoclavage pendant 20 min à 120°C.

Milieu de culture	Composition	Milieu de culture	Composition
MS	MS 5 g/l Saccharose 30 g/l Agar 5 g/l	Préculture ou co-culture	Milieu MS additionné de AIA 0,1 mg/l BAP 2 mg/l
Germination	MS 1,25 g/l Saccharose 8 g/l Agar 5 g/l	Régénération	Milieu MS additionné de AIA 0,1 mg/l BAP 2 mg/l 250 µg.mL/l de ticarcilline/ acide clavulanique (15:1, p/p), (Timentin, Duchefa) Kanamycine (Duchefa), 300 µg/mL

Tableau 3: Composition des différents milieux utilisés pour la culture des plantes. (MS= Murashige et Skoog, 1962)

3- Plasmides recombinants utilisés

Les vecteurs de clonage et les constructions réalisées au cours de ce travail sont décrits dans le **Tableau 4**

pGEM-T Easy :

Le plasmide pGEM®-T Easy (Promega) est utilisé pour le clonage de séquences amplifiées par la technique de PCR, au niveau du multisite de clonage situé entre les promoteurs T7 et SP6 des bactériophages correspondants. Ce multisite se situe dans le fragment d'ADN codant pour le peptide a de la β -galactosidase, permettant également une sélection des colonies recombinantes par le système blanc/bleu. Ce plasmide est utilisé pour la synthèse des sondes utilisées en hybridation *in situ*.

Plasmide recombinant utilisé pour la transformation des plantes ;

La technologie Gateway™ utilisée pour les expériences de transgénèse nécessite un vecteur d'entrée, le plasmide pDONR™201 et deux vecteurs de destination, le plasmide pK7WG2D,1 pour la sur-expression du gène candidat et le plasmide pK7GWIWG2(1),0 pour l'extinction de gène par la stratégie RNAi (**Figure 31**).

Le plasmide pDONR™201 est utilisé pour construire la cassette d'expression du transgène. Il possède les séquences attP1 et attP2 qui permettent le clonage par recombinaison du gène d'intérêt (**Figure 31**) et contient la cassette de sélection des plantes transformées conférant la résistance à la kanamycine.

Le plasmide pK7WG2D,1 est un vecteur permettant la transformation des plantes à l'aide d'*A. tumefaciens*. Il est utilisé dans le cas d'une surexpression d'un gène d'intérêt et possède un site de clonage par recombinaison situé entre les séquences attR1 et attR2 entre promoteur constitutif fort 35S et le terminateur du gène VI du CaMV. Il contient également la cassette de sélection des plantes transformées conférant la résistance à la kanamycine (**figure 31**).

Le plasmide pK7GWIWG2(1),0 est un vecteur permettant la transformation de plantes à l'aide d'*A. tumefaciens*. Il est utilisé dans le cas d'une stratégie RNAi car il possède deux sites de clonage par recombinaison (entre les séquences attR1 et attR2) qui sont en orientation inversée, le tout entre le promoteur constitutif fort 35S et le terminateur du gène VI du CaMV. Il contient également la cassette de sélection des plantes transformées conférant la résistance à la kanamycine (**figure 31**).

Le vecteur pADI a été également utilisé pour la transformation des plants de tomate lorsque la technologie Gateway™ ne donnait pas satisfaction. Ce vecteur correspond au plasmide pPZP212 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) modifié. Il renferme la cassette d'expression provenant du vecteur pDH51 (Pietrzack *et al.*, 1986), constituée par le promoteur constitutif

Gène ciblé	N° d'accession	Vecteur de destination
(1) Surexpression		
GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP2)	AY605668	pK7WG2D,1
GDP-mannose-3,5-épimérase (GME2)	TC 154450	pK7WG2D,1
GDP-mannose-3,5-épimérase <i>A. thaliana</i> (AtGME2)	AY 057660	pK7WG2D'1
L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GaILDH2)	AB080690	échec
Ascorbate oxydase (AO2)	AY971876	échec
(2)Extinction		Vecteur de destination
A- Codant		
GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP3)	AY605668	pK7WIWG2(1),0
GDP-mannose-3,5-épimérase (GME3)	TC 154450	pK7WIWG2(1),0
L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GaILDH3)	AB080690	pK7WIWG2(1),0
Ascorbate oxidase (AO3)	AY971876	pK7WIWG2(1),0
(B) Non-Codant		Vecteur de destination
GDP-mannose pyrophosphorylase (GMP4)	AY605668	pK7WIWG2(1),0
GDP-mannose-3,5-épimérase (GME4)	TC 154450	pK7WIWG2(1),0
L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GaILDH4)	AB080690	pK7WIWG2(1),0
Ascorbate oxidase (AO4)	AY971876	pK7WIWG2(1),0

Tableau 4: Les vecteurs de destination sont utilisés pour la sur-expression et l'extinction de gènes cibles codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de l'acide ascorbique et pour l'ascorbate oxydase.

fort 35S du CaMV, d'un multisite de clonage en aval du promoteur, permettant l'insertion de la séquence codante du gène étudié, et du terminateur de transcription du gène VI du CaMV. Le plasmide pPZP212 porte également la cassette de sélection des plantes transgéniques (Kan^R).

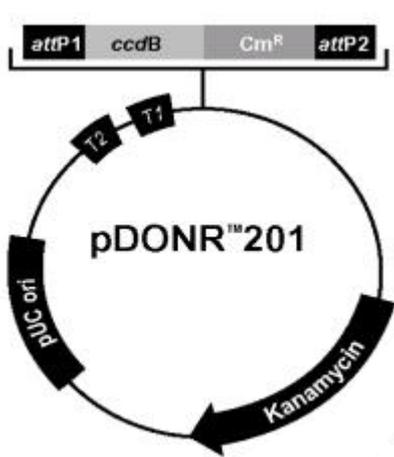
II MÉTHODE D'ANALYSE HISTOLOGIQUE.

1- Protocole expérimental de marquage histochimique pour la localisation de l'ascorbate

La localisation de l'AsA est effectuée selon la méthode décrite par Chinoy (1969). Des tranches de fruit de (20 JAA) d'environ 2 mm d'épaisseur sont placées dans une solution acidifiée de nitrate d'argent (AgNO₃) contenant 5 g cristal de la nitrate d'argent, 34 mL H₂O, 66 mL alcool absolu et 5 mL acide acétique et maintenues à l'obscurité à 4°C. Dans ces conditions, seul l'ascorbate sous sa forme réduite (AsA) est capable de réagir avec les ions de nitrate d'argent. Après 24-48h d'incubation, les tranches de fruit sont lavées trois fois avec une solution alcoolique d'ammoniaque (50%) pendant 15 minutes (5 mL liqueur d'ammoniac et 95 mL 70% ethanol). Les étapes qui suivent jusqu'à l'inclusion des coupes sont réalisées à l'aide de l'automate Citadel 1000 (Shandon). Les premières étapes consistent en plusieurs déshydratations successives dans des bains d'alcool de concentration croissante de 50 à 100%. Après la déshydratation alcoolique a lieu l'imprégnation par un solvant de la paraffine (Histosol Plus) suivie d'une inclusion dans la paraffine à 65°C. Une fois refroidis, les blocs de paraffine contenant les coupes sont débités en rubans de 8 µm grâce à d'un microtome (Shandon) et déposés sur des lames de verre et sont recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck). Enfin, l'observation des lames est réalisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot et les images sont enregistrées à l'aide d'une camera digitale (Sony DKC CM30).

Le procédé histochimique pour détecter l'AsA dans les tissus végétaux est basé sur le fait que l'ion d'argent (Ag⁺) est un excellent accepteur d'électron et AsA est un excellent donneur d'électron. Quand l'ion Ag⁺ est réduit, l'argent métallique formé précipite en tant que granules foncés facilement détectable en microscopie. En général, d'autres composés présents dans la cellule peuvent réduire les ions Ag⁺. Afin de palier à ce problème, la réaction est réalisée à basse température (0 – 3°C) et pH acide (2 – 2,5), dans ces conditions de faibles énergie d'activation, seul l'AsA peut réduire les ions Ag⁺ (Chenoy 1969).

A- Vecteur d'entrée (pDONAR™201)



PDONR™201 de 4470 nucléotides:

nnB T2 séquence de terminaison de transcription	73-100
nnB T1 séquence de terminaison de transcription	232-275
Site d'amorce sens recommandé	300-324
attP1	32-563
ccdB gène (c)	959-1264
gène de résistance au chloramphénicol	1606-2265
attP2 (c)	2513-2744
Site d'amorce antisens recommandé	2769-2792
Gène de résistance à la kanamycine	2868-3677
Origine pUC	3794-4467

(c) = brin complémentaire.

B- Vecteurs de destination :

(1) pK7WG2D,1

(2) pK7GWIWG2(1),0

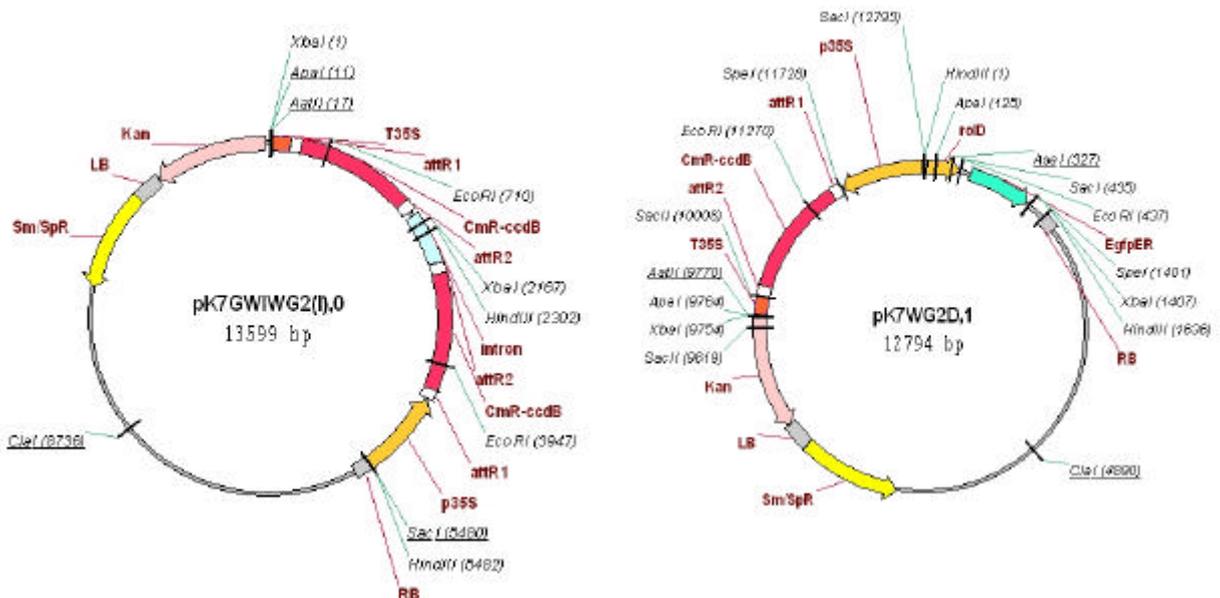


Figure 31. Vecteurs de clonage du système Gateway™ utilisés au cours de cette étude.

(A) Vecteur d'entrée (pDONAR™201).

(B) Vecteurs de destination (1) sur-expression pK7WG2D,1 et (2) extinction (RNAi) pK7GWIWG2(1),0.

2- Méthode de détection *in vivo* de l'H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂, est détecté visuellement dans les feuilles de plantes grâce à l'utilisation du substrat 3,3-diaminobenzidine (DAB) selon la méthode décrite par Thordal-Christensen *et al.* (1997). La technique consiste à immerger les feuilles de tomate fraîchement excisées dans une solution à 1 mg/ml de DAB, à pH 3.8, pendant 12 h à température ambiante à l'abri de la lumière. Par la suite, la solution de DAB est éliminée et remplacée par une solution alcoolique d'éthanol 96%. Le mélange est porté à ébullition pendant 10 min, la solution est éliminée et cette étape est répétée plusieurs fois. Ce traitement a pour but de décolorer les feuilles par extraction des pigments chlorophylliens principalement, seul le produit brun foncé produit par la polymérisation du DAB avec l'H₂O₂ persiste dans les tissus. Les feuilles sont ensuite séchées sur papier absorbant et photographiées à l'aide d'une camera digitale (Sony DKC CM30).

3- Méthode d'analyse de la taille des cellules

3.1- Méthode d'analyse de la taille des cellules du péricarpe du fruit de tomate

A partir de fruits à 20 JAA, des tranches de 2 mm d'épaisseur environ sont préparées à l'aide d'une lame de rasoir préalablement dégraissée à l'éthanol. Les tranches sont immédiatement immergées dans une solution de fixation froide (2,5% glutaraldéhyde et tampon phosphate 100 mM pH 7.2) et dégazées doucement pendant environ 3 h. Les tranches sont ensuite rincées 3 fois dans le tampon phosphate. Ensuite le tampon phosphate est remplacé par de l'eau distillée, la déshydratation est réalisée grâce à une série de bains d'éthanol à 30, 50, 70, 85, et 95% de 15 min et se termine par 3 bains de 15 min dans de l'éthanol 100%.

Les étapes d'inclusion sont réalisées en utilisant la résine Technovit 7100 (Kulzer) qui se compose de :

- a - une résine de base
- b- un durcisseur I (peroxyde de benzoyle)
- c- un durcisseur II

Après la dernière étape de déshydratation, l'éthanol 100% est remplacé par un mélange d'éthanol 100% et de résine de base (v/v) pendant 2 h minimum à température ambiante. Puis, on réalise une solution de préparation contenant 100 mL de résine de base et 1g de Durcisseur I en agitant doucement le mélange. Les échantillons sont alors immergés dans cette solution afin de s'imprégner de la résine pendant toute une nuit. L'inclusion proprement dite des échantillons se fait à l'aide de tubes PCR de 0,5 mL. La

solution de l'inclusion est préparée extemporanément et contient, 15 mL de solution de préparation et 1 mL de durcisseur II. Cette solution est maintenue dans la glace tout au long de l'inclusion afin d'éviter une polymérisation trop rapide. Le péricarpe de fruit est déposé dans le couvercle du tube, orienté de façon à être coupé parallèlement à la surface du couvercle. Environ 0.3- 0,4 mL du mélange d'inclusion sont versés sur l'échantillon, le tube est fermé, retourné et laissé à température ambiante sur une nuit ou jusqu'à polymérisation complète.

Une fois inclus, les blocs contenant les tranches de péricarpe sont débités à l'aide d'un microtome (Reichert 2040) puis les coupes de 3 μm d'épaisseur sont déposées sur des lames de verres, colorées au bleu de toluidine pendant quelques minutes et lavées à l'eau. Les lames sont ensuite mises à sécher pendant quelques minutes sur une plaque chauffante à 50 °C, puis elles sont recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck) et sont laissés une nuit à sécher. Par la suite, l'observation des lames est réalisée à l'aide d'un microscope Zeiss Axiophot et les images sont enregistrées à l'aide d'une camera digitale. L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel Image Pro Plus (Media Cybernetics). L'épaisseur de péricarpe, le comptage des cellules et les surfaces moyennes de cellules sont mesurés dans une région du péricarpe située entre deux vaisseaux.

3.2. Méthode d'analyse de la taille des cellules épidermiques de feuille.

Afin de comparer la croissance des feuilles des plantes transformants avec celle des plantes témoins, il a été nécessaire dans un premier temps de repérer l'apparition des très jeunes feuilles au niveau de l'apex des plantes. Ce travail a consisté à baguer la feuille trois de l'apex et dans un deuxième temps d'attendre 3 semaines pour que cette jeune feuille soit complètement développée. Les mesures ont été réalisées sur les trois dernières folioles de chaque feuille car généralement ce sont elles qui présentent le moins de défaut de développement et sont les mieux exposées à la lumière. L'expérience a consisté à étaler sur la surface ad-axiale de la foliole à l'aide d'un pinceau une fine couche de collodion. L'éther contenu dans ce vernis s'évapore très rapidement et laisse sur la surface une pellicule translucide ou empreinte qu'il est possible de détacher délicatement de la foliole à l'aide d'une pince et placé dans un tube Eppendorf à température ambiante avant analyse. Au niveau de l'échantillonnage, les empreintes ont toujours été réalisées sur des zones identiques de folioles *i.e.* à l'extrémité de la foliole de part et d'autre de la nervure centrale pour les deux types de plantes. Après séchage, environ 1 cm^2 d'empreinte de collodion est placé entre lame et lamelle dans une goutte d'eau. Les observations sont réalisées avec un microscope Zeiss Axioplan (grossissement 10X), la capture des images est faite avec une caméra numérique (Sony DKC-CM30). Les images sont ensuite traitées à l'aide du logiciel ImagePro-Plus (Media Cybernetics) qui permet de déterminer de façon plus ou moins

automatique et rapide les surfaces cellulaires. Plus de 200 photos ont été ainsi analysées chacune représentant entre 300 et 750 cellules mesurées, et les données de surface obtenues ont analysées au niveau statistique à l'aide du test *t* de Student.

