



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UMR 1121 Nancy Université – INRA
Agronomie et Environnement
Ecole doctorale RP2E



THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL

Mention

Sciences Agronomiques

Par **Camille Bénard**

Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate

Soutenue publiquement le **1er octobre 2009** devant le jury composé de :

Mme MJ. Amiot-Carlin	Directrice de recherches, INRA, Université, Marseille I&II-INSERM-INRA	Rapporteur
M L. Urban	Directeur de recherches, INRA, San Giuliano	Rapporteur
M C. Jay-Allemand	Professeur, Université Montpellier II	Examineur
M P. Vivin	Chargé de recherches, INRA Bordeaux	Examineur
Mme H. Gautier	Chargée de recherches, INRA Avignon	Co-directrice de thèse
M F. Bourgaud	Professeur, Nancy-Université-INRA, Nancy	Directeur de thèse

Remerciements

J'ai passé ces cinq dernières années (DEA et Thèse) entre le LAE de Nancy et l'INRA d'Avignon. Ce fut une véritable épopée où j'ai appris beaucoup sur le plan scientifique, mais aussi sur la vie ! Je tiens donc à remercier les nombreuses personnes que j'ai rencontrées et qui ont participé à cette aventure.

Je souhaite remercier **Mme Marie Joséphe Amiot-Carlin**, Directrice de recherches de l'UMR INRA INSERM Université Marseille I&II, **M Laurent Urban**, Directeur de recherches à l'INRA de San Giuliano en Corse, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à **M Christian Jay Allemand**, Professeur à l'Université de Montpellier II et à **M Philippe Vivin**, Chargé de Recherches à l'INRA de Bordeaux, d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie, **Sylvain Plantureux**, directeur du Laboratoire Agronomie et Environnement pendant 3 années.

Je remercie **Frédéric Bourgaud**, nouveau directeur du Laboratoire Agronomie et Environnement, et mon directeur de thèse. Chef, merci d'avoir un peu accéléré les choses et de m'avoir obtenu cette bourse de thèse après mon DEA. Même si cela n'aura pas toujours été facile de débiter cette thématique je peux maintenant me vanter d'avoir été le premier membre de l'équipe tomate ! Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée au cours de ces années de recherche, et pour ta disponibilité lors de la rédaction de ce document. Enfin merci d'avoir été si gentil et compréhensif, notamment cette dernière année. Merci (et bravo !) de m'avoir supportée, et de m'avoir encore et toujours encouragée et rassurée sur la qualité de mon travail.

Je voudrais remercier maintenant ma co-directrice de thèse, **Hélène Gautier**. Merci pour ton implication dans mon travail, et notamment dans l'analyse des résultats. Merci d'avoir été si disponible malgré la distance qui nous séparait. Je te remercie aussi de m'avoir fait confiance pour d'autres projets, et de m'avoir impliquée dans la rédaction d'articles. Et bien sûr merci pour ton soutien et ta gentillesse dont j'ai profité durant toutes ces années.

Je tiens également à remercier **Jean Luc Poessel**, qui a été le premier à m'expliquer le monde compliqué des composés phénoliques. Merci d'avoir toujours pris au sérieux mon travail, merci pour tes conseils éclairés, et merci pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement et en dehors du laboratoire.

Je remercie tous **les gens de l'INRA d'Avignon** d'avoir rendu mes séjours parmi vous agréables. Merci à tous pour votre aide et votre gentillesse. Je remercie spécialement **Jacques, Stéphane, Josiane, Sylvie, José et Marie-Noëlle** avec qui j'ai apprécié travailler. Un merci particulier à **Marion** qui m'a accueillie dans son bureau et avec qui j'ai passé et je passerai de bons moments ! Un tendre merci à **Françoise**, quelle super rencontre ! Que de bons moments passés avec toi et tes amis, merci de m'avoir hébergée, d'avoir pris soin de moi, et de m'avoir fait visiter la région. Merci à tous les copains du ping-pong et particulièrement à **Jacques et Jean-François**.

Je remercie maintenant **tous les membres du LAE**. Merci à tous pour votre disponibilité et votre aide scientifique, et aussi pour les pauses fort sympathiques en salle café !

Plus particulièrement je voudrais remercier :

Martine dont l'arrivée a été salvatrice pour l'équipe tomate ! Merci pour ton aide, et ta gentillesse.

Alain, Christophe, Bernard merci de m'avoir consacré du temps et merci pour votre aide précieuse.

Thamara, merci également pour ton aide, merci d'avoir été aussi patiente avec moi, si disponible, si souriante ! Et surtout merci de m'avoir laissé jouer avec ta fille ! Alors merci à **Paloma** pour les bons moments de détente passés avec toi !

Merci aux collègues de la Thésard Valley pour la bonne ambiance qui y régnait, et en particulier merci à :

Flore, Etienne, Romain, Le grand Seb, Emma, Benoit, de m'avoir aidée, écoutée et remonté le moral quand j'en avais besoin ! Merci aussi pour les bons moments passés au bureau et pour les bonnes soirées.

Robert pour tout ça et plus ! Et aussi pour avoir été mon ami Allemand à la cantine !

Merci à tous les autres pour leur gentillesse **Kristine, Boris, Mike, Dao, Lama, Seb, petit Seb, Pti Ben, Sissi, Guilhem** (bon dernier voisin de bureau !) et aux **stagiaires**, dont **Aurore Bibonne** qui a réalisé son stage de fin d'études dans l'équipe tomate et qui a contribué à ce travail.

Je tiens également à remercier tous les gens de l'ENSAIA et des autres laboratoires qui auront été sympa avec moi et avec qui j'ai eu plaisir à échanger quelques mots dans les couloirs et les labos, je pense par exemple à **Latifa, Sabrina, Sylvie, Philippe Lerouillois, Isabelle Chevalot, les gens du LSE pour les discussions à la cantine.....** désolée si j'en oublie....

Je tiens également à remercier tous ceux qui m'auront si gentiment aidée, comme **Fabrice Blanchard, Emmanuelle Guédon, Olivier Tognella, Adrien, Cédric Paris.....**

Et puis merci à **tout l'URAFPA** de m'avoir acceptée à leur pause et dans leur salle café ! Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Au sein de cette équipe un merci particulier à **Yves Le Roux** pour sa disponibilité et pour son aide pour toutes ces histoires de stats **Cyril Feidt** pour toutes ses blagues ! Merci aussi à **Claire et Christine** qui auront toujours tout fait pour m'aider et qui m'ont sortie de bien des situations difficiles ! Merci et bonne route aux **thésards** (Fayçal, Agnès, Anaël, Angélique, Aude, Nico, Julien....) à qui j'ai bien aimé rendre visite, et merci pour les bavardages de couloir ! Merci à **Catherine** mon coach sportif, entre autres !

Au cours de ma thèse et cette dernière année en tant qu'ATER, j'ai effectué des TP à l'Université Henri Poincaré de Nancy au sein de l'équipe STB. Je souhaite remercier tous les gens qui m'auront aidée à la fac, notamment **JC Pirreaux, V Legué, A Brun, C Fourrey, D Gérard, Jacques, Eliane et Jean Pierre** qui ont participé au bon déroulement de ces enseignements. Un merci particulier à **Claire et Dominique** pour leur gentillesse, le temps qu'elles m'ont consacré, et leurs conseils, qui m'ont confortée dans l'envie d'enseigner.

Je voulais aussi remercier mes amis du ping-pong au CNRS, **les Philippe, Annick.....** et le coach **Tony**, pour cette heure de détente et de rigolade hebdomadaire.

Un grand merci à ma gang de copines : **Alice, Manue, DD, Marine, Hélène, Agnès, Sophie, Maxi, Cath, Rose, et Vincent !** d'avoir été *juste* là ! Merci pour votre bienveillance, pour votre soutien et vos conseils de tous les instants. Merci pour les promenades dans le parc, pour les sorties découvertes et événements locaux (la fête de la mirabelle, sons et lumière...), les soirées resto, les soirées apéro, les soirées bricolage, les soirées juste comme ça ! Les fous rires partagés autour d'un scrabble, d'un verre de vin..... ou deux ! Bref pour tous ces précieux moments et pour votre amitié : sans vous je n'aurais pas réussi.

J'ai aussi une pensée pour **Clément, Alicia, Bérengère, Emilie**, amis de mon parcours étudiant : ayé j'ai fini de rédiger !

Mes derniers remerciements seront pour ma famille :

Un énorme merci à **Thomas**, mon grand frère qui en quelques clics et 2 secondes était là pour m'encourager, me remonter le moral, et me donner le sourire !

Merci à **papa et maman** d'avoir toujours été à mes côtés durant toutes ces années d'études, et d'avoir débarqué dès que j'en avais besoin aux quatre coins de la France ! Merci pour votre amour qui doit vous aider à supporter mon « caractère », et qui m'apporte tant de réconfort. Enfin, merci d'avoir fait de votre mieux pour m'aider, me soutenir et me rendre la vie plus belle et facile depuis toujours et encore plus ces derniers temps.

Enfin j'ai une tendre pensée pour toute ma famille : **Bénard et Fihue**, et j'ajoute un baiser à mémé **Huguette**.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	5
Introduction	9
Chapitre I : Synthèse bibliographique	13
I La tomate	15
A/ Généralités historiques	15
B/ Description botanique	17
C/ Croissance et développement	17
D/ Composition du fruit et des feuilles de tomates	21
a) <i>Composition des feuilles</i>	21
b) <i>Composition des fruits</i>	21
E/ Qualité et valeur santé du fruit	22
F/ Importance économique et production actuelle	23
II Composés phénoliques	27
A/ Généralités biochimiques	27
B/ Localisation et rôle dans les plantes	28
C/ Importance pour l'homme	31
D/ Composés phénoliques chez la tomate	35
E/ Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques	36
a) <i>Lumière</i> :	36
b) <i>Température</i> :	36
c) <i>Période de l'année</i> :	37
d) <i>Nutrition minérale</i> :	37
e) <i>Enrichissement en CO₂</i> :	38
III L'azote	39
A/ Absorption et assimilation de l'azote	39
B/ Impact sur les métabolismes primaires et secondaires	43
IV Lien entre métabolisme primaire et secondaire, théories de répartition du carbone dans la plante	47
A/ Lien entre le métabolisme primaire et secondaire	47
B/ Théories de répartition du carbone dans la plante	49
V Objectifs de la thèse	53
Chapitre II : Matériel et Méthodes	55
I Le matériel végétal utilisé	57
A/ Rondello	57
B/ Clotilde	57
C/ Cervil	59
D/ Microtom	59
II Les dispositifs de culture utilisés lors des expérimentations	61
III Méthodes Analytiques	61
A/ Simplification et validation de la méthode d'extraction des polyphénols	61
a) <i>Comparaison de trois solvants</i>	63
b) <i>Simplification de la méthode</i>	65
c) <i>Volume de solvant nécessaire</i>	65
d) <i>Méthode d'extraction des polyphénols dans les parties végétatives</i>	65

e) Conclusion.....	67
B/ Description des méthodes utilisées.....	67
a) Les méthodes d'extraction	67
b) Les analyses par chromatographie liquide à haute performance, HPLC	69
C/ Méthode de dosage du carbone et de l'azote totaux	73
Chapitre III : Impact de la nutrition azotée dans les parties végétatives de la tomate ...	75
I Matériels et méthodes	79
A/ Caractérisation spatiale des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination des courbes de réponse à l'azote	79
a) Description du dispositif de culture en Nutrient Film Technique (NFT).....	79
b) Préparation des solutions nutritives	81
c) Conditions de cultures.....	81
d) Récolte et échantillonnage	81
e) Analyses statistiques.....	82
B/ Caractérisation temporelle des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination du temps nécessaire	85
a) Description du dispositif de culture hydroponique en conteneur	85
b) Préparation des solutions nutritives	85
c) Conditions de cultures de la deuxième expérimentation.....	86
d) Récolte et échantillonnage	86
e) Analyses statistiques.....	86
II Caractérisation spatiale des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination des courbes de réponses à l'azote	89
A/ Impact de la nutrition azotée sur le développement des plantes	89
B/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote	91
C/ Courbes de réponse à l'azote dans les limbes	93
D/ Conclusion.....	95
III Le temps nécessaire pour la mise en place de la réponse	97
A/ Définition du temps nécessaire pour observer des modifications chez des plantes cultivées en NFT	97
B/ Mise en évidence du temps nécessaire à la mise en place des modifications chez des plantes cultivées sur le système hydroponique en conteneurs	103
C/ Conclusion.....	106
IV Discussion	107
A/ Impact de la nutrition azotée sur la croissance des plantes	107
B/ Composition en métabolites primaires et secondaires.....	108
a) Métabolites primaires	108
C/ Importance du stade phénologique des plants	111
V Conclusion	111
Chapitre IV : Etude de la dynamique temporelle des teneurs en polyphénols lors d'une carence ponctuelle en nitrate	113
I Matériels et méthodes	119
A/ Conditions de culture	119
B/ Description du protocole expérimental	119
C / Récolte et échantillonnage.....	121
D/ Analyses statistiques	121
II Résultats	123

A/ Conséquence sur le développement des plantes.....	123
B/ Conséquence sur la composition des plantes.....	127
III Discussion	132
A/ Effet de la carence sur le développement des plantes	132
B/ Effet de la carence sur la composition des limbes et des fruits	132
C/ Conclusions et perspectives.....	134
Chapitre V : Impact de la nutrition azotée sur les fruits de tomate	137
I Matériels et méthodes	143
A/ Culture effectuée sous serre avec le cv Clotilde	143
a) Description du dispositif de culture sur pain de laine de roche	143
b) Préparation des solutions nutritives	143
c) Conditions de culture	145
d) Caractérisation du microclimat du fruit	145
e) Récolte, échantillonnage, préparation des échantillons et mesure physique	147
f) Analyses statistiques	148
B/ Culture effectuée en phytotron avec le cv Microtom	148
a) Conditions de culture	148
b) Récolte et échantillonnage	149
c) Analyses statistiques.....	149
II Effet de la nutrition azotée sur la qualité visuelle, gustative et nutritionnelle de la tomate cv Clotilde	151
A/ Impact de la nutrition azotée sur le développement des plantes et le rayonnement arrivant aux fruits	151
B/ Impact de la nutrition azotée sur les rendements de la culture et les caractéristiques des fruits	153
C/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote	157
D/ Conclusions	159
III Impact de la nutrition azotée en conditions contrôlées sur le cv Microtom	161
A/ Impact de la nutrition azotée sur la croissance des plantes	161
B/ Impact de la nutrition azotée sur les rendements de la culture et les caractéristiques des fruits	163
C/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, en carbone et azote	163
D/ Conclusions	165
IV Discussion	166
A/ Effet sur le rendement et la qualité visuelle des fruits	166
B/ Effet sur la composition en polyphénols des fruits	166
a) Composition en polyphénols des deux cultivars : Clotilde et Microtom	166
b) Importance de la lumière et de la température	167
c) Etat sanitaire des plantes	168
d) Considération sur le modèle Microtom	168
C/ Le fruit organe particulier et protégé.....	169
D/ Effet bénéfique de la diminution des apports en azote pour la qualité gustative et nutritionnelle du fruit de tomate.....	170
V Conclusion	172

Chapitre VI : Effet du stade de développement et des conditions climatiques sur les teneurs en polyphénols dans les limbes et les fruits de tomate.....	173
I Matériel et Méthodes	176
A/ Influence du stade de développement de la plante et de la saison sur les teneurs en composés phénoliques dans les feuilles.	176
a) <i>Conditions de culture relatives à l'évolution de l'accumulation des composés phénoliques au cours de la croissance des plantes, et effet de la température et du rayonnement.</i>	176
b) <i>Conditions de culture et d'échantillonnage pour mettre en évidence l'influence de la saison de culture</i>	176
c) <i>Analyses statistiques et analyses des résultats</i>	177
B/ Influence du stade de maturité des fruits, de la température et du rayonnement lors de la maturations des fruits, et de la saison de culture sur les teneurs en composés phénoliques.....	177
a) <i>Conditions de culture et de récolte des fruits</i>	177
b) <i>Conditions expérimentales pour étudier l'effet de la température et de la lumière lors de la maturation des fruits</i>	179
c) <i>Analyse de la composition des fruits au cours d'une saison de culture</i>	181
d) <i>Analyses statistiques</i>	181
II Résultats et Discussion	183
A/ Evolution du contenu en composés phénoliques dans les limbes, au cours du développement de la plante	183
B/ Importance de l'environnement de culture.....	185
a) <i>Importance des conditions climatiques au cours de la première culture</i>	185
b) <i>Effet de la saison sur la croissance et la composition des limbes</i>	187
C/ Evolution du contenu en polyphénols des fruits, au cours de leur maturation.....	191
D/ Importance des conditions climatiques	191
a) <i>Evolution du contenu en composés phénoliques au cours de la saison</i>	191
b) <i>Evolution du contenu en composés phénoliques sur des fruits détachés, en fonction des conditions de lumière et de rayonnement</i>	193
III Conclusion	195
Conclusions générales et perspectives	197
Références Bibliographiques	203
Liste des Tableaux et Figures	217
Annexes	227

Introduction

Les végétaux produisent des métabolites primaires qui entrent dans le fonctionnement vital de la cellule. Les plantes synthétisent également de nombreux composés qualifiés de « secondaires » dont toutes les fonctions n'ont pas encore été identifiées mais qui sont fondamentaux, notamment pour l'adaptation des plantes à leur environnement. Plusieurs familles de composés font partie de ce métabolisme secondaire, dont les composés phénoliques ou polyphénols. Chez les végétaux, ces polyphénols sont, entre autres, impliqués dans les mécanismes de résistances aux stress biotiques et abiotiques. Par ailleurs, des études récentes sur l'effet bénéfique de la consommation de fruits et légumes chez l'homme, ont suggéré l'implication de ces composés dans la prévention et la lutte contre certaines maladies. Il est donc important de comprendre les conditions de synthèse et d'accumulation de ces composés, pour améliorer la composition des végétaux aussi bien pour des raisons agronomiques qu'alimentaires.

Ces dernières années plusieurs voies de biosynthèse de métabolites secondaires ont été élucidées, et décrites d'un point de vue moléculaire. Ainsi par des approches de transformations génétiques, les teneurs de certains polyphénols peuvent être accrues. La surexpression d'enzymes clefs de la voie de synthèse de l'acide chlorogénique, permet de doubler ses teneurs dans les feuilles de tomate (Niggeweg *et al*, 2004). En surexprimant des facteurs de transcription, ces augmentations peuvent être encore plus remarquables, en multipliant au moins par dix les concentrations en métabolites (Muir *et al*, 2001; Bovy *et al*, 2002). Cependant si ces approches apportent beaucoup de connaissances d'un point de vue scientifique, leurs applications restent encore controversées. En outre, de telles augmentations des concentrations en polyphénols pourraient avoir des effets inverses de ceux souhaités. En effet les connaissances actuelles en terme de quantité nécessaire ou de dose recommandée pour la santé sont assez incertaines, les modes d'action de ces micronutriments étant toujours à l'étude.

Comparativement, il existe beaucoup moins de données pour expliquer l'effet de l'environnement sur la synthèse et le stockage des métabolites secondaires végétaux (Dumas Y *et al*, 2003). Or c'est une autre approche envisageable pour moduler de façon raisonnable les teneurs en polyphénols. En effet les variations de conditions de culture comme l'intensité de la lumière ou les apports en minéraux conduisent à des augmentations plus modérées, comme par exemple le doublement des teneurs en flavonoïdes (Carpene *et al*, 1982; Lopez-Andreu *et al*, 1988; Awad et De Jager, 2002; Dumas Y *et al*, 2003). Il s'agit d'un ordre de variation qui peut être rencontré au sein d'un même génotype (Martinez-Valverde *et al*,

2002), ce qui permettrait d'éviter des teneurs anormalement élevées pouvant conduire à la toxicité éventuelle de ces molécules.

Ce manque de connaissances sur l'effet des facteurs environnementaux, s'applique en particulier à la tomate. L'intérêt nutritionnel de sa consommation a été démontré, les gènes intervenant dans la synthèse de polyphénols qu'elle contient sont décrits, mais il n'existe pratiquement pas de travaux qui permettent de relier la teneur en polyphénols aux conditions environnementales imposées à la plante.

Dans la première partie du manuscrit, nous proposons une analyse bibliographique visant à apporter des connaissances générales sur la tomate, les composés phénoliques, les effets de la nutrition azotée et à décrire les théories de répartition du carbone dans la plante. Cette première partie soulignera également l'importance des facteurs environnementaux dans la composition des organes végétaux. Ce bilan permettra de justifier nos choix et nos principales hypothèses de travail. Les matériels et les méthodes utilisés dans cette étude seront ensuite décrits. Puis les principaux résultats seront présentés et discutés. Enfin une conclusion générale synthétisant le travail et ses perspectives est proposée en fin de document.

Au moment de la rédaction de ce mémoire, ce travail a été valorisé par la rédaction de trois articles, dont deux ont été publiés à ce jour (Gautier *et al*, 2008; Benard *et al*, 2009), la participation à deux colloques, et a permis de débiter une collaboration avec une équipe dirigée par C. Lillo de l'université des sciences et techniques de Stavanger. (Annexe 1 et 2)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I La tomate

A/ Généralités historiques

La tomate (*Solanum Lycopersicum*) est originaire des vallées fertiles du Mexique. Elle a d'abord été cultivée et améliorée par les indiens du Mexique, sous le nom aztèque « tomatl », avant d'être ramenée en Europe par les conquistadores. Neuf espèces sauvages peuvent être observées en Amérique du sud, dont seulement deux comestibles, la « tomate groseille » (*Solanum pimpinellifolium*) et la « tomate cerise » (*Solanum lycopersicum var cesariforme*) qui est l'ancêtre de nos tomates actuelles (De Broglie et Guérault, 2005; Renaud, 2006).

En Europe les italiens ont été les premiers à la consommer dès le 16ème siècle, notamment en sauce, et c'est sous cette forme qu'elle atteint la France par la Provence au 17ème siècle, avant d'être popularisée à Paris lors de la révolution (Schumann, 1996; Degioanni, 1997). La tomate a longtemps été considérée comme toxique, et on lui associait tous types de vertus maléfiques à cause de sa ressemblance avec la mandragore. Elle a donc d'abord été utilisée en tant que plante ornementale, puis en 1778, elle a rejoint le catalogue de semence potagère de Vilmorin-Andrieu (Degioanni, 1997; Mikanowski et Mikanowski, 1999).

Par la suite, la consommation de tomates a connu un essor au 19ème siècle lorsque les fruits et légumes dit « primeurs » cultivés dans le sud de la France ont été acheminés dans le nord par les chemins de fer. Une variété de tomates s'appelle d'ailleurs la PLM : Paris-Lyon-Marseille. Dans le même temps, la tomate se démocratise en étant cultivée dans les jardins familiaux et ouvriers.

Les premières recherches variétales débiteront au 20ème siècle, pour produire des tomates plus régulières, plus productives, et plus résistantes aux maladies. Les modes de production évoluent également, la production de tomates sous serre toute l'année, notamment aux Pays-Bas prend de l'ampleur. Aux Etats-Unis par contre, les cultures restent davantage effectuées en plein champ de façon mécanisée.

La production et la consommation mondiales de tomates sont devenues très importantes, et depuis les années 90, les consommateurs se plaignent de la standardisation de ce produit et de la perte de goût de la tomate (Degioanni, 1997). Les recherches actuelles s'orientent donc plus vers une caractérisation et une amélioration de la qualité organoleptique du fruit de tomate.

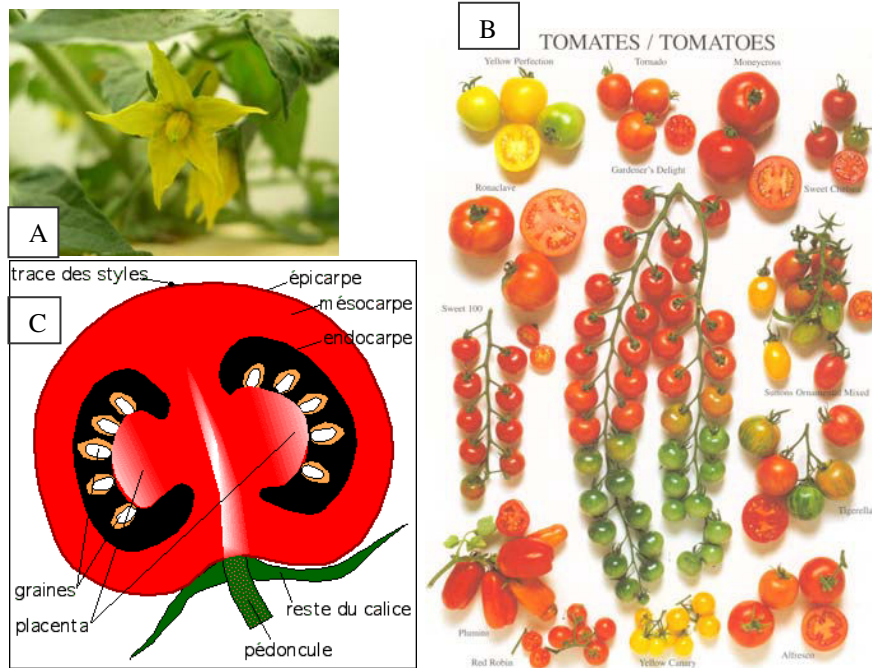


Figure 1 : (A) Fleur de tomate à cinq pétales soudés, en anthèse. (C) Carte postale (Roger Phillips, Nouvelles Images SA) illustrant la diversité des formes, tailles et couleurs des fruits de tomate. (B) Schéma d'un fruit en coupe transversale représentant les différentes parties de la baie.

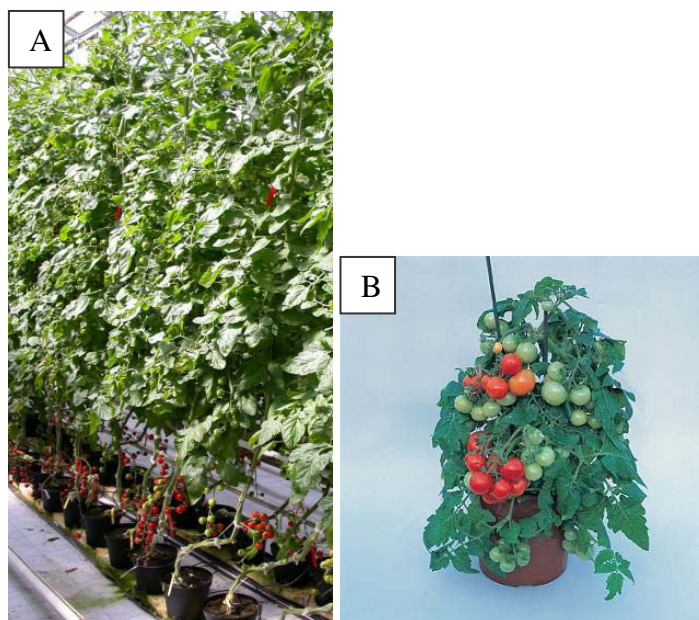


Figure 2 : (A) Plant de tomate cerise (cv Cervil), à croissance indéterminée, cultivé en pot sous serre. (B) Plant de tomate nain (cv Red Robin) à croissance déterminée, cultivé en pot.

B/ Description botanique

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est une plante climactérique, diploïde à $2n=24$ chromosomes (Judd *et al*, 2002), qui appartient à l'ordre des solanales et à la famille des solanacées (Atherton et Rudich, 1986). C'est une plante herbacée, vivace à l'état naturel, et annuelle en culture.

Ses feuilles sont alternes et sans stipule. Elles sont composées, pennées, à 7, 9 ou 11 segments ovales, incisés ou dentelés grossièrement et alternant avec des segments plus petits. Les fleurs sont actinomorphes, autogames, de couleur jaune et réunies en inflorescences pentamères (Figure 1A), sauf le gynécée qui possède entre 2 et 5 carpelles (Abbeyes *et al*, 1963). L'ovaire supère est formé d'au moins deux carpelles soudés, orientés obliquement par rapport à l'axe médian de la fleur, et comprend de très nombreux ovules en placentation axile (Judd *et al*, 2002). Le calice est à pièces partiellement soudées et la corolle est gamopétale (Abbeyes *et al*, 1963) (Figure 1 A).

Le fruit est une baie plus ou moins grosse, de forme variable (sphérique, oblongue, allongée), et de couleurs variées (blanches, rose, rouge, jaune, orange, verte, noire) selon les variétés (Figure 1B)(Renaud, 2003). Les graines sont réparties dans des loges remplies de gel. La paroi de l'ovaire évolue en péricarpe charnu et délimite des loges. Le placenta constitue la partie centrale du fruit et est à l'origine des tissus parenchymateux (Figure 1C). Le nombre de loges, l'épaisseur du péricarpe et l'importance du gel sont dépendants des variétés (Grasselly *et al*, 2000).

C/ Croissance et développement

Les différentes variétés de tomates sont classées selon deux types : déterminé et indéterminé (Figure 2), en fonction du développement de leur tige (Atherton et Rudich, 1986). La croissance déterminée est due à une mutation génétique : le self pruning factor. Chez les variétés à croissance déterminée, la tige après avoir donné un faible nombre de bouquets, se termine elle-même par une inflorescence. Les pousses latérales se terminent également par une inflorescence. Les plantes ont un port buissonnant, leur croissance est souvent compacte et la floraison se produit sur une période courte (Mikanowski et Mikanowski, 1999). Ce caractère déterminé est intéressant pour les cultures précoces et pour les cultures industrielles (Pecaut et Philouze, 1968).

Les variétés à croissance indéterminée présentent un nombre indéfini d'inflorescences sur la tige principale comme sur les tiges latérales. Cette croissance peut cependant être interrompue par des facteurs extérieurs comme le gel, ou régulée en taillant les plantes (Mikanowski et Mikanowski, 1999). La plupart des cultivars disponibles sont des variétés à croissance indéterminée.

La fécondation des ovules et la maturation des fruits marquent respectivement le début et la fin du développement du fruit. Le nombre de fruits par grappe est fonction de la variété utilisée, et peut être déterminé en taillant les plantes, une fois la nouaison des fruits effectuée. La courbe de croissance des fruits est d'allure sigmoïdale et comprend trois périodes :

- Une première phase de croissance lente d'une quinzaine de jours après anthèse, pendant laquelle a lieu la majorité des divisions cellulaires. Pendant cette période, se détermine le potentiel de croissance du fruit à travers le nombre de cellules formées.
- Une deuxième phase de croissance rapide jusqu'au stade vert mature. C'est pendant cette phase, dite de grandissement cellulaire, que le potentiel généré à la première étape est plus ou moins réalisé selon les conditions climatiques et les équilibres végétatifs / génératifs de la plante.
- Une troisième phase dite de maturation, caractérisée par une croissance lente ainsi qu'un changement brutal de la couleur, de la texture et de la composition chimique du fruit. En effet, c'est essentiellement une période de transformations biochimiques qui dépend des composés stockés et de l'environnement du fruit (Grasselly *et al*, 2000).

La qualité d'un fruit s'élabore continuellement pendant son développement. Sa composition finale dépend de l'importation et du stockage des assimilats. La quantité d'assimilats disponible pour le fruit est liée au nombre d'organes puits (organe importateur) et de leur force de puits, et dépend de l'activité photosynthétique des feuilles fournissant le saccharose, principale forme d'importation d'assimilats par les fruits (organes sources) (Grasselly *et al*, 2000). Il faut noter que les fruits verts sont également photosynthétiques et que cette activité est non négligeable (Carrara *et al*, 2001).