III. CYTOMÉTRIE EN FLUX

1- Extraction des noyaux des cellules de feuilles de tomate

Pour déterminer la ploïdie des plantes de tomate transformées, les noyaux sont préparés à partir de feuilles de tomate. Les feuilles sont placées dans une boîte de Pétri et sont lacérées à la lame de rasoir une trentaine de fois dans 2 mL de tampon de Galbraith froid. Les échantillons sont alors filtrés à travers un film de nylon (taille des pores, 30 µm) (Tetko Inc., New York, USA). La suspension de noyaux est conservée à 4°C en présence de formaldéhyde 1% (v/v).

2- Analyse par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux permet de mesurer rapidement plusieurs paramètres sur des cellules ou des noyaux isolés. Les noyaux individualisés défilent à grande vitesse dans un flux liquide devant une source lumineuse, généralement un rayon laser. Chaque noyau, grâce à un marquage préalable au DAPI, va émettre une fluorescence de longueur d'onde toujours supérieure à celle du laser. La fluorescence diffusée dans l'axe va permettre de quantifier la taille de l'objet. La fluorescence à 90°C permet d'évaluer l'intensité de fluorescence de l'objet. Ces deux fluorescences sont séparées par un réseau optique pour être envoyées sur différents photomultiplicateurs pouvant donner une réponse linéaire ou logarithmique. Les signaux analogiques en résultant sont analysés par ordinateur.

Ainsi chaque particule ayant traversé le laser va être associée à deux paramètres : sa taille et son intensité de fluorescence. Le système informatique associé au cytomètre permet de traiter les signaux pour les représenter sous formes d'histogrammes de populations de noyaux.

Les mesures de cytométrie en flux sont réalisées sur 10^4 noyaux avec un appareil Partec GmbH (Münster, Allemagne).

IV. MÉTHODES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLÉIQUES.

1. Extraction des acides nucléiques.

1.1. Extraction d'ADN génomique de feuille de tomate.

L'ADN génomique de feuille est extrait selon deux méthodes sensiblement différentes selon l'analyse moléculaire réalisée ensuite (Southern blot, PCR).

Selon la méthode de Murray et Thompson (1980), les feuilles de tomate sont broyées à l'aide d'un pilon dans un mortier en présence d'azote liquide. Le broyat (2-5 g) est ajouté à un tube contenant 25 mL de tampon d'extraction préchauffé à 65°C (Tris-HCl 220 mM pH 8, EDTA 22 mM pH 8, NaCl 800 mM, Sorbitol 140 mM, CTAB 12 mM et Sarcosyle 1%). Le mélange est homogénéisé en agitant énergiquement, il est incubé à 65°C pendant 20 min, puis placé sur la glace pendant 30 min. Un volume de 10 mL de chloroforme est ajouté au tube et le tout est mis en agitation durant 20 min. Après centrifugation (20 min, 6000 g), la phase aqueuse est récupérée et mélangée à 17 mL d'isopropanol dans un nouveau tube. Le mélange est laissé sur la glace pendant 20 min puis centrifugé 15 min à 6000 g. Le culot d'acides nucléiques est séché à l'air puis repris dans 2 mL d'une solution TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). Un traitement à la RNase (20 µg/mL) est effectué suivi d'une déprotéinisation par extraction au phénol-chloroforme (1:1) suivie d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Les acides nucléiques sont ensuite précipités à l'éthanol 95% (2,5 volume) à -20°C en présence d'acétate de sodium 300 mM pH 5,7. Après centrifugation (45 min, 6000 g), le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 200 µL de TE. La concentration de l'ADN génomique est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm, la qualité de l'ADN préparé est analysée par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

Selon la méthode modifiée d'Edwards *et al.* (1991), l'ADN génomique de tomate est extrait à partir 100 mg de jeune feuille broyées quelques secondes avec un micro-pilon (Sigma Z35994-7) dans un tube Eppendorf. Puis 200 µL de tampon d'extraction sont ajoutés (Tris-HCl 0,2 M pH 7,5, NaCl 0,25 M, EDTA 25 mM et SDS 0,5% (p/v)) et homogénéisés par broyage pour quelques secondes supplémentaires. L'échantillon est centrifugé pendant 4 min à 17000 g à température ambiante. Cent quatre vingt dix µL de surnageant sont prélevés et mélangés à même volume d'isopropanol dans un nouveau tube puis agité énergiquement pendant 5 sec. Le mélange est laissé pendant 5 min à température ambiante puis centrifugé pendant 5 min à 17000 g. Le culot d'ADN séché à l'air est repris dans 90 µL d'eau et soumis à une déprotéinisation par extraction au phénol-chloroforme (1:1) suivie d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Deux µL d'ADN génomique sont ensuite utilisés comme matrice pour réaliser les expériences de PCR.

1.2. Extraction d'ADN plasmidique.

L'ADN plasmique est extrait en utilisant le kit Qiaprep® column Miniprep II (Qiagen), selon les recommandations du fournisseur. La culture bactérienne (3 mL) est sédimentée et le culot de cellules est soumis à l'extraction. L'ADN plasmique est élué dans 100 µL d'eau.

1.3. Extraction d'ARN totaux des feuilles de tomate

Pour l'extraction et la manipulation des ARN, toutes les solutions sont traitées avec 0,1% (v/v) de DEPC, un inhibiteur des ribonucléases, ou préparées avec de l'eau traitée au DEPC. Tout le matériel est nettoyé au chloroforme, séché à l'éthanol et autoclavé.

Les ARN totaux des feuilles de tomate sont extraits à partir de jeunes feuilles en utilisant le kit « NucleoSpin® ARN plant » de Macherey Nagel, selon les recommandations du fournisseur. Ce kit est particulièrement adapté pour l'extraction d'ARN totaux à partir de quantités de matière fraîche inférieures à 100 mg. Le principe d'extraction repose sur la fixation des ARN totaux à des matrices inertes (membrane de silice). L'ADN génomique contaminant est éliminé par un traitement à la DNase I directement sur la membrane. La mini-colonne est ensuite lavée ce qui permet d'éliminer les sels et la DNase I. Les ARN sont élués dans 50 µL d'eau traitée au DEPC.

1.4. Extraction d'ARN totaux de fruits de tomate

L'extraction d'ARN totaux est effectuée d'après la méthode de Verwoerd *et al.* (1989) adaptée par Chevalier *et al.* (1995). Les fruits sont broyés à l'aide d'un broyeur à bille de la marque Dangoumeau en présence d'azote liquide. Le tampon d'extraction [Phénol : (LiCl 100 mM, EDTA 10 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8, SDS 1%), 1:1] est chauffé à 80°C avant d'être ajouté à la poudre congelée (2.5 mL de tampon par gramme de poudre). Le mélange est homogénéisé au Polytron pendant 2 min à vitesse croissante. Les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation pendant 20 min à 15000 g. La phase aqueuse est récupérée et soumise à deux extractions au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). Les ARN sont ensuite précipités sélectivement pendant 4 h à 4°C en présence de LiCl 2 M. Le culot obtenu après centrifugation est repris dans 300 µL d'eau. Les ARN sont alors précipités à l'éthanol 95% (2,5 volume) à -20°C, en présence d'acétate de sodium 0,3 M pH 5.8 (0,1 volume). Le culot final est repris dans de l'eau traitée au DEPC.

La quantité et la qualité des ARN totaux sont déterminées par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm, et après analyse par électrophorèse dénaturante en gel d'agarose.

2. Electrophorèse des acides nucléiques.

2.1. Electrophorèse d'ADN.

2.1.1. Electrophorèse analytique.

L'ADN est analysé par électrophorèse horizontale non dénaturante en gel d'agarose [1% (p/v)] dans du tampon TAE 1X (Tris-HCl 40 mM pH 8, EDTA 1 mM, acétate de sodium 5 mM). Les échantillons sont additionnés de 20% volume de tampon de charge [glycérol 30% (v/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v)]. Les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV grâce à l'utilisation d'un appareil ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech) et après coloration du gel au bromure d'éthidium pendant 20 min (BET, 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.1.2. Electrophorèse préparative.

Les électrophorèses préparatives sont réalisées en gel d'agarose 1.2% (p/v). Les fragments d'ADN sont découpés au scalpel après migration et purifiés par fixation de l'ADN sur des billes de silice après dissolution de l'agarose à 50°C en utilisant le kit « QIAEX® II » de Qiagen, selon les recommandations du fournisseur.

2.2. Electrophorèse d'ARN.

Les ARN sont analysés par électrophorèse horizontale dénaturante en gel d'agarose à 1,2% (p/v). L'agarose est amené à ébullition dans l'eau, puis refroidi à 50°C et complété avec une solution FRB 1X (MOPS 20 mM pH 7, acétate de sodium 8 mM, EDTA 1 mM) et 6% de formaldéhyde. Avant d'être déposés sur le gel, les échantillons sont dénaturés pendant 10 min à 65°C en présence de 10% (v/v) de FRB 5X, 50% (v/v) de formamide et 6,5% (v/v) de formaldéhyde. Les échantillons sont maintenus dans la glace et 0,2 volume de tampon de charge [glycérol 30% (v/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v)] est ajouté. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon FRB 1X. Le gel est ensuite lavé pendant 30 min dans de l'eau avant d'être coloré dans une solution de BET à 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 15 min. Les ARN sont visualisés sous lumière UV.

3. Transfert des acides nucléiques sur membrane de nylon ou de nitrocellulose.

3.1. Transfert de l'ADN.

Le transfert d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose est effectué selon la méthode de Southern (1975). Deux techniques sont utilisées :

Transfert par Southern blot: après électrophorèse, le gel est immergé pendant 15 min dans une solution d'HCl 0,125 N (étape de dépurination), puis immergé 30 min dans la solution de dénaturation (comme ci-dessus) et enfin neutralisé 30 min dans la solution de neutralisation. Après un lavage de 10 min dans un bain de SSC 10X, les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond N⁺ dans du tampon SSC 10X pendant 16 h à température ambiante.

Transfert à sec pour les RT-PCR semi quantitative: le gel est immergé pendant 20 min dans une solution dénaturante de NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M sous agitation douce. Puis le gel est neutralisé pendant 20 min dans une solution de Tris 1 M pH 7.4 et NaCl 1,5 M. Enfin, le gel est lavé 15 min dans une solution SSC 2X (SSC 1X : NaCl 150 mM, citrate de sodium 15 mM). Le transfert de l'ADN sur membrane de nylon (Hybond N⁺, Amersham) est réalisé pendant 16 h à température ambiante.

3.2. Hybridation moléculaire.

3.2.1. Préparation de sondes radioactives.

Le marquage de l'ADN double brin est réalisé par la technique d'amorçage aléatoire multiple (Feinberg et Volgestein, 1983). La matrice (25 ng) est dénaturée par la chaleur pendant 5 min, puis conservée dans la glace. Elle est ensuite mise en contact avec un mélange d'hexanucléotides, le fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E.coli* (dépourvu d'activité exonucléase 5'-3'), et des 4 dNTP dont l'un est radiomarké. Les hexanucléotides hybridés sur la matrice constituent les amorces 3'-OH indispensables pour la synthèse du brin complémentaire radioactif, qui est réalisé à 37°C pendant 30 min.

La préparation des sondes est réalisée à l'aide du kit « PRIME-IT » (Stratagene), en utilisant 1,85 MBq (50 µCi) de précurseur radioactif, [α -³²P]dCTP (3000 Ci.mmoles⁻¹, Amersham). L'ADN radiomarké est séparé des nucléotides libres par passage sur une colonne Séphacryl S-300 (Pharmacia). La radioactivité incorporée est évaluée sur une fraction de 1 µL en présence de liquide de scintillation à l'aide d'un compteur à scintillation.

3.2.2. Hybridation.

Les hybridations sont réalisées dans un four à hybridation. Les températures de préhybridation, d'hybridation et de lavages des membranes varient selon le degré d'identité entre la sonde et l'ADN cible. En conditions optimales la température est fixée à 65°C. Les membranes de nylon ou de nitrocellulose sont préhybridées pendant au moins 2 h dans du tampon d'hybridation (**Tableau 5**). L'hybridation est effectuée pendant 16 h à la même température dans du tampon d'hybridation contenant la sonde préalablement dénaturée par la chaleur (10 min à 100°C), à raison de 10⁶ cpm/mL de tampon. Les lavages sont réalisés à la même température, deux fois 15 min dans une solution SSC 2X, SDS 0,1% (p/v) et une fois 15 min dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1% (p/v). Les membranes sont ensuite mises à autoradiographier à -80°C entre deux écrans amplificateurs.

4. Clonage moléculaire.

4.1. Enzymes de restriction et de modification.

L'hydrolyse de l'ADN au niveau de sites spécifiques par les endonucléases de restriction de type II, est effectuée dans un but analytique ou pour le clonage de fragments d'intérêt. Cette hydrolyse est réalisée en présence d'une unité d'enzyme par µg d'ADN plasmidique et de 2 à 5 unités par µg d'ADN génomique, dans le tampon préconisé par les fournisseurs. Les réactions ont lieu à la température optimale d'activité des enzymes. Les incubations varient selon la nature et la quantité d'ADN à hydrolyser, de 1 h à 6 h. Les enzymes sont inactivées par la chaleur ou par extraction au phénol-chloroforme (1:1) suivie d'une précipitation à l'éthanol 95%.

Les conditions d'utilisation des enzymes de modifications sont celles spécifiées par les fournisseurs ou déterminées à partir des protocoles décrits par Sambrook *et al.* (1989).

4.2. Préparation et transformation des bactéries *E.coli* électrocompétentes.

Les bactéries *E.coli* XL1-Blue sont étalées sur un milieu LB solide supplémenté en tétracycline 25 µg.mL⁻¹ et incubées pendant une nuit à 37°C. Une colonie est alors prélevée et utilisée pour ensemercer 10 mL de milieu LB. La préculture est soumise à agitation (200 rpm) pendant une nuit à 37°C. Deux cent mL de milieu LB sontensemencés avec 2 mL de la préculture, et placés sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600 nm} de 0,5. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées à 4°C afin d'éviter les chocs thermiques. Il s'agit d'une série de cycles de centrifugation-remise en suspension du culot de bactéries dans une

Tampon d'hybridation
Denhardt 5X SSC 6,6X SDS 0,5% (p/v) ADN de sperm de saumon dénaturé 100 µg/mL
Denhardt 50X
Ficoll 1% (p/v) Polyvinylpyrrolidone 1% (p/v) BSA 1% (p/v)
SSC 10X
NaCl 1,5 M Citrate de sodium 0,15 M

Tableau 5. Composition des solutions utilisées pour les hybridations moléculaires.

solution de glycérol 10% (v/v) avec des volumes de solution décroissants : 60 mL, 20 mL, 10 mL, 400 μ L. Les 400 μ L de bactéries sont aliquotés et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les bactéries sont conservées à -80°C.

La transformation s'effectue par électroporation en utilisant le MicroPulser™ (Bio-Rad). Les bactéries compétentes (40 μ L) sont décongelées dans la glace puis mélangées à une fraction du mélange de ligation. Le mélange est placé dans une cuve à électroporation (électrodes distantes de 0,2 cm). Le générateur est réglé pour délivrer un pulse de 1800 Volt en quelques millisecondes. Après l'impulsion électrique, les bactéries sont immédiatement transférées dans 1 mL de milieu LB et soumises à une agitation (200 rpm) pendant 1 h à 37°C. Une fraction de la culture est étalée sur un milieu LB supplémenté en antibiotique approprié, et, suivant le vecteur utilisé, le milieu LB est sélectif par la présence d'un inducteur de la β -galactosidase, l'IPTG (200 mg.mL⁻¹) et d'un substrat coloré, le X-Gal [5% (p/v)].

4.3. Préparation et transformation des bactéries *E.coli* thermocompétentes.

Les bactéries compétentes Library Efficiency® DH5a™ sont étalées sur un milieu LB solide et incubées pendant une nuit à 37°C. Une colonie est alors prélevée et utilisée pour ensemercer 10 mL de milieu LB. La préculture est soumise à agitation (200 rpm) pendant une nuit à 37°C. Cinq cent mL de milieu LB sont ensemençés avec 2 mL de la préculture, et placés sous agitation douce (200 rpm) à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600 nm} de 0,6. Toutes les étapes ultérieures sont réalisées à 4°C afin d'éviter les chocs thermiques. La culture est refroidie immédiatement dans la glace fondante et récoltée par centrifugation 10 minutes à 4°C 4000 g. Le culot est suspendu dans 250 ml CaCl₂ (100 mM) par agitation douce pendant 30 minutes, puis la suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 4000 g. Le culot est repris dans 20 mL de CaCl₂ (100 mM) froid contenant 15% de glycérol et le tout est réparti en fractions aliquotes de 200 μ L qui sont conservées à 4°C pendant 24 heures pour augmenter la compétence des cellules. Les bactéries sont ultérieurement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

La transformation s'effectue selon la méthode décrite par Sambrook *et al.* (1989). Les bactéries thermocompétentes DH5a™ (50 μ L) sont décongelées dans la glace puis mélangées à une fraction du mélange réactionnel BP ou LR (cf § IV-8.1.2 et 8.1.3). Après incubation pendant 30 minutes sur la glace, le choc thermique consiste à passer les cellules à 42°C pendant 30 secondes. 450 μ L de milieu de S.O.C (Extrait de levure 0,05% (p/v), Bactotryptone 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM et glucose 20 mM) sont ensuite ajoutés au mélange et incubés sous agitation (200 rpm) à 37°C pendant

1h. Une fraction de la culture est étalée sur un milieu LB supplémenté en antibiotique approprié.

5. Synthèse des ADNc par transcription inverse (Reverse Transcription ou RT).

Les ADNc sont obtenus par transcription inverse. Au préalable les ARN totaux sont traités à la DNase RQI (Promega) pendant 30 min à 37°C. L'enzyme est éliminée par extraction au phénol-chloroforme, suivi d'une extraction au chloroforme. Les ARN sont ensuite précipités dans l'éthanol 95% en présence d'acétate de sodium 0,3 M pH 5.8 avant d'être repris dans de l'eau DEPC.

Pour la réaction de RT, les ARN sont dénaturés à température ambiante pendant 10 min en présence de 10 mM de HMM (Hydroxy Méthyl Mercurate), puis incubés pendant 5 min à température ambiante en présence de DTT 15 mM. La réaction de transcription inverse est effectuée à 42°C pendant 60 min dans le tampon «First Strand buffer 5X, Invitrogen », en présence de 10 pmoles d'oligonucléotides (oligo-dT), de 500 µM de chaque dNTP, de 40 U de RNasin (Promega) et de 100 U de SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen). L'enzyme est ensuite dénaturée pendant 10 min à 70°C.

Une fraction de la transcription inverse est utilisée en PCR pour amplifier le fragment souhaité.

6. Amplification génique ou PCR (Polymerase Chain Reaction).

La technique de PCR décrite par Saiki *et al.* (1985) est composée de cycles d'amplification comprenant trois étapes : la dénaturation thermique de l'ADN bicaténaire matriciel, l'hybridation des amorces sur l'ADN matriciel, et la synthèse à partir des amorces, d'ADN complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable.

6.1. L'ADN matriciel.

La réaction de PCR est réalisée soit après extraction de l'ADN, soit directement sur des ADNc ou des colonies bactériennes. Pour les PCR effectuées à partir d'ADN plasmidique, génomique, entre 8 et 100 ng d'ADN sont utilisés. Pour les PCR réalisées à partir de bactéries, une colonie est utilisée. L'amplification des ADNc obtenus est effectuée par PCR à partir de 1 µL d'une dilution au dixième des produits de réaction de transcription inverse (selon Joubés *et al.*, 1999).

6.2. Mélange réactionnel.

La composition de l'essai pour un mélange réactionnel de 50 µL est la suivante :

Tampon d'incubation (Sigma) : Tris-HCl 100 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, gélatine 0,01% (p/v)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP : 200 µM de chaque dNTP

Amorces oligonucléotides : 0,4 µM

Taq ADN polymérase (Red Taq DNA polymérase, Sigma) : 1 unité

Les essais sont réalisés dans des tubes Eppendorf de 500 µL ou sur des plaques de 96 puits. Le mélange est recouvert d'huile afin d'éviter l'évaporation de l'échantillon à forte température.

Les amorces utilisées en RT-PCR sont présentées dans le **Tableau 6**.

6.3. Conditions de PCR.

Les amplifications en routine sont réalisées dans un appareil automatisé (**Crocodile II et III, Appligène**). Les amplifications en RT-PCR semi-quantitatives sont réalisées sur un appareil GeneAmp™ PCR System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA)

Le mélange est soumis à des cycles d'amplification qui comprennent une étape de dénaturation des matrices de 30 s à 95°C, une étape d'hybridation dont la durée et la température varient selon les amorces utilisées, et une étape de synthèse d'ADN par extension d'amorces réalisée à 72°C et dont la durée varie avec la taille de la molécule d'ADN à amplifier.

Dans le cas des RT-PCR semi-quantitatives, les cycles sont de 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C et 60 sec à 72°C. La quantité d'ADNc matriciel et le nombre de cycles d'amplification ont été paramétrés en fonction de la provenance tissulaire et de la quantité des ARN utilisés pour la transcription inverse ainsi qu'en fonction du couple d'amorces utilisé.

6.4. Quantification par densitométrie des résultats d'expression par RT-PCR semi-quantitative.

Le niveau d'expression des différents transcrits étudiés a été quantifié par densitométrie des spots obtenus après les expériences de RT-PCR semi-quantitative en utilisant le logiciel Quantity One développé par BioRad.

Tableau 6: Sequences des oligonucléotides utilisés pour la PCR

Nom	Sequence nucléotidique (5'....3')
GMP F2	AAAAAGCAGGCTTCAAGATGAAGGCAAC
GMP R2	AGAAAGCTGGGTCTCACATCACGATTT
GMP R3	AGAAAGCTGGGTCTCTCTACTTGCCC
GMP F4	AAAAAGCAGGCTCCAGTTCTCCTCTTC
GMP R4	AGAAAGCTGGGTCAAAAATTACACATT
GME F1	GCTGAGATGGTCCTCAGCTT
GME R1	ACCAACAGCACAACAGCAAG
GME F2	AAAAAGCAGGCTGGAGAATGGGAAGCTCTGGTGGTA
GME R2	AGAAAGCTGGGTTTTAATCAGCGTGTTGTCTGAGTT
GME F5	GTGAAGGGTGCCGATGTGTCC
GME R5	AACTCAGAGAATACCACAAATG
GME At F2	AAAAAGCAGGCTTCAGAATGGGAAC
GME At R2	AGAAAGCTGGGTTTCACTCTTTTCC
GME R3	AGAAAGCTGGGTGCTCTGCAGGCCATGCATCAGCTT
GME F4	AAAAAGCAGGCTCCAACAATGAGATTG
GME R4	AGAAAGCTGGGTGGTGCCCAACCTT
GaILDH F1	GGAGTTGATGCAGCTCATTG
GaILDH R1	GCTTTGAAACAGGCATGA
GaILDH F2	AAAAAGCAGGCTTTCAAATGCTCCGTT
GaILDH R2	AGAAAGCTGGGTTTACACAGCCTCAGAGGAAGGGAA
GaILDH R3	AGAAAGCTGGGTAAACCCTTTTATTCTCCTTATCCA
GaILDH F4	AAAAAGCAGGCTTGTTGGTTTACGTCAACTCTTTA
GaILDH R4	AGAAAGCTGGGTCCTTCAACTTAACATTCTGAACAA
AO F2	AAAAAGCAGGCTACATGGTTGAGCATGATTTTCATC
AO R2	AGAAAGCTGGGTTTTAAGGCCTGTGGAACCTTTTAC
AO R3	AGAAAGCTGGGTATGATCATATGAAAATGGCTCTAA
AO F4	AAAAAGCAGGCTTTCTATAACATTATTGTCCAAAAC
AO R4	AGAAAGCTGGGTAGCAGCAAAGAGGGAAATTTTATT
Act F2	TGGCATCATACTTTCTACAATG
Act R2	CTAATATCCACGTCACATTTTCAT
13935 F	GCTCAACACATGAGCGAAAC
13935 R	CGCACAATCCCACTATCCTT
13864 F	TAGAGGGCCCGACGTC
13864 R	TTTGGAGAGGACTGCAGGACG

Amplification d'un fragment ciblé (F= sens et R= antisens) : (1) GDP-mannose pyrophosphorylase (**GMP**) ; (2) GDP-mannose 3',5'-épimérase (**GME**) ; (3) L-galactono-1,4-lactone déshydrogenase (**GaILDH**) ; (4) Ascorbate oxidase (**AO**) ; (5) Actine (**Act**) ; (6) vecteurs de destination ;(A) sur-expression pK7WG2D,1 (**13864**) ; (B) silencing par (RNAi) pK7WIWG2(1),0 (**13935**).

7. Hybridation in situ.

L'hybridation in situ est effectuée sur des coupes de jeunes fruits en phase de division cellulaire (7 JAA) et d'expansion cellulaire (20 JAA), des jeunes feuilles, des méristèmes apicaux, floraux et racinaires, selon le protocole décrit par Cox et Golberg (1988) modifié.

7.1. Préparation des sondes ARN sens et antisens marquées à la digoxygénine.

Des fragments PCR de 596 et 506 pb correspondant respectivement à une partie de la séquence codante et 3' non codante de l'ADNc codant pour la GDP-D-mannose épimérase (GME) et la Galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalLDH) sont amplifiés en utilisant les amorces GMEF1 (position 887-906) - GMER1 (position de 1463 à 1482), et GalLDHF1 (position 1404-1423) - GalLDHR1 (position de 1892 à 1909) (**Tableau 6**). Les produits d'amplification sont purifiés sur colonne (QIAquick PCR purification Kit, Qiagen) après électrophorèse préparative, puis clonés dans le vecteur pGEM-T Easy (Promega). La souche *E. coli* XL1-Blue est alors transformée avec chacune de ces constructions. Les clones positifs contenant l'insert sont sélectionnés par le système blanc-bleu. La présence des promoteurs T7 et SP6 de part et d'autre du multisite de clonage du vecteur pGEM-T Easy permet d'orienter l'insert. Le promoteur T7 est utilisé pour la synthèse des transcrits sens qui sont utilisés comme control négatif d'hybridation aux ARN du gène d'intérêt exprimé dans les tissus, tandis que le promoteur SP6 est utilisé pour la synthèse des transcrits antisens (**Figure 32**). L'incorporation d'UTP couplé à la digoxygénine (Dig-11-UTP) permet le marquage des sondes.

Les fragments linéarisés sont purifiés après électrophorèse préparative. Le marquage des sondes est effectuée grâce à Kit de Transcription in vitro (Roche Biochemicals) dans un mélange réactionnel de 20 µL composé de 1 µg d'ADN plasmidique linéarisé, de Tris-HCl 40 mM pH 8, de MgCl₂ 6 mM, de DTT 10 mM, de spermidine 2 mM, d'ATP, CTP, GTP (1 mM chacun), d'UTP 0,65 mM, de Dig-11-UTP 0,35 mM et de 40 U des ARN polymérases correspondantes. L'incubation est effectuée dans un thermocycleur durant 4 h à 37°C. La réaction est stoppée par addition de 5 µL d'EDTA 0,2 M pH 8. Les ARN synthétisés sont précipités en présence de 2,5 µL de LiCl 4 M et de 3 volumes d'éthanol absolu pendant 45 min à -80°C, lavés à l'éthanol 70%, séchés à température ambiante puis repris dans 20 µL d'eau DEPC. Les concentrations d'ARN synthétisés sont déterminées par comparaison à une gamme étalon d'ARN témoin.

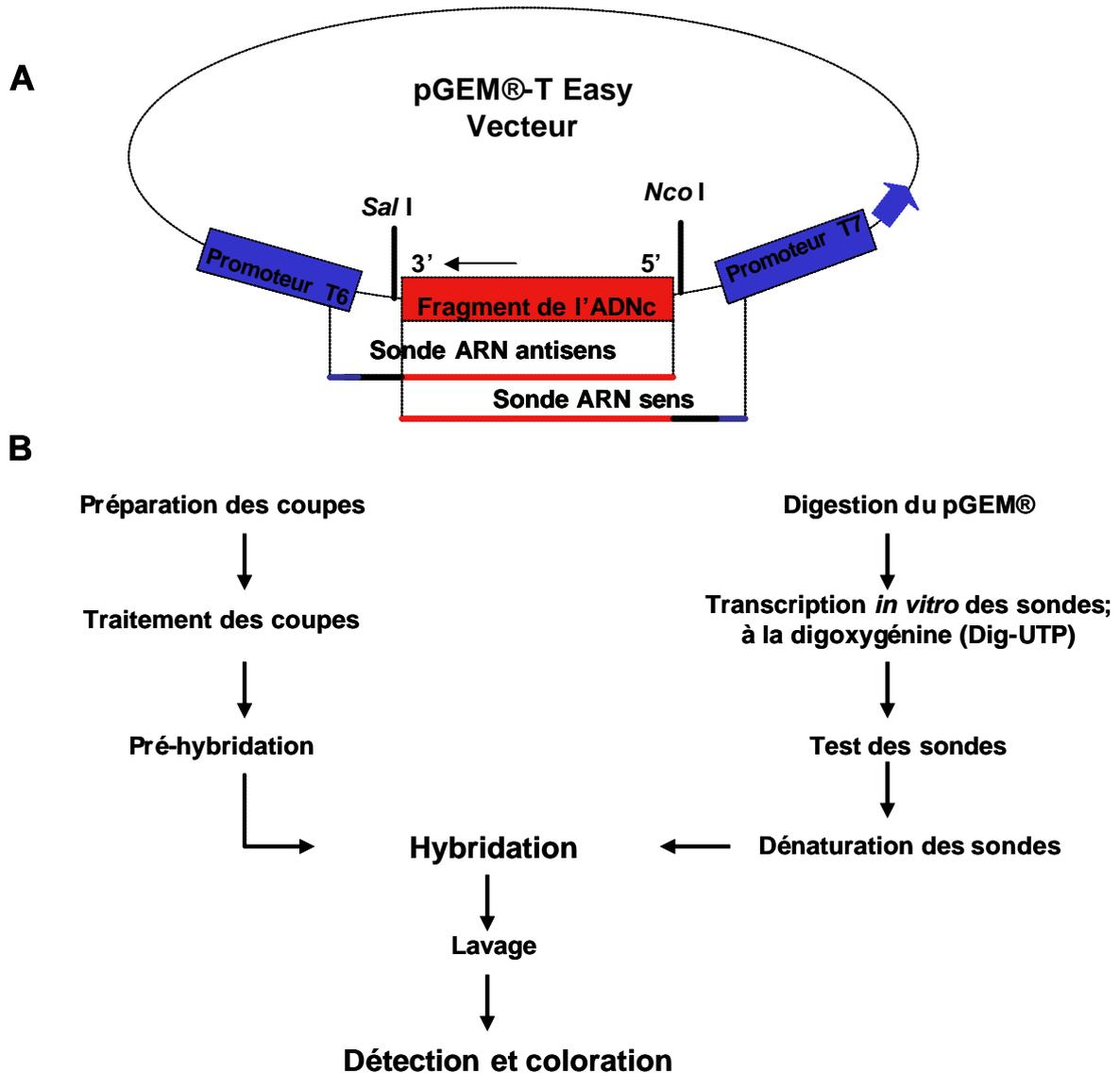


Figure 32. Principe de la technique d'hybridation *in situ*.

A. Carte de restriction simplifiée du plasmide pGEM®-T Easy utilisé pour la transcription *in vitro* des sondes ARN sens et antisens.

B. Protocole d'hybridation *in situ*.

7.2. Préparation des lames et lamelles.

Les lames de verre sont dégraissées dans un mélange alcool/éther (1:1), ensuite passées au four à 200 °C durant 2 h. Par la suite, elles sont trempées dans une solution d'APES (3-Aminopropyltriethoxy silene, Sigma) 2% (v/v) dilué dans l'acétone, ensuite dans une solution d'acétone et enfin rincées 2 fois dans de l'eau traité au DEPC. Les lames sont séchées pendant une nuit dans une étuve à 60°C.

Les lamelles sont siliconées par immersion dans une solution de Sigmacote (Sigma), rincées 3 fois dans de l'eau distillée puis traitées pendant 2 h à 200°C, dans un four Pasteur.

7.3. Préparation du matériel biologique.

Les solutions de fixation et celles essentielles au traitement des coupes (sauf les solutions d'alcool, d'Histosol Plus (CML) et de paraffine (ParaplastPlus, Sigma) sont préparées extemporanément.

Le matériel végétal est plongé dans une solution de fixateur FAA [formaldéhyde 4% (p/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 5% (v/v)]. La fixation se déroule à température ambiante pendant 4 h. La solution est renouvelée toutes les heures et à chaque fois le matériel est soumis au vide pendant 15 min. Les étapes qui suivent jusqu'à l'inclusion sont réalisées à l'aide de l'automate Citadel 1000 (Shandon): déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante de 50 à 100%, imprégnation par un solvant de la paraffine (Histosol Plus) ensuite par la paraffine à 65°C. Les blocs de paraffine sont effectués à l'aide d'un appareil à inclusion (Shandon), débités en rubans de 8 µm grâce à d'un microtome (Shandon) et déposés sur des lames de verre préalablement traitées comme décrit dans le paragraphe précédent. Les préparations sont ensuite séchées dans une étuve à 45°C pendant 24 h.