(g)	Variations	Minéraux (mg)	Variations	Vitamines (mg)	Variations
Eau	93,4-95,2	Ca	9,7-15	Provitamine A	0,5-0,8
Protides	0,9-1,1	K	202-300	B1	0,04-0,06
Lipides	trace-0,3	Na	3-11	B2	0,02-0,05
Glucides	2,8-4,7	P	20-27	B6	0,08-0,1
Fibres	0,5-1,5	Fe	0,2-0,6	C	15-23
Minéraux	0,6	Mg	3-11	E	0,04-1,2

Tableau 1: Composition du fruit de tomate. Les données sont en grammes pour 100g de matière fraîche consommable (Grasselly *et al*, 2000)

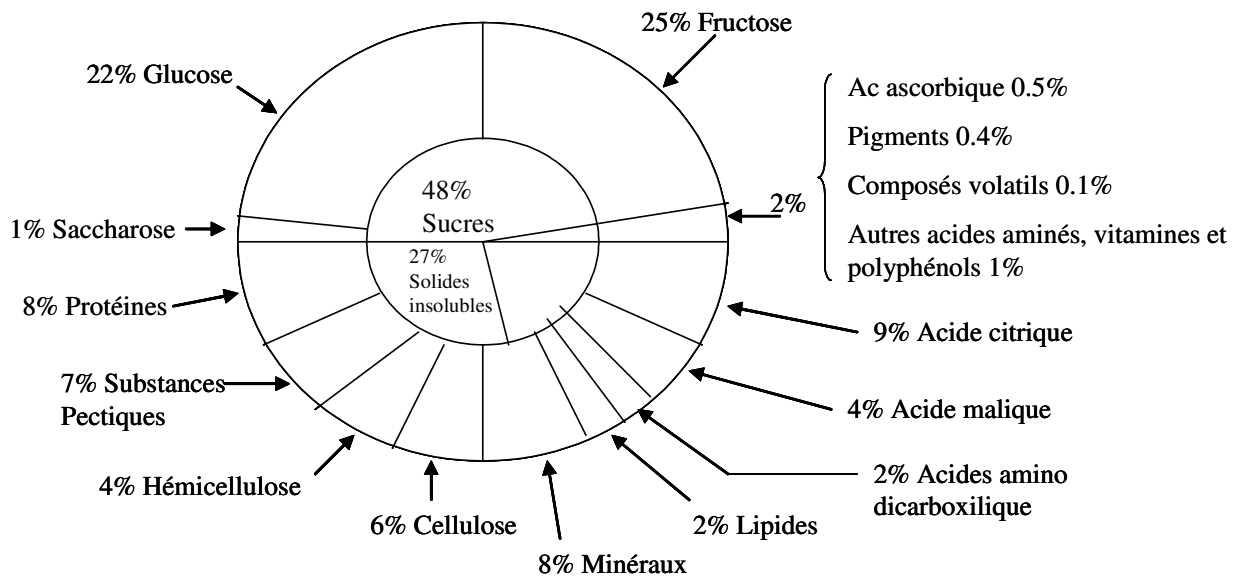


Figure 3 : Composition moyenne de la matière sèche du fruit de tomate (adaptée de Davis et Hobson 1981)

D/ Composition du fruit et des feuilles de tomates

a) Composition des feuilles

Les feuilles de tomates sont toxiques à cause des quantités importantes d'alcaloïdes qu'elles contiennent. Par exemple, la déhydrotomatine et l' α -tomatine sont des glycoalcaloïdes présents en grande quantité dans les feuilles et les tiges de tomate (Kozukue *et al*, 2004). Ces composés sont intéressants pour la plante puisqu'ils interviennent dans la résistance contre certains pathogènes fongiques, comme le Botrytis, bactériens comme *Clavibacter michiganense* (agent du chancre bactérien), et viraux comme le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Friedman, 2002). Les feuilles de tomate contiennent également d'autres métabolites secondaires, comme les composés phénoliques. Les principaux sont la rutine et l'acide chlorogénique, ces deux molécules sont également impliquées dans la résistance des plantes contre certaines maladies, voire contre des herbivores (Johnson K S, 2005; Mittelstraß *et al*, 2006). Les feuilles sont des organes puits au début de leur développement, puis des organes sources qui vont accumuler du saccharose via leur activité photosynthétique. Les feuilles possèdent donc des pigments photosynthétiques : de la chlorophylle a et b et des caroténoïdes dont le bêta-carotène et la lutéïne (Khavari-Nejad et Mostofi, 1998; Mortain-Bertrand *et al*, 2008). Les teneurs en saccharide y sont relativement importantes, l'amidon et le saccharose étant majoritaires, mais des hexoses (fructose et glucose) sont également présents (Khelil *et al*, 2007; Mortain-Bertrand *et al*, 2008). Elles contiennent également des acides organiques, les acides citrique et malique étant les plus abondants (Madsen, 1974).

b) Composition des fruits

Les fruits de tomate sont majoritairement composés d'eau, environ 95%, et possèdent peu de lipides et protides, ce qui en fait un aliment peu calorique, 15 à 20 calories pour 100g (Tableau 1).

La matière sèche des fruits est principalement composée de sucres, environ 50% de la MS (Blanc, 1986) (Figure 3). Le saccharose importé des feuilles, est hydrolysé dans les fruits en glucose et fructose. Le jeune fruit peut également stocker des sucres sous forme d'amidon qui sera dégradé au cours de la maturation. La cellulose et l'hémicellulose représente environ 10% de la MS et les acides organiques 13% (Blanc, 1986). L'acide citrique est l'acide le plus

présent dans le fruit mûr de tomate, suivi de l'acide malique (Grasselly *et al*, 2000). Les teneurs en sucres et en acide sont soumises à de nombreuses régulations, ainsi leur évolution au cours de la maturation du fruit n'est pas établie et est dépendante des conditions de culture.

Les tomates possèdent également de nombreuses vitamines : A, B1, E et C, ainsi que des fibres (1.8g pour 100g MF), des acides aminés essentiels, des sels minéraux (potassium, chlore, magnésium, phosphore) et des oligoéléments (fer, zinc, cuivre, cobalt, bore, nickel, iode) (Tableau 1), ce qui en fait un aliment particulièrement recommandé par les diététiciens (De Broglie et Guéroult, 2005). L'intérêt nutritionnel de la tomate réside également dans le fait que ce fruit contient de nombreux métabolites secondaires, et des antioxydants. En effet, la tomate contient des polyphénols, des flavonoïdes comme la rutine et des dérivés d'acides hydroxycinnamiques comme l'acide chlorogénique (Moco *et al*, 2006). Cet aspect de la composition du fruit sera détaillé plus loin. Le fruit de tomate contient également des caroténoïdes, comme le lycopène et le bêta-carotène, responsables de la couleur rouge et jaune respectivement de la tomate. Les teneurs en lycopène et en bêta-carotène sont respectivement d'environ 3 et 1 mg pour 100g de MF, ces teneurs sont très dépendantes des cultivars et des conditions de culture (Grasselly *et al*, 2000). Enfin des alcaloïdes ont également été mis en évidence dans les fruits de tomate, leur concentration diminuant nettement avec la maturation du fruit (Kozukue *et al*, 2004). En effet les teneurs en α -tomatine sont de 500 mg/kg de MF dans les fruits verts et d'environ 5 mg/kg MF dans les fruits rouges. Ces composés sont également impliqués dans la valeur santé du fruit de tomate, puisque par exemple la tomatine (mélange de déhydrotomatine et de l' α -tomatine) diminue les taux de triglycérides, voire de cholestérol dans le sang. Les processus d'action de ces molécules sont en cours d'étude (Friedman, 2002).

E/ Qualité et valeur santé du fruit

La qualité est une notion complexe puisque sa définition varie selon que l'on se place dans la situation du producteur, du distributeur ou du consommateur. Pour le producteur les critères importants sont le rendement, la résistance aux maladies, et les capacités d'adaptation aux contraintes pédo-climatiques (Kaluzny-Pinon *et al*, 2001). Le distributeur s'intéresse plus à la durée de vie du produit, l'homogénéité des lots, et à sa bonne tenue lors de la conservation et du transport (Guichard, 1999). Enfin pour le consommateur, la qualité du fruit est l'association de plusieurs paramètres : son aspect (couleur), sa texture (fermeté), son goût

(saveur, arôme) et, depuis peu, sa valeur-santé (Kaluzny-Pinon *et al*, 2001). La qualité gustative des fruits peut se décomposer en trois parties : la texture, la saveur et les arômes. La texture est principalement caractérisée par la fermeté du fruit. L'arôme du fruit est défini par la concentration en composés aromatiques volatiles, sachant que plus de 400 composés ont été identifiés chez la tomate, et enfin la saveur est relative aux teneurs en sucre et acide (Grasselly *et al*, 2000).

Plusieurs études associent la consommation de tomates et de ses produits dérivés à une réduction des risques de contracter des cancers et des maladies cardiovasculaires. En effet ils sont riches en substance potentiellement actives, comme les vitamines, les minéraux, les micronutriments ou les fibres (Berrino et Villarini, 2008). Cependant l'effet réel de la consommation est difficile à établir puisque par exemple, les méthodes d'analyses utilisées dans les expérimentations ne sont pas toujours les mêmes. De plus à l'heure actuelle les études épidémiologiques sont encore peu nombreuses et leurs résultats sont parfois contradictoires (Scalbert *et al*, 2005; Giovannucci E., 2007; Kavanaugh *et al*, 2007). En outre peu d'études donnent des indications sur les doses efficaces (consommation en repas par jour à base de tomate), un seul apport pourrait être suffisant, sachant qu'un apport important de lycopène pourrait être néfaste (Giovannucci E, 1999).

La médecine chinoise associe plusieurs vertues à la tomate (Fan Qie), et lui associe des saveurs douces, acides et légèrement froides. Les méridiens destinataires étant le foie, l'estomac et les poumons (Sionneau et Chapellet-Lopez, 2004).

F/ Importance économique et production actuelle

La tomate est la troisième espèce cultivée au monde, après la pomme de terre et la patate douce, et le deuxième légume le plus consommé (De Broglie et Guérault, 2005). Ce légume représente donc un enjeu économique, et est soumis à une concurrence importante. Cent cinquante millions de tonnes de tomates sont produites annuellement dans le monde (données FAO 2005) (Péron, 2006). Cette production se répartit sur tous les continents : 44% en Asie, 22,5% en Amérique, 21,5% en Europe, 12% en Afrique (Grasselly *et al*, 2000). La France est le sixième producteur européen, derrière la Turquie, l'Italie, l'Espagne, la Grèce et le Portugal (données INTERFEL 2008). Selon l'INSEE, en France, environ

Culture sur :	K	Ca	Mg	NH₄	NO₃	H₂PO₄	SO₄
NFT	7	7	2	0,5	10,5	1,5	4,5
Substrat	7	7,5	2		10,5	1,5	5

Tableau 2 : Exemple de composition de solution nutritive en milliéquivalent par litre, suivant le dispositif de culture, en flux continu (Nutrient Film Technique) ou sur un substrat organique. Adapté de Péron, 2006

800 000 tonnes de tomates ont été produites en 2004, dont 580 000 commercialisées en produits frais (Péron, 2006). On peut également estimer que 100 000 tonnes sont produites par des particuliers (Degioanni, 1997).

En 2008, les français ont acheté en moyenne 13kg de tomates, ces achats étant effectués toute l'année, avec tout de même une augmentation de la consommation lors de la période estivale. Pendant la période hivernale deux origines dominent les importations : le Maroc et l'Espagne. A partir du printemps les origines se diversifient avec notamment des importations de Belgique et des Pays Bas qui entrent en concurrence avec la production française (données INTERFEL 2008).

La culture de la tomate est envisageable sur l'ensemble du territoire français, mais le sud-est et l'ouest de la France sont les principaux bassins de production de tomates destinées au marché frais. Actuellement, la production de tomates est réalisée de façon intensive, et est principalement effectuée sous serres chauffées (96% de la production nationale). Il reste quelques cultures effectuées sous abris froids et en champs, principalement pendant la période estivale, la surface de production en champs étant en constante régression ces dernières années. La production de tomates de type grappe reste nettement dominante (54% de la production totale), devant les tomates rondes qui se vendent en vrac. Cependant la gamme de tomates proposées a tendance à se diversifier ; des tomates de type cerise, cocktail, allongée et plus récemment des variétés anciennes séduisent le consommateur (données INTERFEL 2008).

Les cultures sous serre sont majoritairement effectuées en hydroponie, sur des substrats comme la laine de roche, la laine de verre, la fibre de coco, qui sont jetés à la fin d'une campagne de culture. Le climat sous la serre (température, humidité, taux de CO₂, photopériode et intensité lumineuse) est modulé en fonction du stade de développement des plants. La composition des solutions nutritives varie suivant la variété et le substrat utilisé, la région et la période de culture. Un exemple de composition est donné dans le tableau 2. Il faut noter que le pH et la conductivité des solutions sont également contrôlés et ajustés respectivement entre 5,7 et 6,2 pour le pH et entre 2,5 et 3,5mS.cm⁻¹ pour la conductivité. La densité des cultures est adaptée en fonction de la saison de culture, elle est de l'ordre de 2,2 plants/m². Les plantes sont également taillées pour éviter le développement de rameaux axillaires, effeuillées pour conserver un bon équilibre végétatif/génératif, et le nombre de fruits par bouquet est généralement fixé à 5 ou 6 fruits par grappes.

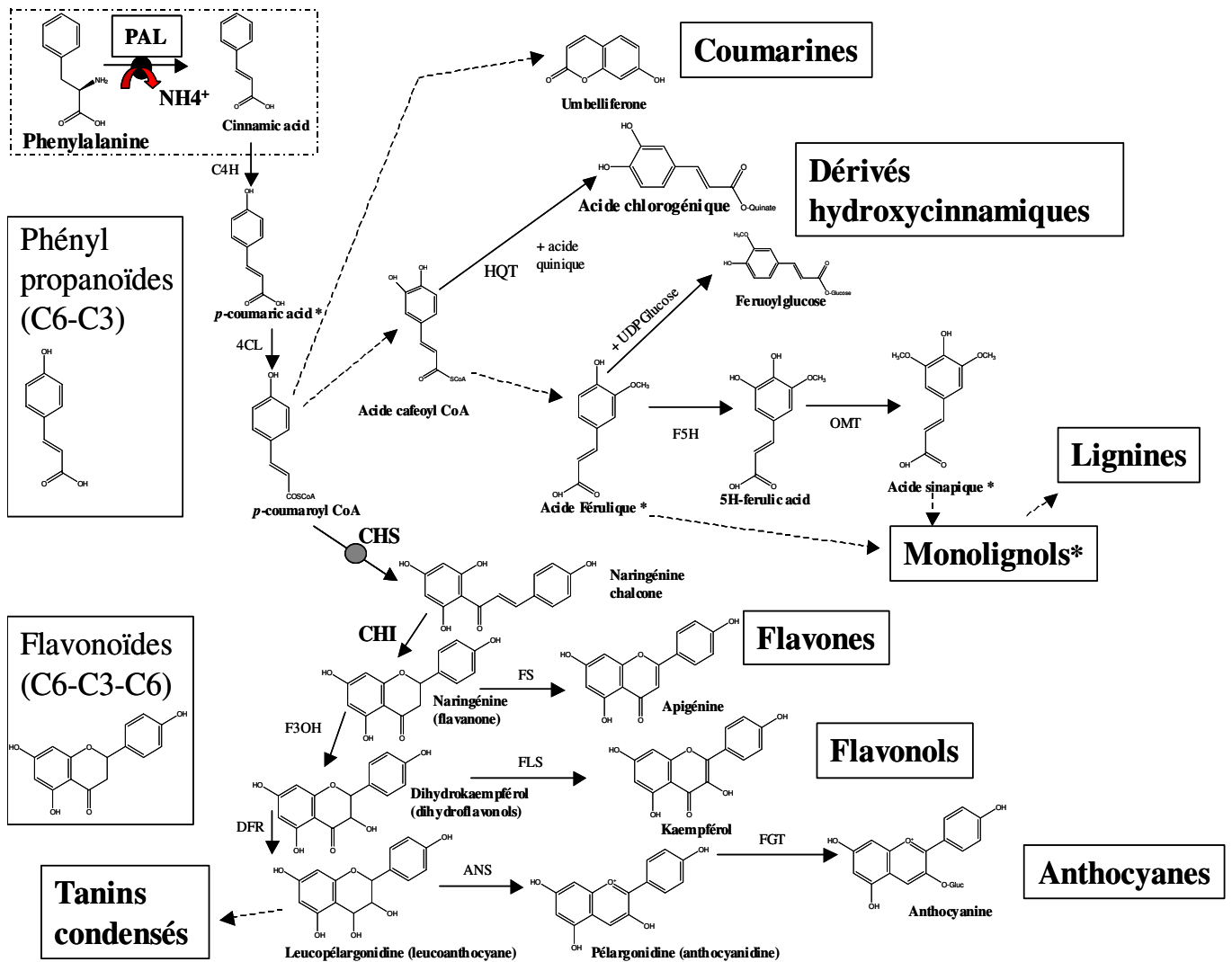


Figure 4 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux. Phénylalanine Ammonia Liase (PAL), Cinnamate 4hydroxylase (C4H), CoA Ligase (4CL), Hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase (HQT), *O*-méthyltransférase (OMT), Férulate 5-hydroxylase (F5H), Chalcone Synthase (CHS), Chalcone Isomérase (CHI), Flavone-3 hydroxylase (F3OH), Dihydroflavonol réductase (DFR), Flavone synthase (FS), Flavonol synthase (FLS), Anthocyanine synthase (ANS), Flavonoïde glucosyl transférase (FGT). (*) indique les composés impliqués dans la synthèse des monolignols, Les flèches en pointillés indiquent que plusieurs étapes enzymatiques, non représentées, sont nécessaires pour arriver au produit indiqué.

La protection contre les maladies et ravageurs est effectuée en intégrant des auxiliaires de culture, comme *Macrolophus* ou *Encarsia* qui sont respectivement des prédateurs et des parasitoïdes, ou en appliquant des spécialités commerciales pour lutter contre le développement de champignons, de bactéries ou de maladie virales (Péron, 2006).

II Composés phénoliques

A/ Généralités biochimiques

Les composés phénoliques (ou polyphénols) sont des molécules qui appartiennent au métabolisme secondaire. Les polyphénols constituent un groupe important de métabolites secondaires, environ 10 000 composés ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui. La plupart des molécules phénoliques sont formées à partir de deux acides aminés aromatiques la tyrosine et surtout de la phénylalanine. Ces acides aminés sont formés de façons variables suivant les végétaux, à partir du préphénate (Guignard, 2000), lui-même formé par la voie de l'acide shikimique (Macheix *et al*, 2005).

Les polyphénols sont des molécules très diversifiées, constituées d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils peuvent être regroupés en de nombreuses classes suivant la complexité du squelette de base (noyau C6), le degré de modification de ce squelette (oxydation, hydroxylation....) et enfin suivant les molécules auxquelles ils sont associés (glucides, lipides, protéines, autres métabolites). Les formes les plus simples sont représentées par deux principaux groupes dont dérivent de nombreux composés : les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes (Figure 4). Les formes complexes quant à elles, sont pour la plupart issues de la condensation de certaines formes simples et renferment, entre autre, les tannins et les lignines.

Les acides hydroxycinnamiques, ou phénylpropanoïdes, sont des composés dont le noyau de base est en C6-C3. Sous l'action de la **Phénylalanine Ammonia Liase (PAL)**, la phénylalanine libère un ion ammonium et forme de l'acide cinnamique. Celui-ci est à son tour hydroxylé par la Cinnamate 4Hydroxylase (C4H) pour former l'acide para-coumarique qui sera à l'origine de nombreuses molécules. Ces acides sont rarement présents sous formes

libres, ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons se font souvent au niveau des fonctions carboxyliques, ce qui conduit à la formation d'ester. Les liaisons avec du glucose (sous forme Uracile Diphosphate, UDPG) forment des ester de glucose (l'acide feruoylglucose). Les liaisons avec différentes molécules organiques (Coenzyme A ou acide quinique par exemple) conduit par exemple à l'acide p-coumaroyl CoA. L'acide chlorogénique est l'ester de l'acide caféique le plus fréquemment rencontré (liaison avec un acide quinique en C5). Si la liaison s'effectue avec des mono ou di-amine, des phénolamides sont formés. Les estérifications peuvent être multiples, ainsi l'acide caféique peut être estérifié avec des acides quiniques et former les acides di et tri-caféoylquinique. Des liaisons avec des sucres peuvent aussi être effectuées au niveau des fonctions hydroxyles, ce qui conduit à la formation de glucoside (glucoside de l'acide caféique) (Macheix *et al*, 2005).

Les flavonoïdes sont des composés en C6-C3-C6, qui renferment plusieurs milliers de molécules pouvant être regroupées en plus de dix classes, induisant une nomenclature complexe. Ils sont issus du para-coumaroyl CoA et de 3 molécules de malonyl-CoA qui forment l'hydroxychalcone comprenant 2 noyaux benzéniques (Figure 4). Cette transformation s'effectue avec une autre enzyme clef la **Chalcone Synthase (CHS)**. La fermeture de l'hétérocycle central s'effectue par la **Chalcone Isomérase (CHI)**. Les différentes classes de flavonoïdes sont d'abord définies par la structure de l'hétérocycle central, et son degré d'oxydation. Puis chacune des classes est caractérisée par son degré de substitution par des groupements hydroxyles ou méthoxyles. De plus ces composés sont la plupart du temps liés à des sucres, généralement par une liaison glycosidique, qui est dégradable par une hydrolyse acide à chaud. Les conséquences de la glycosylation sont multiples : modification de la couleur des pigments, modification de la solubilité ou des propriétés biologiques (Macheix *et al*, 2005).

B/ Localisation et rôle dans les plantes

A l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales.

Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (Winkel, 2004; Macheix *et al*, 2005). D'autres organites du cytoplasme, comme des vésicules golgiennes ou des chloroplastes, peuvent participer à la biosynthèse des composés phénoliques mais ce ne sont pas des lieux d'accumulation. Certains flavonoïdes ont même été localisés au niveau du noyau des cellules où ils pourraient directement moduler l'expression des gènes. Ces divers lieux de localisation impliquent un transfert des composés phénoliques depuis leurs lieux de synthèse (Macheix *et al*, 2005).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (Tomas-Barberan et Espin, 2001; Cheynier et Sarni-Manchado, 2006).

Les composés phénoliques interviennent dans un grand nombre de processus physiologiques chez la plante et dans les interactions avec leur environnement, leur structure leur conférant des fonctions très spécifiques (Desjardin, 2008). Par exemple la lignine est un composant essentiel des plantes qui permet leur maintien et la conduction de l'eau (Macheix *et al*, 2005). Les composés phénoliques contribuent également à la croissance et au développement de la plante par des actions diverses et variées. Ils interviennent par exemple dans le métabolisme et le transport de l'auxine (Macheix *et al*, 2005; Treutter, 2006) et dans celui de l'éthylène (Fleuriet, 1976; Vendrell, 2003). Les flavonoïdes conditionnent même la formation des grains de pollen chez le pétunia (Napoli *et al*, 1999).

Par ailleurs les composés phénoliques peuvent avoir un rôle de signal (Treutter, 2006), des flavonoïdes permettent par exemple la mise en place de la symbiose entre des Fabacées et des bactéries, ce qui permet à ces plantes de fixer directement l'azote atmosphérique. Ces composés interviennent également dans les interactions entre les plantes supérieures via des processus d'allélopathie. Ils participent aux phénomènes de pollinisation puisqu'ils sont

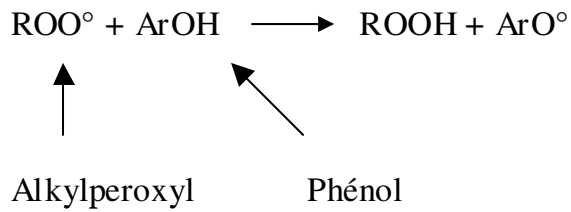


Figure 5 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène. Le radical formé devient moins dangereux. Adapté de Sawa 1999

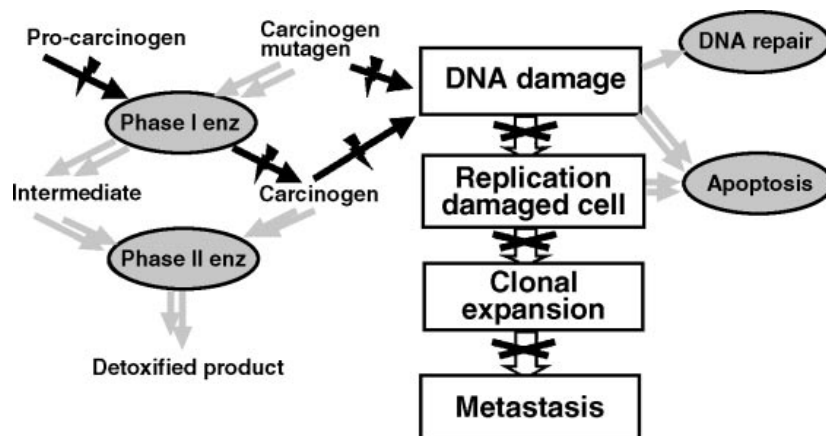


Figure 6 : Représentation des différentes phases de prolifération du cancer et des potentiels lieux d'action des polyphénols végétaux. Les doubles flèches grises indiquent un effet stimulateur alors que les flèches noires indiquent un effet inhibiteur des phénols. Adapté de Hollamn, 2001

responsables de la coloration des fleurs. Chez le pétunia plus de 40 dérivées anthocyaniques ont été identifiés pour former la couleur violette (Macheix *et al*, 2005). De plus les flavonoïdes ont un rôle de filtre contre le rayonnement UV, ce qui explique leur localisation dans les tissus externes (Gould et Lister, 2006). Enfin les flavonoïdes comme les dérivées hydroxycinnamiques jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux stress environnementaux (Walton et Brown, 1999). Lors de blessures ou d'attaques de pathogènes fongiques et bactériens, la synthèse de composés phénoliques est stimulée ou induite. Ces molécules, des phytoalexines, peuvent alors jouer un rôle de défense (Koes *et al*, 1994; Macheix *et al*, 2005). La nature des composés synthétisés est caractéristique de l'espèce végétale, le pois produit par exemple de la pisanine (isoflavonoïde), le persil du psoralène (furanocoumarine).

C/ Importance pour l'homme

La plupart des composés phénoliques interviennent par leur seule présence dans les régimes alimentaires, en particulier grâce à la consommation de fruits, de légumes et de produits dérivés (Macheix *et al*, 2005). Des études épidémiologiques mettent en avant les effets bénéfiques de la consommation de fruits et légumes pour lutter contre des maladies dégénératives comme les cancers ou les maladies neurodégénératives, mais aussi pour prévenir les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou le diabète (Tomas-Barberan et Gil, 2008). Chez l'homme l'efficacité d'un traitement, comme une alimentation riche en fruits et légumes, est quantifiée via des marqueurs biologiques. Par exemple le taux d'espèces réactives avec l'acide thiobarbiturique est utilisé pour témoigner du niveau d'oxydation des lipides, relatif aux stress oxydatifs (Johnson I T, 2008). Or certaines de ces études apportent des résultats contrastés et controversés à propos de la consommation de fruits et légumes, ou de l'utilisation de molécules particulières comme marqueurs biologiques, ce qui souligne la nécessité de mener davantage de travaux pour mieux comprendre et caractériser les mécanismes mis en jeu (Kavanaugh *et al*, 2007; Tomas-Barberan et Gil, 2008). En outre l'efficacité des molécules présentes les fruits et légumes, dont les polyphénols, est prouvée *in vitro* mais reste à confirmer *in vivo*, et les doses à prescrire restent difficiles à établir (Johnson I T, 2008). La composition des aliments est complexe, et les molécules qui les composent interagissent entre elles. C'est pourquoi, les effets bénéfiques chez l'homme, de la

consommation d'un fruit ou d'un légume en particulier ne peuvent pas se résumer uniquement à l'effet d'une seule substance (Liu, 2004; Bazzano, 2008).

La structure des phénols végétaux, leur confère une activité antioxydante aussi importante que celles des vitamines C et E (Rice-Evans *et al*, 1997). Leur mode d'action est une combinaison de réactions chimiques (chélation de métaux, la donation d'hydrogène ou d'électron) qui interrompt les réactions d'oxydation de molécules, comme l'ADN les lipides ou les protéines, en formant des radicaux plus stables (Figure 5), et donc qui aboutit à une diminution des teneurs en radicaux libres (Rice-Evans *et al*, 1997; Sawa *et al*, 1999; Hollman, 2001). Ces composés interviennent également à différents stades de développement des cancers, notamment en stimulant la mort de cellule et en inhibant certaines enzymes (Figure 6). Pendant longtemps, l'action bénéfique de la consommation des fruits et légumes a été principalement reliée aux teneurs en composés antioxydants de ces aliments. Or une fois ingérés ces composés sont fortement modifiés par l'organisme. L'équipe de Scalbert (2002) a étudié l'absorption des polyphénols au niveau des barrières intestinales et mis en évidence l'importance de la microflore du colon dans la métabolisation de ces composés (Scalbert *et al*, 2002). Ainsi les composés qui atteignent les cellules et les tissus sont chimiquement différents de ceux qui ont été absorbés, ce qui modifie et pourrait diminuer leurs activités biologiques (Kroon *et al*, 2004). De plus, l'absorption et la biodisponibilité des polyphénols sont variables suivant leur structure et les molécules auxquelles ils sont associés (Singh et Ramassamy, 2008), enfin les concentrations en composés retrouvées dans le sang après ingestion d'aliments riches en polyphénols (thé vert, vin rouge, pomme, oignon...) sont très faibles (<10 μ M) (Aherne et O'Brien, 2002; Manach *et al*, 2004; Jaganath et Crozier, 2008). Il n'est donc pas surprenant qu'*in vivo*, l'augmentation de l'activité antioxydante au niveau du sang par exemple, n'est pas clairement associée à un effet positif sur la santé (Johnson I T, 2008). Actuellement d'autres hypothèses d'actions sont proposées. Par exemple ces micronutriments pourraient être impliqués dans des cascades de signalisation, qui stimulent entre autres, les systèmes de défense au niveau cellulaire (Jaganath et Crozier, 2008). Ils pourraient également intervenir dans de multiples activités biologiques en régulant l'expression de certains gènes, et moduler entre autres certaines activités enzymatiques (Dangles et Dufour, 2006; Singh et Ramassamy, 2008). Les travaux de Williams, 2004 soulignent le rôle clef des flavonoïdes comme molécules « signal » plus que comme antioxydant (Williams *et al*, 2004). Il a également été mis en évidence l'importance des processus inflammatoires dans le développement de maladies chroniques comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires. Or quelques études indiquent une diminution significative des teneurs de plusieurs marqueurs

biologiques relatifs à l'activité inflammatoire, lors d'une alimentation riche en fruits et légumes (Sanchez-Moreno *et al*, 2003; Johnson I T, 2008). Actuellement l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes des citrus qui favorise la circulation capillaire et améliore le tonus veineux est déjà utilisée (Manthey, 2000; Kanaze *et al*, 2003). Cependant leurs modes d'action ne sont également pas définis, et il existe également des travaux qui n'ont pas abouti aux mêmes conclusions (Johnson I T, 2008).

Par ailleurs des extraits végétaux plus ou moins complexes, riches en principes actifs de nature phénolique sont utilisés à des fins thérapeutiques, comme complément alimentaire ou comme médicament (phytoestrogènes) (Macheix *et al*, 2005).

Dans le futur, des études sur des individus malades et sains doivent encore être menées pour expliquer et valider l'effet bénéfique de la consommation de fruits et légumes. De plus, des marqueurs biologiques plus précis, et l'utilisation de nouvelles techniques d'analyse faisant appel à la biologie moléculaire (nutrigénomique, protéomique, métabolomique...) vont permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes d'actions et peut être aboutir à des recommandations.

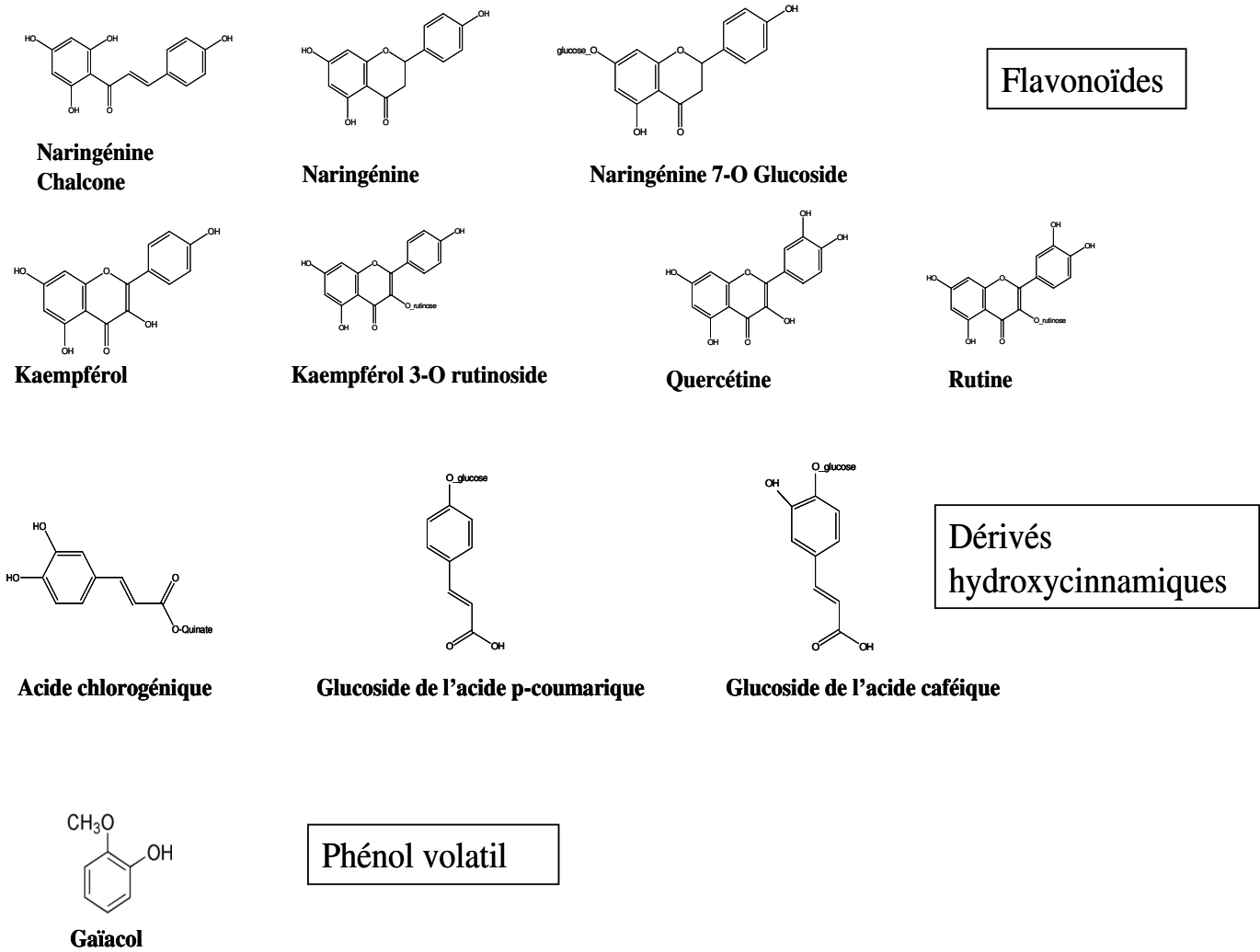


Figure 7 : Exemples de composés phénoliques identifiés chez la tomate

D/ Composés phénoliques chez la tomate

Le fruit de tomate renferme de nombreux métabolites, dont plusieurs dizaines de polyphénols. L'équipe de Mocco (2006) a effectué un important travail de détermination de ces composés par spectrométrie de masse, et créé une base de données nommée MoTo DB qui comprend de nombreuses informations (temps de rétention, masse...). Ils ont par la suite complété leur étude en apportant des données de répartition des composés dans le fruit en tenant compte du stade de maturation du fruit (Moco *et al*, 2007). En effet la composition phénolique des fruits de tomates évolue avec la maturation du fruit (Fleuriet et Macheix, 1981; Gautier *et al*, 2008), et elle varie également quantitativement et qualitativement suivant les cultivars étudiés, les tomates cerises étant généralement les plus riches (Raffo *et al*, 2002).

Les flavonoïdes sont majoritairement trouvés sur la partie externe du fruit (peau et péricarpe), et les principaux composés détectés sont la naringénine chalcone et des glucosides de la naringénine, des formes glycosilées de la quercétine comme la rutine, et des dérivés glycosilés du keampférol, les formes aglycones n'étant détectées qu'après hydrolyse (Figure 4 et 7) (Hunt et Baker, 1980; Krause et Galensa, 1992; Stewart *et al*, 2000; Bauer *et al*, 2004; Sliestad et Verheul, 2005).

Les acides hydroxycinnamiques sont plus présents au niveau de la chair du fruit et dans les graines et le gel qui les entoure (Fleuriet et Macheix, 1976). Il s'agit d'esters de glucose et d'acide quinique ou de glucosides formés avec les acides caféique, férulique et para-coumarique (Figure 4 et 7). Le plus abondant étant l'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique)(Fleuriet et Macheix, 1976; Winter et Herrmann, 1986).

Différent phénols ont également été identifié parmi les composés volatils de la tomate, comme le gaïacol, ces composés participent à la qualité organoleptique du fruit de tomate, plus particulièrement à l'odeur et à l'arôme du fruit (Crouzet, 2006).

La composition en composés phénoliques des parties végétatives de la tomate (tige, racine, feuille) n'a pas été à notre connaissance caractérisée. Cependant les feuilles renferment des quantités importantes de polyphénols totaux (Stout *et al*, 1998). L'acide chlorogénique et la rutine semblent être les composés les plus abondants (Wilkens R T *et al*, 1996). Comparativement Stewart *et al*. 2001 ont quantifié environ dix fois plus de flavonols dans les feuilles que dans les fruits de tomate (Stewart *et al*, 2001). Ces concentrations sont vraisemblablement liées au rôle de filtre UV de ces composés.

E/ Influence de l'environnement sur la synthèse des composés phénoliques

Comme nous l'avons vu précédemment les composés phénoliques interviennent dans de nombreux phénomènes pour permettre à la plante de s'adapter à son milieu (Macheix *et al*, 2005). Ce paragraphe n'est donc pas exhaustif et seul l'impact de quelques facteurs de l'environnement est présenté.

a) Lumière :

La lumière agit de façon quantitative et qualitative et est corrélée à l'une augmentation des teneurs en composés phénoliques et plus particulièrement de flavonoïdes dans les tissus (Macheix *et al*, 2005). L'activité de certaines enzymes de la voie de biosynthèse des polyphénols est stimulée par la lumière, c'est le cas, entre autres, de la PAL (Flores *et al*, 2005), de la C4H (Bell-Lelong *et al*, 1997) et de la CHS (Feinbaum et Ausubel, 1988). En cultivant des tomates sous une forte intensité lumineuse, Wilkens *et al*. (1996) ont quantifié environ deux fois plus de rutine et d'acide chlorogénique que dans les plantes cultivées sous une faible intensité lumineuse. Il faut également rappeler le rôle de photoprotection des flavonoïdes. Ainsi sous un rayonnement UV les activités de la PAL et de la CHS, par exemple, sont stimulées, et les teneurs en polyphénols sont accrues (Desjardin, 2008). La lumière rouge pourrait également avoir un rôle particulier dans la formation des flavonoïdes, et notamment favoriser la formation de naringénine-chalcone (Hunt et Baker, 1980).

b) Température :

La température peut modifier les teneurs en polyphénols chez les fruits pendant la phase de croissance des fruits sur la plante, mais également après la récolte. Pour les plants de tomate, un stress thermique semblerait apparaître à partir de 35°C, causant l'accumulation de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques. En effet, un stress thermique provoqué par des températures froides (4°C) ou élevées entraîne une augmentation des activités PAL et CHS qui a pour conséquence d'augmenter les teneurs en composés phénoliques (Leyva *et al*, 1995). En outre, l'oxydation des composés phénoliques par les polyphénols oxydases (PPO) et peroxydases (POD) est inhibée, ce qui maximise l'accumulation des polyphénols (Rivero *et al*, 2001).

Lors du stockage des aliments, les activités enzymatiques sont déterminantes sur la qualité finale du fruit et sur sa durée de conservation. Il a été démontré que l'augmentation de

la température de conservation entraînait une augmentation des activités de certaines enzymes (lipoxygénases, peroxydases, réductases et catalases). Par conséquent placer des tomates à une température élevée (35°C) entraîne des dégâts oxydatifs (Mondal *et al*, 2004). De la même façon, Soto-Zamora *et al.* (2004), ont démontré que la conservation des fruits (récoltés au stade vert mature) à 4°C, température inférieure à la température optimale de stockage, inhibait la maturation et accélérât les pertes en antioxydants (particulièrement en caroténoïdes) (Soto-Zamora *et al*, 2004).

c) Période de l'année :

Les tomates sont produites toute l'année, mais la composition du fruit notamment en antioxydants varie au cours de la saison (Raffo *et al*, 2006; Toor *et al*, 2006). Slimestad et Verheuil (2005) ont observé sur une saison de culture que les teneurs en acide chlorogénique, en rutine ou en naringénine chalcone, pouvaient être multipliées par trois en fonction de la date de récolte (Slimestad et Verheul, 2005). Ces variations saisonnières sont attribuables entre autres aux conditions de lumière et de température (Riga *et al*, 2008).

d) Nutrition minérale :

Peu de travaux existent sur l'influence de la fertilisation minérale sur les teneurs en composés phénoliques. Cependant la nutrition minérale peut avoir tellement d'effets aussi bien sur la croissance que sur le développement des plantes, qu'il est logique de s'attendre également à des répercussions sur la composition des tissus. En outre, les apports en minéraux modifieront d'autant les teneurs de certaines substances si ce sont des constituants directs de ce composé ou s'ils jouent un rôle central dans la synthèse ou le stockage de ce composé (Grusak et DellaPenna, 1999; Crosby, 2008). Les micro comme les macroéléments peuvent modifier la composition en polyphénols. Il a été clairement démontré qu'une carence en bore induisait une augmentation des teneurs en flavonoïdes d'environ 40 à 50%, dans les feuilles et les fruits de tomate (Carpena *et al*, 1982; Lopez-Andreu *et al*, 1988; Ruiz *et al*, 1998). Les effets du phosphore et du manganèse sont par contre plus variables (Zornoza et Esteban, 1984). L'équipe de Penalosa (1989) a observé qu'une déficience (0,2 et 0,5mmol/L) ou un excès (4 mmol/L) en phosphore dans la solution nutritive entraînait une diminution des teneurs en flavonoïdes dans les feuilles (Penalosa *et al*, 1989). Par contre, Stewart *et al.* (2001) ont mis en évidence que de faibles apports en phosphore augmentaient les teneurs en

flavonols dans les fruits mais ce uniquement pendant les premiers stades de maturation, les bénéfices de ce stress diminuant avec la maturation (Stewart *et al*, 2001). La nutrition azotée modifie également les teneurs en composés phénoliques (Dumas Y. *et al*, 1993; Wilkens R T *et al*, 1996). Stout *et al*. (1998) ont obtenu des concentrations plus de deux fois plus importantes dans les feuilles de tomates ayant poussé avec de faibles apports en N (2 mM) en comparaison des teneurs obtenues dans les feuilles du fort traitement en N (8 mM). L'équipe de Stitt, notamment dans les travaux de Fritz (2006) a mis en évidence que les apports d'azote inhibaient fortement le métabolisme des phénylpropanoïdes dans les feuilles de tabac (Fritz *et al*, 2006). Des études relatent également une augmentation des teneurs en polyphénols lors de faibles apports en azote, dans les tubercules de pomme de terre, ou dans les fruits comme le raisin ou les pommes (Awad et De Jager, 2002; Delgado *et al*, 2004; Mittelstraß *et al*, 2006). Par contre aucune étude n'a pu mettre en évidence une répercussion significative de la nutrition azotée sur la composition en polyphénols dans les fruits de tomate (Stewart *et al*, 2001). Nous verrons que la nutrition azotée modifie la répartition du carbone dans la plante, induisant des variations aussi bien au niveau du métabolisme primaire qu'au niveau du métabolisme secondaire.

e) Enrichissement en CO₂ :

Les cultures sous enrichissement en CO₂ vont modifier le statut carboné de la plante et augmenter la disponibilité en carbone (Haukioja *et al*, 1998). Une augmentation de 30% des teneurs en composés phénoliques dans les feuilles peut être observée (Penuelas et Estiarte, 1998) mais ce comportement est très dépendant des plantes et des molécules étudiés. En outre, la synthèse des tannins, des terpènes et de la lignine ne semblent pas modifiée par un enrichissement en CO₂ (Koricheva *et al*, 1998; Penuelas et Estiarte, 1998). L'équipe de Wang (2003) a obtenu des teneurs en phénylpropanoïdes et en flavonoïdes significativement plus importantes chez des fraisiers cultivés sous enrichissement en CO₂ (Wang S. Y. *et al*, 2003). Par contre Fajer (1992) n'a pas mis en évidence d'augmentation des teneurs en métabolites secondaires chez *plantago* (Fajer *et al*, 1992).

III L'azote

L'azote fait partie des éléments essentiels que la plante puise dans la solution du sol pour assurer sa croissance et son développement. En effet l'azote entre dans la composition de molécules indispensables telles que les acides aminés et les acides nucléiques mais aussi dans celle de certains métabolites secondaires. Cet élément représente de 1,2 à 7,5 g pour 100g de MS chez les plantes (Meyer *et al*, 2008). Chez la tomate les teneurs en azote dans la plante sont variables en fonction des organes. Les parties végétatives (racine, tiges et feuilles) sont les compartiments les plus riches en azote, elles contiennent environ 6g d'azote pour 100g de MS, les fruits contiennent seulement 1,7g d'azote pour 100g de MS (Toor *et al*, 2006).

A/ Absorption et assimilation de l'azote

L'ammonium et le nitrate sont les principales sources d'azote disponibles pour la plante. Certaines plantes, comme les Fabacées, peuvent également assimiler l'azote présent dans l'atmosphère, sous forme de N₂, par l'intermédiaire de symbiose avec des bactéries. Ce mécanisme ne sera pas décrit ici. Le nitrate est la forme préférentiellement utilisée, cependant ces anions nitrate (NO₃⁻) seront transformés au cours de leur assimilation en ions ammonium (NH₄⁺), qui seront incorporés dans des molécules organiques.

L'absorption du nitrate s'effectue au niveau des racines grâce à deux systèmes de transports : un système de transport à haute affinité (High Affinity Transport System, HATS) qui est constitutif et inductible, et un système à faible affinité (Low Affinit Transport System, LATS). Ces deux systèmes sont actifs, mais les HATS sont les plus sollicités. La contribution des LATS devient plus importante quand le milieu est riche en nitrate, les HATS étant saturés (Tischner et Kaiser, 2007). Le prélèvement du nitrate dans le sol par les racines est déterminé par la demande de la plante et pas par la disponibilité en azote du milieu. Ainsi il existe des systèmes de régulation de l'absorption du nitrate, notamment par les produits du métabolisme du NO₃⁻ et par l'ion lui-même (Grignon *et al*, 1997; Touraine et Gojon, 1997). Ces contrôles ne sont pas encore clairement définis, la caractérisation moléculaire des systèmes d'absorption, et de leur régulation va permettre d'en améliorer la compréhension (Daniel-Vedele *et al*, 1998; Forde, 2000).

Une fois le nitrate absorbé au niveau racinaire, il peut être soit immédiatement réduit, exporté vers les feuilles via le xylème, stocké dans les vacuoles ou rejeté dans le milieu extérieur. La conduction du nitrate jusqu'au vaisseau du xylème s'effectue par osmose, suivant le gradient de concentration, par voie symplastique. Puis le transit horizontal jusqu'aux feuilles est assuré par la montée de la sève brute, suivant un gradient de potentiel hydrique décroissant (Meyer *et al*, 2008).

La répartition de l'assimilation réductrice des nitrates entre les racines et les parties aériennes est variable. Chez beaucoup d'herbacées, la réduction des nitrates se fait surtout dans les feuilles, tandis qu'elle est racinaire chez les ligneux (Grignon *et al*, 1997). Cette répartition dépend également des conditions environnementales et notamment de la concentration en nitrate du milieu. En effet lorsque les concentrations en nitrate sont faibles, la réduction s'effectue au niveau des racines, et les feuilles recevront seulement l'azote sous forme organique. Par contre si la concentration est plus importante un flux de nitrate pourra parvenir jusqu'aux feuilles. La réduction des nitrates s'effectue avec l'action de deux enzymes : la nitrate réductase (NR) et la nitrite réductase (NIR). La NR convertit le NO_3^- en NO_2^- , dans le cytoplasme. La NIR réduit le NO_2^- en NH_4^+ dans les plastes (chloroplastes) (Figure 8). La réduction d'une mole de NO_3^- en NH_4^+ libère toujours une mole de OH^- . L'intérieur des cellules devient donc alcalin. Dans les feuilles, cette alcalinisation est neutralisée par la biosynthèse d'acides organiques, principalement d'acide malique. Dans les racines, ces ions peuvent être relargués dans le sol via un système d'échange ionique (Lüttge *et al*, 2002). La NR et la NIR sont soumises à de nombreuses régulations. Les facteurs de l'environnement, comme la lumière ou les concentrations en nitrate, et des facteurs endogènes comme le rythme circadien ou l'application d'hormone (cytokinine et éthylène) peuvent intervenir (Faure *et al*, 1997). De plus l'assimilation du nitrate nécessite des donneurs d'électrons (NADH, NADPH, ferredoxine) et de l'énergie qui sont apportés par les réactions de la photosynthèse, de la respiration, et par la voie des pentoses phosphates. Ces mêmes réactions fournissent des squelettes carbonés utilisés lors de l'assimilation de l'ammonium qui correspond à l'intégration de cet ion dans les chaînes carbonées, pour former des molécules organiques (Figure 8).

L'ammonium assimilé peut avoir plusieurs origines : il peut être prélevé directement dans le milieu (système de HATS et LATS), issu de l'assimilation réductrice du NO_3^- , ou issu de la photorespiration. Ainsi les enzymes responsables de l'assimilation de l'ammonium sont présentes dans plusieurs organes de la plante. Chez les végétaux supérieurs l'assimilation de l'ammonium fait principalement intervenir successivement deux enzymes la glutamine

synthétase (GS) et la glutamate synthase (ou glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase, GOGAT). L'ion ammonium est d'abord incorporé dans du glutamate au cours d'une réaction catalysée par la GS pour former la glutamine. Puis sous l'action de la GOGAT et en présence d' α -cétoglutarate, deux molécules de glutamate sont formées, dont une qui sera recyclée pour la synthèse de glutamine (Brugière *et al*, 1997). Les groupements azotés de la glutamine et du glutamate sont ensuite transférés à d'autres molécules pour former les différents composés azotés de la cellule, dont les acides aminés.

L'autre voie d'assimilation faisant intervenir la glutamate déshydrogénase (GDH), permet directement la formation de glutamate, cependant cette réaction est surtout observée *in vitro* ou chez les bactéries et les champignons. Chez les végétaux supérieurs le rôle de la GDH est toujours en cours de détermination. Cette enzyme fonctionne également dans le sens du catabolisme du glutamate, libérant du NH_4^+ et des squelettes carbonés. Ces substrats carbonés pourraient compenser une baisse de l'activité photosynthétique.

B/ Impact sur les métabolismes primaires et secondaires

Les plantes peuvent donc prélever l'azote sous forme de nitrate ou d'ammonium, et la forme d'azote fournie modifie la croissance et le développement des plantes. Il faut également noter que, chez les végétaux les métabolismes azoté et carboné sont interdépendants. L'assimilation de l'azote par la plante nécessite de l'énergie et des pouvoirs réducteurs qui sont produits lors de la respiration et la photosynthèse. Inversement l'assimilation photosynthétique du CO_2 nécessite l'élaboration de molécules azotées comme des enzymes (Ferrario *et al*, 1997). Ainsi toute modification du métabolisme azotée se répercutera sur l'assimilation et le métabolisme du carbone, et inversement.

Une alimentation strictement ammoniacale n'est pas favorable pour la croissance des plantes, elle induit une acidification du milieu racinaire et un ensemble de modifications regroupées sous le terme de syndrome ammoniacal. Il s'agit d'un déficit de cations et anions, d'une diminution des teneurs en acides organiques, de l'accumulation des acides aminés (surtout dans les racines) et de l'accumulation de glucides dans les feuilles (Errebhi et Wilcox, 1990; Chaillou et Lamaze, 1997). Chez la tomate, une fertilisation majoritairement ammoniacale, induit en outre une diminution de la croissance des plantes, et des symptômes de toxicité au niveau des feuilles et des tiges (Peet et Welles, 2005).

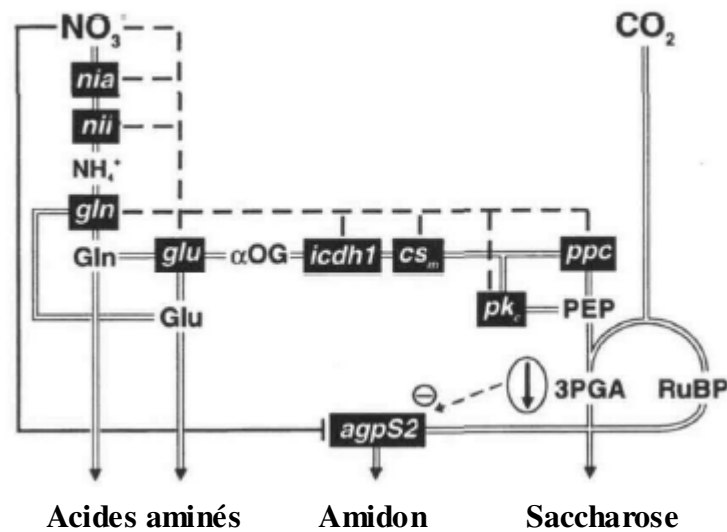


Figure 9 : Régulation coordonnée des métabolismes carboné et azoté par le nitrate. Les gènes sont encadrés en noir. Les voies métaboliques de la synthèse des acides aminés, de l'amidon et du saccharose sont représentées par un trait large. L'induction des gènes est représentée par des lignes en pointillées et la répression par un trait plein. Gènes codant pour : nitrate réductase (*nia*), nitrite réductase (*nii*), glutamate synthase (*gln*), glutamine synthase (*glu*), isocitrate déhydrogénase (*icdh1*), citrate synthase (*cs*), pyruvate kinase (*pk*), phosphoenolpyruvate carboxylase (*ppc*), ADP-glucose pyrophosphorylase (*agpS2*). Métabolites clefs : glycerate-3-phosphate (3PGA), glutamine (Gln), glutamate (Glu), α -oxoglutarate (α OG), phosphoenolpyruvate (PEP), ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Adapté de Scheible, 1997.

Ainsi, même si son assimilation est plus coûteuse en énergie, le nitrate est la forme préférentiellement absorbée par les végétaux supérieurs. Cet ion présente l'avantage de pouvoir être mis en réserve dans les vacuoles, et d'être facilement transporté dans toute la plante. Une fertilisation riche en nitrate permet d'accroître les teneurs en protéines (Stout *et al*, 1998), et augmente la croissance végétative des plantes parfois au détriment de la formation des fruits (Peet et Welles, 2005). Des plantes subissant une carence en azote présentent un jaunissement prématuré des feuilles, et une réduction des parties végétatives aériennes au profit des racines.

En termes d'accumulation de matière et de croissance, la nutrition mixte ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) apporte de meilleurs résultats qu'une alimentation avec l'un ou l'autre de ces ions, la plante tirant avantage des deux formes (Chaillou et Lamaze, 1997).

En plus, de son rôle dans la croissance de la plante, le nitrate joue un rôle de signal direct ou indirect qui conduit à une régulation complexe des métabolismes du carbone et de l'azote dans la plante (Scheible W. R. *et al*, 1997; Tischner et Kaiser, 2007) (Figure 9). Par exemple Scheible (1997), a mis en évidence chez le tabac, que le nitrate réprimait l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de l'amidon, ce qui explique la corrélation négative observée entre les apports en azote et l'accumulation d'amidon. Il est également observé, en cas de faibles apports en azote, une diminution des teneurs en acides organiques et une augmentation des teneurs en sucres, notamment en hexoses, dans les feuilles et dans les fruits de tomate (Aziz, 1968; Guidi *et al*, 1998; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005; Simonne *et al*, 2007). L'architecture racinaire est également sensible aux apports de nitrate. Une fertilisation riche en nitrate conduit à un développement important des parties aériennes, en inhibant le développement des racines. Par contre des apports localisés sur une zone racinaire stimulent la croissance latérale sur cette zone (Scheible W R *et al*, 1997).

Le métabolisme secondaire est également modifié par l'importance et la forme de la nutrition azotée. Toor *et al*. (2006) ont observé dans les fruits de tomate, une diminution de la production des composés phénoliques lorsque l'azote était apporté majoritairement sous forme d'ammonium (Toor *et al*, 2006). Par contre la présence d'ammonium a favorisé la synthèse d'alcaloïdes chez la pervenche par rapport à une fertilisation avec seulement du nitrate (Ahmad *et al*, 2006).

Enfin, il est communément observé qu'une nutrition pauvre en azote conduit à une augmentation des teneurs en molécules carbonées dans les tissus, comme les composés phénoliques. C'est ce qu'a observé entre autres, l'équipe de Stout dans les feuilles de tomate (Stout *et al*, 1998), où les teneurs en composés phénoliques étaient multipliées par deux sur le

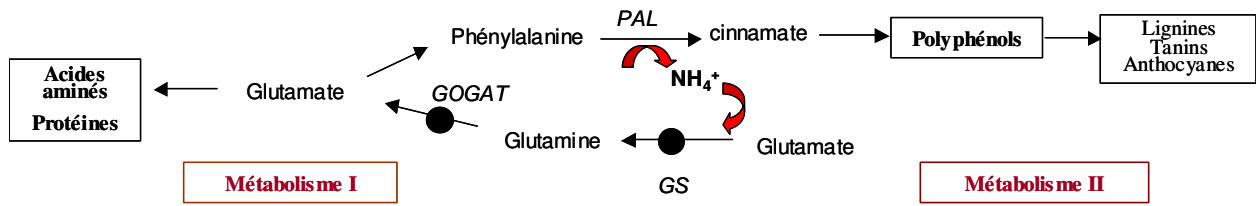


Figure 10 : Représentation du phénomène de recyclage de l'azote faisant intervenir les métabolismes primaire et secondaire. Phénylalanine ammonia lyase (PAL), Glutamine synthase (GS), glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT).

milieu de culture le plus faible en azote. Par contre cette évolution est inversée pour les teneurs en composés azotés, comme certains alcaloïdes (Nowacki *et al*, 1976; Sreevalli *et al*, 2004), et toutes les molécules n'évoluent pas dans ce sens. Plusieurs théories tentent d'expliquer cette répartition du carbone dans la plante, elles seront décrites dans la partie suivante.

IV Lien entre métabolisme primaire et secondaire, théories de répartition du carbone dans la plante

A/ Lien entre le métabolisme primaire et secondaire

Le métabolisme primaire représente tous les processus de bases, comme la croissance ou la respiration, qui sont vitaux pour la plante. Les métabolites primaires proviennent de ces réactions et sont les composés essentiels de la machinerie moléculaire de la cellule (acides nucléiques, protéines, lipides et d'hydrates de carbone). Le métabolisme secondaire a été défini par rapport à cette définition, et constitue donc tous les autres processus. Initialement la notion de métabolites secondaires résidait dans trois principales observations : une difficulté à attribuer une fonction précise à ces composés dans la physiologie de la plante, leur répartition très inégale selon les végétaux et au sein même des plantes, et enfin leur inertie biochimique (Macheix *et al*, 2005). Actuellement la désignation de « secondaire » paraît plus discutable, nous avons par exemple souligné le rôle fondamental de la lignine dans le port des végétaux. Il a aussi été établi qu'il existait une synthèse inductible et constitutive de ces composés, qui peuvent donc être stockés dans un premier temps et utilisés en cas de besoin. Il faut également noter que ces deux métabolismes interagissent. Au sens strict la chlorophylle peut être considérée comme un métabolite secondaire, alors qu'elle permet la réalisation de la photosynthèse et donc la synthèse de glucides. La synthèse des polyphénols peut également être un exemple d'interaction entre les deux métabolismes (Figure 10). Lors de la première étape de la voie de biosynthèse des composés phénoliques, la phénylalanine est déaminée par la PAL, et produit du cinnamate. Ce composé va par la suite être à l'origine de nombreux

polyphénols. Or il a été démontré par marquage à l'azote 15, que l'ammonium relargué lors de cette réaction était réintégré dans le cycle d'assimilation de l'azote via les enzymes GS et GOGAT, pour permettre la synthèse d'une nouvelle molécule de phénylalanine (Razal *et al*, 1996).

B/ Théories de répartition du carbone dans la plante

Les métabolites primaires participent au fonctionnement de la cellule et donc à la croissance de la plante, alors que les métabolites secondaires permettent plutôt à la plante de s'adapter à son environnement et se défendre contre les parasites. Or leurs synthèses nécessitent un même élément de base : le carbone. Il existe donc une « compétition » pour le C lors de la formation des métabolites primaires et des métabolites secondaires.

Les plantes ne résistent pas de la même façon à des stress biotiques, notamment aux attaques d'herbivores. Pour expliquer ces différentes capacités de défense des plantes, relatives à leurs teneurs en métabolites secondaires, plusieurs théories ont été élaborées. Quatre d'entre elles influencent particulièrement les recherches dans le domaine de l'écologie : la théorie de la défense optimale (Optimal Defense Theory, ODT), la théorie de l'équilibre de la nutrition carbonée (Carbon Nutrient Balance CNB) également appelée la théorie du ratio carbone/azote (Carbohydrate Nitrogen Ratio) , la théorie du taux de croissance (Growth Rate hypothesis, GR ; Ressource availability hypothesis) et la théorie de l'équilibre entre les mécanismes de différenciation et de croissance (Growth Differentiation Balance Hypothesis GDBH) (Stamp, 2003).

L'ODT (Barto et Cipollini, 2005) indique que la production spatiale et temporelle de molécules de défense tient compte de l'importance du tissu pour la plante (sa « valeur »), de la probabilité d'une attaque, et du bénéfice pour la plante en comparaison du coût énergétique engendré, en terme de pérennité de l'espèce (*ie* de « fitness ») (Hamilton, 2001). Cependant, la description de cette théorie reste assez générale, elle est donc difficile à exploiter (Hamilton *et al*, 2001; Stamp, 2003).