7.4. Déparaffinage et réhydratation des coupes.

Les lames sont tout d'abord déparaffinées par 3 bains successifs d'Histosol Plus pendant 10 min, puis rincées dans 2 bains d'alcool 100% pendant 10 min. Les opérations de réhydratation sont réalisées dans des bains d'alcool 95, 70, 50 et 30% pendant 1 min chacun. Les lames sont subséquemment placées dans 3 bains successifs de PBS 1X pendant 5 min chaque fois, et enfin dans un bain de SSPE 2X pendant 10 min.

7.5. Préhybridation, et hybridation.

Une solution de préhybridation (formamide 50% (v/v), SSPE 4X, Dextran sulfate 10%

(p/v), Denhardt 1X, ARNt de levure 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ADN de sperme de saumon 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ soniqué et dénaturé 10 min à 100°C) est déposée sur les coupes à raison de 150 μL par lame. La préhybridation se déroule pendant 1 h, dans une chambre humide, à température ambiante. Les préparations sont ensuite rincées dans un bain de SSPE 2X. Cent μL de la solution de préhybridation contenant maintenant 50 ng de sonde marquée et dénaturée 10 min à 80°C sont déposés sur chaque lame. Les lames sont recouvertes d'une lamelle siliconée puis placées dans un incubateur (modèle SM30, Merck Eurolab) à 45°C, en atmosphère humide, pendant une nuit.

7.6. Lavages et détection immunologique.

Après hybridation, l'excès de sonde et les hybrides aspécifiques sont éliminés par des lavages de 30 min à température ambiante dans du SSPE à concentration saline décroissante (2X puis 1X et 0,5X), ensuite les préparations subissent un dernier lavage à 55°C dans du SSPE 0,5X. Suite à ce lavage, les lames sont soumises à un dernier lavage en SSPE 0,5X pendant 30 min, à température ambiante. L'étape de détection immunologique à l'aide d'anticorps anti-digoxygénine (Roche Biochemical) nécessite des traitements préalables des lames. Elles sont immergées 2 fois dans du tampon 1 (Tris-HCl 100mM, NaCl 150 mM) à température ambiante pendant 5 min, et 1 fois 30 min dans une solution de BSA [Triton X-100 0,3% (v/v), BSA 2% (p/v)] préparée dans du tampon 1, à température ambiante. Cent cinquante μL de la solution d'anticorps diluée au 1/500 dans du tampon BSA sont déposés sur chaque lame. L'incubation dure une nuit à 4°C. L'excès d'anticorps est éliminé dans deux bains successifs de 15 min dans 200 mL de tampon 1 suivis de 2 rinçages de 5 min en tampon 3 (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl_2 50 mM), à température ambiante sous agitation douce. Cent cinquante μL de la solution de NBT/BCIP (Roche Biochemical) (respectivement 450 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 175 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dilués dans du tampon 3) sont déposées sur les coupes qui sont alors placées à l'obscurité. La réaction de coloration, se traduisant par l'apparition d'une coloration rouge-violet est arrêtée par rinçage dans un bain d'eau distillée. Les lames sont mises à sécher une nuit à température ambiante et les préparations sont recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'Entellan (Merck).

8. Méthode de transgénèse et d'analyses des plantes transgéniques.

8.1. Construction des vecteurs de transformation selon la Technologie Gateway™.

Le clonage des séquences des gènes d'intérêt de tomate est réalisé grâce à la technologie Gateway™ développée par Invitrogen. Cette technologie, basée sur les

propriétés de reconnaissance de sites spécifiques sur le chromosome d'*Escherichia coli* et de recombinaison au niveau de ces sites par le bactériophage lambda (Landy 1989), a été adaptée pour permettre le clonage de séquences d'ADN dans des vecteurs plasmidiques (<http://www.invitrogen.com>). La recombinaison a lieu entre les sites spécifiques de recombinaison att (att : site-specific attachment), attB sur le chromosome d'*E. coli* et attP sur le bactériophage lambda. La recombinaison consiste en un échange suivi d'une ligation de deux brins d'ADN pour donner un nouvel ADN, elle implique plusieurs protéines qui se fixent sur les sites att. Cette technologie fournit donc un moyen efficace et rapide pour intégrer une séquence d'ADN possédant les sites attB dans un vecteur intermédiaire dit d'entrée possédant les sites attP. Une fois intégrée dans le vecteur d'entrée, il est possible d'utiliser le même principe pour transférer cette séquence dans de multiples vecteurs dits de destination possédant les sites att (**figure 33**). Les vecteurs de destination varient selon la construction que l'on souhaite réaliser (surexpression, sous-expression par RNAi, fusion gène rapporteur, etc...) Dans mon travail, j'ai utilisé deux types de vecteurs de destination fournis par l'Université de Gent : Les vecteurs pK7WG2D,1 pour la surexpression et pK7GWIWG2(1),0 pour la sous-expression.

8.1.1. Obtention des séquences d'ADN pour le clonage Gateway.

La séquence du gène d'intérêt est obtenue par une première PCR dans laquelle on utilise comme matrice les ADNc de fruit de tomate issus de RT en présence des amorces sens et antisens définies dans le **tableau 6** Pour la surexpression d'un gène d'intérêt, l'ADNc pleine longueur est choisi. Pour la sous-expression, une région de 482 à 517 pb située en 5' de l'ADNc ainsi qu'une région de 123 à 163 pb située en 3' dans la partie non traduite de l'ADNc sont sélectionnées (**figure 34**). Les conditions de PCR sont celles définies par le fournisseur du kit Ex Taq™ (TaKaRa Bio INC, Japan). La réaction est réalisée dans un volume total de 25 µl contenant 0.1 µL produit du RT, 5 pmol d'amorces du gène d'intérêt, 2 U de polymérase Ex Taq d'ADN (TakaRa), 2.5 µL tampon de réaction, 0.1 mM de MgCl₂, et 0.2 mM de dNTP. Après dénaturation à 94°C pendant 3 min, l'amplification a été réalisée par 30 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à (T_m-2°C) et 1 min/kb de gène cible à 72°C, suivi d'une étape de synthèse d'ADN par extension d'amorces réalisée à 72°C pendant 5 min. Les produits d'amplification PCR obtenus sont purifiés après électrophorèse préparative grâce à l'utilisation du kit QIAGEN, QIAE X®II.

Afin d'ajouter les sites attB à la séquence d'intérêt, lors d'une seconde PCR on utilise comme matrice le fragment d'ADN purifié précédemment, en présence de nouvelles amorces sens et antisens comprenant en 3', une séquence spécifique de la séquence de l'ADN d'intérêt et, en 5', une séquence spécifique de 12 bases notée attB1 et attB2 pour l'amorce antisens comme indiqué ci-dessous.

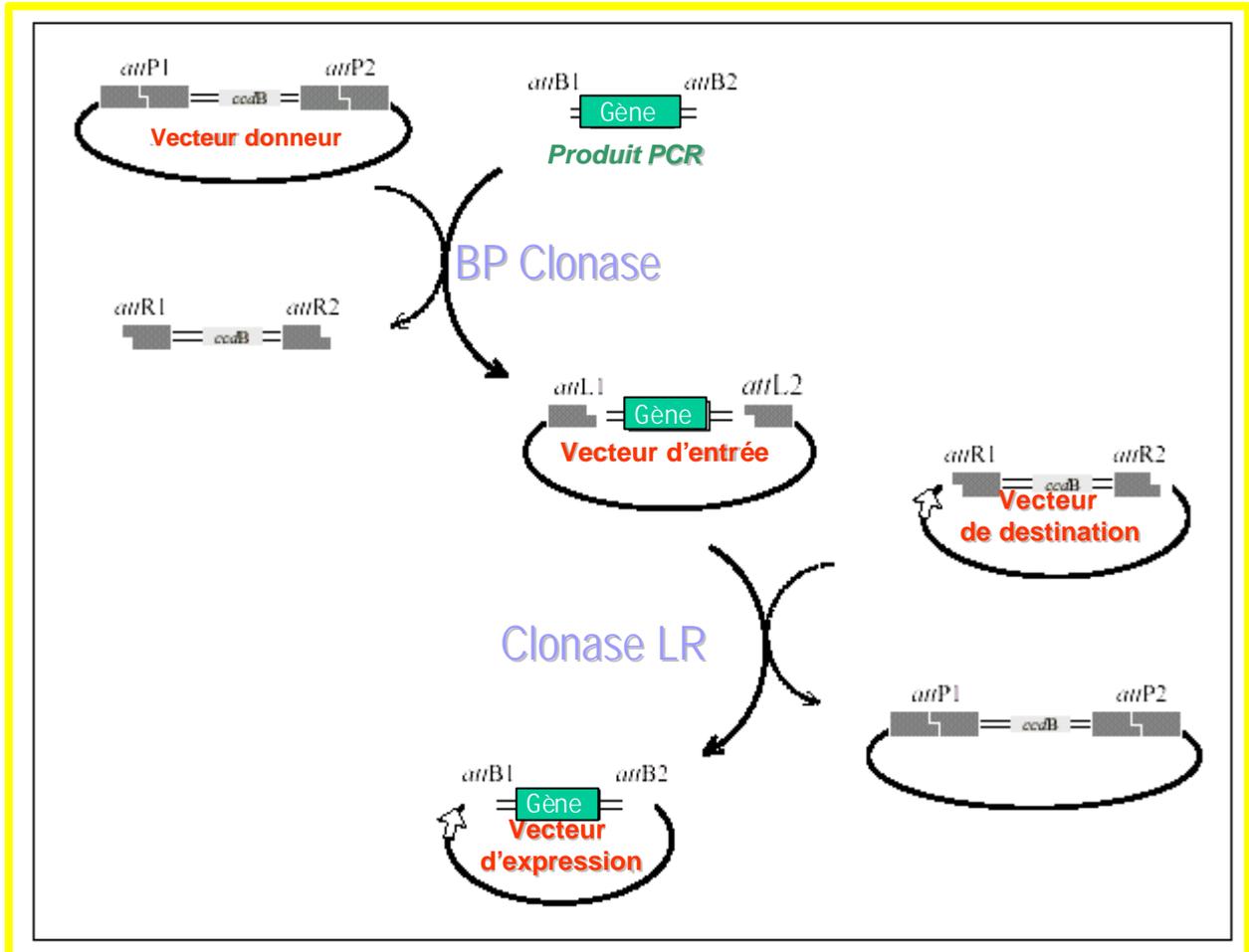


Figure 33. Représentation schématique du système Gateway™. attP, attB, attR et attL sont des sites de recombinaison.

Abréviation : *ccdB*, gène codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches bactériennes

attB1: AAAAAGCAGGCT - amorce sens du gène d'intérêt

attB2: AGAAAGCTGGGT - amorce antisens du gène d'intérêt

La réaction d'amplification PCR est réalisée dans volume total de 25 μ L contenant 2 U de polymérase Ex Taq d'ADN (TakaRa), 10-100 ng de produit PCR n°1, 10 pmol de chaque amorce (attB1, attB2), 2.5 μ L tampon, 0.1 mM MgCl₂, et 0.2 mM de dNTP. Cette PCR comprend deux étapes d'amplifications distinctes. Après dénaturation à 94°C pendant 3 minutes, la première étape comprend 5 cycles de 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 45°C et 1 minute/kb de gène cible à 72°C, suivi d'une deuxième étape de 25 cycles de 15 secondes à 94°C, 30 secondes à (T_m - 2°C) et 1 minute /kb de gène cible à 72°C. Une étape de synthèse d'ADN par extension d'amorces réalisée à 72°C pendant 5 minutes termine la réaction. Les fragments attB-PCR sont purifiés après électrophorèse préparative grâce à l'utilisation du kit QIAGEN, QIAEX®II.

8.1.2. Réaction de recombinaison BP.

Le clonage du fragment attB-PCR purifié dans le vecteur d'entrée pDONR™ 201 est réalisé grâce à la réaction de recombinaison BP selon le protocole du fournisseur. La réaction comprend 4 μ L tampon de réaction BP, 30-300 ng du produit PCR d'attB, 150 ng pDONR™ vecteur (vecteur d'entrée), 4 μ L d'enzyme BP clonase pour un volume final de 20 μ L complété par du tampon TE. La réaction est incubée pendant 24 h à 25°C. 1 μ L de cette réaction est utilisé pour transformé 50 μ L de cellules thermo-compétentes DH5a™. Après le choc thermique (**cf § IV-4.3**), 20 μ L de la culture sont étalés sur du milieu LB agar complémenté en kanamycine à 50 μ g/mL

La sélection des clones ayant intégré la construction est réalisée après PCR sur colonie en utilisant les amorces spécifiques de l'insert. En parallèle, les colonies sont mises en culture dans un milieu LB liquide contenant 50 μ g/mL de kanamycine à 37°C sur une nuit. L'ADN plasmidique est extrait en utilisant le kit QIAprep® Column Miniprep (Qiagen) selon le protocole du fournisseur et dosé au spectrophotomètre. Pour confirmer l'intégration dans le pDONR™ 201 et la taille de l'insert, l'ADN plasmidique est digéré par les enzymes de restriction *HincII* et *PstI*.

8.1.3. Réaction de LR

Cette réaction permet la recombinaison de la séquence d'intérêt dans le vecteur de destination (Surexpression ou RNAi). La réaction (5 μ L) comprend 1 μ L du vecteur d'entrée

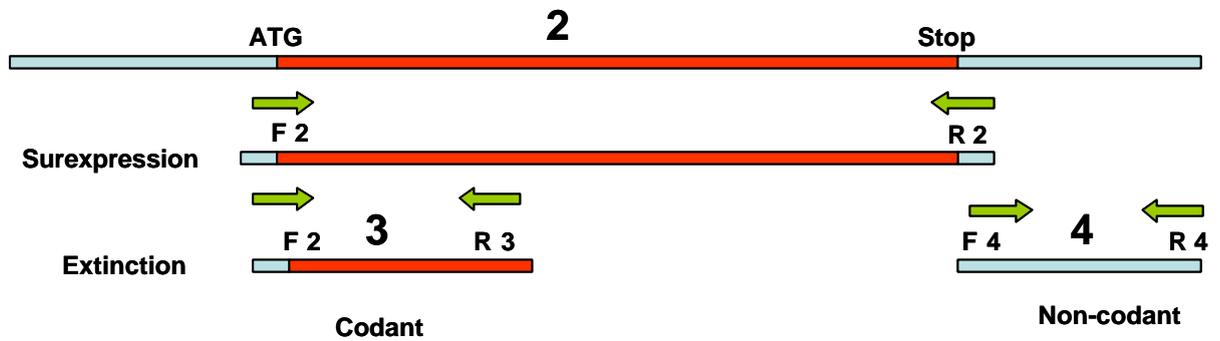


Figure 34. Les régions amplifiées par PCR. Pour la sur-expression, la pleine longueur de la région codante a été amplifiée (2). Pour le silencing de différents membres d'une famille de multigènes, une région conservée de la séquence codante a été amplifiée (3). Pour cibler un gène spécifique, la région 3'UTR de ce gène a été amplifiée (4).

Abréviation : F = sens, R = antisens.

recombinant (~ 40 ng), 2 µL de vecteur de destination spécifique comme indiqué dans le **tableau 4** (~ 80 ng), 1 µL de tampon de réaction de LR et 1 µL d'enzyme LR clonase. La réaction est incubée sur une nuit à 25°C. 1 µL de réaction est utilisé pour transformer 50 µL de cellules thermo-compétentes DH5a™ comme précédemment. 20 µL de culture sont étalés sur milieu LB agar contenant 100 µg/mL de spectinomycine.

Les colonies issues de cette sélection subissent ensuite un second criblage afin de vérifier que la recombinaison LR s'est faite correctement. Ces colonies sont étalées à la fois sur un milieu LB complété en spectinomycine à 100 µg/mL et sur un milieu LB complété en spectinomycine à 100 µg/mL + chloramphénicol à 25 µg/mL. Seules les colonies ayant perdu la résistance au chloramphénicol sont conservées. En parallèle, l'intégration de l'insert dans le vecteur de destination est vérifiée par PCR sur colonies en utilisant les amorces spécifiques de chaque séquence d'intérêt. Un second contrôle consiste à digérer l'ADN plasmidique par des enzymes de restriction spécifiques : *HindIII* et *XbaI* dans le cas du clonage dans le vecteur RNAi pour confirmer l'intégration de l'insert en position répétée inversée et uniquement *XbaI* pour le clonage dans le vecteur de surexpression.