La GR (Coley *et al*, 1985) s'inscrit dans le prolongement de l'ODT et relate également des variations génotypiques. Elle postule que les ressources de la plante sont attribuées en priorité à la croissance ce qui conditionne la synthèse de molécules de défense au sein des plantes. Elle considère également la « valeur » des tissus et différencie les molécules de défense constitutives et induites. Par exemple, une plante vivant dans un milieu

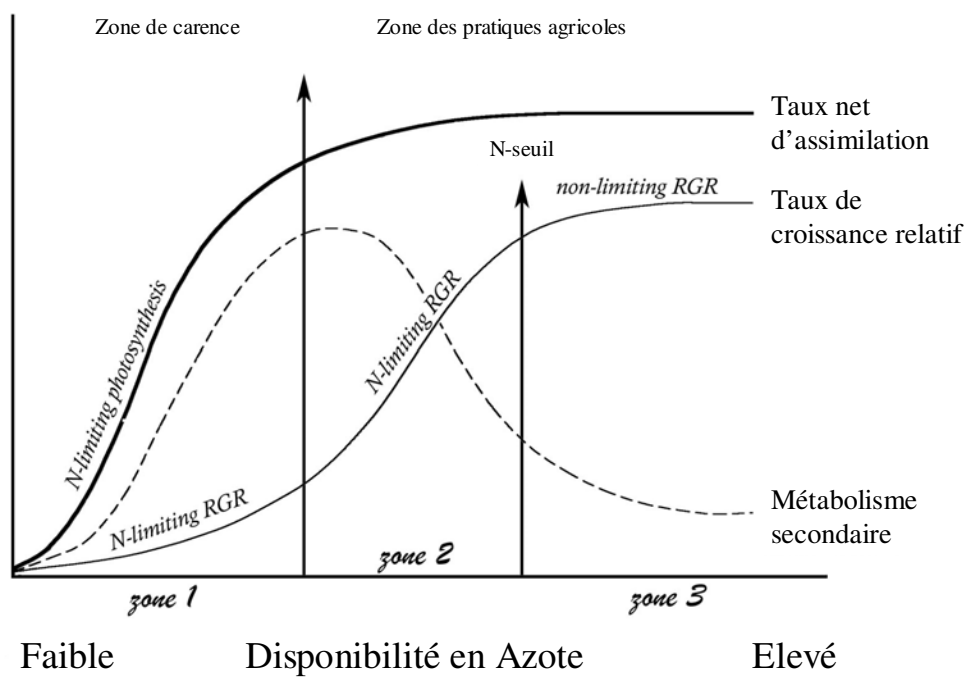


Figure 11 : Représentation théorique selon la GDBH du taux d'assimilation du CO_2 (Net Assimilation Rate), du taux de croissance relatif (Relative Growth Rate) et du taux de synthèse des métabolites secondaires, en fonction de la nutrition azotée. Adapté de Stamp, 2004.

peu favorable aura une faible capacité à produire des tissus (pour remplacer les tissus consommés par un herbivore), et donc beaucoup de molécules de défenses constitutives (pour défendre les tissus existants) mais peu de molécules induites (Stamp, 2003).

La CNB (Bryant *et al*, 1983) propose que le ratio carbone/nutriment de la plante, déterminé par les ressources du milieu et particulièrement par la disponibilité en lumière et en azote, contrôle la production de métabolites secondaires. Par exemple une diminution du ratio carbone/azote (en cas de limitation de la photosynthèse), donc une plus grande disponibilité d'azote, induira une diminution de la synthèse de métabolites carbonés (comme les composés phénoliques) mais inversement augmentera la synthèse de molécules azotées (comme les alcaloïdes). Cette théorie considère également que la croissance est prioritaire sur la synthèse de métabolites secondaires, mais décrit des variations phénotypiques. De plus elle considère que la croissance est plus limitée que la photosynthèse en cas de faibles ressources dans le milieu, et qu'une lumière faible diminuera la photosynthèse plus que la croissance (Hamilton *et al*, 2001).

La GDBH inclus et complète la CNB en prenant en considération davantage de paramètres environnementaux (Loomis, 1932). Elle pose l'hypothèse que la croissance de la plante, *ie* la synthèse de composés de structure, et la production de métabolites secondaires, *ie* le processus de différenciation, sont corrélées négativement. En fonction des conditions du milieu de culture (ressources et environnement), la plante fait donc un compromis pour répartir son carbone entre ces deux processus, trois cas de figure sont envisagés (Figure 11). En cas de ressources très faibles, la plante est en condition de carence (zone 1), les mécanismes de croissance et de photosynthèse sont limités, donc peu de métabolites secondaires et de biomasse sont produits. En cas de ressources intermédiaires (zone 2), la croissance serait plus limitée que la photosynthèse, ainsi un excès de carbone serait disponible pour la production de composés secondaires carbonés dont les polyphénols. Enfin en cas de ressources pléthoriques (zone 3), ni la croissance ni la photosynthèse ne seraient limitées, et les composés carbonés seraient principalement alloués à la production de biomasse (Herms et Mattson, 1992; Wilkens R T *et al*, 1996; Stamp, 2004).

Toutes ces théories coexistent et sont régulièrement testées pour différentes plantes et différents facteurs environnementaux. Ainsi elles sont parfois contestées, c'est le cas de la CNB car elle ne prend pas en compte l'influence du génotype et son interaction avec l'environnement pour quantifier les variations phénotypiques (Hamilton *et al*, 2001). Mais elles sont également validées, reformulées ou précisées (Muzika, 1993; Koricheva *et al*, 1998;

Ohnmeiss et Baldwin, 2000; Hamilton *et al*, 2001; Barto et Cipollini, 2005). En effet, Stamp (2003, 2004) a expliqué à plusieurs reprises qu'il était difficile de mettre au point et de tester rigoureusement ces théories relatives au domaine de l'écologie. De plus les métabolites secondaires sont des molécules de structures et de fonctions très variées au sein des plantes, ce qui peut expliquer la difficulté à prédire de façon générale leur évolution en fonction des conditions extérieures.

V Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe « métabolites secondaires » de l'unité mixte de recherche Nancy Université-INRA, Laboratoire Agronomie Environnement Nancy-Colmar. Depuis plusieurs années le projet de recherche de cette équipe était axé sur la caractérisation des enzymes (P450) impliquées dans la voie de biosynthèse des furocoumarines (composés phénoliques dérivant des coumarines, Figure 7). En parallèle de ces recherches, mes travaux de DEA et de thèse ont initié une nouvelle thématique de recherche autour de la « qualité des produits végétaux » dont les objectifs actuels sont d'étudier la régulation par la plante de la synthèse, du transport et du devenir des métabolites secondaires bioactifs, en réponse à son environnement. Des facteurs biotiques et abiotiques ainsi que leurs interactions seront étudiés.

Nous avons choisi de commencer ce programme par l'étude de la nutrition minérale et plus particulièrement de la nutrition azotée. Comme indiqué dans la bibliographie, l'azote est un élément indispensable pour la plante mais de façon surprenante peu de travaux ont été menés en ce qui concerne l'impact de la nutrition azotée sur le métabolisme secondaire d'espèces agronomiques comme la tomate. De plus lors de la première étape de la formation des composés phénoliques (synthèse de l'acide cinnamique par la PAL), un ion ammonium est libéré, et le devenir de cet ion s'inscrit dans une possible collaboration entre le métabolisme primaire et secondaire (Figure 10). Le but de mon travail de thèse a donc été d'évaluer l'effet de la nutrition azotée sur les teneurs en polyphénols chez la tomate.

Le premier objectif a été d'observer l'évolution des teneurs en polyphénols au niveau des parties végétatives des tomates en réponse à différents niveaux de fertilisation azotée, et d'essayer de caractériser cette réaction aussi bien au niveau spatial que temporel. Le fruit est le produit final et commercial des tomates, et actuellement le consommateur prête davantage attention à la qualité de ce produit et notamment à sa valeur santé qui est de plus en plus mise en avant et qui pourrait impliquer les polyphénols. Le deuxième objectif de ce travail a donc été de déterminer dans quelles mesures une diminution de la nutrition azotée allait modifier la composition des fruits de tomates, et pouvait affecter leur qualité. En parallèle à ces travaux portant sur l'azote, nous avons également considéré l'influence d'autres facteurs environnementaux, comme la lumière et la température, qui jouent un rôle fondamental au cours de la culture.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre, le matériel végétal, et les dispositifs de culture seront décrits de façon succincte, les conditions de cultures seront plus largement présentées au début de chaque chapitre de résultat. Par contre, l'ensemble des techniques analytiques est entièrement exposé dans ce chapitre.

I Le matériel végétal utilisé

Nous avons mené notre étude sur la tomate (*Solanum lycopersicum*), qui est la plante modèle pour les recherches sur la qualité des fruits charnus. Il existe plus de 1700 variétés de tomate, et les variétés exploitées sont souvent renouvelées. Nous avons donc voulu mener des études sur des cultivars utilisés en production (Rondello, Clotilde, Cervil) pour se rapprocher des conditions agronomiques réelles. Mais nous avons également voulu acquérir des connaissances sur un cultivar nain (Microtom) utilisé de plus en plus dans le domaine de la recherche puisqu'il présente les caractéristiques d'une plante modèle pour l'étude des plantes à fruits charnus (Meissner *et al*, 1997).

A/ Rondello

Solanum lycopersicum cv. Rondello est une variété commercialisée par De Ruiters. C'est une variété de tomate hybride (F1) à croissance indéterminée (Figure 12 A). Les tomates produites mesurent 5 à 10cm de diamètre, et sont destinées à l'industrie. Ce cultivar est cultivé aussi bien hors-sol qu'en plein champ. C'est une variété précoce, qui produit des fruits de 120-140g.

B/ Clotilde

Solanum lycopersicum cv Clotilde est une variété développée par Syngenta. C'est une plante à croissance indéterminée utilisée en culture hors sol (Figure 12B), qui donne des tomates de type grappe produites pour être consommées en fruits frais. Les bouquets comportent entre 5 et 6 fruits, d'une centaine de gramme chacun. Cette variété a été utilisée comme référence en production de tomate de type grappe.



Figure 12 : (A) Plant de tomate (cv Rondello) en culture NFT sous serre à Avignon ; (B) Plant de tomate (cv Clotilde) cultivé sous serre en hydroponie sur laine de roche ; (C) Plant de tomate (cv Microtom) en culture NFT sous serre à Avignon ; (D) Plant de tomate (cv Microtom) en culture hydroponie en conteneurs, en phytotron à Nancy

C/ Cervil

Solanum lycopersicum cv Cervil est une variété développée par Vilmorin. Elle produit des fruits de type cerise d'environ 6g. C'est une variété à croissance indéterminée utilisée en culture hors sol (Figure 2A). Les fruits sont rassemblés en bouquet d'environ vingt fruits bien colorés.

D/ Microtom

La variété Microtom a été élaborée à partir d'un croisement entre Florida Basket et Ohio 4013-3 (Scott et Harbaugh, 1989). C'est une plante naine qui mesure entre 10 et 20cm (Figure 12C et D), dont les fruits mesurent 2cm environ et pèsent entre 2 et 5 g. L'équipe de Marti (2006) a montré que Micro-Tom présentait des mutations sur les gènes DWARF (D), qui affecte la synthèse des brassinostéroïdes, et SELF PRUNING (SP) responsable de la croissance déterminée, voire une troisième mutation qui affecte sa taille MINIATURE (MNT) (Marti *et al*, 2006). Cette plante a été créée pour être utilisée comme plante ornementale. Cependant Meissner *et al*. (1997), ont proposé également de l'utiliser comme modèle pour des travaux en biologie moléculaire. En effet Micro-Tom présente plusieurs caractéristiques d'une plante modèle. C'est une variété peu encombrante, ce qui permet sa culture en serre ou en chambre de culture sur de faibles surfaces. Son cycle de culture est rapide, entre 70 à 90 jours, en comparaison des variétés plus classiques où les premières récoltes ont lieu 4 à 5 mois après le semis (Renaud, 2003). De plus ce cultivar peut être transformé avec une bonne efficacité (Meissner *et al*, 1997) d'où son utilisation en génomique. L'équipe de Génomique Fonctionnelle du Développement du Fruit de l'INRA de Bordeaux a développé une collection de variants fortement mutagénéisés par l'ethylmethanosulfonate (EMS). Une banque de donnée phénotypique associée (Microtom Mutant Data Base, MMDB) est en cours de construction (l'accès public est envisagé à terme).

II Les dispositifs de culture utilisés lors des expérimentations

Plusieurs dispositifs de culture ont été utilisés suivant le lieu de réalisation des cultures et le cultivar utilisé (Figure 12). Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sous serre ou en chambre de culture, sur un substrat organique ou directement au contact de la solution nutritive. Les solutions nutritives étaient préparées à partir d'eau déminéralisée et de sels ou de solution commerciale. Il s'agissait de solution nutritive complète dont les teneurs en nitrate variaient entre 0 et 15mM. Leur composition a été contrôlée et ajustée pendant toute la durée des expérimentations.

Les plantes ont été conduites de façon à limiter le développement des bourgeons axillaires, lors de la fructification, le nombre de fruit par grappe a généralement été contrôlé. Des auxiliaires de culture et des traitements phytosanitaires ont été effectuées de façon préventive et curative en cas d'infection.

Au moment des récoltes, les organes prélevés (racine, tige, feuille, fruit) ont été rapidement congelés dans de l'azote liquide pour éviter l'altération des molécules. Les conditions de cultures et d'échantillonnage seront emplement décrites en début des chapitres de résultats.

III Méthodes Analytiques

A/ Simplification et validation de la méthode d'extraction des polyphénols

Nous avons commencé nos analyses de polyphénols dans des fruits, en utilisant une méthode développée au GAFL (INRA, Avignon, JL Poessel, MN Corre), qui est inspirée de la méthode de Fleuriet (1976). Trois extractions successives par 5ml d'éthanol à 70% froid sont effectuées sur 250 mg de matière sèche (MS). Après homogénéisation de l'extrait à l'Ultra-Turrax, l'extrait est placé sous agitation rotative (15 minutes pour la première extraction puis 5 minutes pour les suivantes) avant d'être centrifugé. Les surnageants sont regroupés, l'extrait est évaporé puis il est repris dans 1ml de méthanol qualité HPLC et filtré à 0,45µm, avant d'être analysé en chromatographie (CLHP).

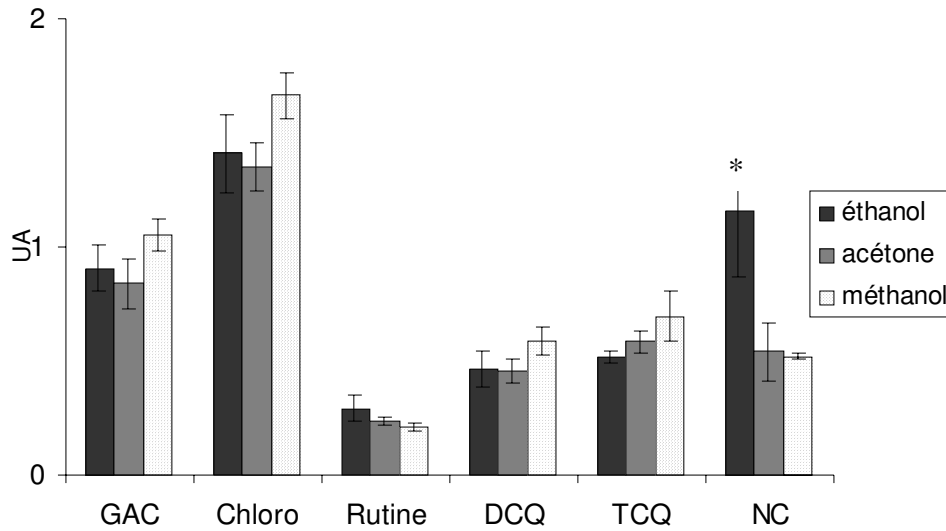


Figure 13 : Quantités de polyphénols, en unité arbitraire, extraits selon les 3 solvants utilisés : éthanol, acétone et méthanol à 70%. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 extractions, \pm écart type. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique (Chloro), la rutine, les di et tri caféoylquinique (DCQ et TCQ), ainsi que la naringénine chalcone (NC). (*) indique une différence significative à 5% selon un test de Tukey.

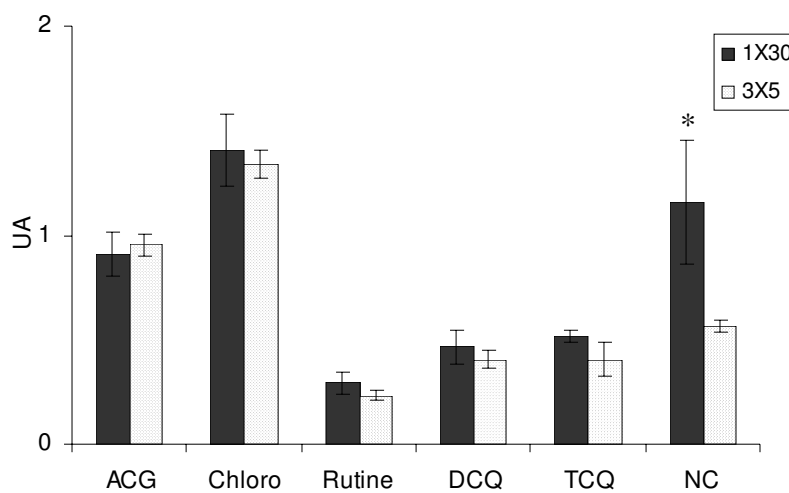


Figure 14 : Quantités de polyphénols obtenues, suivant deux méthodes d'extraction : une extraction avec 30min d'agitation ou 3 extractions avec 5minutes d'agitation. Les résultats sont des moyennes de 3 extractions, \pm écart type, exprimés en unité arbitraire. Les composés quantifiés sont les mêmes que précédemment. (*) indique une différence significative à 5% selon un test de Tukey.

Dans la littérature les méthodes d'extractions des composés phénoliques sont très diverses et leur efficacité dépend de la nature des composés à extraire (Naczk et Shahidi, 2004). Nous avons donc décidé de réaliser une étude sur fruit, puis sur limbe, pour valider notre méthode. En outre cette étude nous a permis de simplifier la précédente méthode.

Nous avons choisi d'utiliser de l'éthanol à 70% puisqu'il a été observé que les solvants purs présentaient des capacités d'extraction plus faible (Naczk *et al*, 1992). Cependant d'autres solvants : l'acétone et le méthanol sont fréquemment utilisés (Hertog *et al*, 1992; Georgé *et al*, 2005). Nous avons donc étudié les différentes capacités d'extraction de ces trois solvants (dilué à 70% avec de l'eau) sur notre matériel, pour confirmer notre choix.

Il a également été démontré que les temps d'extraction courts limitaient la dégradation des molécules, mais en augmentant la durée, l'extraction était meilleure (Cork et Krockenberger, 1991). Nous avons donc voulu vérifier si une méthode simplifiée d'extraction (une extraction de 30minutes) apportait d'assez bons résultats, la méthode de référence (3 séries d'extractions de 5min) étant assez laborieuse.

Enfin la méthode de référence nécessitait 250mg de matière sèche. Cette quantité s'est révélée rapidement trop importante par rapport aux quantités disponibles dans nos échantillons. Nous avons donc réduit la masse à 125mg mais conservé le même volume de solvant, le ratio volume de solvant sur quantité de matière sèche a donc été modifié. Nous avons donc également voulu mesurer l'importance de ce ratio.

a) Comparaison de trois solvants

Cinq millilitres de solvants, éthanol, acétone et méthanol, respectivement à 70%, ont été utilisés pour extraire les composés phénoliques sur 125mg de matière sèche de fruit de tomate (cv Picollo). Après homogénéisation à l'Ultra-Turrax, le mélange était placé sous agitation pendant 30 minutes.

Globalement il n'y a pas eu de différences significatives entre les trois solvants (Figure 13), seule la naringénine chalcone (NC) a été significativement mieux extraite par l'éthanol. De plus l'acétone et le méthanol étant des solvants plus toxiques, leur manipulation implique plus de précautions. **L'éthanol est donc resté notre solvant d'extraction.**

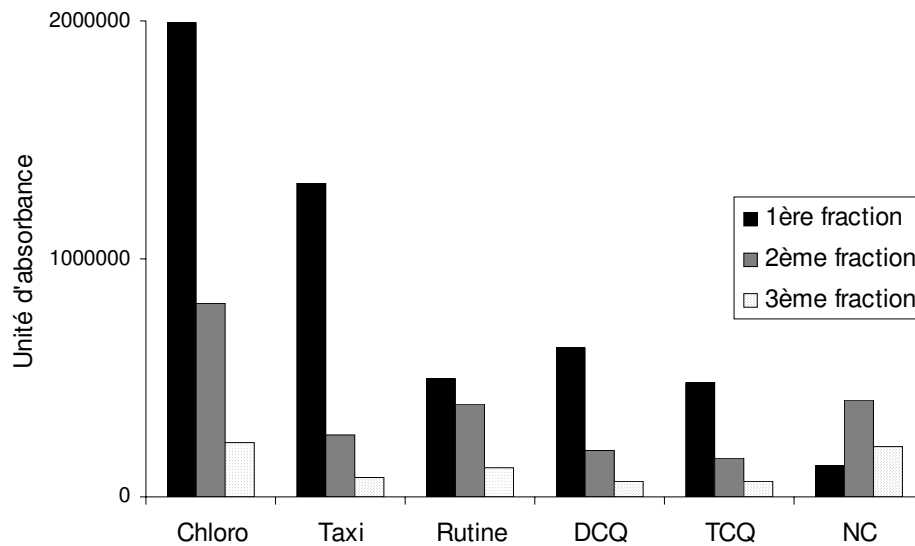


Figure 15 : Quantités de polyphénols (unité d'absorbance) obtenues dans chaque fraction de l'extraction en 3 fois 5 minutes d'agitation. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique (Chloro), la rutine, les di et tri caféoylquinique (DCQ et TCQ), la naringénine chalcone (NC), ainsi que la taxifoline (Taxi) qui est utilisé comme étalon interne.

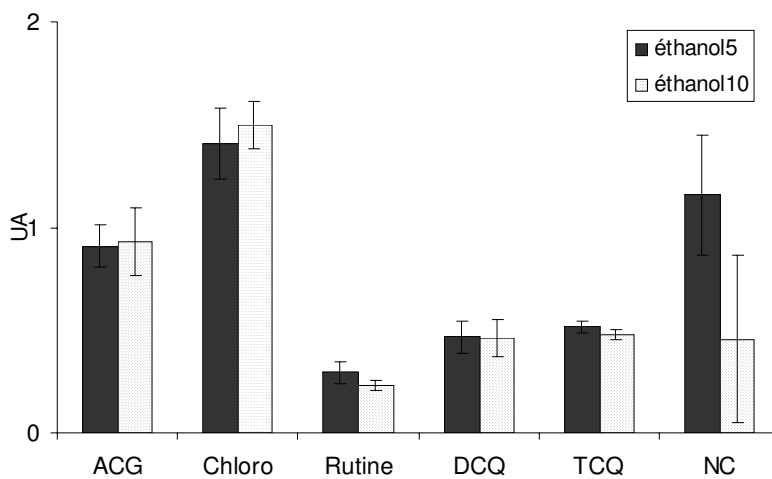


Figure 16 : Quantités de polyphénols isolées dans des fruits de tomate extraits avec 5 ou 10 ml de solvant. Les résultats présentés sont des moyennes de 3 extractions, \pm écart type, exprimés en unité arbitraire. Les composés quantifiés sont les mêmes que précédemment. (*) indique une différence significative à 5% selon un test de Tukey.

b) Simplification de la méthode

Deux types d'extraction ont été comparés en extrayant 125mg de matière sèche. La première consistait en 30 minutes d'agitation avec 5ml d'éthanol à 70%, et la deuxième comprenait 3 extractions successives pendant 5 minutes d'agitation avec 5ml d'éthanol à 70%. Les 3 fractions intermédiaires d'un échantillon extrait avec la deuxième méthode ont été isolées et analysées séparément.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus entre les deux méthodes ne sont pas différents, seule la NC a été mieux extraite avec un temps d'agitation plus long (Figure 14). Au regard de la figure 15, l'éthanol semble extraire dès la première extraction une grande partie des composés, et lors de la deuxième davantage de flavonoïdes. Il faut noter également qu'avec trois séries d'extractions des pertes peuvent être engendré lors de l'évaporation (3 tubes à évaporer et à reprendre au lieu d'un). **La méthode a donc été simplifiée en une seule extraction de 30 minutes.**

c) Volume de solvant nécessaire

Dans la littérature, les volumes d'extraction sont différents suivant les études, donc le ratio : volume de solvant / masse de matière de sèche utilisée varie. Il est par exemple de 0,08 dans la méthode d'Hertog, 1992, fréquemment utilisée (Crozier *et al*, 1997; Naczki et Shahidi, 2004). Par contre dans la méthode de référence (GAFL Avignon) il était de 0.02 (5ml pour 250g de MS), et dans notre méthode il était de 0.04 (5ml pour 125mg de MS).

Pour tester l'impact du volume de solvant d'extraction, cinq ou dix millilitres de solvant (éthanol à 70%), respectivement pour obtenir un ratio de 0.04 et 0.08, ont été utilisé pour extraire les polyphénols dans 125mg de matière sèche de tomate (variété picollo).

Les résultats obtenus entre les deux méthodes n'ont pas été significativement différents (Figure 16). **Nous avons donc conservé un ratio de 0.04, entre le volume de solvant et la matière sèche à extraire.**

d) Méthode d'extraction des polyphénols dans les parties végétatives

Pour extraire les composés phénoliques des parties végétatives (limbe, tige, et racine), nous avons dans un premier temps testé différentes méthodes d'extraction décrites dans la

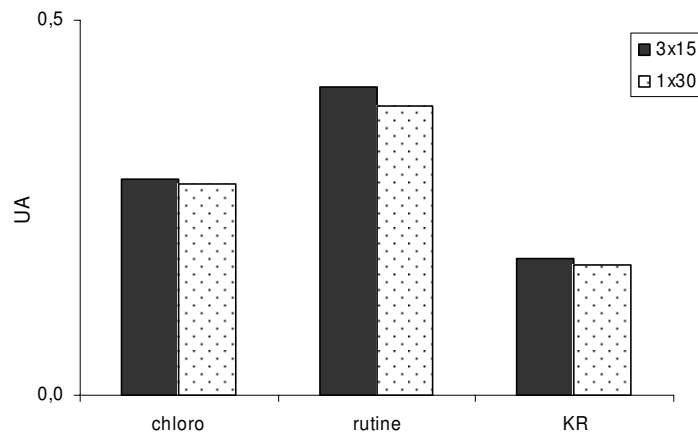


Figure 17 : Quantité de polyphénols (unité arbitraire) obtenue dans les limbes, suivant deux méthodes d'extraction : 3 fois 5minutes ou une fois 30min d'agitation. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique (Chloro), la rutine, les di et tri caféoylquinique (DCQ et TCQ), ainsi que la naringénine chalcone (NC).

littérature, comme le méthanol à 80% ou à différentes concentrations (40, 70%) et mélangé à de l'acide acétique (0.5, 2.5%), en faisant varier la durée d'extraction (20min, 2heures). Cependant toutes ces méthodes se sont révélées être d'une très faible efficacité pour notre matériel. Nous avons donc testé la méthode de référence, qui a apporté des résultats satisfaisants. La MS et le volume de solvant avaient été réduits de façon proportionnelle, pour conserver le ratio de 0.04 : 50 mg de MS et donc 2ml de solvant. Les parties végétatives ont donc d'abord été extraites suivant la méthode de référence : 3 séries d'extraction de 5 minutes avec de l'éthanol à 70%, avant d'être également simplifiée en une seule extraction de 30minutes sous agitation, les résultats obtenues suivant ces deux méthodes semblant apporter des résultats comparables (Figure 17).

e) Conclusion

Avec ces expérimentations, nous avons pu valider l'efficacité de notre méthode, par rapport à d'autres techniques trouvées dans la littérature. Ces expérimentations de base nous ont également permis de simplifier la méthode d'extraction utilisée jusqu'à présent, en une seule extraction de 30 minutes avec 5 ml d'éthanol à 70% sur 125 mg de MS de fruit ou 2ml de solvant et 50mg de MS de partie végétative.

B/ Description des méthodes utilisées

a) Les méthodes d'extraction

Les extractions ont été effectuées sur des poudres de matière sèche, 50 et 125mg respectivement pour les parties végétatives ou pour les fruits, avec de l'éthanol à 70%, respectivement 2 et 5 ml. Les extractions étaient faites à froid, sur glace et avec du solvant à -20°C. Après pesée de la MS en tube Falcon de 50ml pour les fruits et en tube Eppendorf de 2ml pour les parties végétatives, 50µl de taxifoline à 2mg/ml étaient ajoutés. La taxifoline (Extrasynthèse) est un flavonoïde, qui a été utilisé comme étalon interne puisque ce composé n'est pas présent à l'état naturel chez la tomate et son temps de rétention est approprié pour nos analyses. Dans un premier temps trois séries d'extractions, avec 15 minutes d'agitation chacune étaient réalisées, puis la méthode a été simplifiée à une seule extraction comprenant 30 minutes d'agitation. Une fois le solvant ajouté, le mélange était homogénéisé à l'Ultra-

	Chapitre III					Chapitre IV		Chapitre V		Chapitre VI				
	II		III			II		II	III	A	B	C	D a)	D b)
	Limbes Rondello	Tiges Rondello	Racines Rondello	Limbes Rondello (temps intermédiaire)	Limbe Rondello (temps de réponse)	Parties végétatives microtom	Fruits microtom	Fruits Clotilde	Fruits Microtom	Limbes Rondello (temps intermédiaire)	Limbes Rondello	Fruits Cervil	Fruits Clotilde	Fruits Cervil
MS en mg	50	50	50	50	50	50	125	125	125	50	50	125	125	125
V éthanol	2	2	2	2	2	2	5	5	5	2	2	2,5	5	2,5
nb extraction	3x15min	3x15min	3x15min	3x15min	1x30min	1x30min	1x30min	1x30min	1x30min	3x15min	3x15min	1x15 + 2x5min	1x30min	1x15 + 2x5min
Extrait	400µl MeOH	400µl MeOH		400µl MeOH	300µl H2O + 700µl MeOH	300µl H2O + 700µl MeOH	300µl H2O + 700µl MeOH	300µl H2O + 700µl MeOH		400µl MeOH	400µl MeOH	500 µl MeOH	300µl H2O + 700µl MeOH	500µl MeOH
Rendement	60%	60%	60%	60%	70%	60%	70%	70%	70%	60%	60%	40%	70%	40%

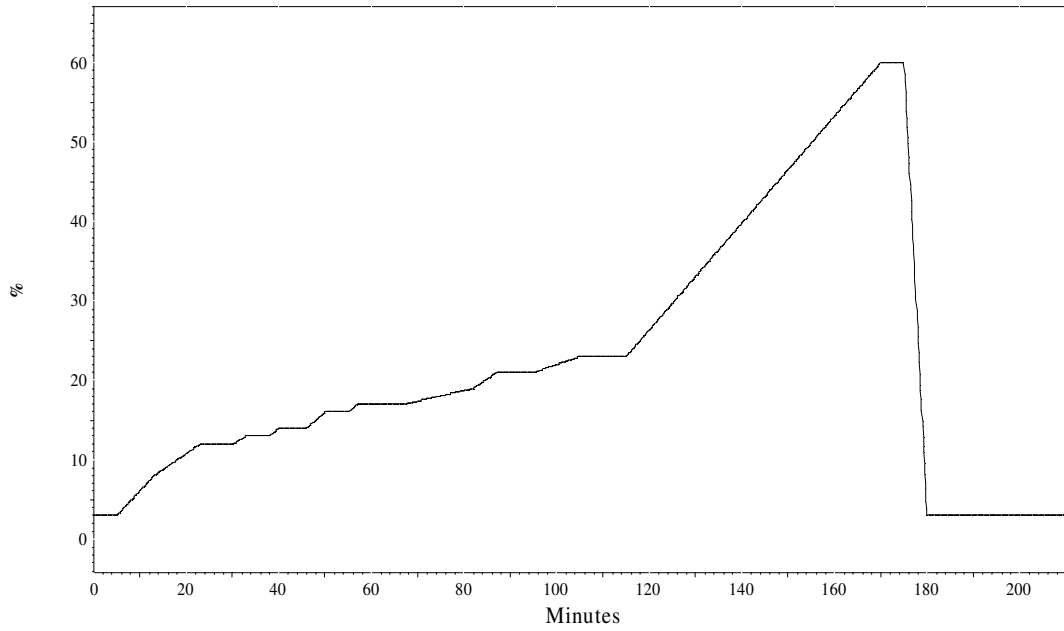
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction utilisées selon le chapitre, et des rendements obtenus. Le volume d'éthanol est en ml, après évaporation à sec les échantillons ont été repris dans différents mélanges (méthanol pur (MeOH) ou avec de l'eau) pour constituer les extraits.