8.2. Transformation et sélection des plantes

8.2.1. Transformation des cotylédons de tomate

Les cotylédons de tomate sont coupés en 3 explants afin d'induire une meilleure réponse à la blessure nécessaire pour l'infection par *A. tumefaciens*. Les milieux de préculture, de co-culture et de régénération utilisés pour les cotylédons de tomate sont décrits dans le **Tableau 3**. Seul le milieu de régénération contient la kanamycine, antibiotique de sélection des cals transformés et le timentin (Duchefa), mélange de deux antibiotiques permettant d'éliminer les agrobactéries.

Lors du processus de transformation, les explants sont immergés pendant une trentaine de minutes dans une culture en phase exponentielle de croissance d'*A. tumefaciens* transformées par les plasmides recombinants contenant les constructions surexpression, RNAi ou le vecteur vide (sans l'insert d'ADNc d'intérêt). L'excès de cellules bactériennes est éliminé entre deux feuilles de papier absorbant stérile. Le matériel végétal est ensuite co-cultivé avec les agrobactéries pendant 48 h sur milieu gélosé. Puis, les explants sont rincés 2 fois 3 min dans du milieu MS liquide additionné de Tween - 20 0,05% (v/v, Sigma) et mis en culture sur le milieu de sélection [milieu de régénération + 300 µg.mL⁻¹ de kanamycine (Duchefa) + 250 µg.mL⁻¹ de ticarcilline/acide clavulanique (15:1, p/p) (Timentin, Duchefa)] jusqu'à la formation de cals. Les plantules régénérées se développant à partir des cals sont repiquées sur milieu de régénération dépourvu d'hormone. Les régénérants résistants sont repiqués 3 fois sur le milieu de sélection et les plantes

enracinées sont transférées en serre.

8.2.2. Méthodes d'analyses des plantes transgéniques.

8.2.2.1. Analyse moléculaire.

Les plantes transformées sont analysées par PCR et RT-PCR de façon à prouver l'intégration de l'ADN-T dans l'ADN génomique de la plante (**figure 35**) et la transcription ou non des ARNm correspondants. Les analyses moléculaires sont effectuées selon les protocoles décrits aux paragraphes **IV 5 et 6**.

8.2.2.2. Analyse phénotypique.

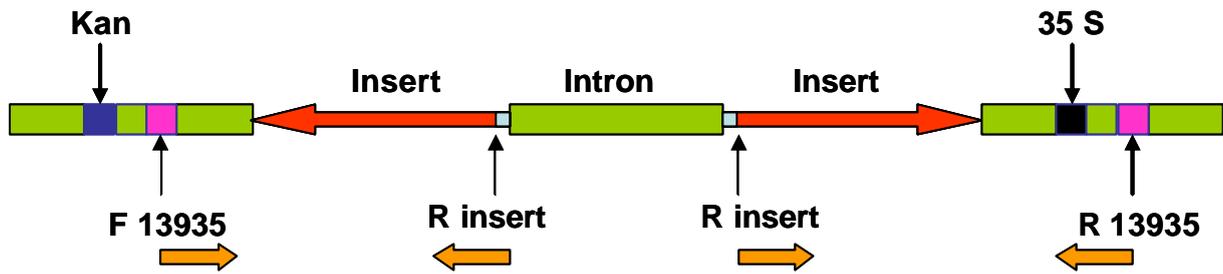
Les plantes transformées de première génération T₀ et les suivantes (T₁, T₂) sont analysées au niveau physiologique en terme de vitesse de croissance de la plante, de taille de la plante, de pourcentage d'avortement des fleurs, de croissance des fruits (taille, poids, forme, couleur), ainsi qu'un certain nombre d'autres paramètres qui sont apparus différents dans ces plantes en comparaison avec les plantes contrôles.

8.2.2.3. Mesure de la ploïdie

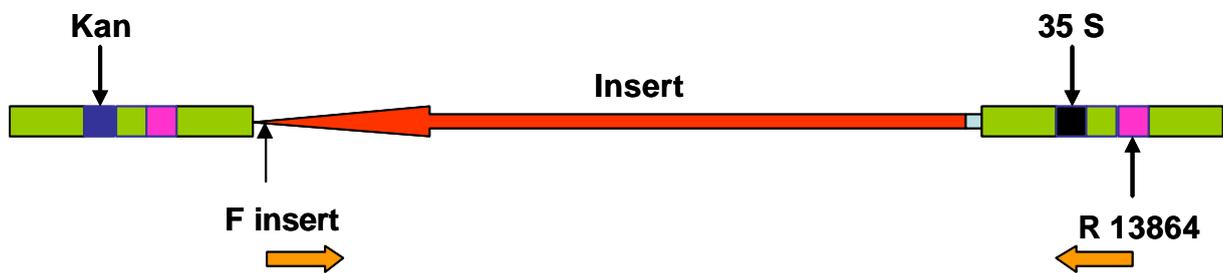
La ploïdie des plantes transformées est déterminée selon la méthode décrite aux **paragraphes III 1 et 2**. En effet, il est possible qu'une plante ait régénérée à partir d'une cellule ayant subi un accident de division à l'issue duquel elle se retrouve polyploïde (**Figure 36**), ce qui peut affecter le développement des plantes.

8.2.2.4. Méthode de sélection des plantes transformées homozygotes et hétérozygotes.

Pour une lignée transgénique donnée, les graines sont récoltées et stérilisées comme décrit dans le **paragraphe I-1**. Cinquante graines sont mises à germer sur un milieu de germination contenant 300 mg L⁻¹ Kanamycine. Une lignée est homozygote quand on observe 100% de germination, alors que pour une lignée hétérozygote environ 33% des plantules meurent après germination des graines.



A- Extinction de gène (RNAi), pK7GWIWG2(1) T-DNA



B- Surexpression de gène, pK7WG2D T-DNA

Figure 35. Le schéma montre les PCR qui ont été réalisées afin de confirmer l'intégration des transgènes dans l'ADN génomique des plantes transformées. (A), concernant les constructions RNAi, deux PCR ont été effectuées en utilisant les amorces suivantes (1- F 13935 et R insert. 2- R 13935 et R insert). (B) concernant les constructions de sur-expression une seule PCR a été réalisée en utilisant les amorces F insert et R13863

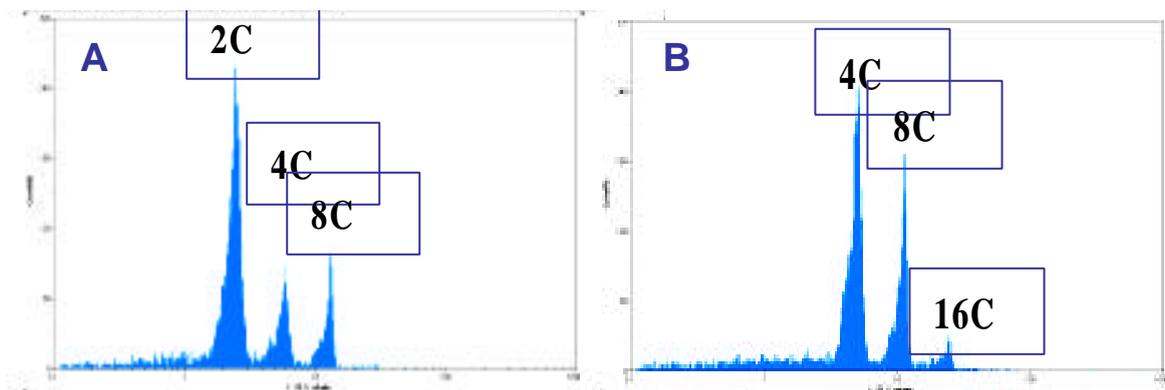


Figure 36 Mesure du taux de ploïdie des noyaux (A) issus d'une plante sauvage, ou (B) issus d'une plante tétraploïde.

9. Méthode d'analyse du transcriptome de la tomate par la technique des micro-réseaux d'ADNc (cDNA Microarray).

Les micro réseaux d'ADN utilisés proviennent du CGEP (Center for Gene Expression, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Université de Cornell, Ithaca, NY, USA, <http://bti.cornell.edu/CGEP/CGEP.html>). Les bibliothèques d'EST utilisées pour la fabrication du micro réseaux d'ADNc TOM1 proviennent de tissus relativement variés tels que la feuille, les racines, les fruits ou les fleurs. Ces micro réseaux sont composés de 13400 dépôts, représentant 12899 EST, soit 8700 gènes (Alba *et al.*, 2004). Les ADNc sont déposés par contact sur des lames de verre en 32 sous réseaux de 21 colonnes par 20 lignes.

9.1. Synthèse des ADNc et marquage indirect par des fluorochromes.

La synthèse et le marquage indirect des ADNc s'effectue à partir de 30 µg d'ARN total pour chaque conditions en utilisant le CyScibe Post-Labeling kit (ref RPN 5660X, Amersham Biosciences, GE Healthcare) en suivant les recommandations du fournisseur. Les cibles marquées sont ensuite quantifiées par dosage spectrophométrique, en réalisant un balayage de 200 nm à 700 nm, afin de déterminer l'absorbance de l'ADNc à 260 nm ainsi que la quantité de fluorochrome incorporée (à 550 nm pour la cyanine 3 et 650 nm pour la cyanine 5). Les 2 cibles marquées correspondant aux 2 conditions étudiées sont mélangées puis leur volume est réduit à 10 µL par utilisation de colonnes Microcon YM-30 (cat N°42410, Amicon Bioseparations, Millipore), en centrifugant 10 minutes à 10 000 *g*. Le concentrant est récupéré en retournant la colonne et en centrifugeant 3 minutes à 1500 *g*. Le volume est alors complété à 120 µL par un tampon d'hybridation (1:1 (v/v) formamide (5X SSC, 0.25% SDS, 5X Denhardt, et 1 mg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé 5 min à 100°C (Stratagene). Le mélange est dénaturé 1 min à 100°C puis placé dans la glace fondante avant d'être injecté sur les lames.

Les micros réseaux sont disposés dans une station d'hybridation automatique (TECAN HS 4800, Tecan Trading AG, Switzerland) et les lames sont incubées à 42°C. Deux rinçages de 30 sec avec une solution 1X SSC 0.1% SDS sont effectués afin d'éliminer les poussières et les impuretés à la surface des lames.

Les cibles marquées sont injectées sur la surface des micros réseaux et mises sous agitation moyenne. L'hybridation s'effectue pendant 16h à 42°C. La température est ensuite abaissée à 30°C et lames sont lavées par 3 fois 1 min avec une solution 1X SSC 0.1% SDS. Par la suite, les lames sont lavées par 3 fois 1 min avec une solution 0.1X SSC 0.1% SDS, puis un dernier lavage avec une solution 0.1X SSC durant 30 sec. Enfin, les lames sont séchées par sous flux d'azote pendant 3 min.

9.2. Acquisition des données

Les lames sont scannées par un lecteur de fluorescence à double laser Genepix 4000 B (Axon Instruments) en utilisant le logiciel d'acquisition d'image Genepix 4.0 Pro. L'ajustement des photomultiplicateurs est réalisé sur la première lame et les réglages sont conservés pour les suivantes : 500 Volt pour Cy3 et 600 Volt pour Cy5.

Toutes les expériences de comparaison par micro réseaux sont réalisées en double et en intervertissant les fluorochromes. Donc pour chaque expérience, 4 lames de micro réseaux sont réalisées pour une comparaison entre 2 conditions. Toutes les lames sont inspectées visuellement afin d'éliminer les dépôts ou hybridations hétérogènes et/ou aberrants.

9.3. Analyse statistique

Les données brutes, correspondant aux intensités moyennes des spots sans soustraction du bruit de fond, sont soumises au logiciel R/MAANOVA v091 à 3 (R package for microarray analysis) pour la visualisation, le pré-traitement, la normalisation et l'analyse statistique des données. Les données brutes sont transformées (Cui *et al.*, 2003) grâce à l'utilisation d'une fonction LOWESS basée sur l'intensité des spots (en utilisant un intervalle de lissage de 20%). Après validation visuelle de l'étape de prétraitement sur le rapport par rapport à l'intensité de la courbe pour chaque lame, les données sont soumises à une seconde analyse par ANOVA (Wolfinger *et al.*, 2001). Les données obtenues en double sont moyennées, et la variance des effets systématiques est évaluée par normalisation ANOVA avec le modèle suivant : $y_{g,i,k} = \mu + A_i + D_j + E_{g,i,j,k}$, où $y_{g,i,j,k}$ est le logarithme en base 2 de la mesure pour le gène g , μ est la moyenne globale du signal, A_i est le principal effet provenant de la lame, D_j est l'effet principal provenant des fluorochromes, et E est l'erreur. Les valeurs normalisées pour chaque gène ($Y_{g,i,j,k}$, corrigées par la soustraction des valeurs ajustées pour les principaux effets $A_i + D_j$) sont utilisées en tant que valeur d'entrée pour le gène par le modèle de gène : $rg_{ijk} = G_g + (GA)_{gi} + (GD)_{gi} + (GS)_{gk} + eg_{ijk}$. Pour chaque gène, les différences entre les effets d'échantillon gène-spécifique $(GS)_{gk}$ sont testés en utilisant le test de Fisher (F-test). Les valeurs correspondantes sont basées sur le test hybride (F2) de R/MAANOVA v0391 à 3 (Cui *et al.* 2003) qui utilise une combinaison d'estimation de variance globale et gène-spécifique dans le dénominateur des fonctions statistiques. Afin d'éviter les hypothèse de distribution, les F-test est réalisé avec un intervalle résiduel restreint et 1000 itérations. Les valeurs de P (Test de Student) sont ajustées avec la procédure « step-up » linéaire incluse dans R/MAANOVA afin de tenir compte de la fausse vitesse de découverte. De plus, la moyenne et la déviation standard des valeurs normalisées

pour les contrôles négatifs sont calculées, et les gènes dont les valeurs normalisées sont plus faibles que la moyenne plus deux fois la déviation standard des contrôles négatifs (valeur de cut off) sont exclus de l'analyse.

V. Méthodes d'analyse des protéines.

1. Extraction des protéines végétales.

Le matériel végétal est broyé à l'aide d'un pilon dans un mortier en présence d'azote liquide. Le broyat (1 g) est placé en présence de 3 mL de tampon d'extraction [Tris-HCl 50 mM pH 7,2, DTT 10 mM, PVPP 5% (p/v), cocktail inhibiteur de protéase (Sigma) 3% (v/v)]. Le mélange est homogénéisé au polytron à vitesse moyenne et dans la glace. Après centrifugation pendant 20 min à 23000 g et 4°C, le surnageant est déssalé sur colonne Sephadex® G-25 Medium (Sigma-Aldrich®) équilibrée avec du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 et KCl 50 mM. Après dosage, les protéines sont stockées sous forme de parties aliquotes de 100 µL à -80°C.

2. Dosage des protéines.

Le principe du dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976), repose sur la fixation non covalente d'un colorant sur les protéines, le bleu de Coomassie. A pH acide, la forme anionique de ce colorant se fixe préférentiellement aux protéines par des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques des acides aminés, principalement l'arginine, mais aussi la lysine et l'histidine. Le complexe ainsi formé absorbe dans une gamme de longueurs d'onde dont le maximum se situe à 595 nm.

Le dosage est réalisé en utilisant le «Bio-Rad Protein Assay» de Bio-Rad. Une solution de γ -globulines est utilisée comme standard.

3. Analyse par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

En présence de SDS, un détergent anionique, les protéines acquièrent une charge électrique négative proportionnelle au nombre de molécules de SDS fixées, leur charge propre étant négligeable. Dans ces conditions, les protéines se déplacent dans un champ électrique vers l'anode. Le système d'électrophorèse discontinue décrit par Laemmli (1970) est utilisé. Le gel est constitué de deux parties différant par leur concentration en acrylamide

et leur pH :

Gel de concentration (« Stacking gel ») : acrylamide 5% (p/v), bisacrylamide 0,13% (p/v), Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v) et les catalyseurs PSA 0,5% (p/v) et TEMED 0,05% (p/v).

Gel de séparation (« Resolving gel ») : acrylamide 10 à 15% (p/v), bisacrylamide 0,26 à 0,39% (p/v), Tris-HCl 400 mM pH 8,8, SDS 0,1% (p/v) et les catalyseurs PSA 0,5% (p/v) et TEMED 0,05% (p/v).

Les échantillons sont dilués dans le tampon de charge [Tris-HCl 62 mM pH 6,8, glycérol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), bleu de bromophénol 1% (p/v)] et dénaturés à 100°C pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel et la migration s'effectue dans le tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%).