Turrax (Polytron PT2100) puis des barreaux aimantés étaient ajoutés dans les tubes pour permettre l'agitation sur un agitateur magnétique. Les agitations étaient effectuées sur agitateur magnétique pour les fruits ou en thermomixeur (1000rpm, Compact Eppendorf) pour les organes végétatifs. Les surnageants ont été purifiés par centrifugation (5minutes à 1000rpm), puis ils ont été évaporés à sec au speed vac (Jouan RC10.10). Au début de mes travaux, les extraits secs ont été repris dans du méthanol pur puis dans un mélange méthanol-eau (70/30) qui permet une meilleure re-solubilisation, et une amélioration du rendement d'extraction. Les extraits ont été purifiés par filtration (Filtre Minisart RC 4 45µm, Sartorius) ou par centrifugation avant analyse. Le rendement d'extraction a été déterminé en comparant l'aire des pics de taxifoline obtenues lors des analyses, avec celui obtenu lors de l'injection d'un mélange témoin composé du solvant de reprise (eau-méthanol) additionné de 50µl de taxifoline.

Les différentes méthodes d'extractions utilisées et les rendements observés sont résumés dans le tableau 3.

b) Les analyses par chromatographie liquide à haute performance, HPLC

La quantification des composés phénoliques a été effectuée par absorbance en chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La séparation a été effectuée en phase inverse sur une colonne C18 (Merck C18) de longueur 250mm, de diamètre 4mm, et de porosité 5µm précédée d'une pré-colonne. Les analyses ont été effectuées sur plusieurs machines ou détecteurs, la présence d'un étalon interne dans les échantillons, et la détermination de gamme étalon sur chaque appareil nous a permis de comparer les résultats. La détection a été effectuée par balayage entre les longueurs d'onde 200 et 400nm, et la quantification à 330nm. Plusieurs configurations de chromatographe ont été utilisées au cours de mes travaux de thèse. Les analyses ont d'abord été effectuées avec un CLHP de la marque Beckman System Gold, géré par le programme 32Karat, munie d'un passeur automatique 508, d'un détecteur à barrette de diode (module 168), et d'un détecteur à mono longueur d'onde (module 166). Puis certains échantillons ont été analysés sur une machine de marque Shimadzu, système d'exploitation LC solution, munies de système de pompe LC-20AD, d'un passeur automatique SIL-20AC thermostatés, et d'un détecteur à double longueurs d'onde SPD-20AV. Pour toutes ces configurations la colonne restait à température ambiante.



La plupart des échantillons ont été analysés avec une méthode longue (230min, Figure 18) mais lors de la dernière expérimentation une méthode plus courte (130min, Figure 19) a été utilisée. Ces méthodes ont également été développées par l'équipe du GAFL d'Avignon et permettent une bonne séparation des composés. La méthode longue a d'abord été utilisée pour pouvoir déterminer correctement un maximum de molécules, la séparation étant meilleure. Une fois les composés cibles déterminés, la méthode courte s'est révélée suffisante.

Tous les 3 échantillons un rinçage de la colonne avec 95 ou 100% de méthanol a été effectué. La colonne était conservée sous 95 ou 100% de méthanol. 20 μ l d'échantillons étaient injectés. La phase mobile était constituée de deux solutions : de l'eau ultra-pure acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide orthophosphorique (A), et du méthanol qualité HPLC (B). Le gradient consistait en un mélange de B dans A, de 3 à 60%, à un débit de 0.5ml/min. Nous avons analysé des extraits de limbe, tige, racine, des fruits verts et rouges (Figure 20). Pour tous ces extraits l'identification des composés détectés a été faite en ce basant sur les données bibliographiques, les spectres UV, et des analyses en spectrométrie de masse.

La quantification des molécules a été obtenue grâce à une gamme étalon en 4 ou 5 points, chaque point correspondant en abscisse au rapport de molarité : n témoin / n taxifoline et en ordonnée à l'aire relative de la molécule témoins/aire taxifoline. Les teneurs en rutine, acide chlorogénique, kaempférol-3-O-rutinoside ont été exprimées en mg de composé par g/MS ; les autres composés (glucoside de l'acide caféique, di et tricafeoylquiniques, naringénine chalcone) ont été exprimés de façon relative, en équivalent acide chlorogénique. Les standards ont été achetés chez Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France).

L'identité des composés phénoliques a été confirmée par couplage chromatographie phase liquide - spectrométrie de masse. Les analyses ont été effectuées sur un LC MS/MS (modèle LTQ Thermoelectron, logiciel d'exploitation des données : Xcalibur 2.0). L'azote a été utilisé comme gaz de nébulisation, sous pression et chauffé à 120°C. Les paramètres ont été optimisés pour analyser les composés sur une gamme m/z comprise en 40 et 1200. Le voltage du capillaire était de 5 kV, et la température de désolvation (capillaire de transfert) de 250°C. Pour permettre la caractérisation de toutes les molécules, les analyses ont été effectuées en mode HESI (Heated Electrospray Ionisation) positif et négatif.

Les échantillons étaient préparés de la même façon qu'en HPLC (extraction hydro éthanolique), mais à partir de plus de MS (extraits plus concentrés). 20 μ l d'extrait était injectés, les conditions de séparation (gradient, colonne, solvant) étaient les mêmes que lors des analyses en HPLC.

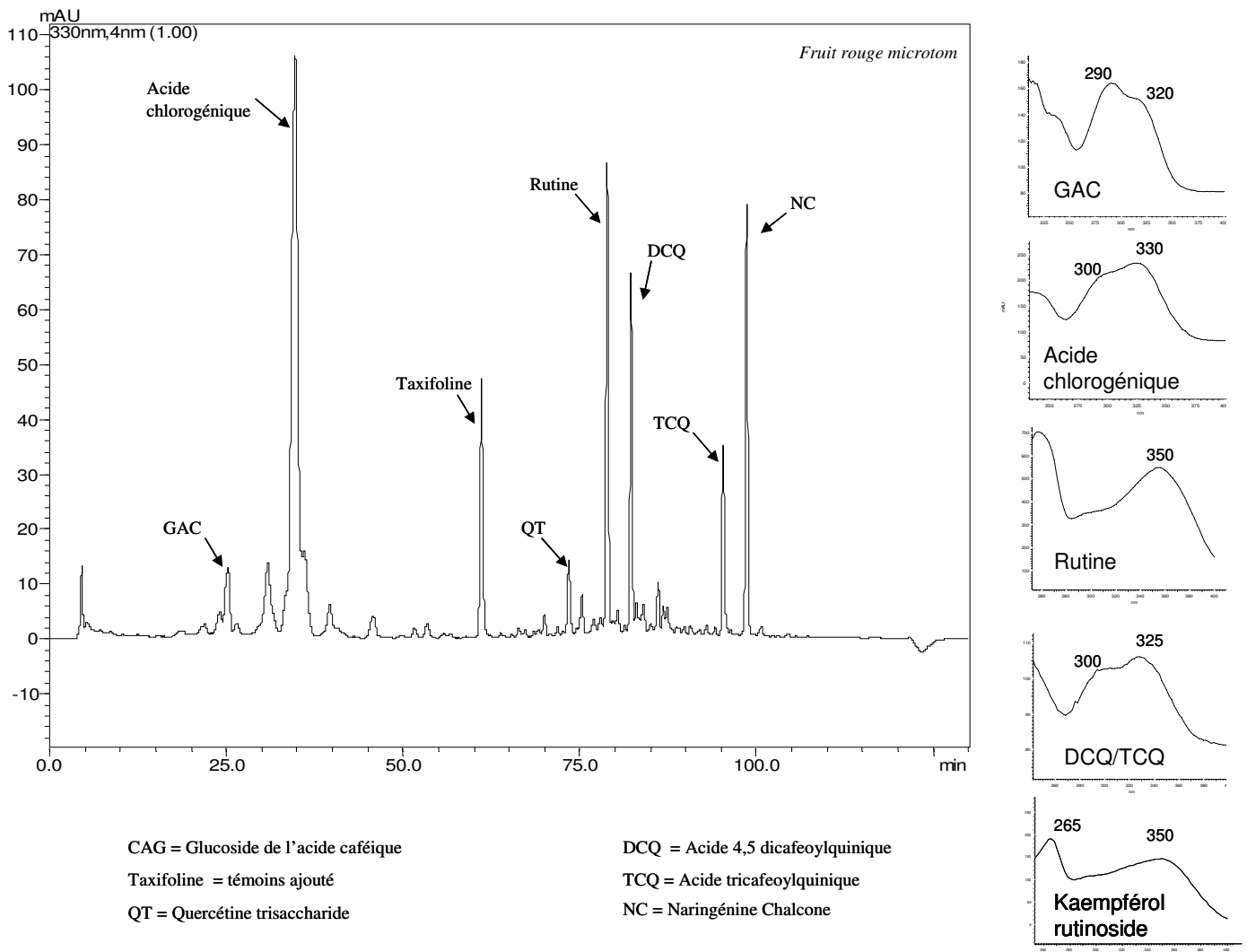


Figure 20 : Chromatogramme HPLC de fruit de tomate rouge (cv Microtom), enregistré à la longueur d'onde $\lambda=330\text{nm}$, et les spectres d'absorbance dans l'UV des molécules identifiées.

C/ Méthode de dosage du carbone et de l'azote totaux

Les pourcentages de carbone et azote totaux ont été obtenus par chromatographie sur colonne en phase gazeuse en utilisant un auto analyseur carbone/azote (Flash EA 1112, Thermo Finnigan). Entre 3 et 5 mg de MS (fruit, limbe, tige ou racine) ont été pesés et condensés dans des nacelles en étain. La capsule subit une combustion sous un flux d'oxygène qui accélère la combustion. Un flux d'hélium utilisé comme gaz vecteur, transporte les gaz formés (CO_2 , N_2 , CO , O_2), à travers une colonne de cuivre qui permet la réduction des oxydes azote, et la formation de CO_2 et de N_2 . Une colonne de perchlorate de magnésium, placée en série, permet de piéger les molécules d'eau. Finalement, une colonne de chromatographie en phase gazeuse sépare le N_2 et le CO_2 (temps d'analyse de 5min) qui sont détectés par un catharomètre (pont de Wheaston, détecteur à conductivité).

Les teneurs en carbone et azote des échantillons étaient estimées par rapport à une gamme étalon établie avec de l'acide aspartique (%C=36.05 et %N=10.52).

Chapitre III : Impact de la nutrition azotée dans les parties végétatives de la tomate

Nous avons vu au cours de la synthèse bibliographique que les plantes pouvaient assimiler l'azote sous forme ammoniacale et nitrique. Cette dernière étant la forme préférentiellement absorbée. L'assimilation de ces deux ions induit des modifications au niveau des métabolismes primaire et secondaire. Ainsi pour s'affranchir des interactions éventuelles, nous avons choisi de réduire notre étude à l'influence de **l'azote nitrique**, sur les teneurs en polyphénols.

Il a déjà été observé que les concentrations en polyphénols des feuilles étaient accrues par une diminution des apports en azote (Wilkens R T *et al*, 1996; Hoffland *et al*, 2000; Stewart *et al*, 2001), mais l'évolution dans les autres organes n'a à notre connaissance jamais été décrite. **Notre étude vise donc à confirmer et compléter ces observations en décrivant également la composition des racines et des tiges.** De plus, ces précédents travaux se limitaient à un faible nombre de traitements azotés. Alors que notre dispositif expérimental soumet les plantes à un nombre élevé de traitements azotés, ce qui va nous permettre de **décrire les changements engendrés au niveau de la plante par des courbes de réponse à l'azote.**

Plusieurs théories tentent de prédire la répartition du carbone dans la plante, entre les métabolites primaire et secondaire. Parmi elles la théorie de *l'équilibre entre la croissance et la différenciation* (Growth Differentiation Balance Hypothesis GDBH) pose l'hypothèse que la croissance de la plante et la production de métabolites secondaires sont corrélées négativement. La GDBH considère trois cas de figure selon les ressources du milieu, que l'on peut classer en trois zones : une zone de carence importante, une zone limitante et une zone optimale pour la croissance (Herms et Mattson, 1992; Wilkens R T *et al*, 1996; Stamp, 2004). Pour chacune de ces zones le taux de photosynthèse, de croissance et de synthèse de métabolites secondaires sont différents (Figure 11). Cette théorie a été principalement testée sur des espèces ligneuses, et a été critiquée à plusieurs reprises. Son domaine d'application ayant notamment été restreint aux composés phénoliques, en écartant les terpènes et les tannins (Reichardt *et al*, 1991; Muzika, 1993; Haukioja *et al*, 1998; Koricheva *et al*, 1998; Hamilton *et al*, 2001). Il faut rappeler que les métabolites secondaires regroupent des molécules de structures diverses, des molécules strictement carbonées (comme les polyphénols, terpènes et tannins) et des molécules comprenant aussi des groupements azotés (comme les alcaloïdes), ce qui peut être, entre autres, à l'origine de résultats contradictoires.

Un autre objectif de cette étude est donc de tester l'application de la GDBH sur une espèce agronomique modèle, la tomate, en se focalisant sur l'étude de 3 composés phénoliques d'intérêt : l'acide chlorogénique, la rutine et le kaempférol rutinoside (KR), qui

sont les principaux composés phénoliques présents dans les feuilles de tomate. Ces composés interviennent notamment dans la résistance des plantes aux attaques bactériennes et fongiques (Maher *et al*, 1994; Andreu *et al*, 2001; Flors *et al*, 2001; Shadle *et al*, 2003; Niggeweg *et al*, 2004; Mittelstraß *et al*, 2006; Treutter, 2006). Leur rôle de protection contre les herbivores demeure toutefois controversé (Hoffland *et al*, 2000; Johnson K S et Felton, 2001; Johnson K S, 2005).

Dans un deuxième temps nous avons cherché à déterminer le temps nécessaire pour que la régulation du métabolisme secondaire de la plante soit visible au niveau des limbes. Ainsi dans la première partie du chapitre des plantes récoltées 25 jours après le semis vont être étudiées, et dans la deuxième partie des récoltes plus précoces de cette même expérience seront exploitées. Une autre expérimentation a également été mise en place pour confirmer ce temps de mise en place de la réponse.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication en préparation pour *Journal of Experimental Botany*.

I Matériels et méthodes

A/ Caractérisation spatiale des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination des courbes de réponse à l'azote

Une expérience a été conduite à Avignon avec l'unité PSH qui dispose d'un système de culture NFT, pour établir des courbes de réponse à la nutrition azotée.

a) Description du dispositif de culture en Nutrient Film Technique (NFT)

Le système Nutrient Film Technique (NFT) a été mis en place sur Avignon par Stéphane Adamowicz et Jacques Lebot, du groupe Plante et Système de culture Horticole (PSH) de l'INRA d'Avignon, il a d'ailleurs été décrit récemment dans un article (Adamowicz et Le Bot, 2008). Il consiste en un agencement de gouttières en PVC (2m de long par 3,2 cm de diamètre) organisées en table de culture (Figure 11A). Ces gouttières sont préalablement percées pour permettre l'implantation de tubes de culture suffisamment espacés, au travers desquels vont pousser les plantes. Les graines (cv Rondello) ont été directement semées sur le système NFT, les tubes de culture possédant un grillage fin à leur base.

Chacun des systèmes de NFT (un ensemble de gouttière) est alimenté par une solution nutritive de concentration en NO_3^- déterminée. La solution nutritive est en circulation permanente dans les gouttières, à un débit de $0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, et drainée dans un réservoir dédiés. La composition ionique a été suivie en mesurant le pH et la concentration en NO_3^- , par spectrométrie (Vercambre et Adamowicz, 1996) en prélevant les solutions nutritives de façon manuelle à l'époque mais actuellement le suivi se fait de façon automatique, grâce à une interface informatique (baptisée Totomatix). Du nitrate (NO_3^-) et de l'acide sulfurique (H_2SO_4) ont été ajoutés pour compenser les diminutions de concentration en nitrate. Les corrections ont été de plus en plus fréquentes au fur et à mesure de la croissance des plantes, afin de maintenir les concentrations en nitrate quasiment constantes dans les solutions. À la fin des expériences la concentration cationique a été contrôlée et n'a pas présenté de variations significatives par rapport aux valeurs de départ.

Sels	KH_2PO_4	K_2SO_4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	KNO_3	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2, 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{EDTA-Fe}, 1\text{H}_2\text{O}$
<i>M (g/mol)</i>	136,086	174,254	236,151	101,103	256,407	172,168	246,470	385,070
NO₃⁻ en mM	0		0,0000			0,6026		
	0,01		0,0012			0,6017		
	0,05		0,0059			0,5983		
	0,125		0,0148			0,5918		
	0,15		0,0177			0,5897		
	0,2	0,1361	0,1743	0,0236		0,5854	0,3697	0,0165
	0,3			0,0354		0,5768		
	1			0,1181		0,5165		
	3			0,3542		0,3443		
	7			0,8265				
	15			1,4405	0,1011	0,2308		

Tableau 4 : Composition des solutions nutritives utilisées en cultures hydroponiques suivant les teneurs en nitrate du milieu. Masse de sels en gramme nécessaire pour préparer 1L de solution.

b) Préparation des solutions nutritives

Avec ce dispositif, sept apports différents en azote ont été dispensés : 0,05 ; 0,125 ; 0,2 ; 0,3 ; 3 ; 7 et 15mM de NO_3^- . Toutes les solutions nutritives, sauf celles à 15 mM, ont été conçues pour que la somme nitrate plus sulfate ($\text{NO}_3^- + \text{SO}_4^{2-}$) soit égale à 12 meq.L⁻¹. Les concentrations des autres espèces ioniques étaient les mêmes dans tous les traitements, la composition des solutions est présentée dans le tableau 4. Les solutions nutritives ont été préparées à partir de l'eau déminéralisée et de sels purs ; les oligo-éléments ont été fournis par une solution de Kanieltra (Hydro Azote, France) formule 6 Fe (0,1mL.L⁻¹) et de Fe-EDTA (43 μM). Le pH des solutions était de 5,5 et la conductivité électrique (CE, mS.cm⁻¹) variait de 1.2-1.4 à 2,1 selon les concentrations en azote.

c) Conditions de cultures

Des plants de tomate de la variété Rondello (*Solanum lycopersicum cv Rondello*) ont été cultivés sur une surface de 30 m², dans une serre à Avignon, entre septembre et octobre 2000. La serre était chauffée à 18 °C et aérée à partir de 25 °C au cours de la germination et la levée, puis aérée à partir 20 °C. L'humidité relative a été fixée à 55%. Afin d'éviter tout stress, les plantes ont été peu manipulées jusqu'à la récolte. La serre avait été blanchie à la chaux pour réduire l'intensité de la lumière incidente sur les cultures et pour faciliter le contrôle de la température de l'air. Des relevés de densité de flux de photon au niveau des plantes (PPFD) ont été effectués à hauteur des plantes (QS capteurs, DELTA-T DEVICES, Cambridge, Royaume-Uni). Les températures d'air sous abri ventilé, et de chacune des solutions nutritives ont également été relevées. Les mesures ont été prises toutes les minutes, moyennées toutes les heures, et enregistrées sur une station Delta-Logger (Delta-T Devices).

d) Récolte et échantillonnage

Les récoltes ont été effectuées en fin de nuit (à partir de 8h du matin), 14, 18, 21, 25 et 28 jours après le semis (JAS), dans la première partie de ce chapitre seule la récolte effectuée à 25 jours après semis sera étudié. La fin de nuit correspond au moment de la journée où les métabolites (primaire et secondaire) sont le moins sujets aux variations nycthémérales (Fritz *et al*, 2006). Au moment de la récolte, les plantes ont été choisies au hasard, sachant qu'au moins 1 plante par tube était prélevée. Les autres plantes restaient sur le dispositif.

Sept plantes par traitement ont été prélevées (10 plantes à 14 jours), toutes les plantes ont été stockées à l'obscurité dans une chambre froide (15°C) avant d'être séparées en différentes parties : limbe, tige et racine. Au moment de la récolte plusieurs paramètres morphologiques ont été relevés dont la surface foliaire qui a été quantifiée à l'aide d'un planimètre (LI-3000A avec LI-3050A Convoyeur à courroie, LI-COR, Lincoln, Etats-Unis), et la biomasse fraîche qui a été déterminée sur une balance de précision (modèle AE 260, sensibilité de 0,1 mg, Mettler, Greifensee, Suisse). Tous les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C avant d'être lyophilisés (Genèse 25 ES, Virtis Company, Gardiner, Etats-Unis). Après lyophilisation les échantillons ont été pesés (modèle AE 163, sensibilité de 0,01 mg, Mettler) pour déterminer la MS et broyés en une fine poudre à l'aide d'un broyeur à bille (modèle MM200, Retsch, Haan, Allemagne), dont les pots ont été préalablement refroidis à l'azote liquide. Les poudres sèches ont été conservés à -20 ° C jusqu'aux analyses.

Pour les analyses biochimiques, les différentes parties issues d'un même niveau d'azote ont été rassemblées, pour ne plus constituer qu'un seul échantillon représentant suffisamment de MS pour les analyses. Ainsi un échantillon, respectivement de racine, tige ou limbe, représente un ensemble de 7 plantes (ou 10 pour le prélèvement à 14 jours). Pour chaque partie, suivant les quantités de matière sèche disponibles par traitement, les teneurs en nitrate (dosage par spectrométrie réalisé suivant la méthode de (Vercambre et Adamowicz, 1996), azote et carbone totaux, ainsi que les concentrations en composés phénoliques ont été déterminées. L'azote réduit a été calculé par différence entre l'azote total et l'azote nitrique.

e) Analyses statistiques

Les individus ayant été rassemblés, il n'y a pas de répétition du traitement. Cependant nous avons cherché à représenter nos données suivant des courbes de réponses, en adoptant un modèle mathématique simple. Chaque courbe de réponse a été traitée sous forme de deux droites (de pentes différentes) qui se rejoignent au niveau d'un point de rupture appelé x_0 . Il y a donc deux parties : dans la première le paramètre Y répond fortement à X (niveau d'azote de la solution nutritive) ; dans la deuxième, Y ne répond plus (ou peu) à X (Figure 20). L'analyse statistique consiste donc à tester un modèle de deux droites (régressions linéaires) successives jointives au point x_0 . Ces analyses ont été faites à l'aide du logiciel SYSTAT (v. 5.1 for the

Macintosh, SYSTAT Inc., Evanston, USA). Les différents paramètres sont déterminés en résolvant les équations suivantes :

$$Y = b_1 + (a_1 * x) \text{ quand } x \leq x_0 \text{ Sinon } Y = b_1 + (a_1 - a_2) * x_0 + a_2 * x$$

Pour $x = x_0$ on a l'égalité $b_1 + a_1 x_0 = b_2 + a_2 x_0$

La différence entre les pentes a été mesurée. Si elle n'était pas significative (selon un test de Student avec $\alpha=5\%$), une régression linéaire simple a été calculée.

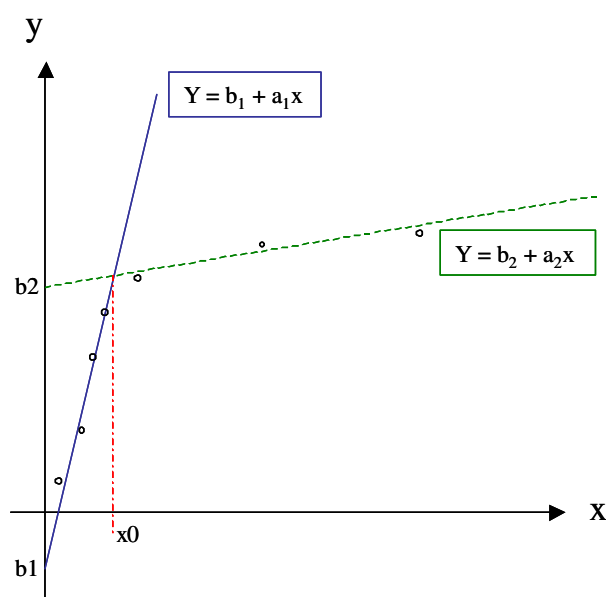


Figure 21 : Représentation théorique des résultats obtenus. Y est la variable quantifiée, X la concentration en nitrate dans la solution, x_0 le point de rupture (*i.e.* la concentration critique en nitrate où la réponse de la plante change), b une constante (l'ordonnée à l'origine), a_1 et a_2 les pentes des droites avant et après le point de rupture

Les données ont été représentées avec une échelle linéaire mais en appliquant une rupture d'axe sur les graphiques (DeltaGraph v 4.5 for the Macintosh, SPSS Inc., Chicago, USA)

L'effet de l'azote sur la production de matière fraîche et sa répartition dans les organes ont été évalués par une analyse de variance avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France), avec un risque de première espèce $\alpha=5\%$. Le test a posteriori de Tukey a été utilisé. Nous avons fait figurer les pourcentages de variation qui ont été calculés, par rapport au traitement le plus riche en azote, de la façon suivante : $(\text{faible-fort})/\text{fort} \times 100$. Ainsi une variation de -20% indique que la diminution des apports en azote a induit une diminution de 20% du paramètre étudié par rapport aux valeurs obtenues sur le milieu riche.

Sels	MoO ₃	MnCl ₂ , 4H ₂ O	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	CuSO ₄ , 5H ₂ O	H ₃ BO ₃	FeSO ₄	Na ₂ EDTA
<i>M (g/mol)</i>	143,94	197,91	287,54	249,68	61,83	278,02	372,24
m (g)	0,051	2,882	1,166	0,147	1,594	3,734	7,445

Tableau 5 : Composition de la solution d'oligoélément apportée lors des cultures hydroponiques à Nancy. Composition basée sur la composition du Kanieltra (Hydro Azote, France). Masse de sels en gramme nécessaire pour préparer 375ml de solution.

B/ Caractérisation temporelle des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination du temps nécessaire

La culture de tomate cv Rondello précédemment décrite, a également été utilisée pour répondre à cette question mais ce sont les limbes récoltés 14, 18 et 21 jours après le semis qui ont été analysés. De plus une autre culture de ce même cultivar a été effectuée pour confirmer les précédentes observations, sachant que cette culture a été menée dans d'autres conditions : sous serre à Nancy, et en hydroponie dans des conteneurs.

a) Description du dispositif de culture hydroponique en conteneur

Les graines de tomate sont semées en serre, dans des bacs sur du terreau horticole Gramoflor (Allemagne), puis placée sous l'arrosage automatique qui dispense de l'eau. Les plants sont transférés dans des conteneurs en plastique pouvant contenir 2 litres de solution nutritive. Les plantules sont entourées de fibre de verre et placées sur des plaques de polystyrène extrudé de 2cm d'épaisseur, laissant le système racinaire au contact de la solution nutritive. Les solutions nutritives sont régulièrement entièrement renouvelées. Une oxygénation des solutions est effectuée par un bullage permis par une arrivée d'air comprimé via un capillaire (Figure 12D). Les conteneurs sont changés de place de façon aléatoire à chaque renouvellement de solution pour homogénéiser les conditions de cultures.

b) Préparation des solutions nutritives

Les solutions nutritives ont été préparées selon les recommandations de Jacques Le bot et Stéphane Adamowicz, en respectant les mêmes proportions de micro et macroéléments que lors de la culture NFT. Les macro et microéléments ont été apportés sous forme de sels dissous dans de l'eau distillée (Tableau 4 et 5). Les microélément (0.3ml/L de solution nutritive) ont été préparés par analogie avec la formule du Kanieltra (Tableau 5). Le pH était ajusté entre 4.9 et 5.1 avec de la soude à 1M, et la conductivité variait entre 1 et 1.3mS.cm⁻¹ suivant les milieux.

c) Conditions de cultures de la deuxième expérimentation

Des plants de tomate de la variété Rondello ont été cultivés entre le 17 avril et le 7 mai 2007. Quatre semaines après la germination en terre les plants, au stade 1-2 paires de feuilles et 4cm de racine, ont été transférés en hydroponie sur des milieux contenant 1 ou 7mM de NO_3^- . Pour cette expérimentation deux conteneurs, qui comprenaient deux plants chacun ont été mis en place, par niveau d'azote. Les solutions nutritives ont été renouvelées après la première semaine de culture puis tous les quatre jours, les concentrations en NO_3^- étaient contrôlées par colorimétrie à l'aide du kit Visiocolo Eco, Macherey-Nagel.

La régulation de la température a été effectuée par un système de refroidissement, qui s'est déclenché quand la température était supérieure à 20°C. Le rayonnement était dépendant des conditions extérieures.

Des pièges gluants jaunes étaient en place, et des traitements contre les aleurodes ont été effectués à l'aide de deux matières actives Bifenthrine (100g/L) et Buprofézine (440g/L) (Aleutot, Capiscol) qui devaient permettre la lutte contre les larves et les adultes.

d) Récolte et échantillonnage

Les récoltes ont été effectuées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture hydroponique. A chaque récolte, 4 plantes ont été prélevées, puis séparées en trois parties : limbe, tige et pétiole, et racine. Les MF ont été déterminées sur une balance de précision (Modèle 3600, sensibilité 0.1g, Mettler), puis seuls les limbes ont été conservés pour les analyses, plongés dans l'azote liquide et conservés à -20°C avant d'être lyophilisés. Après lyophilisation, les échantillons ont été pesés pour déterminer la MS et réduit en poudre à l'aide d'un broyeur à bille (MM200, Restch, France). Seules les feuilles visuellement saines ont été conservées pour les analyses en chromatographie. Les teneurs en azote et carbone totaux ont été déterminées, ainsi que les concentrations en composés phénoliques.

e) Analyses statistiques

L'impact de l'apport en azote et de la date de récolte sur les variations de teneurs en composés phénoliques, et les pourcentages de carbone et azote, ont été déterminées par une analyse de variance à deux facteurs. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France), avec un risque de première espèce $\alpha=5\%$. Le test a

posteriori de Tukey a été utilisé. Les pourcentages de variation calculées par rapport au traitement le plus riche en nitrate sont indiqués. Les données ont été représentées avec une échelle linéaire mais en appliquant une rupture d'axe sur les graphiques.

A

Azote	Limbe	Tige	Racine	MF totale	ratio racine / p aériennes
0,05	2,617	2,089	0,967	5,673	0,21
0,125	2,683	2,429	1,068	6,180	0,21
0,2	2,763	2,633	1,035	6,431	0,19
0,3	3,081	3,108	1,063	7,252	0,17
3	2,958	3,243	0,835	7,036	0,13
7	3,592	3,950	1,103	8,645	0,15
15	3,583	4,191	1,179	8,952	0,15
effet azote	***	***	(*)	***	***
%variation	-27	-50	-18	-37	+36

B

Azote	Limbe	Tige	Racine
0,05	46,22	36,87	16,91
0,125	43,41	39,34	17,25
0,2	42,97	40,93	16,10
0,3	42,52	42,85	14,63
3	42,14	46,02	11,85
7	41,56	45,68	12,76
15	40,07	46,80	13,13
effet azote	***	***	***
%variation	+15	-21	+29

Tableau 6 : (A) Quantité de matière fraîche produite par plante, en gramme après 25 jours de culture, en fonction des traitements azotée (mM NO_3^- en solution). (B) Distribution relative de la biomasse fraîche totale entre les différents organes, après 25 jours de culture, en fonction des traitements azotée (mM NO_3^- en solution). Les données sont des moyennes calculées pour 7 plantes récoltées après 25 jours de culture. NS, non significatif, *i.e.*, $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

II Caractérisation spatiale des modifications engendrées par la nutrition azotée dans les organes végétatifs : détermination des courbes de réponses à l'azote

L'évolution des paramètres morphologiques et physiologiques a été étudiée chez des plants de tomates (cv Rondello) ayant été cultivés sur sept milieux azotés, après 25 jours de culture en NFT. Dans un premier temps la réponse globale des différentes parties limbes, tiges et racines a été mesurée, puis dans les limbes l'analyse a été plus complète, et des courbes de réponse à l'azote ont été déterminées.

A/ Impact de la nutrition azotée sur le développement des plantes

La nutrition azotée a eu un effet significatif sur la production de matière fraîche totale des plants, la diminution des apports en nitrate a restreint la production de matière fraîche (Tableau 6A). Chaque partie a été affectée, mais dans des proportions différentes. Entre les traitements les plus extrêmes (0,05 et 15mM), la masse de tige a été diminuée de 50%, celle des limbes de 27%, alors que celle des racines n'a été diminuée que de 18%. Ainsi avec la diminution des apports en azote le ratio racine/parties aériennes a augmenté de façon significative de 0.15 à 0.21.

La répartition de la matière fraîche par organe a également été significativement modifiée en fonction des milieux de culture (Tableau 6B). Sur les milieux pauvres en azote (<0,3mM), le pourcentage de matière fraîche alloué aux racines et aux limbes était plus important que chez les plantes des milieux riches (respectivement 46 et 17% contre 40 et 13%), la diminution de matière fraîche allouée aux tiges compensant cette réorganisation (36% sur le milieu pauvre et 46% sur le milieu riche).

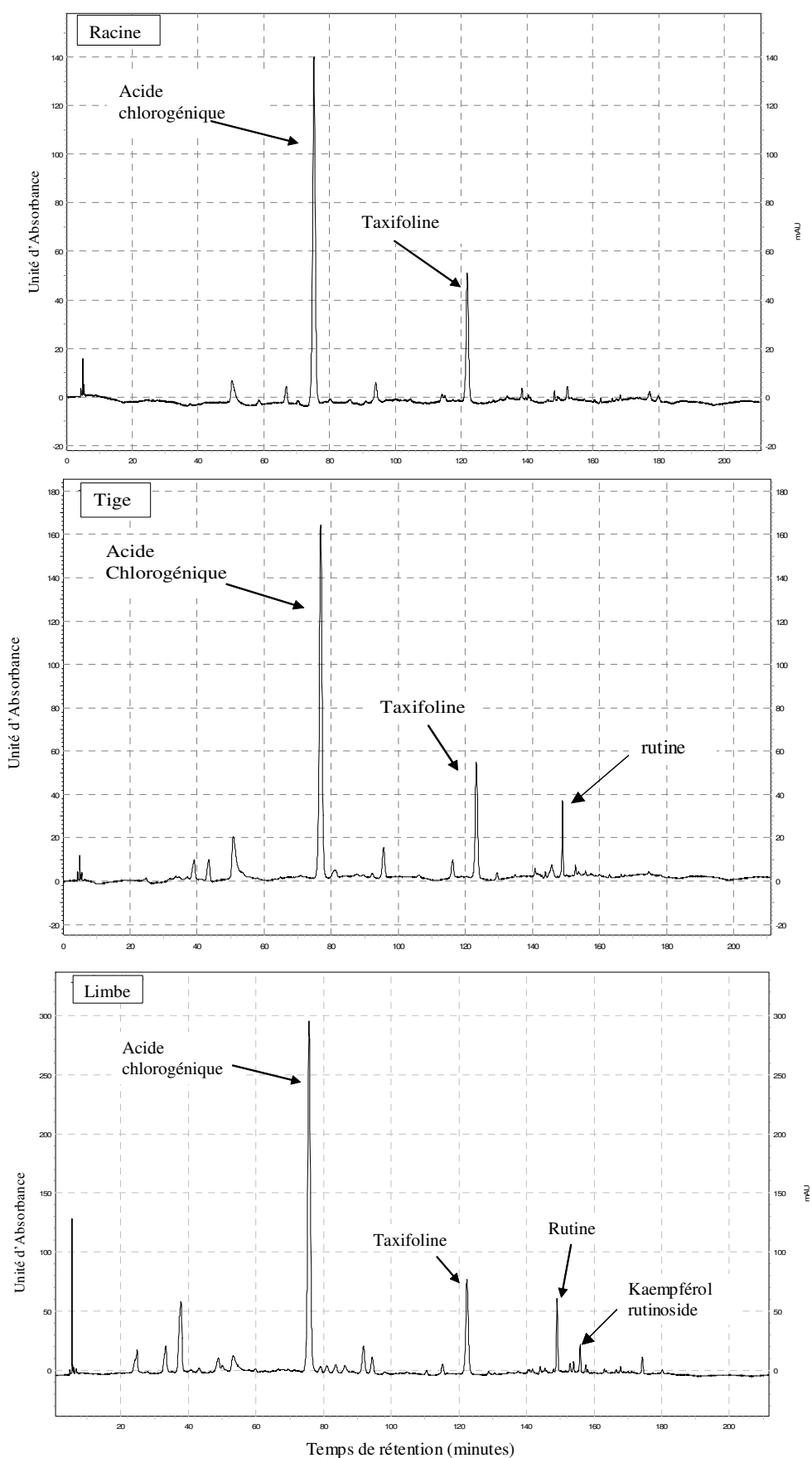


Figure 22 : Chromatogrammes obtenus par HPLC à une longueur d'onde de 330nm, de racine, tige et limbe de tomate cv Rondello.

B/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote

Les chromatogrammes obtenus pour les 3 types d'organes (limbe, tige et racine) se sont différenciés de façon qualitative et quantitative (Figure 22). En effet, dans les racines, l'acide chlorogénique est le principal composé phénolique détecté, à hauteur de 0,2 à 1mg/gMS. Dans les tiges, davantage d'acide chlorogénique a été isolé environ 1,5 mg/gMS, et la rutine a également été quantifiée à raison de 0,3mg/gMS. La composition des limbes est plus complexe, le nombre de composés mis en évidence a été plus important. Cet organe contient plus d'acide chlorogénique, et la rutine a été détectée dans de même proportion que dans les tiges. Un autre composé, le kaempférol rutinoside a été détecté et quantifié à environ 0,4mg/g MS.

Les réponses à la nutrition azotée ont été différentes suivant les organes étudiés. Dans les racines, les différentes quantités de nitrate apportées dans les solutions nutritives ont faiblement modifié les teneurs en azote et carbone totaux (Tableau 7A). Les variations des teneurs en acide chlorogénique bien qu'importante (-81%), n'ont pas été corrélées avec les apports en nitrate (Tableau 7A).

Par contre dans les tiges, l'effet de la nutrition azotée a été plus régulier (Tableau 7B). Les teneurs en carbone n'ont pas varié, mais les teneurs en azote total ont augmenté avec les apports en nitrate. Les concentrations en acide chlorogénique et en rutine ont augmenté lors de la diminution des apports en nitrate respectivement de 70 et 10%.

Enfin, c'est dans les limbes que l'impact de la nutrition a été le plus remarquable (Tableau 7C). Les pourcentages d'azote et de carbone totaux dans la plante ont augmenté avec l'augmentation des apports en nitrate. A l'inverse, les teneurs en acide chlorogénique ont été multipliées par 2,4, celles de la rutine par 1,8 et pour le KR de 1,2 chez les plantes cultivées sur le milieu à 0,05 mM par rapport au milieu contenant 15 mM de NO_3^- (Tableau 7C).

A				B				
	Chloro	%N	%C		Chloro	Rutine	%N	%C
0,3	0,172	5,35	37,04	0,1	1,607	0,313	4,96	29,93
3	1,326	5,85	36,46	0,3	1,442	0,313	5,22	29,21
7	0,445	5,80	36,04	15	0,961	0,282	5,91	29,49
15	0,907	5,80	35,77	% variation	+67	+11	-16	+1
% variation	-81	-8	+4					

C					
	Chloro	Rutine	KR	%N	%C
0,05	2,987	0,566	0,437	5,72	36,15
0,125	2,399	0,502	0,419	5,82	37,07
0,2	2,261	0,377	0,356	5,76	36,26
0,3	1,732	0,328	0,349	5,76	35,76
3	1,681	0,270	0,339	5,88	37,04
7	1,459	0,258	0,362	6,16	37,24
15	1,322	0,324	0,380	6,45	38,00
% variation	+126	+75	+15	-11	-5

Tableau 7 : Effet de la nutrition azotée sur les concentrations en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote totaux, dans les racines (A), tiges (B) et limbes (C). Les concentrations en polyphénols sont en mg/gMS, et les teneurs en carbone et azote totaux en gramme pour 100g de MS. Le pourcentage de variation explicite la différence observée pour les traitements azotés les plus extrêmes.

	NO3	N tot	N red	Surface	Chloro	Rutine	KR
<i>b1</i>	-0,037	5,761*	5,365*	111,16*	3,142*	0,613*	0,472*
<i>a1</i>	11,421*	0,048*	0,028	156,095*	-4,726*	-1,003*	-0,543*
<i>x0</i>	0,214*			0,328*	0,302*	0,367*	0,238*
<i>a2</i>	0,029			2,759*	-0,028	0,005	0,002
<i>a1/a2</i>	394			57	168	200	270

Tableau 8 : Paramètres relatifs aux régressions par parties, calculées pour analyser l'effet de la nutrition azotée sur les teneurs en nitrate, en azote réduit et total, ainsi que sur la surface des limbes, les teneurs en composés phénoliques (acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside). x_0 correspond au point de rupture, pour $x < x_0$ b_1 est l'ordonnée à l'origine et a_1 la pente de la droite ; et pour $x > x_0$ a_2 correspond à la pente de la 2^{ème} droite, et a_1/a_2 au ratio des 2 pentes. (*) indique la nature statistiquement significative du paramètre calculé au seuil $p=0,05$.

C/ Courbes de réponse à l'azote dans les limbes

En plus des teneurs en azote total (N), les concentrations en azote réduit et en nitrate ont été mesurées (Figure 23 A et B). Malgré la large gamme de concentration en nitrate apportée, les teneurs en azote réduit sont restées indépendantes de la nutrition. En effet, l'analyse statistique révèle que la relation avec la concentration de la solution se résume à une seule droite, de pente non significativement différente de zéro (Tableau 8). En revanche, les teneurs en N total ont augmenté de façon significative avec l'augmentation de la nutrition azotée (Tableau 8 et Figure 22A). Cette variation s'explique par la fraction nitrique de l'azote des feuilles, qui a été modifiée par le traitement. Les teneurs en nitrate ont évolué en deux temps, en marquant un point de rupture à environ 0,2 mM (Tableau 8 et Figure 23B). Avant ce point l'augmentation a été presque 400 fois plus importante qu'après où la pente s'est révélée faible et non significative.

La réponse de la croissance des limbes à la nutrition est similaire à celle observée pour la teneur en nitrate. La surface des limbes a augmenté de 40% avec l'augmentation des apports en azote (Figure 23 C). Cette augmentation s'est faite en deux temps, séparée par le point de rupture x_0 qui se situait à environ 0,3 mM de NO_3^- (Tableau 8). L'augmentation a été plus importante avant x_0 , et les pentes ont toujours été significativement différentes de 0 (Tableau 8).

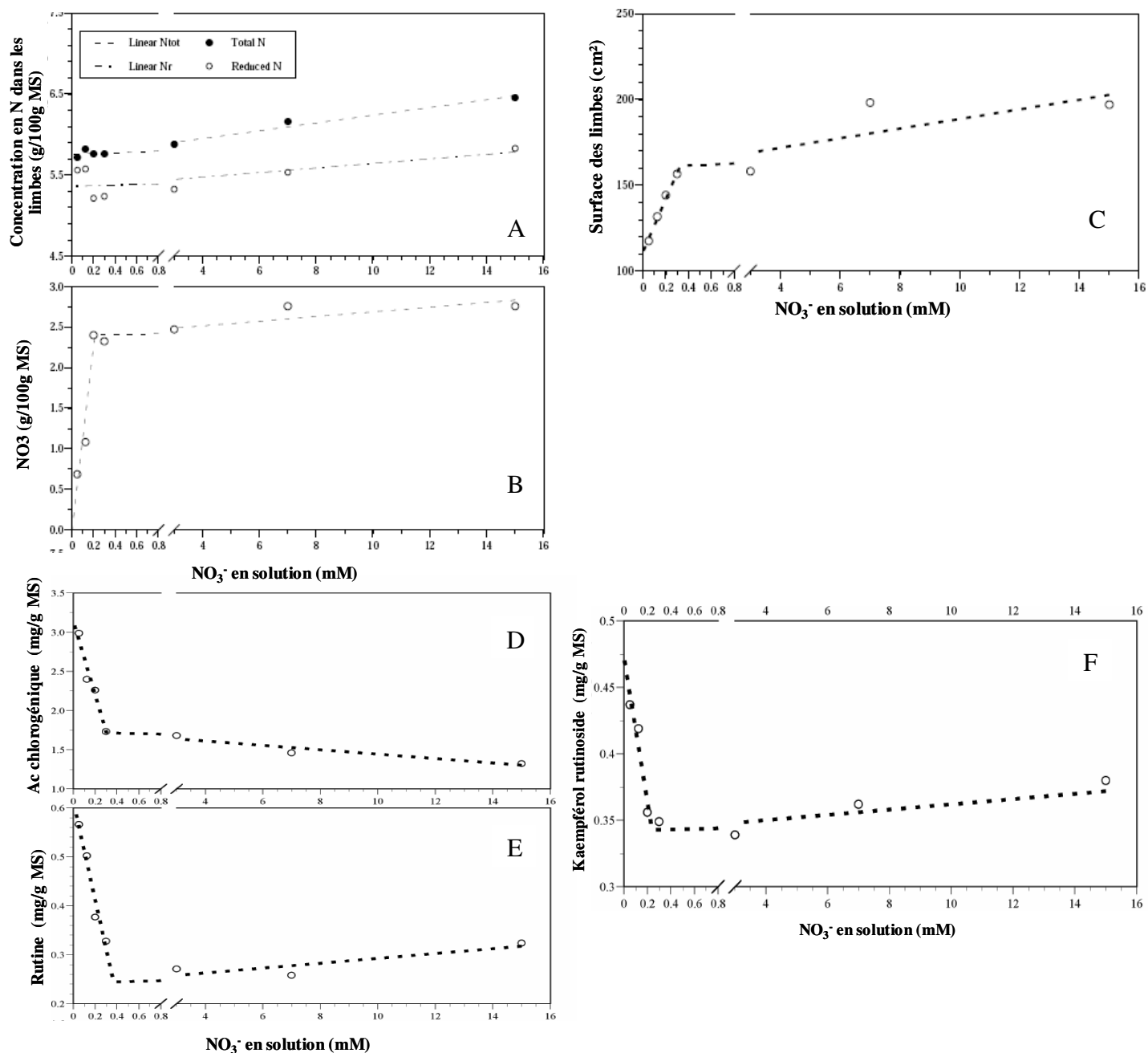


Figure 23 : Effet de la nutrition azotée après 25 jours de culture sur les teneurs en azote réduit et azote total (A), en nitrate (B) (g/100gMS) sur la surface des limbes (C) (en cm²), ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques : acide chlorogénique (D), rutine (E), kaempférol rutinoside (F) (mg/gMS)

Une forte réponse à l'azote a été observée pour les concentrations en composés phénoliques dosés dans les feuilles (acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside)(Figure 23 D, E et F). La courbe de réponse obtenue allait à l'inverse des observations précédentes. Pour les composés dosés, les teneurs ont diminué avec l'augmentation des teneurs en NO_3^- dans la solution nutritive (pente négative) (Figure 23 D, E, et F ; Tableau 8). Avec l'augmentation des apports en azote les teneurs en polyphénols ont été divisées d'un facteur 1.5 à 2. Leurs diminutions ont été particulièrement marquées avant le point critique qui se situe aux alentours de 0.3mM. Pour l'acide chlorogénique par exemple, avant le point de rupture la pente qui caractérise la diminution est 170 fois plus forte qu'après x_0 (Tableau 8). Après le point de rupture les teneurs en acide chlorogénique continuent de diminuer par contre les teneurs en KR et rutine tendent à augmenter.

D/ Conclusion

Les plants de tomate ont été cultivés pendant 25 jours, sur une large gamme de concentration en nitrate, qui a été maintenue quasiment constante au niveau des racines. En séparant en trois parties les plantes, nous avons observé que les racines avaient été peu affectées par la nutrition azotée, leur MF ne diminuant que de 20% et les teneurs en polyphénols n'ont pas présentées d'évolution particulière. Dans les tiges l'impact de la diminution des apports en N a été plus régulier. Enfin, les limbes se sont révélés être les organes les plus sensibles et réactifs au traitement. La MF de limbe a été significativement diminuée et au contraire les teneurs en polyphénols ont été multipliés par deux lors de la diminution de la nutrition azotée.

Le dispositif de culture mis en place, 7 niveaux d'azote très contrastés, a permis de définir deux zones de réponse : une zone limitante pour la croissance et une zone non limitante. En se basant sur l'évolution de la surface des feuilles, la concentration en nitrate limitante pour la croissance des plantes se situerait vers 0,3mM pour ce système de culture. Les variations décrites avant ce point de rupture ont été nettement plus importantes qu'après. Globalement l'augmentation des concentrations en azote nitrique dans les solutions nutritives a induit deux types de réponses dans les limbes : une augmentation des paramètres relatifs à la morphologie de la plante, et une diminution des concentrations en composés phénoliques.

	14 jours			18 jours			21 jours		
	MF	%N	%C	MF	%N	%C	MF	%N	%C
0,05	0,221	5,25	36,06	0,713	5,21	36,12	1,306	5,85	35,83
0,125	0,207	5,28	35,66	0,693	5,52	36,10	1,317	6,14	36,24
0,2	0,248	5,28	36,27	0,744	5,34	35,80	1,333	5,87	36,11
0,3	0,229			0,730	5,82	36,91	1,416	6,24	36,61
3	0,281	5,68	36,65	0,801	5,76	37,14	1,392	6,47	37,08
7	0,276	5,88	37,05	0,871	6,04	37,94	1,617	6,62	37,65
15	0,262	5,99	37,30	0,935	6,15	37,71	1,856	6,58	36,73
Effet azote	***			***			**		
% variation	-16	-12	-3	-24	-15	-4	-30	-11	-2

Tableau 9 : Teneurs en N et C totaux (g/ 100 gMS) dans les limbes, et MF de limbe produite (en g/plant), pour des tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis. Les plantes ont été cultivées sur le système de NFT alimenté par sept SN dont les teneurs en nitrate étaient comprises entre 0,05 et 15 mM NO₃⁻. NS, non significatif, i.e., P > 0.1; (*), P < 0.1; *, P < 0.05; ***, P < 0.001.

	14 jours			18 jours			21 jours		
	Chloro	Rutine	KR	Chloro	Rutine	KR	Chloro	Rutine	KR
0,05	0,196	0,027	0,048	1,854	0,413	0,273	1,644	0,532	0,287
0,125	0,506	0,125	0,151	1,336	0,339	0,247	1,392	0,559	0,322
0,2	0,160	0,021	0,061	0,543	0,164	0,138	1,022	0,310	0,177
0,3				0,775	0,260	0,241	1,079	0,421	0,231
3	0,211	0,054	0,090	0,259	0,082	0,089	0,812	0,241	0,122
7	0,457	0,096	0,147	1,662	0,356	0,243	1,042	0,457	0,212
15	0,506	0,107	0,147	1,664	0,408	0,282	0,830	0,489	0,275
% variation	-61	-75	-68	+11	+1	-3	+98	+9	+4

Tableau 10 : Concentrations en mg/gMS d'acide chlorogénique (Chloro), de rutine et de kaempférol rutinoside (KR), dans des limbes de tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis. Les plantes ont été cultivées sur le système de NFT alimenté par sept SN dont les teneurs en nitrate étaient comprises entre 0,05 et 15 mM NO₃⁻.

III Le temps nécessaire pour la mise en place de la réponse

Nous avons précédemment observé une augmentation des concentrations en polyphénols chez la tomate en réponse à une diminution des apports en azote après 25 jours de culture. Cette évolution étant plus marquée au niveau des limbes. Nous allons maintenant essayer de caractériser plus précisément le temps nécessaire à la mise en place de cette réponse tout en restreignant notre étude aux limbes. Dans un premier temps, les récoltes effectuées 14, 18 et 21 après le semis, lors de la culture NFT ont été exploitées. Puis, pour confirmer ces résultats, la composition au cours du temps de plantes issues d'une deuxième expérimentation a été déterminée.

A/ Définition du temps nécessaire pour observer des modifications chez des plantes cultivées en NFT

Dans cette expérience, les graines ont été semées directement sur le dispositif de NFT, elles ont donc été soumises aux différents niveaux d'azote dès leur germination. Dès le premier prélèvement à 14 jours (Tableau 9), l'augmentation des conditions de nutrition azotée a provoqué une augmentation de la production de MF, des teneurs en azote et dans une moindre mesure en carbone totaux.

La corrélation négative entre les teneurs en polyphénols et les apports en azote observée après 25 jours de culture (Figure 23), s'est mise en place progressivement dans les limbes (Tableau 10 et Figure 24). Dans un premier temps les teneurs en polyphénols ont été plus importantes chez les plantes ayant reçu le plus d'azote. Puis cette tendance s'est inversée progressivement et après 21 jours de cultures les plantes des milieux pauvres en azote (<0,3 mM) ont présenté des teneurs en acide chlorogénique plus importante que les plantes des milieux riches. De la même manière, les concentrations en rutine et en kaempférol rutinoside, ont eu tendance à diminuer dans un premier temps avec des apports en azote croissants, puis à augmenter pour des apports très importants (7 et 15 mM)(Tableau 10). Il semble donc que sur ce système de culture, un délai de 18 à 20 jours soit nécessaire pour observer des modifications de teneurs en métabolites secondaires au niveau de la composition des limbes.

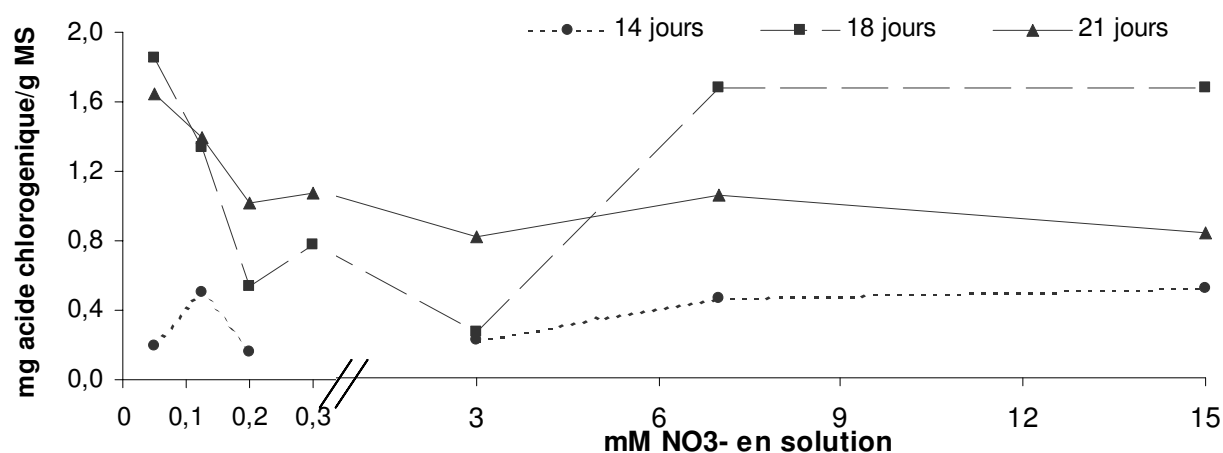


Figure 24 : Concentrations en acide chlorogénique (mg/gMS), dans des limbes de tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis. Les plantes ont été cultivées sur le système de NFT alimenté par sept SN dont les teneurs en nitrate étaient comprises entre 0,05 et 15 mM NO₃⁻.

	Entre 14-18 jours			Entre 18-21 jours			Entre 21-25 jours		
	MS	Chloro	Tot	MS	Chloro	Tot	MS	Chloro	Tot
0,05	3,2	29,9	29,7	1,5	1,3	1,5	2,2	3,9	3,5
0,125	3,4	8,9	8,3	1,6	1,7	1,9	2,2	3,9	3,3
0,2	3,1	10,4	10,7	1,5	2,9	2,8	2,2	4,9	4,4
0,3	2,5	9,3	9,1	1,7	2,3	2,3	2,4	3,8	3,3
3	2,9	1,7	1,8	1,5	4,6	4,0	2,3	4,8	4,6
7	3,4	11,3	10,2	1,6	1,0	1,2	2,4	3,3	2,9
15	1,5	1,3	1,4	1,7	0,9	1,2	2,1	3,3	2,6

Tableau 11 : Rapport entre deux prélèvements de la matière sèche produite, des teneurs en acide chlorogénique (Chloro en mg par plante) et de la somme Chloro, Rutine, KR (Tot, en équivalent d'acide chlorogénique par plante). Le rapport a été calculé de la façon suivante, par exemple pour un même niveau d'azote le rapport MS entre 14 et 18 jours = MS à 18 jours / MS à 14 jours.

Pendant la période d'étude, les plantes étaient en phase de croissance importante. Ainsi entre deux prélèvements, la matière sèche produite a été plus ou moins importante suivant la date de récolte et le niveau de fertilisation (Tableau 11). Les deux premiers prélèvements se sont distingués par un fort taux de croissance et de production de polyphénols (Tableau 11). En effet entre 14 et 18 jours de culture, la MS produite a été multipliée par 3 ou par 1,5 sur les milieux contenant respectivement 0,05 et 15mM, et les teneurs en acide chlorogénique par 30 ou 1,2. Par la suite les rapports de production de MS ou de polyphénols ont été plus faibles.

Même si ces augmentations de MS et de teneurs en polyphénols n'ont pas été proportionnelles entre elles (Tableau 11), la taille des plantes doit être prise en considération. En se plaçant à l'échelle de la plante (Figure 25), on observe que pour des apports en azote inférieur à 3mM, l'évolution des teneurs en acide chlorogénique est indépendante de la masse des plants. Mais au delà, la masse de limbe produite a compensé la plus faible concentration en polyphénols (en g/g MS), l'écart entre les traitements devient plus faible (Figure 24 et 25A). Les mêmes observations ont été faites pour les teneurs en rutine et en kaempférol rutinoside (résultats non montrés). Par contre, après 25 jours de culture, cette tendance n'a plus été observée, les teneurs en acide chlorogénique par plante tendent à rester plus importantes sur le milieu pauvre en nitrate (Figure 25 B).

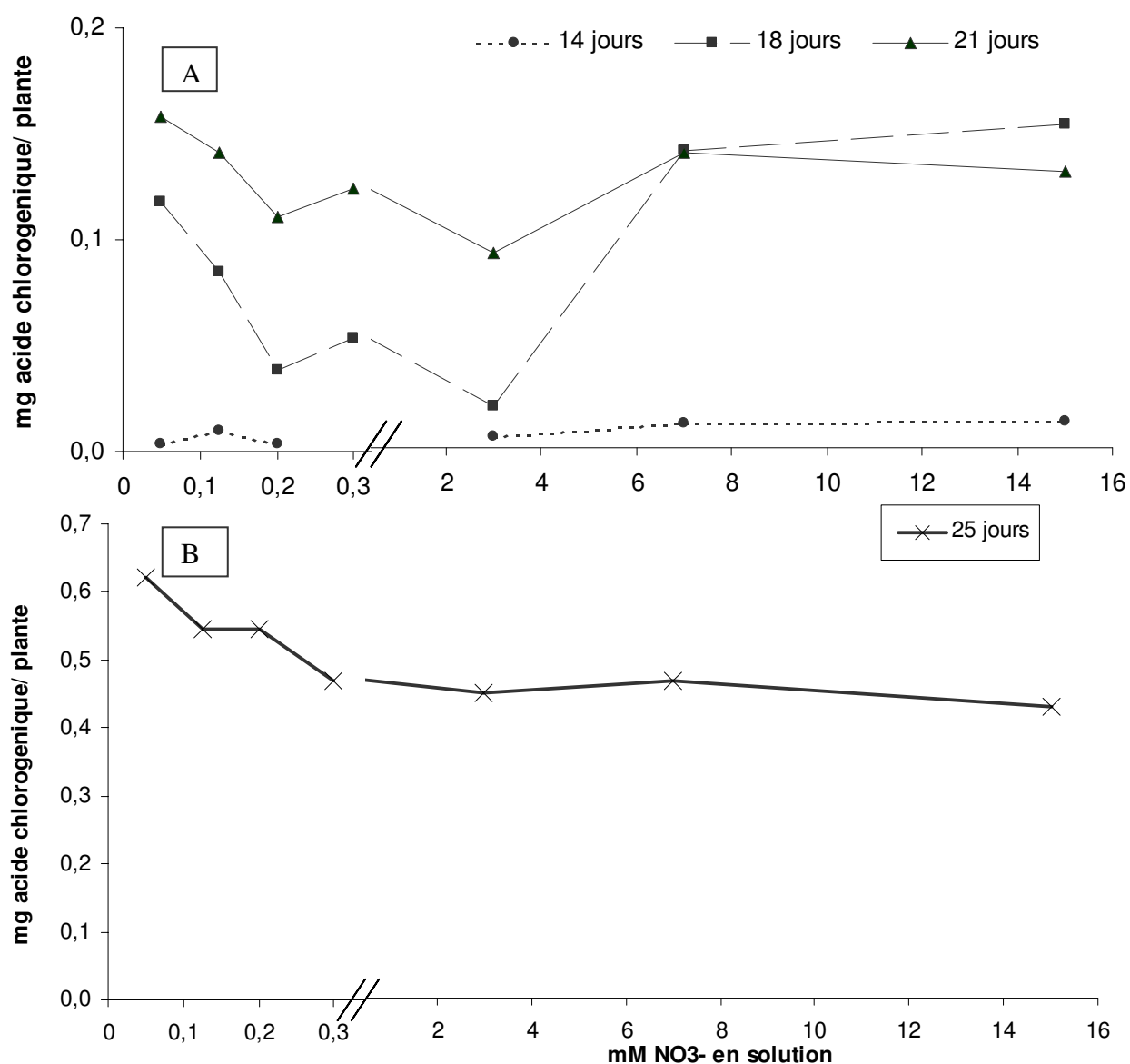


Figure 25 : Evolution des concentrations en acide chlorogénique (mg/plante) au sein des plantes, dans des limbes de tomates récoltées 14, 18, 21 (A) et 25 (B) jours après le semis. Les plantes ont été cultivées sur le système de NFT alimenté par sept SN dont les teneurs en nitrate étaient comprises entre 0,05 et 15 mM NO₃⁻.

	jours	MF		%N	%C
1mM	4	0,87	c	2,57	b
	8	2,53	bc		
	13	3,13	bc	6,23	a
	16	6,88	bc		
	20	8,22	b	5,11	a
7mM	4	0,84	c	2,43	b
	8	2,93	bc		
	13	6,75	bc	6,12	a
	16	17,40	a		
	20	20,93	a	5,38	a
Effet azote		***		NS	NS
Effet date		***		***	(*)
Interaction		***		NS	NS

Tableau 12 : Teneurs en N et C totaux (g/ 100 gMS) dans des limbes, et MF (en g/plant) de limbe, pour des tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes calculées sur 4 plantes. Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sur des milieux contenant 1 ou 7mM NO_3^- . NS, non significatif, i.e., $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Les moyennes ont été comparées avec un test de Tukey, les lettres différentes au sein d'une même colonne indiquent des différences significatives.