4. Révélation des protéines au bleu de Coomassie.

Après l'électrophorèse, les protéines sont révélées et fixées par immersion du gel pendant 30 min dans une solution de coloration : éthanol 45%, acide acétique 10%, bleu de Coomassie R250 0,25% (p/v). Le gel est ensuite décoloré dans une solution d'éthanol 30%, acide acétique 5%.

5. Production d'anticorps polyclonaux anti-galactono-1,4-lactone déshydrogénase de tomate.

Dans les bases de données du TIGR (The Genomic for Institute research, <http://www.tigr.org>), la disponibilité de la séquence codant pour la galactono-1,4-lactone déshydrogénase de tomate (TC 163697) permet d'avoir accès à la séquence protéique correspondante. Les anticorps anti-GalLDH ont été produits par la société Eurogentec (Herstal, Belgique) à partir de deux peptides synthétiques issus de la séquence de la GalLDH. Les peptides décrits ci-dessous ont été choisis pour leur haut potentiel antigénique.

Peptide 1 (aa 321-335): *H2N-MSKEKGPPKNKPKYT + C-CONH2*

Peptide 2 (aa 559-573): *H2N-AYNQARKELDPNRIL + C-CONH2*

Les principales caractéristiques considérées sont l'hydrophilicité, l'index antigénique, la probabilité de surface et la flexibilité. Le "+C" correspond à une cystéine additionnelle nécessaire au couplage spécifique de l'extrémité du peptide au carrier qui dans notre cas est la protéine KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin ou hémocyanine de patelle). La production des anticorps est réalisée par deux lapins, chaque lapin est immunisé par 3 injections d'un mélange des deux peptides. Au bout de 12 semaines, le sérum de chaque lapin est

recupéré. Une fraction de sérum (15 ml) issu d'un des deux lapins est utilisée pour la purification des immunoglobulines G (IgG) dirigées contre chacun des peptides séparément. Les deux purifications sont réalisées par chromatographie d'affinité (AF-Amino TOYOPEARL 650M) par la société Eurogentec. Les anticorps polyclonaux anti-Peptide1 et anti-Peptide2 purifiés sont alors stockés à -80°C dans un tampon PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) en présence de 0.01% d'azide de sodium et 1% de sérum albumine bovine (BSA).

6. Analyse par western-blot.

6.1. Electrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

Après électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) préalablement incubée dans le tampon de transfert (Tris 25 mM pH 8,3, glycine 150 mM, méthanol 10%). L'électrotransfert est effectué pendant 45 min à 2,5 V/cm² de membrane, à l'aide du système semi sec de Millipore.

Après le transfert, la membrane est séchée à l'air libre. L'efficacité et la qualité du transfert sont vérifiées par coloration de la membrane au Rouge Ponceau [Rouge Ponceau 0,1% (p/v), acide acétique 1% (v/v)]. La membrane est ensuite décolorée à l'eau avant de réaliser l'immunodétection.

6.2. Immunodétection des protéines sur membrane de nitrocellulose.

La membrane est saturée pendant 1 h sous agitation douce dans une solution de TBS-Tween [Tris 25 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 2% (v/v)] supplémentée par 3% (p/v) de lait écrémé en poudre. La membrane est ensuite incubée 1 h avec l'anticorps anti-Peptide 1 (ou anti-Peptide 2) de tomate utilisé à la dilution 1/300^{ème} dans du tampon TBS-Tween et lait 3%. Trois lavages successifs sont ensuite effectués dans du TBS-Tween pour éliminer les anticorps primaires non fixés.

La révélation des complexes anticorps primaires-antigènes est réalisée par incubation de la membrane dans un sérum anti-immunoglobulines G de lapin. L'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) est utilisé à la dilution 1/6000^{ème} dans une solution de TBS-Tween, lait 3%. La membrane est incubée 1 h, puis lavée comme précédemment. La révélation est réalisée en utilisant un mélange de Naphtol AS-TR phosphate et de Fast red RC (Sigma). La solution de coloration est préparée en mélangeant 10 mL de solution de naphtol phosphate (un comprimé dans 10 mL d'eau) avec 10 mL de Fast red (un comprimé dans 10 mL de Tris 0,2 M pH 8). La réaction de coloration,

se traduisant par l'apparition d'un coloré rouge, est arrêtée par lavage de la membrane dans de l'eau distillée.

7. Mesure de l'activité enzymatique GalLDH in vitro

L'activité GalLDH est mesurée selon le protocole modifié de Ôba *et al.* (1995). Environ 300 mg de jeunes feuilles de tomate sont broyées et homogénéisées à l'aide d'une pilon (Bibby Sterilin, SVL22) sur la glace en présence de 3 mL de tampon d'extraction [Tris-HCl 100 mM pH 7,5, DTT 1 mM, PVPP 1% (p/v), Sucrose 0.3% et cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma) 3% (v/v)]. Après centrifugation pendant 5 minutes à 12000 *g* et à 4°C, le surnageant est déssalé sur une colonne Sephadex® G-25 Medium (Sigma-Aldrich®) préalablement équilibrée avec du tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 5 mM et Sucrose 0.3%. La teneur en protéines de l'extrait est mesurée comme décrite au paragraphe **V. 2**.

A l'aide d'un spectrophotomètre, l'activité GalLDH est quantifiée en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm en présence de L-galactono-?-lactone et à 27°C. Le mélange réactionnel (1mL) est composé de 40 µg de protéine de l'extrait fraîchement préparé, de cytochrome c (50 µM), de TritonX-100 (0.15%) et de L-galactono-?-lactone (4.2 mM) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.4. Après 5 minutes de préincubation, la réaction démarre par l'ajout de L-galactono-?-lactone. Dans ces conditions, la vitesse de réaction est linéaire pendant au moins de 10 minutes. Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme requise pour oxyder 1 µmole de L-galactono-?-lactone qui correspond à la formation de 2 µmole de cytochrome c réduit par minute. Le coefficient d'extinction molaire de 17.3 mM⁻¹ cm⁻¹ pour la différence entre la forme oxydée et réduite du cytochrome c a été employé pour les calculs d'activité.

IV. Méthode d'analyse des Métabolites

1. Méthode d'analyse de l'ascorbate et de son état d'oxydo-réduction.

Le principe du dosage de l'ascorbate est issu de la méthode décrite par Leipner *et al.* (1997). Cette méthode est une adaptation du dosage de l'ascorbate réduit décrit par Franke (1955) et du dosage de l'ascorbate oxydé (Déhydroascorbate ou DHA) décrit par Hughes (1956). Les concentrations d'ascorbate réduit et total des échantillons de tomate sont déterminées au spectrophotomètre en mesurant la réduction du DCIP (2,6-dichloroindophénol) par l'ascorbate. A l'état oxydé, le DCIP est de couleur bleue et absorbe à 524 nm dans les conditions de pH de l'analyse. Lorsque le DCIP est réduit par l'ascorbate de l'échantillon, il se décolore et son absorption diminue proportionnellement à son état de

réduction. Les résultats sont exprimés en milligramme d'ascorbate pour cent grammes de matière fraîche (mg ascorbate/100 g MF).

1.1. Méthode d'extraction de l'ascorbate

Cinq cent milligrammes de matière fraîche congelés dans l'azote liquide sont broyés et homogénéisés au Polytron à grande vitesse pendant 30 s dans un tube de 15 mL, contenant 2,5 mL de milieu d'extraction (acide métaphosphorique 3% (p/v) et EDTA(Na)₂ 2,5 mM). Après centrifugation à 14000 g pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est filtré à travers un film de nylon (pores de 30 µm, Tetko Inc., New York, USA), le filtrat est récupéré et peut être stocké pendant 30 min au maximum dans la glace à l'abri de la lumière avant analyse.

1.2. Méthode d'extraction de l'ascorbate contenu dans l'apoplaste

La méthode d'extraction de l'ascorbate apoplastique est effectuée selon le protocole de Turcsányi *et al.* (2000). L'expérience consiste à récupérer une fraction enrichie en fluide de lavage extracellulaire (FLE) au niveau des folioles de tomate par rapport au reste du tissu qui constitue le résidu d'extrait foliaire (REF). L'extraction réalisée à partir de feuilles du même âge issues de plusieurs transformants et des plantes contrôle a été répétée trois fois.

La quatrième feuille âgée d'environ 3 semaines est détachée de la plante, puis lavée à l'eau distillée. A partir de ce moment, toutes les manipulations sont faites à 4°C. Toutes les folioles d'une feuille (~ 1 g poids frais) sont détachées, pesées puis placées dans un tube Falcon de 50 ml contenant 40 mL de Glycine 20 mM (pH 2,5), 100 mM KCl et 2,5 mM EDTA puis infiltrée sous vide (-70 kPa) pendant 3 minutes. Grâce à une grille immergée à quelques millimètres de la surface du liquide, on évite la remontée des folioles lors du dégazage. L'efficacité d'infiltration est estimée lorsque plus de 80% de la feuille présente une coloration mate sombre, preuve que le liquide a bien pénétré dans les espaces intercellulaires. Les folioles sont ensuite séchées sur du papier absorbant, repesées, roulées soigneusement et insérées dans un cône de 5 ml placé sur un tube Eppendorf de 1.5 mL pré pesé contenant 20 µl d'acide métaphosphorique 30% (p/v) et EDTA(Na)₂ 25 mM. Le fluide de lavage extracellulaire est récupéré par centrifugation (10 min à 1000 g) à 4°C. Les tubes Eppendorf sont repesés pour déterminer le volume du FLE et conservé sur la glace jusqu'au dosage. Approximativement 100 µL de FLE est récupéré pour 1 g de feuille. La teneur en ascorbate total et réduit mesurés selon le protocole décrit dans le paragraphe suivant. Le résidu d'extrait foliaire (REF) est broyé en présence d'azote liquide et son contenu en ascorbate est extrait et mesuré. La contamination du FLE par le cytosol est estimée par la mesure

de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH, EC 1.1.1.49) selon la méthode décrite par Kornberg et Horecker (1955) dans des extraits FLE préparés en absence d'acide métaphosphorique. L'activité G6PDH a été détectée dans REF, en revanche aucune activité G6PDH n'était mesurable dans FLE, indiquant que le FLE ainsi préparé était dépourvu de contamination cytoplasmique.

1.3. Dosage de l'ascorbate réduit et total.

Deux cent μL de surnageant d'extraction sont prélevés et mis à incuber dans une cuve en plastique de 3 mL, pendant 15 minutes à température ambiante, en présence de 100 μL de K_2HPO_4 (45%), et soit 50 μL d'eau distillée pour le dosage de l'ascorbate réduit, soit 50 μL d'homocystéine (0,1%) pour le dosage de l'ascorbate total. L'ajout d'homocystéine au milieu de mesure permet de réduire avec spécificité le DHA en ascorbate dans ces conditions de pH. Après incubation, 500 μL de tampon citrate-phosphate (2 M, pH 2,3) sont ajoutés dans chaque cuve. La D.O. est mesurée à 524 nm immédiatement après addition de 500 μL de DCIP (0,008 %) et agitation, contre un blanc contenant 100 μL K_2HPO_4 (45%), 500 μL de tampon citrate-phosphate (2 M, pH 2,3), 200 μL de milieu d'extraction et 550 μL d'eau distillée. Cette valeur de la D.O. est identifiée comme la D.O. n°1 lors des calculs de correction. La décoloration du DCIP par l'ascorbate est immédiate. La quantité d'ascorbate dans chaque cuve est déterminée par rapport à une courbe de calibration réalisée à partir d'ascorbate pur, aux concentrations suivantes et dans les mêmes conditions d'analyse : 0, 100, 200, 300, 400, 500, et 600 μM .

L'homocystéine est utilisée préférentiellement au glutathion ou à la cystéine pour réduire le DHA de l'échantillon en ascorbate (Hughes, 1965), car la réduction du DHA par l'homocystéine est complète après quelques minutes à température ambiante et à pH supérieur à 6,8, alors que la réaction est beaucoup plus lente pour la cystéine ou le glutathion. Le pH de 6,8 du milieu de réaction a été obtenu par ajout de K_2HPO_4 . De plus, l'homocystéine présente une affinité plus faible pour le DCIP que les deux autres composés sulphydryles. Ces 3 composés sulphydryles peuvent interférer avec le principe de dosage de l'ascorbate de par leur capacité à réduire le DCIP à un taux dépendant du pH de milieu réactionnel. Cependant, Hughes (1956) a démontré que la réduction du DCIP par l'homocystéine n'interfère pas dans le dosage de l'ascorbate lors des 30 premières secondes, lorsque le pH de la réaction est amené à 2,5 par ajout du tampon citrate-phosphate.

1.4. Paramètres de correction.

Des corrections doivent être apportées à la mesure initiale de la D.O. Ces corrections correspondent d'une part à la réduction non spécifique du DCIP par le tampon d'extraction dans le cas du dosage de l'ascorbate réduite, et par le tampon d'extraction et l'homocystéine dans le cas du dosage de l'ascorbate total, et d'autre part à l'absorption non spécifique à 524 nm de composés présents dans l'extrait de tomate. Une fois la mesure effectuée (D.O n°1), 20µL d'ascorbate concentré (1%) sont ajoutés dans chaque cuve pour réduire et décolorer en totalité le DCIP. La valeur de D.O. mesurée à 524 nm contre le même blanc est appelée D.O. n°2. La D.O. finale est calculée comme suit :

$$\text{D.O. finale} = \text{D.O.n}^{\circ}1 - \text{D.O. n}^{\circ}2.$$

2. Méthode d'analyse des isoprénoïdes dans les fruits de la tomate

2.1. Extraction des isoprénoïdes.

L'extraction des isoprénoïdes est réalisée selon la méthode décrite par Fraser *et al.* (2000). Les fruits de tomate sont prélevés à plusieurs stades de développement, les grains et le gel sont éliminés, le reste broyé sous forme de poudre, puis les poudres congelées sont lyophilisées. Cette étape est indispensable pour la stabilisation des échantillons car elle permet de conserver de façon optimale les poudres pendant plusieurs mois voire plusieurs années à -80°C. Par ailleurs, de par la sensibilité des isoprénoïdes à la lumière, tous les échantillons préparés sont stockés et manipulés dans un environnement à faible luminosité ambiante y compris au cours de l'extraction.

Environ 10 mg de poudre de fruit lyophilisée sont homogénéisés dans 1 mL de méthanol au polytron à vitesse moyenne pendant 20 secondes. Un volume de 1 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 est ajouté. Après 10 minutes d'incubation à 4°C, 4 mL de chloroforme sont additionnés à l'échantillon. Le mélange est agité vigoureusement et conservé dans la glace pendant 10 minutes. Dans les tubes, 2 phases apparaissent, une phase supérieure aqueuse (méthanol et Tris-HCl) contenant les débris cellulaires et les composés hydrophiles et une phase inférieure organique contenant les composés hydrophobes dont les isoprénoïdes dissous dans le chloroforme. La phase organique est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur. Afin d'augmenter le rendement d'extraction, 2 extractions successives sont nécessaires. La totalité des phases organiques est ensuite évaporées sous flux d'azote et l'extrait sec est stocké à -20°C et à l'obscurité avant l'analyse.

2.2. Dosage des isoprénoïdes

Les isoprénoïdes sont dosés par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) en phase inverse selon la méthode décrite par Fraser *et al.* (2000). Ces composés sont séparés par HPLC à l'aide d'un chromatographe en phase liquide Spectra System P4000 (Spectra-Physics Analytical Inc., San Jose, Ca, USA) sur une colonne de silice YMC C30 (250x4.6 mm) qui constitue la phase fixe apolaire. La séparation repose sur le principe de partage de phases. La phase mobile est constituée de 3 solvants qui sont mélangés par la pompe pour donner le gradient de polarité croissante décrit dans le **tableau 7** à un débit de 1 mL/min. Les échantillons séchés sont repris dans 200 µl d'acétate d'éthyle. Ils sont injectés (50 µL) par un passeur automatique d'échantillons (Spectra System AS3000), maintenus à 4°C. La colonne est maintenue à 30°C dans le compartiment four du passeur. La détection des isoprénoïdes est réalisée simultanément à 3 longueurs d'ondes (290-330-460 nm) par un détecteur Spectra System UV 6000 à barrettes d'iode. Les spectres d'absorption sont saisis de 200 à 800 nm. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés grâce au logiciel Chroméléon (Dionex). La quantification est déterminée par rapport à une solution standard de chacun des isoprénoïdes.

3. Méthode de dosage de la chlorophylle dans les feuilles de tomate.

Le dosage de la chlorophylle est réalisé comme décrit par Wintermans et Mouts (1965). Le matériel végétal constitué de 300 mg de jeunes feuilles est broyé et homogénéisé à l'aide d'un pilon (Bibby Sterilin, SVL22) dans 1.4 mL d'éthanol 95%. Le mélange est agité vigoureusement et conservé 10 min sur la glace. Après centrifugation pendant 1 min à 20000 g, 1 mL du surnageant est prélevé et la D.O est mesurée au spectrophotomètre à 665 nm pour la chlorophylle a et 649 nm pour la chlorophylle b. La teneur en chlorophylle totale est calculée comme suit :

$$\text{Chlorophylle a} = 13,7 * \text{D.O (665)} - 5,76 * \text{D.O (649)} \quad (\mu\text{g/mL})$$

$$\text{Chlorophylle b} = 25,8 * \text{D.O (649)} - 7,6 * \text{D.O (665)} \quad (\mu\text{g/mL})$$

$$\text{Chlorophylle a+b} = 6,1 * \text{D.O (665)} + 20,04 * \text{D.O (649)} \quad (\mu\text{g/mL})$$

4. Méthode de mesure de la photosynthèse dans les feuilles de tomate.

La mesure de la photosynthèse nette de feuilles attachées aux plantes a été réalisée à l'aide d'un analyseur de CO₂ à infra-rouge portable (LCA3 - Analytical Development Corporation), travaillant en circuit ouvert. Pour l'exécution de cette mesure, l'air référence est capté dans l'atmosphère à l'aide d'une canne de 3 mètres de hauteur et pompé vers une

(A)

Durée	Solvants		
	A: Méthanol	B: Méthanol 80%, Eau 20% Acétate d'ammonium 0,2%	C: Tert-Butyl méthyle ether
0 min	95%	5%	0%
12 min	95%	5%	0%
12,10 min	80%	5%	15%
42 min	30%	5%	65%
72 min	95%	5%	0%

(B)

passeur d'échantillons		
1- Pompe	Eluant	Méthanol, Méthanol-eau-acétate ammonium, tert butyl méthyl éther
	Boucle d'injection	10 à 50 µL
	Nom de la pompe	Pompe à gradient quaternaire
	Pression moyenne	55 bars
	Débit de la pompe d'injection	1 mL / minute
	Nom de la colonne	YMC-Pack
2- Colonne	Type	YMC C30
	Dimension	L = 250 mm, ø = 4,6 µm
	Taille des particules	Particules sphériques, Ø = 5 µm
	Température	30°C
	Principe de séparation	Gradient
	Détecteur	Barrette de diode W 6000 LP
3- Détecteur	Détection	Spectrophotométrique (λ = 290, 330, 460 nm)
	Logiciel d'acquisition	PC 1000 Thermo-Finnigan

Tableau 7. Chromatographie Liquide haute performance (HPLC)

(A) Programme du gradient utilisé lors de la chromatographie.

(B) Caractéristiques de la chaîne HPLC utilisée.

enceinte qui constituera un volume de gaz tampon. La teneur en CO₂ de ce gaz est déterminée avant qu'il soit envoyé, à débit constant vers la chambre portable dans laquelle est placée une portion de feuille de surface égale à 6,2 cm² (**Figure 37**). Grâce aux capteurs placés dans la chambre, la température et l'humidité de l'air sont mesurées avant et après son passage dans l'enceinte qui contient la feuille. Par le biais d'électrovannes, air entrant et air sortant de la chambre sont analysés en alternance. Le calcul de la photosynthèse sera donc réalisé à partir du produit de la différence de concentration en CO₂ (ajusté aux conditions de température et pression atmosphériques) par le débit de l'air balayant la chambre. Les équations employées dans les calculs sont décrites dans le manuel et les spécifications du fabricant. Cet appareil mesure parallèlement le rayonnement photosynthétique actif (PAR) grâce à un capteur (photocellule à sélénium, précision 10 μEm⁻²s⁻¹) placé dans la chambre. La photosynthèse a été mesurée à des intensités lumineuses variant de 200 à 1000 μEm⁻²s⁻¹, soit une cinquantaine de points par plante, ce qui a permis de tracer une droite de régression (**figure 37**).

5. Méthode de mesure de l'activité respiratoire et la production d'éthylène des fruits de tomate

En collaboration le laboratoire Agrotec du Centre Technique Agroalimentaire d'Agen (Lot et Garonne), j'ai réalisé des mesures de l'activité respiratoire ainsi que la production d'éthylène sur des fruits de tomates issus des transformants et de plantes témoin. Pour chaque lignée examinée, le matin de l'expérience nous avons récolté plusieurs fruits représentant 6 stades de maturation : Vert mûr (VM); Breaker (BR); Tournant (TO); Orange (OR); Rouge léger (RL); Rouge mûr (RM). Chaque stade de maturation a été déterminé sur la base de l'âge du fruit *i.e.* déterminé en nombre de jour après anthèse et la couleur de fruit déterminée grâce à la mesure du paramètre (L,a,b) au moyen d'un chromamètre MINOLTA, CR-200. Au moins 3 tubes Falcon de 50 ml contenant entre 3 et 4 fruits du même stade ont été préparés, soigneusement fermés, et transportés à Agen. Le bouchon des tubes a été préalablement percé puis obturé avec un septum de caoutchouc permettant à l'aide d'une aiguille le prélèvement de gaz contenu dans le tube scellé. Après 1 h d'incubation à 20°C, la respiration a été quantifiée à l'aide d'un respiramètre (PBI Dans Sensor, modèle check mate 9900, Danemark) spécialement conçu pour mesurer la teneur en dioxyde de carbone et en oxygène d'échantillon gazeux. Grâce à une aiguille qui lui est connectée, l'appareil prélève directement un volume d'échantillon, l'analyse et indique la valeur. La prise d'essai est très rapide et peut être répétée plusieurs fois. Pour la mesure de l'éthylène, un échantillon gazeux de 500μl est prélevé dans chaque tube, puis analysé dans un Chromatographe Phase Gazeuse (CPG DN200 – Delis NERMAG Instruments) équipé d'une colonne PoraPak (SUPELCO Sigma-Aldrich). Les mesures d'éthylène sont réalisées après deux heures d'incubation des fruits à 20°C et répétées deux fois.

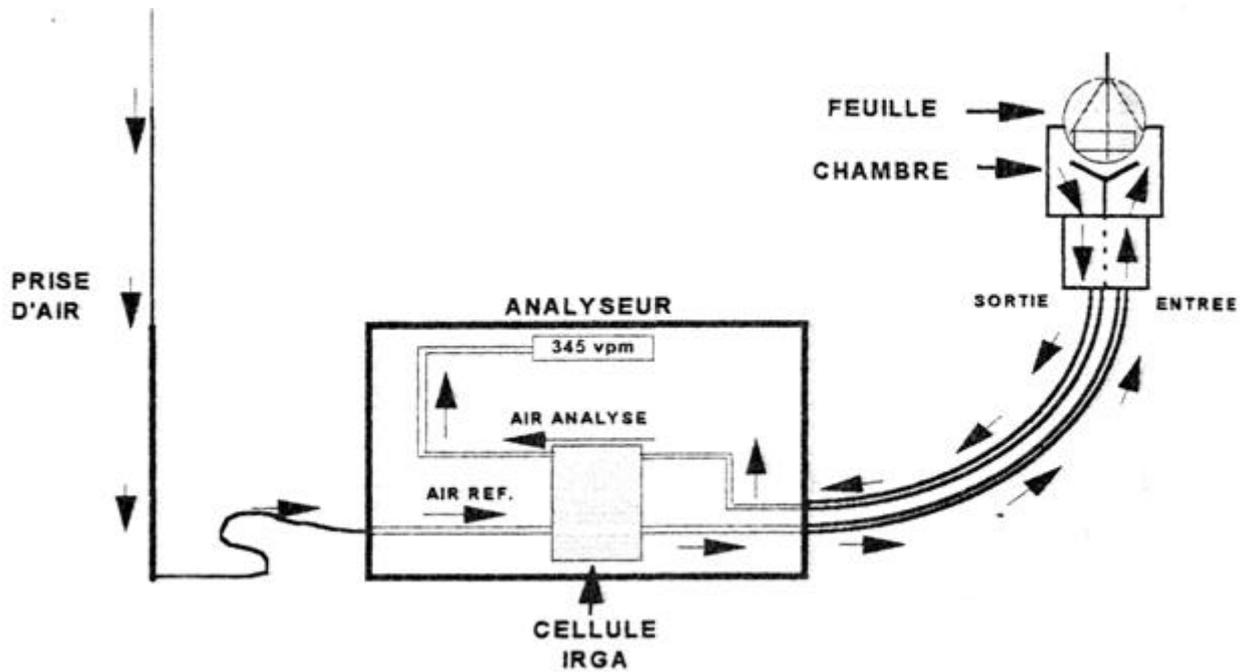


Figure 37. Schéma représentant le principe de l'analyseur de CO₂ à infra-rouge portable (LCA3 – Analytical Development Corporation) utilisé pour mesurer la photosynthèse nette des feuilles isolées sur les plantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Rahman, M.** (1977). Patterns of hormones, respiration and ripening enzymes during development, maturation and ripening of cherry tomato fruits. *Physiol Plant* **39**: 115-118.
- Agarwal, S., and Rao, A. V.** (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Cmaj* **163**: 739-44.
- Agius, F., Gonzalez-Lamonthe, R., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, L., Botella, M. A., and Valpuesta, V.** (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol.* **21**: 177-181.
- Ahuja, K. D., Kunde, D., and Ball, M. J.** (2003). Effects of olive oil and tomato lycopene combination on heart disease risk factors. *Asia Pac J Clin Nutr* **12 Suppl**: S21.
- Alba, R., Fei, Z., Payton, P., Liu, Y., Moore, S. L., Debbie, P., Cohn, J., D'Ascenzo, M., Gordon, J. S., Rose, J. K., Martin, G., Tanksley, S. D., Bouzayen, M., Jahn, M. M., and Giovannoni, J.** (2004). ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* **39**: 697-714.
- Alonso, A. P., Vigeolas, H., Raymond, P., Rolin, D., and Dieuaidé-Noubhani, M.** (2005). A new substrate cycle in plants. Evidence for a high glucose-phosphate-to-glucose turnover from in vivo steady-state and pulse-labeling experiments with [¹³C]glucose and [¹⁴C]glucose. *Plant Physiol.* **138** :2220-32.
- Alpert, K., Grandillo, S., and Tanksley, S.** (1995). FW-2.2-A major QTL controlling fruit weight is common to both red-fruited and green-fruited tomato species. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 994-1000.
- Alvarez, M. E., and Lamb, C.** (1997). Oxidative burst-mediated defence responses in plant disease resistance. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press pp 815-839.
- Anderson, J. W., Foyer, C. H., and Walker, D. A.** (1983). Light-dependant reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. *Planta* **158**: 442-450.
- Arrigoni, O., Arrigoni-Liso, R., and Calabrese, G.,** (1975). Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. *Nature* **256**: 513-514.
- Arrigoni, O., Bitonti, M. B., Cozza, R., Innocenti, A. M., Liso, R., and Veltri, R.** (1989). Ascorbic acid effect on pericycle cell line in *Allium cepa* root. *Caryologia* **42**: 213-216.
- Arrigoni, O., De Gara, F., Tommasi, R., and Liso, R.** (1992). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **99**: 235-238.
- Arrigoni, O., Calabrese, G., De Gara, M. B., Bitonti, M., and Liso, R.** (1997). Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *Plant Physiol.* **150**: 302-308
- Asada, K.** (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* **85**: 235-241.
- Asada, K.** (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50**: 601-639.
- Asard, H., Horemans, N., and Caubergs, R. J.** (1995). Involvement of ascorbic acid and a b-type cytochrome in plant plasma membrane redox reactions. *Protoplasma* **184**: 36-41.
- Baig, M. M, Kelly, S., and Loewus, F.** (1970) L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulonono-1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. *Plant Physiol* **46**: 277-280.
- Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C., and Rothan, C.** (2006). The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *J Exp Bot* **57**:961-970.

- Barber, G. A.** (1968). The synthesis of guanosine 5'-diphosphate D-rhamnose by enzymes of higher plants. *Biochim Biophys Acta* **165**: 68-75.
- Barber, G. A.** (1971). The synthesis of L-glucose by plant enzyme system. *Arch Biochem Biophys* **147**: 619-623.
- Barth, C., Moeder, W., Klissing, D. F., and Conklin, P. L.** (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c1. *Plant Physiol* **134**: 1784-1792.
- Bartoli, C. G., Pastorib, G. M., and Foyer, C. H.** (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* **123**: 335-343.
- Baydoun, A. H., and Fry, S. C.** (1988). [2-3H] Mannose incorporation in cultured plant cells: Investigation of L-galactose residues of the primary cell wall. *J. Plant Physiol* **132**: 484-490;
- Bertin, N., Gary, C., Tchamitchian, M., and Vaissiere, B. E.** (1998). Influence of cultivar, fruit position and seed content on tomato fruit weight during a crop cycle under low and high competition for assimilates. *J Horticult Sci Biotechnol* **73**: 541-548.
- Bewley, J. D., Burton, R. A., Morohashi, Y., and Fincher, G. B.** (1997). Molecular cloning of a cDNA a (1--4)-beta-mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* **203**: 454-459.
- Bowles, D. J.** (1990). Defence-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brummell, D. A., and Harpster, M. H.** (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **47**: 311-40.
- Burns, J. J.** (1960). Ascorbic acid in "Metabolic Pathway". (D. M. Greenberg, ed.) 2nd ed.,: 394-411. Academic Press, New York.
- Charles, S. A., and Halliwell, B.** (1980). Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochem J* **189**: 373-376.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessing, D. F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**: 1883-1886.
- Chevalier, C., Bourgeois, E., Pardet, A., and Raymond, P.** (1995) Molecular cloning and characterization of six cDNAs expressed during glucose starvation in excised maize (*Zea mays* L.) root tips. *Plant Mol. Biol.* **28**: 473-485.
- Chinoy, N. J.** (1969). On the specificity of the alcoholic, acidic silver nitrate reagent for the Histochemical localization of ascorbic acid. *Histochemie* **20**: 105-107.
- Citterio, S., Sgorbati, S., Scippa, S., and Sparvoli, E.** (1994). Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. *Physiol Plant* **92**: 601-607.
- Cong, B., Liu, J., and Tanksley, S. D.** (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13606-11. Epub 2002 Oct 7.
- Conklin, P. L., and Last, R. L.** (1995). Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol* **109**: 203-212.
- Conklin, P. L., Williams, E. H., and Last, R.L.** (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9970-9974.
- Conklin, P. L., Norris, S. R., Wheeler, G. L., Williams, E. H., and Smirnov, N.** (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin c) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**: 4198-4203.
- Conklin, P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R., and Last, R. L.** (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics* **145**: 847-856.
- Conklin, P. L.** (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ* **24**: 383-394.
- Cooper, J. B., Heuser, J. E., and Varner, J. E.** (1994). 3,4-dehydroproline inhibits cell wall

assembly and cell division in tobacco protoplasts. *Plant Physiol* **104**: 747-752.

Cordoba-Pedregosa, M. C., González-Reyes, M., agrario Canadillas, M., del Navas, P., and Cordoba, F. (1996) Role of apoplastic and cell wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol*. **112**: 1119-1126.

Cox, K. H., and Golberg, R. B. (1988). Analysis of plant gene expression. *Plant Molecular Biology: A practical approach*, C.H. Shaw Ed. (Oxford IRL press):1-34.

Crichton, R. R., Ponce-Otiz, Y., Koch, M. H. J., Parfait, R. and Stuhmann, H. B. (1978). Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and lentil (*Lens esculenta*). *Biochem. J.* **171**: 349-356.

Cui, X., Kerr, M. K., Churchill, G. A. (2003). Transformations for cDNA microarray data. *Stat Appl Genet Mol Biol* **2** (1) : Art4

Davis, J. N., and Hobson, G. E. (1981). The constituents of tomato fruit the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crit Rev Food Sci Nutr* **15**: 205-280.

De Gara, L., Paciolla, C., Liso, R., Stefani, A., Blanco, A., and Arrigoni, O. (1993). Ascorbate metabolism in mature pollen grains of *Dasyphyrum villosum* (L)Borb. during imbibition. *J Plant Physiol* **141**: 405-409.

De Gara, L., Pinto, O., and Arrigoni, O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiol Plant* **100**: 894-900.

Demming-Adams, B., and Adams, W. W. I. (1990). The carotenoid zeaxanthin and high-energy-state quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* **25**: 187-198.

De Tullio, M. C., Paciolla, C., Vecchia, F. D., Rascio, N., D'Emérico, S., De Gara, L., Liso, R., and Arrigoni, O. (1999). Changes in onion root development induced by the inhibition of peptidyl-prolyl hydroxylase and influence of the ascorbate system on cell division and elongation. *Planta* **209**: 424-434.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res Res* **19**: 1349.

Etienne, C., Rothan, C., Bouzayen, M., and Causse, M. (2003). La génomique en Biologie Végétale. INRA éditions, Eds JF Morot-Gaudry et JF Briat.

Feinberg, A. P., and Volgestein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity/activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.