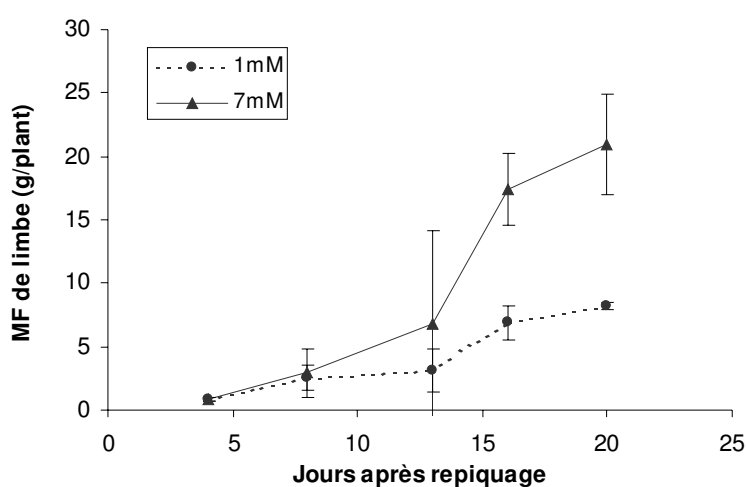


Figure 26 : Evolution des matières fraîches (MF) des limbes tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes \pm ET, calculées sur 4 plantes. Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sur des milieux contenant 1 ou 7mM NO_3^- .

B/ Mise en évidence du temps nécessaire à la mise en place des modifications chez des plantes cultivées sur le système hydroponique en conteneurs

Le but de cette expérimentation était de confirmer et de préciser le délai nécessaire pour que les effets de la nutrition azotée soient visibles au niveau des teneurs en polyphénols à l'échelle des limbes. Pour ce faire des plants de tomates du même cultivar (Rondello) ont été soumis à deux niveaux de nutrition azotée 1 et 7mM considérés respectivement comme limitant et optimal ; cette culture a été conduite sur le système de culture hydroponique en conteneurs et dans d'autres conditions environnementales.

Nous avons observé une modification significative de la croissance des plants en fonction du milieu azoté mais aussi de la date de récolte (Tableau 12 et Figure 26). En effet après 16 jours de culture, les plantes recevant 1mM NO_3^- ont produit moins de matière fraîche aérienne que les plantes recevant 7mM (Tableau 12). Les teneurs en azote (N) et carbone totaux dans les limbes n'ont pas été significativement modifiées par les apports en azote. On remarque que la durée du traitement azotée a eu un effet significatif, les plants récoltés 4 jours après le transfert en hydroponie ont présenté significativement moins d'azote que celles récoltées après 16 ou 20 jours (Tableau 12).

jours		chloro	rutine		KR		
1 mM	4	7,30	abc	2,04	c	0,30	abc
	8	5,35	bcde	1,93	c	0,30	abc
	13	6,34	abcd	3,98	ab	0,45	a
	16	9,83	a	4,50	ab	0,36	ab
	20	8,64	ab	5,35	a	0,29	abc
7 mM	4	3,68	cde	1,77	c	0,22	bc
	8	3,86	cde	1,28	c	0,25	bc
	13	2,56	e	1,17	c	0,14	c
	16	3,76	cde	1,82	c	0,13	c
	20	3,36	de	2,64	bc	0,16	c
Effet azote		***		***		***	
Effet date		*		***		NS	
Interaction		(*)		**		*	

Tableau 13 : Concentrations en mg/g MS d'acide chlorogénique (Chloro), de rutine et de kaempférol rutinoside (KR), dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes \pm ET, calculées sur 4 plantes. Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sur des milieux contenant 1 ou 7mM NO_3^- . NS, non significatif, i.e., $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Les moyennes ont été comparées avec un test de Tukey, les lettres différentes au sein d'une même colonne indiquent des différences significatives.

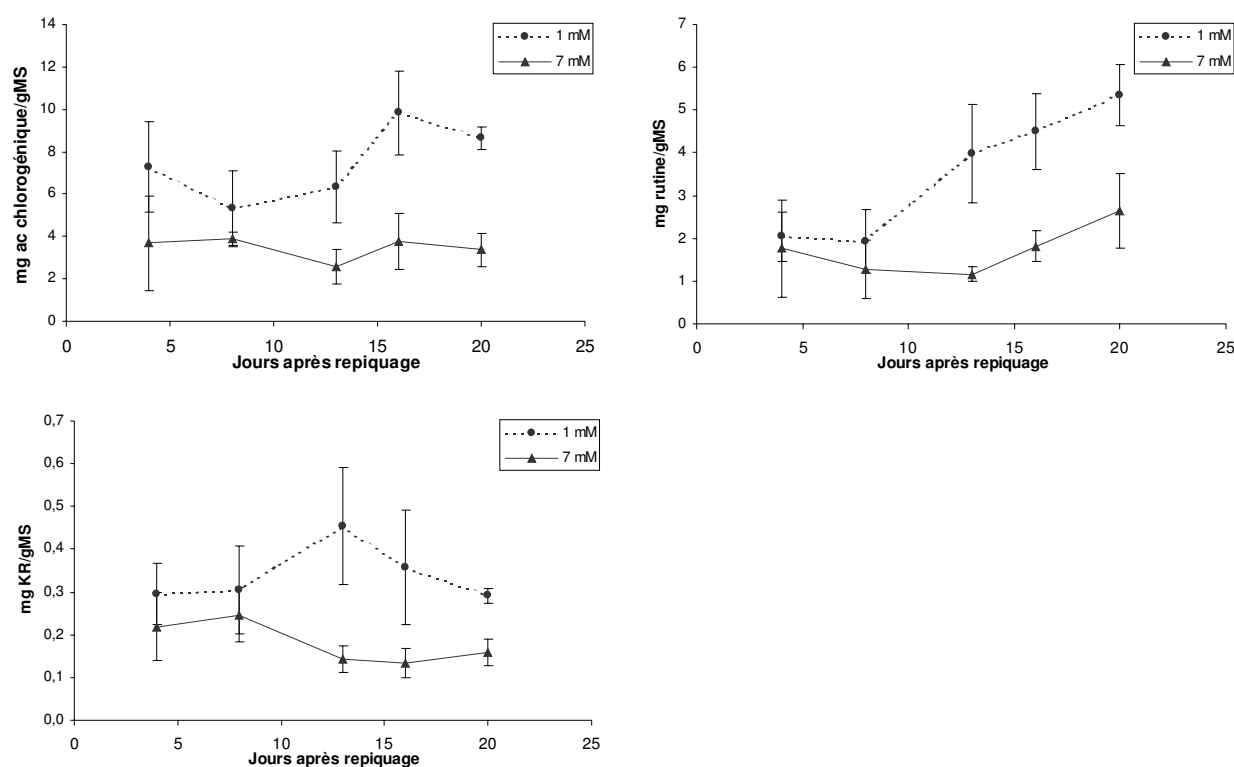


Figure 27 : Evolution des concentrations en acide chlorogénique (mg/gMS), dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes \pm ET, calculées sur 4 plantes. Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sur des milieux contenant 1 ou 7mM NO_3^- .

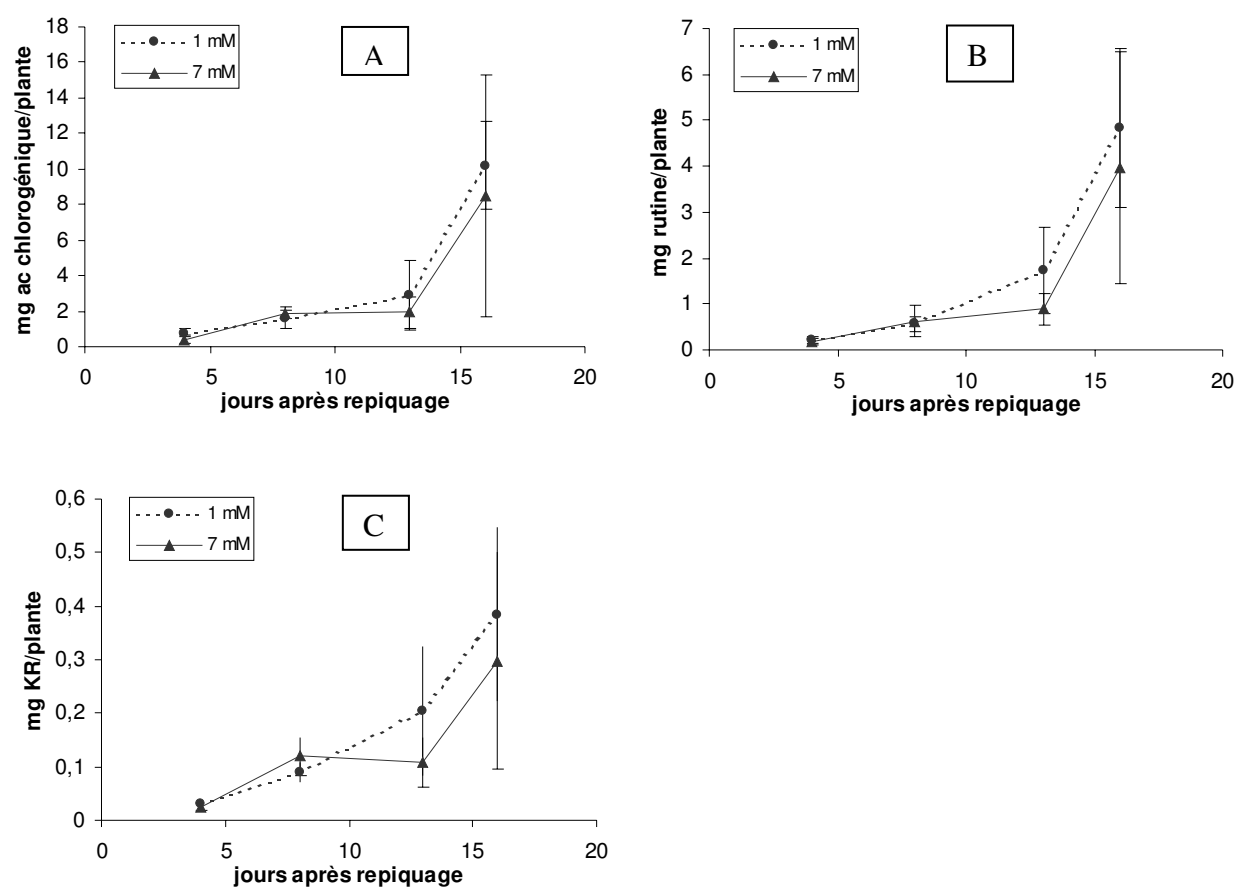


Figure 28 : Evolution des teneurs en acide chlorogénique (A), rutine (B) et kaempférol rutinoside (C) en mg/plante, dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes \pm ET, calculées sur 4 plantes. Les plantes ont été cultivées en hydroponie, sur des milieux contenant 1 ou 7mM NO_3^- .

Lors de cette deuxième expérimentation, les plantes cultivées sur le milieu le plus pauvre ont également présenté des teneurs en polyphénols au moins deux fois plus importantes que celles du milieu riche (Tableau 13). C'est à partir de 13 jours de culture hydroponique, que les teneurs en acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside sont devenues significativement plus importantes (Figure 27). Ce profil semble se conserver en exprimant les quantités de polyphénols accumulées dans les limbes à l'échelle de la plante, mais les écarts entre les milieux ne sont pas significativement différents (Figure 28).

C/ Conclusion

La production de matière fraîche est profondément affectée par la nutrition azotée. Sur ces deux dispositifs, une diminution de la production de MF a été observée après environ 15 jours de culture sur les milieux azotés. Ce délai correspond approximativement au temps nécessaire pour que les modifications du métabolisme secondaire soient visibles au niveau des métabolites quantifiés dans les limbes. En effet après une vingtaine de jours l'augmentation des teneurs en polyphénols dans les limbes a été visible sur le système NFT, et seulement après 13 jours de culture hydroponique en conteneurs.

Pour ces deux expérimentations, la croissance des plants a été tellement affectée, que la diminution de la nutrition azotée n'engendre que de faibles augmentations des teneurs en polyphénols foliaires, à l'échelle de la plante entière.

IV Discussion

A/ Impact de la nutrition azotée sur la croissance des plantes

Lors de la culture en NFT à Avignon, le nombre important de traitements azotés mis en place (7 niveaux d'azotes), et leur amplitude (facteur 300 entre 0,05 et 15mM) nous ont permis d'étudier le comportement des plantes et de définir une zone limitante et non limitante pour leur croissance, en fonction des courbes de réponse à l'azote. Habituellement les études se limitent à un faible nombre de traitements, entre 2 et 4 (Larsson *et al*, 1986; Wilkens R T *et al*, 1996; Stewart *et al*, 2001; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005), ce qui n'est pas suffisant pour obtenir une courbe de réponse, et tester les hypothèses de la GDBH (Wilkens R. T., 1997; Stamp, 2004).

Sur ce système, la concentration en NO_3^- en dessous de laquelle, la croissance des limbes a été limitée, était d'environ 0.3mM NO_3^- , c'est une concentration plus faible que celles qui avait été relatées dans d'autres études (Siddiqi *et al*, 1998). La valeur absolue de ce seuil est dépendante du système de culture, ici les solutions sont en flux continu, et les concentrations en nitrate en solution ont été maintenues quasiment constantes même pour les traitements très faibles, c'est ce qui pourrait expliquer la différence. D'ailleurs lors de la deuxième culture, sur un système hydroponique en conteneurs avec une moindre agitation et un renouvellement des solutions moins fréquent, une forte diminution de la MF produite a été observée dès 1mM NO_3^- .

La croissance des limbes a été significativement réduite par la diminution des apports en azote après 25 jours de culture et cet effet a été observé dès les premières semaines de culture (Tableau 6A). Ce paramètre a suivi la « loi du minimum », nous avons observé une courbe de réponse caractéristique entre la production de masse des plants et l'azote disponible. En réponse à une diminution des apports en azote, les tiges ont été le compartiment le plus lésé de la plante, la MF de tige produite diminuant de 50% pour le plus faible apport en nitrate (Tableau 6A et B). La distribution de la matière fraîche produite a été classiquement réorganisée, et la croissance des limbes et des racines a été la moins pénalisée (Kovacic et Backor, 2007).

La diminution de 40% de la surface foliaire des limbes, s'est répercutée sur matière fraîche produite qui a diminué de 30% entre les traitements azotés les plus extrêmes. La surface d'interception de la lumière a donc été diminuée, cette observation est conforme aux

conclusions de la littérature qui considèrent que la taille des feuilles est liée à la disponibilité en azote des SN (Palmer *et al*, 1996; Lawlor, 2002; Dreccer, 2006). Par contre le taux d'assimilation du CO₂ (net assimilation rate, NAR) a été le même quel que soit le traitement (Adamowicz et Le Bot, 2008), ainsi la photosynthèse n'a pas été affectée par les traitements azotés. Avant 0,3mM (le point de rupture), la nutrition azotée a limité davantage la croissance que la photosynthèse, puis au-delà du point de rupture ni la croissance ni la photosynthèse n'ont été limitées. Nos données s'inscrivent donc dans les deuxième et troisième zone citées en introduction, de la GDBH (Herms et Mattson, 1992).

B/ Composition en métabolites primaires et secondaires

Les teneurs en azote organique n'ont pas été significativement modifiées par la nutrition azotée, par contre la concentration en NO₃⁻ dans les limbes a été significativement diminuée, surtout dans la zone de limitation (<0.3mM NO₃⁻) (Figure 23A et B). Chez la tomate, le NO₃⁻ avait déjà été identifié comme étant la forme majeure de stockage de l'azote, son abondance étant liée aux conditions de culture (Le Bot, 2001).

a) Métabolites primaires

La composition des limbes après 25 jours de culture a été complétée par les teneurs en carbohydrates (amidon, saccharose, glucose et fructose) et en acides organiques (acide malique, citrique) des limbes (Annexe 3).

La teneur en amidon (5.3 % MS en moyenne), a diminué de façon non significative avec la nutrition azotée. Cette observation est surprenante par rapport à d'autres études qui avaient mis en avant des évolutions opposées entre l'amidon et les apports en azote (Scheible W. R. *et al*, 1997), mais elle peut s'expliquer par les conditions de récolte. En effet l'amidon s'accumule dans les tissus pendant la journée et il est dégradé pendant la nuit. Donc au moment de nos récoltes l'amidon n'avait pas été reconstitué par les plantes. De même, le saccharose a représenté environ 1.2 % de la MS indépendamment de la nutrition azotée appliquée.

En revanche, les teneurs en hexoses ont été sensibles à la nutrition azotée. Les concentrations en glucose et fructose ont suivi des variations parallèles, avec une très forte réduction de leur teneur dans la zone limitante (*ie* <0.2mM) avant d'augmenter légèrement

pour des apports en azote plus importants. Cette diminution n'est pas la conséquence d'une dilution passive des hexoses dans la MF, puisque les concentrations en fructose et glucose ont diminué respectivement de 84 et 65% alors que la MF a augmenté de seulement 30% entre 0,05 et 15mM NO_3^- . L'augmentation des teneurs en sucres avec la diminution de la nutrition azotée avait déjà été observée chez la tomate (Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005), et semble être cohérente avec le ralentissement général du métabolisme de la plante, incluant la respiration, alors que la photosynthèse n'est pas limitée.

L'évolution des acides organiques a été inverse à celle des sucres, mais proche de celle du NO_3^- dans les limbes : leur concentration a augmenté avec les apports en azote dans les solutions nutritives. Ceci est cohérent avec le rôle de « signal » du nitrate, qui lorsqu'il augmente, induit l'accumulation des acides organiques dans les feuilles de tabac et de tomate (Scheible W. R. *et al*, 1997; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005). Au niveau fonctionnel, il faut également noter que la synthèse de malate intervient pour contre balancer la modification du pH provoquée par l'assimilation du NO_3^- (Lüttge *et al*, 2002).

b) Métabolites secondaires

Les concentrations en polyphénols dans les limbes ont fortement augmenté lors de la diminution de la nutrition azotée. La réponse dans les tiges a été plus modérée et aucune tendance ne s'est dégagée pour les racines. Si l'absorption des éléments est effectuée au niveau des racines, une part du nitrate est assimilée au niveau des parties aériennes (Forde, 2000). Ainsi les variations de concentration en nitrate des solutions nutritives, ont eu des conséquences visibles au niveau des limbes, et cela à partir de 10 à 20 jours de culture suivant le système. Ce délai d'observation peut paraître long en comparaison de la réactivité des enzymes clefs de la voie de synthèse des polyphénols. En effet en quelques heures des pics d'activités des enzymes comme la Phénylalanine ammonia lyase (PAL) ou la Chalcone synthase (CHS) sont observés en réponse à un stress biotiques ou abiotique (Bernards et Ellis, 1991; Gowri *et al*, 1991; Merkle *et al*, 1994; Mori *et al*, 2001). Par contre pour observer une modification des teneurs en métabolites au niveau des tissus végétaux, davantage de temps est nécessaire. Lors d'attaque de pathogènes, une augmentation des composés phénoliques totaux peut être observée quelques jours après l'infection (Andreu *et al*, 2001; Yamunarani *et al*, 2004). Après une période de carence en azote, des plantules d'*arabidospis* ont été placées dans un milieu de culture riche en azote. Une diminution du niveau d'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des polyphénols est visible après 3h, mais au niveau

des métabolites peu de variations ont été observées, même après 8h sur ce milieu (Scheible W R *et al*, 2004).

Les concentrations en polyphénols dans les limbes ont été multipliées par deux en diminuant les apports en NO_3^- , cette augmentation ayant été nettement plus importante dans la zone limitante (<0.3mM). Ces observations sont en accord avec les prédictions de la GDBH, et avaient déjà été réalisées chez la tomate (Wilkens R T *et al*, 1996; Stout *et al*, 1998; Hoffland *et al*, 2000; Stewart *et al*, 2001) et chez d'autres plantes (Haukioja *et al*, 1998; Cipollini *et al*, 2002; Cartelat *et al*, 2005). Cette augmentation de plus 50% des teneurs en acide chlorogénique, ne s'expliquent pas uniquement par la diminution de 30% de la MF. En outre, en conditions de nutrition non limitante pour la croissance (> 0.3mM), les concentrations ont continué à diminuer légèrement. Ces résultats confortent l'idée de Stout *et al*. (1998), que cette augmentation des composés phénoliques en condition de limitation en azote ne peut pas être qu'un phénomène d'allocation de surplus de composés carbonés. La stimulation d'enzyme clefs de la voie de biosynthèse de polyphénols, en conditions azotées limitantes, comme la PAL, la Cinnamate-4-Hydroxylase (C4H) ou la CHS (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995; Fritz *et al*, 2006), participe également à l'augmentation des concentrations en polyphénols. De plus la stimulation de la voie des phénylpropanoïdes faisant intervenir la PAL, permet la libération d'un ion ammonium qui pourrait être recyclé pour la synthèse de métabolites primaires (Margna, 1977; Razal *et al*, 1996). Ce phénomène pourrait conférer à la plante une certaine tolérance aux conditions limitantes en azote, dans la mesure où l'ion ammonium libéré est repris en charge par le système GS/GOGAT. Nous avons tout de même observé une dilution importante des composés phénoliques dans la biomasse produite, ce qui a limité l'augmentation des polyphénols à l'échelle de la plante, comme il avait déjà été observé (Wilkens R. T., 1997).

Le point de rupture observée sur la courbe d'accumulation des polyphénols en fonction des apports en nitrate, s'est situé à environ 0,3mM NO_3^- , comme pour la croissance des limbes et proche de celui des teneurs en nitrate (0.2mM). Cette relation entre les teneurs en polyphénols et le statut azoté de la plante a déjà été observée (Cartelat *et al*, 2005). Elle est d'ailleurs exploitée par l'entreprise Force A qui commercialise des capteurs optiques mesurant les teneurs en polyphénols et en chlorophylle, ce qui permet de déterminer l'état physiologique des plants, et donc d'adapter la fertilisation ou de suivre la maturation des baies de raisin par exemple.

C/ Importance du stade phénologique des plants

Les prélèvements espacés dans le temps ont mis en évidence qu'il existait en plus de l'effet azote escompté, un effet de la date de récolte. Cet effet traduit l'importance de deux paramètres : l'âge des plants et leur environnement de culture. Au cours de ces expérimentations les plants étaient en phase active de croissance, des productions de biomasse importantes ont pu être observées surtout lors des premiers jours de cultures. Les prélèvements répétés dans le temps nous ont également permis de déterminer les quantités de composés phénoliques synthétisés par jour (Annexe 4). Ces quantités ont varié en fonction de la date de récolte et du milieu de culture. Elles ont eu tendance à être plus importantes chez les plantes cultivées avec des apports en azote limitant pour la croissance (*ie* <0,3 mM NO₃⁻). Ces taux ont été plus importants lors des derniers prélèvements, entre 21 et 25 jours en NFT et entre 13 et 16 jours pour la culture en conteneurs, ce qui ne correspond pas aux phases de croissances les plus marquées. Il a été démontré que les feuilles jeunes contenaient davantage de composés phénoliques (Wilkens R. T., 1997; Stout *et al*, 1998). Il serait donc intéressant de classer les feuilles suivant leur niveau de croissance pour déterminer la part de molécules induites par la nutrition azotée. On peut également se demander s'il existe un transfert des polyphénols vers les limbes formés, depuis d'autres organes comme les tiges qui sont des lieux potentiels d'accumulation de métabolites secondaires.

V Conclusion

Nous avons donc observé dans les limbes de tomate, deux tendances en réponse à la diminution des concentrations en azote nitrique dans les solutions nutritives : une diminution des paramètres relatifs à la morphologie de la plante (taille et poids des feuilles), et des acides organiques ; mais une accumulation des hexoses, et des composés phénoliques. Quelles que soient les variations observées nous avons mis en évidence que ces évolutions n'étaient pas proportionnelles au niveau d'azote apporté, mais que la phase importante de réponse de la plante se situait en condition limitante pour le NO₃⁻ (*ie* avant x_0). Ce seuil étant variable selon le paramètre étudié, et dépendant du système de culture. Lors de notre étude, en culture NFT, ce seuil s'est situé aux environs de 0,3 mM de NO₃⁻ en solution, pour la croissance des plantes

et les teneurs en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec la GDBH, puisque lorsque la croissance est limitée (*ie* avant x_0) mais pas la photosynthèse par un élément minéral (ici l'azote) les teneurs en métabolites secondaires carbonés, comme les polyphénols, sont augmentées.

La réactivité de la plante a été assez rapide, puisque après 10 à 20 jours de culture les teneurs en polyphénols ont été modifiées. Il serait maintenant intéressant d'évaluer l'évolution dans le temps de tels changements. On peut en effet se demander si cette augmentation des concentrations en polyphénols se maintient dans le temps. Ce sera l'objet du chapitre suivant où nous étudierons la stratégie de la plante en condition de carence ponctuelle, en caractérisant plus particulièrement l'évolution des teneurs en composés phénoliques.

**Chapitre IV : Etude de la dynamique
temporelle des teneurs en polyphénols lors
d'une carence ponctuelle en nitrate**

La carence en éléments minéraux est souvent utilisée pour étudier la régulation et la formation des composés secondaires dont les composés phénoliques (Scheible W R *et al*, 2004; Lillo *et al*, 2008). Il a par exemple été observé, une augmentation de la transcription des gènes codant pour la PAL dans des limbes de tabac cultivés en condition de carence azotée (0.2mM NO₃⁻). Ces plantes ont également présenté une augmentation du niveau de transcription des gènes codant pour la 4-coumarate: Coa ligase (4CL) et pour l'hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase (HQT). Ces changements au niveau génomique se sont répercutés sur les teneurs en dérivés hydroxycinnamiques et en flavonoides, en provoquant notamment une augmentation des concentrations en acide chlorogénique et en rutine (Fritz *et al*, 2006). Dans une autre étude, il a été observé une augmentation du niveau d'ARNm codant pour la chalcone synthase (CHS) et la dihydroflavonol-4-reductase (DFR) dans des feuilles de tomate soumises à une carence azotée, ce qui a principalement induit une augmentation des teneurs en anthocyanes (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995). Par conséquent il existe plusieurs études qui démontrent une stimulation du métabolisme des phénylpropanoïdes, au niveau moléculaire, en réponse à une carence en azote (Scheible W R *et al*, 2004; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005; Kovacik et Backor, 2007). Ces études ont été conduites sur de courtes durées, des modifications du niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des polyphénols étant observables en quelques heures (Scheible W R *et al*, 2004). Or nous avons vu dans le chapitre précédent, que le délai pour que ces modifications soient visibles, au travers de modifications des concentrations en métabolites dans les limbes, était de quelques jours. **Ainsi pour observer des modifications au niveau des métabolites, notre expérimentation va s'inscrire sur plusieurs jours.**

Les métabolites cibles que nous étudierons seront : **acide chlorogénique** et la **rutine**. Il a été démontré que ces composés intervenaient directement dans la résistance contre des pathogènes fongiques comme *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou, et bactériens (Yao *et al*, 1995; Andreu *et al*, 2001; Niggeweg *et al*, 2004; Mittelstraß *et al*, 2006; Treutter, 2006) ou indirectement en tant que molécule signal (Hahlbrock, 1989, Treutter 2006). Dans le cas de la tomate, les limbes sont un des sites d'infection parasitaire, les dégâts causés pouvant devenir important à l'échelle de la plante entière et induire des pertes de rendement en fruits. La réduction des traitements phytosanitaires représente un enjeu important pour l'agriculture actuelle mais également pour la préservation de l'environnement et de la santé humaine. C'est pourquoi l'amélioration de la résistance des plantes aux attaques parasitaires via leurs conditions de cultures offre des perspectives intéressantes.