Foyer, C. H., and Halliwell, B. (1976). Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25.

Foyer, C., H. and Rewell, J. (1983). Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239-244.

Foyer, C. H., Lelandais, M., and Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* **133**: 696-717.

Foyer, C. H., and Lelandais, M. (1996). A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J. Plant Physiol.* **148**: 391-398.

Franke, W. (1955). Ascorbinsäure. In *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Vol. II (eds K. K. Paech & M.V. Tracey), pp. 95-112. Springer, Berlin.

Fraser, P.D., Pinto, M. E., Holloway, D. E., and Bramely, P. M. (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J* **24**: 551-558.

Gabriela, M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P., Noctor, G., and Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant cell* **15**: 939-951.

Gatzek, S., Wheeler, G. L., and Smirnov, N. (2002). Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. *Plant J* **30**: 541-553.

Gillaspy, G., Ben-David, H., and Grissem, W. (1993). Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.

- Giovannoni, J.** (2001). Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 725-749.
- Gonzalez-Reyes, J. A., Hidalgo, A., Caler, J. A., Palos, R., and Navas, P.** (1994). Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant Physiol* **104**: 271-276.
- Grace, S. C., and Logan, B. A.** (1996). Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broadleaved evergreen species. *Plant Physiol* **112**: 1631-1640.
- Grandillo, S., Ku, H.-M., and Tanksley, S. D.** (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 978-987
- Griffin, A. M., Poelwijk, E. S., Morris, V. J., and Gasson, M. J.** (1997). Cloning of the aceF gene encoding the phosphomannose isomerase and GDP-mannose pyrophosphorylase activities involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 389-396.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maliga, P.** (1994). The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* **25**: 989-994.
- Hancock, D. R., and Viola, R.** (2002). Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends in Biotechnol* **20**: 299-305.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A.** (1989). Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**: 629-634.
- Hashimoto, H., Sakakibara, A., Yamasaki, M., and Yoda, K.** (1997). *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes GDP-mannose pyrophosphorylase, which is essential for protein glycosylation. *J Biol Chem* **272**: 16308-16314.
- Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A. and Navas, P.** (1989). Ascorbate free radical enhances vacuolization in onion root meristems. *Plant Cell Environ* **12**: 455-460.
- Ho, L. C., and Hewitt, J. D.** (1986). Fruit development. In the tomato crop, A. a. Rudish, ed. Chapman and Hall, London, 201-231.
- Ho, L. C.** (1996). The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J Exp Bot* **47**: 275-281.
- Hobson, G. E., and Grierson, D.** (1993). Tomato. In *Biochemistry of Fruit Ripening*, G. Seymour, J. Taylor and G. Tucker, eds. (London: Chapman & Hall), pp. 405-444.
- Hodge, A. M., English, D. R., McCredie, M. R., Severi, G., Boyle, P., Hopper, J. L., and Giles, G. G.** (2004). Foods, nutrients and prostate cancer. *Cancer Causes Control* **15**: 11-20.
- Horemans, N., Asard, H., and Caubergs, R., J.** (1994). The Role of Ascorbate Free Radical as an Electron Acceptor to Cytochrome b-Mediated Trans-Plasma Membrane Electron Transport in Higher Plants. *Plant Physiol* **104**: 1455-1458.
- Hughes, R. E.** (1956). The use of homocysteine in the estimation of dehydroascorbic acid. *Biochem J* **64**: 203-208.
- Huh, W. K., Kim, S. T., Yang, K.S., Seok, Y. J., Hah, Y. C., and Kang, S. O.** (1994). Characterization of D-arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC-10231. *Eur. J. Biochem.* **225**: 1073-1079.
- Huh, W. K., Lee, B. H., Kim, S. T., Kim, Y. R., Rhie, G. E., Baek, Y. W., Hwang, C. S., Lee, J. S., and Kang, S. O.** (1998). D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **30**: 895-903.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R. J., and Robertson, H. D.** (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **250**: 409-417.
- Imai, T., Karita, S., Shiratori, G., Hattori, M., Nunome, T., Ôba, K., and Hirai, M.** (1998). L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol* **39**: 1350-1358.
- Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., Aggioni, O., and Liso, R.** (1990). The size of the quiescent center in roots of *Allium cepa* L. grown with ascorbic acid. *New Phytol.* **114**: 507-509.

- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., and Mapson, L. W.** (1954). Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochem. J.* **56**: 1-15.
- Ito, M., Kodama, H., Komamine, A., and Watanabe, A.** (1998). Expression of extension gene is dependent on the stage of the cell cycle and cell proliferation in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Mol Biol* **36**: 343-351.
- Jain, A. K., and Nessler, C. L.** (2000). Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed* **6**: 73-78.
- Johanston, C. S., Steinberg, F. M., and Rucker, R. B.** (2001). Ascorbic Acid. In *HandBook of vitamin*, R. B. Rucker, Rucker, R. B., Suttie J. W. McCromick D. B. and Machlin L. J., ed. Marcel Dekker, Inc., NewYork, 529-554.
- Joubes, J., Phan, T. H., Just, D., Rothan, C., Bergounioux, C., Raymond, P., and Chevalier, C.** (1999). Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol* **121**: 857-869.
- Joubes, J., and Chevalier, C.** (2000). Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol* **43**: 735-45.
- Joy, R. W., Patel, K. R., and Thorpe, T. A.** (1988). Ascorbic acid enhancement of organogenesis in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* **13**: 219-228.
- Kaiser, W. M.** (1979). Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of the oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* **145**: 377-382.
- Kato, N., and Esaka, M.** (1999). Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol Plant* **105**: 321-329.
- Keller, R., Springer, F., Renz, A., and Kossmann, J.** (1999). Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence. *Plant J* **19**: 131-141.
- Kerk, N. M., and Feldman, L. J.** (1995). A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organization of root meristems. *Development* **121**: 2825-2833.
- Kim, S. T., Huh, W. K., Kim, J. Y., Hwang, S. W., and Kang, S. O.** (1996). D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbate in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1297**: 1-8.
- Kornberg, A., and Horecker B. L.,** (1955). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O., eds. *Methods in enzymology*, Vol. 1. New York: Academic press, 323-325.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landy, A.** (1989). Dynamic, structural and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann Rev Biochem* **58**: 913-949.
- Lavine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593.
- Leipner, J., Francheboub, Y., Stamp, P.** (1997). Accumulation by sub optimal growth temperature diminishes photooxidative damage in maize leaves. *Plant Cell Environ* **20**: 366-372.
- Lin, L., and Varner, J. E.** (1991). Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol* **96**: 159-165.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M. B., and Arrigoni, O.** (1984). Relationships between ascorbic acid and cell division. *Exp Cell Res* **150**: 314-320.
- Liso, R., Innocenti, A. M., Bitonti, M. B., and Arrigoni, O.** (1988). Ascorbic acid-induced progression of quiescent centre cells from G1 to S-phase. *New Phytol* **110**: 469-471.
- Liu, J., Cong, B., and Tanksley, S. D.** (2003). Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus *fw2.2* controls fruit size. *Plant Physiol* **132**: 292-9.

- Loewus, F. A.** (1963) Tracer studies of ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry* **2**: 109-128.
- Loewus, M. W., Bedgar, D. L., Saito, K., and Loewus, F. A.** (1990). Conversion of L-sorbosone to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. *Plant Physiol* **94**: 1492-1495.
- Lorence, A., Chevone, B., Mendes, P., and Nessler, C.** (2004). *Myo*-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol* **134**: 1200-1205.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klissing, D. F., and Raskin, I.** (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.
- Mapson, L. W., and Breslow, E.** (1958). Biological synthesis of ascorbic acid: conversion of derivatives of D-galacturonic acid into L-ascorbic acid by plant extracts. *Biochem J* **64**: 151-157.
- Mareschi, J. P., Brun, L., and Belliot, J. P.** (1980). Evaluation of the daily amount of ascorbic acid supplied by food in France. *Ann. Nutr. Aliment.* **34**: 89-100.
- Marré, E., Arrigoni, O., and Rossi, G.** (1959). Ascorbic acid and photosynthesis. II. Anaerobic photo-oxidation of ascorbic acid by chloroplast fragments and by whole chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta* **36**: 56-64.
- McClarty, G. A., Chan, A. K., Choy, B. K., and Wright, J. A.** (1990). Increased Ferritin gene expression is associated with ribonucleotide reductase gene expression and the establishment of hydroxyurea resistance in mammalian cells. *J Biol Chem* **265**: 7539-7547
- Mieda, T., Yabuta, Y., Rapolu, M., Motoki, T., Takeda, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., and Shigeoka, S.** (2004). Feedback inhibition of Spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol* **45**: 1271-1279.
- Millar, A., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J., Bartoli, C.G., Theodoulou, F., and Foyer, C.** (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* **133**: 443-447.
- Mittler, R., and Lam, E.** (1996). Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in higher plants. *Trends Microbiol* **4**: 10-15.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant. Sci* **7**: 405-415.
- Murray, H. G., and Thompson, W. F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic acids Res* **8**: 4321-4325.
- Mutsuda, M., Ishikawa, T., Takebe, T., and Shigeoka, S.** (1995). Subcellular localization and properties of L-galactono-gama-lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Biosci. Biotech Biochem* **59**: 1983-1984. Abstract.
- Naidu, K. A.** (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery ? An overview. *Nutr. J* **21**: 2-7.
- Nesbitt, T. C., and Tanksley, S. D.** (2002). Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*. Implications for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics* **162**: 365-79.
- Nishikimi, M., and Udenfried, S.** (1976). Immunologic evidence that the gene for L-gulonono-gama-lactone oxidase is not expressed in animal subject to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2066-2068.
- Nitsch, J.** (1970). Hormonal factors in growth and development. In *The Biochemistry of the Fruits and their Products*, A. C. Hulme, ed. (London: Academic Press), pp. 427-472.
- Ôba K, Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., and Yamamoto, T.** (1995) Purification and properties of L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem* **117**: 120-124
- Østergaard. J., Persiau, G., Davey, M., Bauw, G., and Van Montagu, M.** (1997). Isolation of a cDNA coding for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants: purification, characterization, cDNA cloning and expression in yeast. *J. Biol Chem* **272**: 30009-30016.
- Padh, H.** (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* **68**: 1166-1173.

- Pallanca, J., and Smirnoff, N.** (1999). Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol* **120**: 453-461.
- Paolacci, A. R., Badiani, M., D'Annibale, A., Fusari, A., and Matteucci, G.** (1997). Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *triticum durum* def. seedling acclimated to non-stressing high temperature. *J Plant Physiol* **150**: 381-387.
- Pateraki, I., Sanmartin, M., Kalamaki, M., Gerasopoulos, D., and Kanellis, A.** (2004). Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J Exp Bot* **55**:1623-1633.
- Pietrzack, M., Shillito, R. D., Hohn, T., and Potrykus, I.** (1986). Expression in plants of two bacterial antibiotics resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic. Acids Res.* **14**: 5857-5868.
- Pitrat, M., and Coord, F.** (2003). Histoires de légumes. La tomate, ed. INRA, Paris pp 267-277.
- Rautenkranz, A., Machler, F., Li, L., Martinoia, E., and Oertli, J. J.** (1994). Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* cv. Gerbil) leaves. *Plant Physiol* **106**: 187-193.
- Rayle, D. L., and Cleland, R. E.** (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**: 1271-1274.
- Reichstein, T., and Grussner, A.** (1934). Energiebige synthesis dev L-ascorbinsäure (C-vitamin). *Helv Chim Acta* **17**:311-328.
- Reiter, W. D.** (1988). The molecular analysis of cell wall components. *Trends Plant. Sci* **3**: 27-32
- Rick, C. M.** (1978). La tomate. *Pour la Science* **12**: 76-86.
- Ronald, R., Eitenmiller, W. O., and Landen, J. R.** (1999). Vitamin analysis for the health and food science. CRC Press, USA: 223-226.
- Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E. J., 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. *J Biol Chem.* **277**: 43948-60.
- Sa-Correia, I., Darzins, A., Wang, S. K., Berry, A., and Chakrabarty, A. M.** (1987). Alginate biosynthetic enzymes in mucoid and non mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: overproduction of phosphomannose isomerase, phosphomannomutase, and GDP-mannose pyrophosphorylase by overexpression of the phosphomannose isomerase (pmi) gene. *J Bacteriol* **169**: 3224-3231.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of b-globin sequences and restriction site analysis of sickle-cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saito, K., Nick, J. A., and Loewus, F. A.,** (1990). D-Glucosone and L-sorbosone, putative intermediates of L-ascorbic acid biosynthesis in detached bean and spinach leaves. *Plant Physiol* **94**:1469-1500.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, F.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Savouré, A., Thorin, D., Davey, M., Hua, X., Mauro, S., Van Montagu, M., Inzé, D., and Verbruggen, N.** (1999). NaCl and CuSo4 treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Cell and Environ* **22**: 387-396.
- Siendones, E., Gonzales-Reyes, J. A., Santos-Ocana, C., Navas, P., and Cordoba, F.** (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol* **120**: 907-912.
- Smirnoff, N.** (1995). Antioxidant system and plant response to the environment. In: Smirnoff N, ed. environment and plant metabolism: flexibility and acclimation. Oxford: bios Scientific Publishers : 217-243.
- Smirnoff, N.** (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot* **78**: 661-669.

- Smirnoff, N.** (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 1455-1464.
- Smirnoff, N.** (2000b). Metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Curr Opin Plant Biol* **3** : 229-235.
- Smirnoff, N.** (2001) L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* **61**:241-66.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Streb, P., Feierabend, J., and Bligny, R.** (1997). Resistance to photoinhibition of photosystem II and catalase and antioxidative protection in high mountain plants. *Plant cell Environ.* **20**: 1030-1040.
- Sugiyama, T., Kido, N., Komatsu, T., Ohata, M., Jann, K., Jann, B., Saeki, A., and Kato, N.** (1994) Genetic analysis of *Escherichia coli* O9 rfb: identification and DNA sequence of phosphomannomutase and GDP-mannose pyrophosphorylase genes. *Microbiology* **140**: 59-71.
- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K. and Esaka, M.** (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* **27**: 139-148.
- Tamaoki, M., Mukai, F., Asai, N., Nakajima, N., Kubo, A., Aono, M., and Saji, H.** (2003). Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* **164**: 1111-1117.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, F., and Vanderleyden, J.** (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell.* **7**: 573-588
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D. B.** (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187-1194.
- Turcsányi, E., Lyons, T., Plöchi, M., and Barnes, J.** (2000). Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J Exp Bot* **51**: 901-910
- Van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G., and Tanksley, S.** (2002). Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* **14**: 1441-56.
- Varga, A., and Bruinsma, J.** (1986). Tomato. In *CRC Handbook of Fruit Set and Development*, S. P. Monselise, ed. (Boca Raton, Fla: CRC Press), pp. 461-491.
- Veljovic-Jovanovic, S. D., Pignocchi, C., Noctor, G., and Foyer, C. H.** (2001). Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol* **127**: 426-435.
- Vera, P., Lamp, C., and Doener, P. W.** (1994). Cell cycle regulation of Hydroxyleproline-rich glycoprotein HRGPnt3 gene expression during the initiation of lateral root meristem. *Plant J* **6**: 717-727.
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M., Hoekema, A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids Res* **17**: 2362-2368.
- Von Heijne, G.** (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO. J.* **5**: 1335-1342.
- Wagner, C., Sefkow, M., and Kopka, J.** (2003). Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. *Phytochemistry* **62**: 887-900.
- Watanabe, K., Suzuki, K., and Kitamura, S.** (2006). Characterization of a GDP-D-mannose 3", 5"-epimerase from rice. *Phytochemistry* **67**: 338-346.
- Wheeler, G., Jones, M., and Smirnoff, N.** (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**:365-369.
- Wintermans, J. F., and Mots, A.** (1965). Spectrophotometric characteristic of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys. Acta* **109**: 448-453.

Wolff, S. P., Garner, A., and Dean, R. T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 27-31.

Wolfinger, R. D., Gibson, G., Wolfinger, E. D., Bennett, L., Hamadeh, H., Bushel, P., Afshari, C., and Paules, R. S. (2001). Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol* **8**: 625-637.

Wolucka, B. A., Persiau, G., Van Doorselaere, J., Davey, M. W., Demol, H., Vandekerkhove, J., Van Montagu, M., Zabeau, M., and Boerjan, W. (2001) Partial purification and identification of GDP-mannose 3",5"-epimerase of *Arabidopsis thaliana*, a key

enzyme of the plant vitamin C pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 14843-14848.

Wolucka, B. A., and Van Montagu, M. (2003) GDP-mannose-3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem* **278**: 47483-47490.

Yabuta, Y, Yashimura, K., Takeda, T., and Shigeoka, S. (2000). Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-Galactono 1,4-lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* **41**: 666-675.