L'évolution de ces deux composés (acide chlorogénique et rutine) en fonction de la nutrition azotée a déjà été étudiée dans le chapitre précédent. L'augmentation des teneurs en composés phénoliques en réponse à une limitation de la nutrition azotée, ainsi que son effet bénéfique pour la plante en cas d'attaque parasitaire ont également déjà été observés. Cependant la durée de ce bénéfice n'est pas connue. En particulier, l'évolution des teneurs après un épisode de carence en azote n'a jamais été décrite à notre connaissance. **Le but de cette étude est donc de caractériser la stratégie de la plante en cas de carence ponctuelle en azote, et de définir la dynamique temporelle de ces polyphénols.**

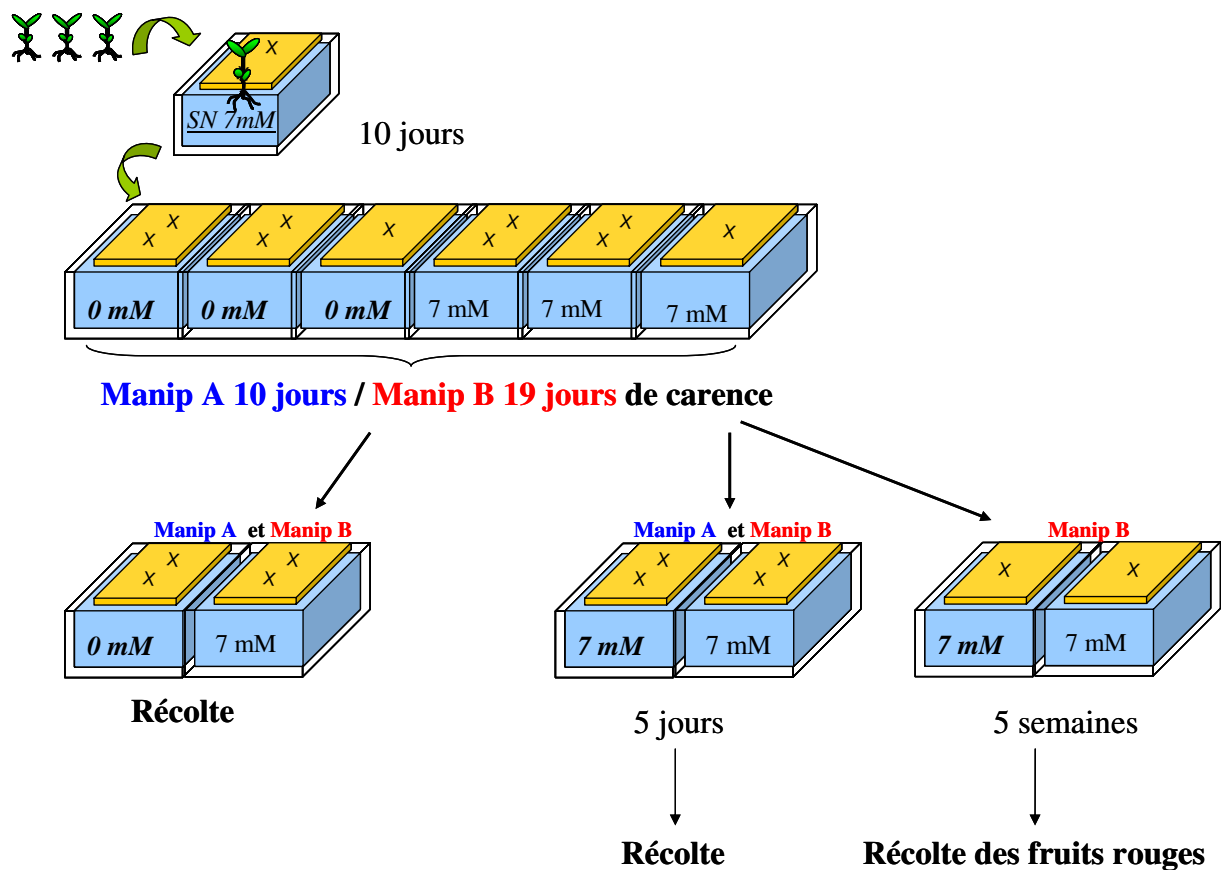


Figure 29 : Représentation simplifiée du protocole expérimental utilisé pour étudier l'effet d'une carence azotée ponctuelle chez la tomate. Les plantes ayant subi une période de carence sont indiquées en gras et italique. Une seule des deux répétitions (*i.e.* 1 seul conteneur) apparaît sur le schéma. Au cours des deux expérimentations, après 10 jours d'acclimatation, 4 conteneurs (soit 8 plantes, représentées par des croix) ont été placées en situation de carence (indiqué en gras et en italique) et 4 conteneurs ont été placés sur un milieu riche à 7mM (plantes témoins). Deux conteneurs de chaque traitement (4 plantes carencées et 4 plantes témoins) ont été récoltés à l'issue de la période de carence. Les deux conteneurs restant ont été cultivés, sur le milieu riche pendant 5 jours avant d'être récoltés. Lors de l'expérimentation B, 4 plantes témoins et 4 plantes ayant subi la période de carence ont été cultivées sur le milieu riche (7mM) jusqu'à la maturation des fruits, récoltés au stade rouge. En bleu les dates de prélèvement pour l'expérience A (10 jours de carence), et en rouge pour l'expérience B (19 jours de carence).

I Matériels et méthodes

A/ Conditions de culture

Des plants de tomates de la variété Microtom ont été cultivés en hydroponie en phytotron à Nancy entre le 25 mai et le 28 juin 2007. Trois semaines après la germination, des plants au stade 1-2 paires de feuilles et 2cm de racine, ont été transférés en hydroponie. Pour cette culture, deux conteneurs de 2L contenant 2 plantes, ont été utilisés par traitement. Les milieux de culture utilisés contenaient 7mM ou 0mM de nitrate considéré respectivement comme les milieux riche et carencé. Pour le descriptif du système de culture, la composition et la préparation des solutions nutritives : voir Chap III.

Les solutions nutritives ont été renouvelées tous les 3 jours. La température était comprise entre 23-25°C de jour et 18-20°C la nuit, et l'humidité relative était de 75% de jour et 70% la nuit. Le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) moyen était d'environ 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et la photopériode était de 14h. Après nettoyage du phytotron, des pièges gluants ont été installés, et des traitements contre les aleurodes ont été effectués au besoin (Aleutot, Capiscol, France). Seules les parties indemnes de tous symptômes ont été conservées pour les analyses.

B/ Description du protocole expérimental

Dans un premier temps les plantes ont été placées sur le milieu riche à 7mM de NO_3^- pour une période d'acclimation de 10 jours (Figure 29). Puis les plantes ont été séparées en deux groupe et transférées sur deux milieux : un milieu riche contenant 7mM de NO_3^- (noté par la suite 7mM) et un milieu carencé ne contenant pas de NO_3^- (noté par la suite **0mM**). Les plantes sont restées sur ces deux milieux pendant 10 jours lors de la première expérimentation (Manip A) et 19 jours lors de la deuxième expérimentation (Manip B). A l'issue de cette période, une partie des plantes ayant subi la carence et des plantes témoins, a été récoltée. L'autre est restée en hydroponie pour 5 jours supplémentaires où elles étaient toutes cultivées à nouveau avec une solution riche en azote (7mM) avant d'être récoltées (cette période est également appelée par la suite : période de retour à la normale). Enfin, des plantes de l'expérimentation B (4 témoins et 4 carencées), ont été cultivées sur le milieu riche (7mM), et

conservées pendant 5 semaines après la période de carence, pour déterminer l'impact du traitement sur la production et la composition des fruits.

C / Récolte et échantillonnage

A chaque récolte, quatre plantes par traitement (2 conteneurs) ont été prélevées : les deux plantes de chaque conteneur ont été rassemblées, un échantillon correspond donc un à ensemble de deux plantes. Pour chaque récolte on disposait de 2 répétitions de 2 plantes par traitement. Les matières fraîches ont été déterminées par type d'organes : limbes, tiges, pétioles, et racines. Pour les analyses chimiques, seuls les limbes ont été conservés, plongés dans l'azote liquide et stockés à -20°C avant d'être lyophilisés. Après lyophilisation, les échantillons ont été pesés pour déterminer la MS et réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à bille (MM200, Restch, France). Les teneurs en azote et carbone totaux ont été déterminées dans les limbes, ainsi que les concentrations en composés phénoliques.

Lors de l'expérimentation B, en plus des analyses sur les limbes, les fruits rouges (stade 8-9 OCDE) des quatre plantes conservées 5 semaines supplémentaires, ont été récoltés au fur et à mesure de leur maturation. Un échantillon correspondait à un lot de fruits récoltés le même jour, sur une même plante, au même stade de maturation. Par conséquent les récoltes ne correspondaient pas à un nombre de jours de culture, ni à un nombre précis de fruits. A chaque récolte, les fruits frais ont été dénombrés, pesés, nettoyés à l'eau distillée, puis plongés dans l'azote liquide où ils ont été broyés dans un mortier (pour permettre une lyophilisation homogène), puis conservés à -20°C avant d'être lyophilisés. Après lyophilisation, la MS a été déterminée, les échantillons broyés (broyeur à bille), et les polyphénols ont été dosés par HPLC.

D/ Analyses statistiques

Des analyses de variance ont été effectuées avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France), avec un risque de première espèce au seuil $\alpha=5\%$. Le test a posteriori de Tukey a été utilisé. Nous avons fait figurer les pourcentages de variation qui ont été calculés, par rapport au traitement le plus riche en azote (témoins à 7mM NO_3^-), de la façon suivante : (faible N-fort N)/fort N x 100.

Expérimentation A		Nb fleurs	MF limbes	MF tiges	MF racines	MF tot
carence 10 jours	<i>0</i>	14,3	3,4	2,1	6,8	12,3
	7	16,3	7,1	6,2	9,1	22,3
% variation		-12	-52	-66	-26	-45
retour à la	7	12,5	4,4	4,3	11,4	20,2
normale 10 + 5	7	23,0	13,7	10,7	13,0	37,4
% variation		-46	-68	-59	-12	-46

Expérimentation B		Nb fleurs	MF limbes	MF tiges	MF racines	MF tot
carence 19 jours	<i>0</i>	17,5	3,3	2,7	7,1	13,2
	7	27,3	10,5	10,4	10,3	31,3
% variation		-36	-68	-74	-31	-58
retour à la	7	18	4,7	4,7	8,1	17,5
normale 19 + 5	7	37,8	17,2	12,1	11,7	41,1
% variation		-52	-73	-61	-31	-57

Tableau 14 : Impact d'une carence azotée (expé A : 10jours ; expé B : 19 jours) et d'un retour sur le milieu riche (5jours) sur le nombre de fleurs, le poids de matière fraîche des limbes, tiges et racines. Les données de biomasse sont des moyennes en g/plante.

II Résultats

A/ Conséquence sur le développement des plantes

Les deux expérimentations A et B ont donné des résultats similaires quant à l'impact de la carence en azote sur la distribution de la MF (Tableau 14). L'augmentation de biomasse de la plante a été fortement limitée par la période de carence. Les MF de tiges et de limbes sont fortement réduites et le développement des racines a été affecté. Une diminution d'environ 50% de la biomasse totale a été observée chez les plantes carencées (Tableau 14).

Après avoir été replacés sur le milieu riche pendant 5 jours, la reprise de la croissance des plants, notamment des tiges, ayant connu la carence n'a pas été suffisamment importante pour rattraper le retard dans leur développement (Tableau 14). Ces plants ont toujours présentés deux fois moins de biomasse totale, respectivement -47 et -56% pour les expérimentations A et B, les matières fraîches, aérienne et racinaire, ayant été toutes deux diminuées. La diminution du nombre de fleurs a même été plus importante après cette période de retour. De façon générale la plus longue période de carence a induit une diminution légèrement plus marquée de la biomasse et du nombre de fleurs.

L'évolution de la biomasse et du nombre de fleurs en fonction des dates de prélèvement et du milieu de culture est représentée dans la figure 30. Pour les plants témoins (7mM) la MF limbes, et l'apparition des fleurs augmentent régulièrement au cours du temps (Tableau 15). Ce qui n'est pas le cas pour les plants ayant subi une carence (Tableau 15). Chez ces derniers, les pentes des droites représentant l'évolution des différents paramètres sont moins importantes montrant l'effet de la carence.

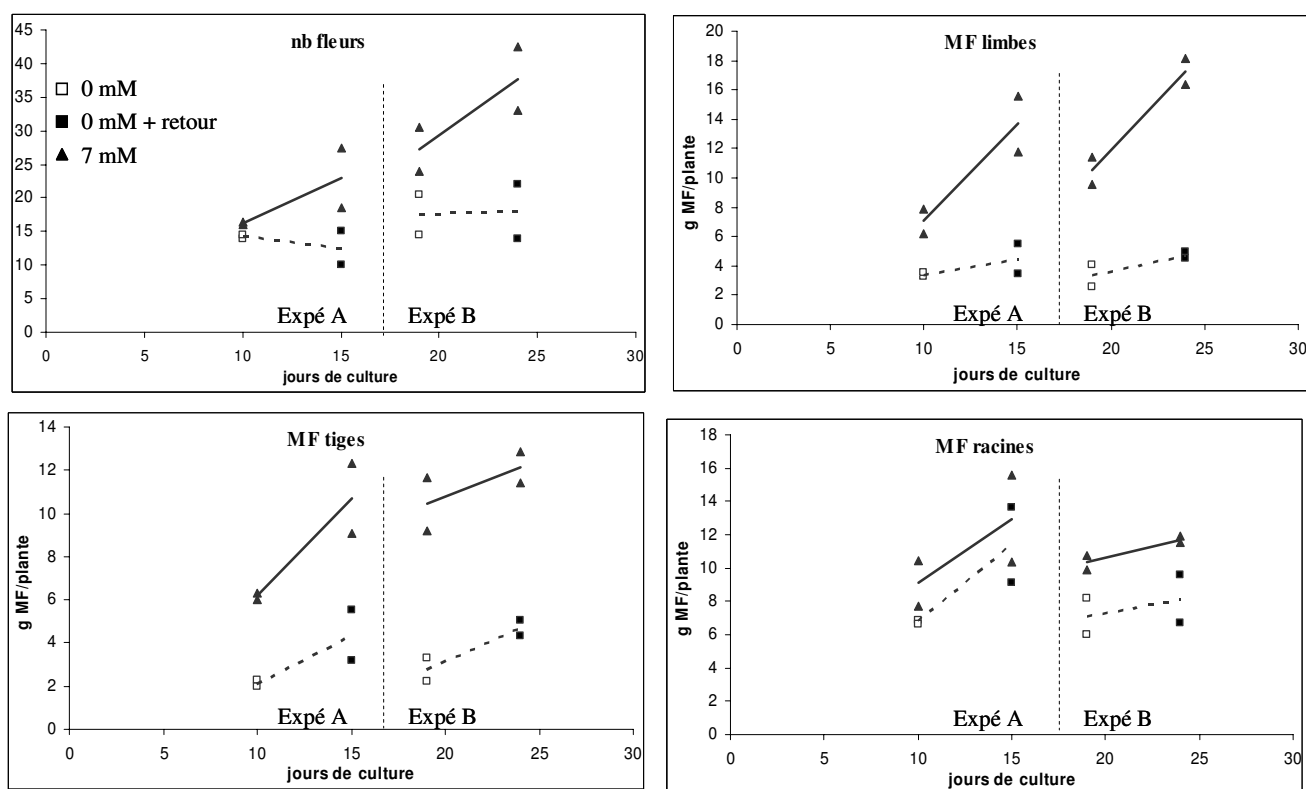


Figure 30 : Evolution du nombre de fleurs et de la masse fraîche des limbes, tiges et racines, au cours des expérimentations A (prélèvement à 10 et 15 jours) et B (prélèvement à 19 et 24 jours). Les données sont des moyennes en g/plante, calculées pour les plantes des deux mêmes dispositifs de culture. Les traits pointillés relient les valeurs à la fin de la période de carence et après 5 jours de retour sur le milieu riche. Les traits pleins relient les valeurs au cours du temps des plantes ayant toujours été cultivées sur le milieu riche (7mM).

			Pente	R ²
nombre fleurs	A	0	-0,35	0,20
		7	1,35	0,53
	B	0	0,10	0,01
		7	2,10	0,62
MF limbes	A	0	0,21	0,34
		7	1,33	0,83
	B	0	0,28	0,60
		7	1,35	0,93
MF tiges	A	0	0,44	0,64
		7	0,91	0,80
	B	0	0,39	0,82
		7	0,34	0,42
MF racines	A	0	0,92	0,68
		7	0,77	0,46
	B	0	0,21	0,14
		7	0,28	0,79

Tableau 15 : Equations des régressions obtenues, pour représenter l'évolution du nombre de fleurs et de la masse fraîche des limbes, tiges et racines au cours du temps, selon les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours).

La figure 31 illustre la réorganisation de la MF, suite à la période de carence en azote. La part de MF allouée aux racines a été plus importante pour les plants en condition carencée que pour les plantes poussant sur le milieu riche, respectivement 55 et 40 % (Figure 31). La part de MF allouée aux tiges a quant à elle diminuée sur le milieu carencée, 17%, au lieu de 28% à 7mM. Des résultats similaires ont été observés pour la deuxième expérimentation qui confronte les plants à une période de carence plus longue (résultats non présentés). Après la période de retour sur le milieu riche, la répartition de la MF n'a pas été très modifiée mais les tiges ont semblé reprendre de la vigueur au dépend des limbes ou des racines (résultats non présentés).

Le nombre de fruits, et le poids total des fruits, récoltés entre le 26 juillet et le 13 août lors de l'expérimentation B, ont été nettement plus faibles chez les plantes ayant subi une période de carence (Tableau 16). En effet nous avons observé un retard dans la mise à fruit chez ces plantes, même si leur développement végétatif était devenu comparable à celui des plantes témoins. Par contre le poids moyen des fruits récoltés n'était pas significativement différent, mais leur teneur en MS était plus importante 8.8 contre 7.1 %.

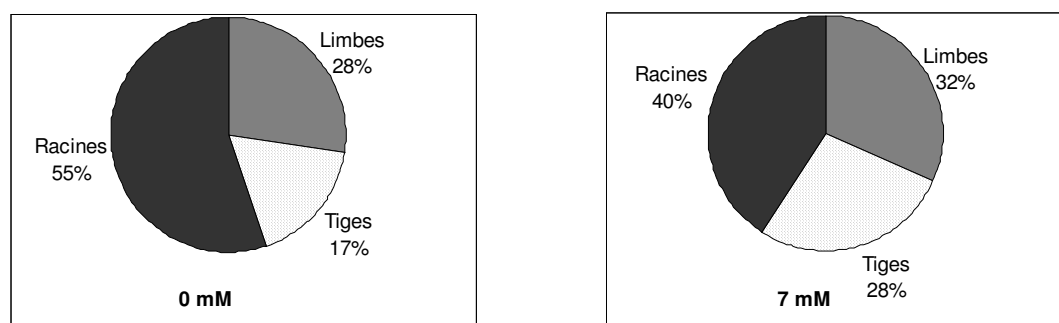


Figure 31: Répartition de la matière fraîche dans les plants de tomate après 10 jours de carence ou de culture sur un milieu riche.

	nb fruits	MF tot	poids moy	%MS
0	6	18,3	3,25	7,11
7	16,8	64,6	3,82	8,83
Effet traitement	**	**	NS	*

Tableau 16 : Nombre, poids total (g) et poids moyen (g/fruit), et pourcentage de MS (g pour 100g MF) des fruits récoltés lors de l'expérimentation B entre le 26 juillet et le 13 août. Les données sont des moyennes calculées pour quatre plantes par traitement, sur l'ensemble des récoltes effectuées. NS, non significatif, *i.e.*, $P > 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Expérimentation A		Chloro	Rutine	%N	%C
10 jours	0	0,163	1,900	2,33	40,58
	7	0,069	1,771	6,15	40,31
% variation		+136	+7	-62	+1
10 + 5	0	0,997	2,813	4,62	40,24
	7	0,339	1,923	5,88	39,51
% variation		+194	+46	-21	+2

Expérimentation B		Chloro	Rutine	%N	%C
19 jours	0	0,275	2,745	1,68	40,89
	7	0,127	1,253	5,90	40,09
% variation		+117	+119	-71	+2
19 + 5	0	1,935	3,560	4,56	39,80
	7	0,440	1,703	5,55	40,88
% variation		+340	+109	-18	-3

Tableau 17 : Impact d'une carence azotée (expé A : 10 jours ; expé B : 19 jours) et d'un retour sur le milieu riche (5jours) sur les concentrations en acide chlorogénique et en rutine (mg/g MS), les teneurs en azote total et carbone total (g/100gMS) dans les limbes. Les données sont des moyennes calculées sur 4 plantes (2x2).

B/ Conséquence sur la composition des plantes

Après la période de carence, les teneurs en acide chlorogénique ont plus que doublé chez les plantes carencées (+136 et +117% respectivement pour les expérimentations A et B) par rapport aux témoins (Tableau 17). Les concentrations en rutine des plants carencés ont peu augmenté lors de la première expérimentation A (+7%), mais elles ont doublé lors de la seconde (+119%) (Tableau 17). Ces différences ont été plus marquées après le retour sur le milieu riche. Les concentrations en acide chlorogénique lors des deux expérimentations, ont continué à augmenter après le retour sur le milieu riche (+194 et +340 % respectivement pour les expérimentations A et B). Cette tendance a également été observée pour la rutine, dont les concentrations ont augmentées de 50 à 120 %.

Globalement les teneurs en acide chlorogénique et en rutine augmentent au cours du temps (Figure 32) et le facteur de détermination est compris entre 0.7 et 1 (Tableau 18). La stimulation de la synthèse de ces composés est visible à travers les pentes des droites de régressions qui sont nettement plus fortes chez les plantes ayant subi une période de carence, respectivement 3 et 5 fois plus importantes pour les deux expérimentations A et B pour l'acide chlorogénique, et 2 à 3 fois plus importante pour la rutine (Tableau 18).

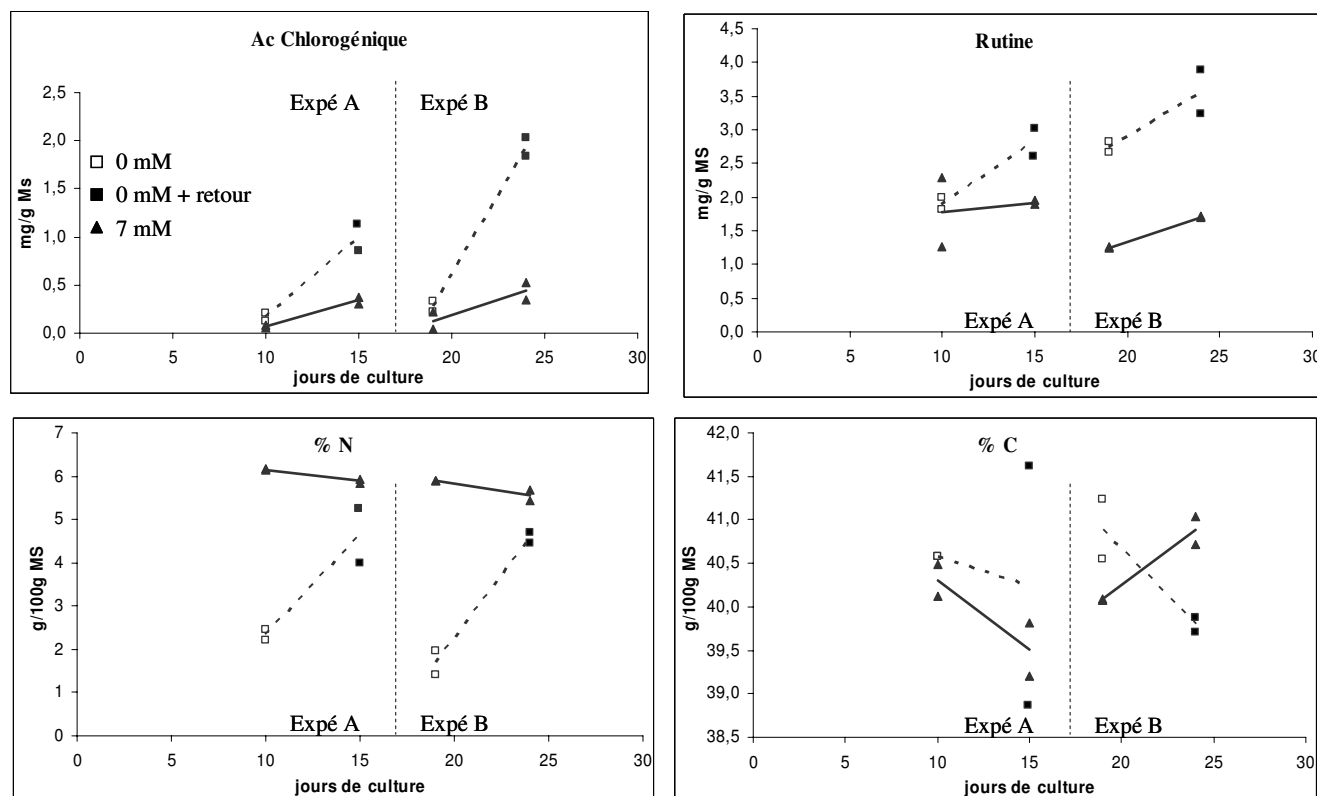


Figure 32 : Evolution des teneurs en composés phénoliques (acide chlorogénique et rutine en mg/g MS) et des teneurs en azote et carbone total (g/100gMS), pour les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours). Les données sont des moyennes calculées pour les plantes des deux mêmes dispositifs de culture. Les traits pointillés relient les valeurs à la fin de la période de carence et après 5 jours de retour sur le milieu riche. Les traits pleins relient les valeurs au cours du temps des plantes ayant toujours été cultivées sur le milieu riche (7mM).

			Pente	R ²	
Chloro	A	0	0,17	0,95	
		7	0,05	0,97	
	B	0	0,33	0,99	
		7	0,06	0,75	
	Rutine	A	0	0,18	0,89
			7	0,03	0,04
B		0	0,16	0,75	
		7	0,09	1,00	
%N		A	0	0,46	0,86
			7	-0,05	0,94
	B	0	0,58	0,98	
		7	-0,07	0,79	
	%C	A	0	-0,07	0,03
			7	-0,16	0,71
B		0	-0,22	0,83	
		7	0,16	0,92	

Tableau 18 : Equations des régressions obtenues, pour représenter l'évolution des teneurs en composés phénoliques et en N et C total, selon les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours).

	Chloro	Rutine	%N	%C
0	4,71E-04	1,27E-03	2,13	41,42
7	4,65E-04	9,83E-04	2,30	41,65
Effet traitement	NS	NS	(*)	NS

Tableau 19 : Teneurs en acide chlorogénique (Chloro), et en rutine en mg/gMS, et teneurs en azote total et carbone total en g/100gMS dans les fruits de tomate récoltés entre le 26 juillet et le 13 août pour l'expérimentation B. Les données sont des moyennes calculées pour quatre plantes par traitement, sur l'ensemble des récoltes effectuées. NS, non significatif, i.e., $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

		Chloro	Rutine
A	0	0,523	1,431
	7	0,527	2,918
B	0	1,112	1,859
	7	0,886	3,599

Tableau 20 : Teneurs en acide chlorogénique et en rutine dans les limbes en mg par plant, après la période de retour sur le milieu riche, au cours des expérimentations A (10 jours de carence) et B (19 jours de carence).

La carence en azote a induit une diminution importante du pourcentage d'azote total dans les limbes, -60 et -70 % respectivement pour les expérimentations A et B (Tableau 17). Après le retour sur le milieu riche les pourcentages de variation sont réduits à -20%. En effet, si pour les plantes témoins les teneurs en azote total sont restées stables entre les deux prélèvements, elles ont augmenté fortement lors du retour sur le milieu à 7mM chez les plantes ayant subi la période de carence (Figure 32). Les teneurs en azote semblent bien corrélées aux apports azotés (Tableau 18). Par contre les teneurs en carbone n'ont pas été modifiées par le traitement (Tableau 17).

Dans les fruits récoltés sur toute la période de culture, les teneurs moyennes en acide chlorogénique et en rutine ont été les mêmes pour les deux traitements (Tableau 19). Nous n'avons pas non plus observé de différence en comparant les concentrations obtenues pour chaque composé au sein d'une même récolte (résultats non montrés). De la même façon, les teneurs en carbone total et azote total n'ont pas ou peu été affectées par la période de carence subie en début de la culture.

Pour évaluer la réponse à la carence en azote à l'échelle de la plante, nous avons quantifié les teneurs en acide chlorogénique et en rutine dans l'ensemble des limbes des plantes après la période de retour sur le milieu riche. Nous avons observé que les quantités d'acide chlorogénique sont restées constantes lors de l'expérimentation A et légèrement plus importantes pour les plantes ayant subi la carence lors de l'expérimentation B (Tableau 20). En revanche, les teneurs en rutine ont été quasiment deux fois plus faibles chez les plantes carencées, et cela lors des deux expérimentations.

III Discussion

A/ Effet de la carence sur le développement des plantes

En dix jours de carence en azote, la plante a mis en place une stratégie de répartition de la MF, en privilégiant le développement de son système racinaire. Cette stratégie de développement est classiquement observée (Kovacik et Backor, 2007), puisque la plante met tout en œuvre pour explorer son milieu de culture afin d'y trouver les éléments dont elle manque. De façon générale, la production de matière fraîche a été quasiment diminuée de moitié chez les plants carencés, et le retour sur le milieu riche pendant cinq jours n'a pas induit de reprise suffisante de la croissance pour combler le retard pris durant cette période. Pour l'expérimentation B qui comprenait 19 jours de carence, la diminution de la matière fraîche produite a été tellement importante qu'elle s'est répercutée plus tard dans le cycle de la plante. En effet les plantes ayant subi la carence ont présenté un retard conséquent dans la mise à fruit par rapport aux plantes témoins, ce qui a induit un rendement en fruits beaucoup plus faible. Par contre les fruits récoltés sur les plantes ayant subi la carence avaient une teneur en matière sèche plus faible mais le même poids moyen (Tableau 16).

B/ Effet de la carence sur la composition des limbes et des fruits

Après 10 jours de carence en azote, la modification du métabolisme secondaire s'est répercutée sur la composition des limbes. Les teneurs en acide chlorogénique ont été multipliées par deux chez les plants carencés. Une telle augmentation avait déjà été observée sur des semis d'*Arabidopsis* soumis à 2 jours de carence, mais les concentrations des composés synthétisés plutôt en début ou milieu de la voie de biosynthèse, comme les dérivés hydroxycinnamiques, n'avaient pas beaucoup varié en comparaison des teneurs en rutine par exemple. Cette observation avait été corrélée à un niveau constant de transcription des gènes codant pour la PAL et la 4CL (Scheible W R *et al*, 2004). Dans nos expérimentations, nous avons également observé une augmentation des teneurs en rutine (x2) lors de l'expérimentation B, mais ce sont surtout les concentrations en acide chlorogénique qui ont été particulièrement modifiées (x2 à 4.5). Cette différence dans la nature des composés s'accumulant pourrait être liée aux plantes étudiées. Chez *Arabidopsis*, les dérivés

hydroxycinnamiques, comme l'acide chlorogénique ne sont pas des composés qui s'accumulent dans les tissus, contrairement à ce qui a lieu chez la tomate. Nous avons effectivement obtenu des teneurs en acide chlorogénique cent fois plus importantes dans les feuilles de tomates que dans les plantules d'*Arabidopsis*.

Une autre étude menée sur des plants de camomille (Kovacik *et al*, 2007) a montré que les teneurs en composés phénoliques dans les feuilles pouvaient être significativement différentes dès 4 jours de carence en azote ; en particulier les teneurs en acide chlorogénique ont été multipliées par deux dès le quatrième jour, mais d'autres composés n'ont pas réagi aux traitements azotés. Cet écart a été conservé tout au long du traitement entre les plantes carencées et les plantes témoins.

Ainsi, bien que les plants de tomates soient assez riches en azote (accumulé pendant les 10 jours d'acclimatation), en quelques jours de carence le statut azoté et le métabolisme de la plante sont affectés. Nous avons observé une diminution très prononcée du pourcentage d'azote dans les tissus après la période de carence (-60 %), et une augmentation des teneurs en métabolites secondaires (Tableau 17). Ces observations confortent les travaux qui utilisent les concentrations en polyphénols comme indicateur du statut azoté de la plante.

Il est important de noter qu'après la période de retour sur le milieu riche, l'effet de la période de carence a été conservé, les concentrations étant toujours au moins deux fois plus importantes chez les plantes carencées. L'équipe de Scheible (2004) avait également effectué une période de retour sur un milieu riche mais de seulement quelques heures. S'ils ont observé une répression des gènes intervenant dans la synthèse des polyphénols trois heures après l'ajout de NO_3^- , les teneurs en composés phénoliques n'avaient pas varié après 8h. Au niveau enzymatique les réponses aux stimuli sont très rapides, quelques heures après l'application du stress, et ponctuelles (Bernards et Ellis, 1991; Gowri *et al*, 1991; Merkle *et al*, 1994; Mori *et al*, 2001). L'équipe de Kovacik (2007), a également observé une stimulation de la synthèse de la PAL chez les plantes carencées en azote après 4 jours ; mais après 12 jours de traitement cette activité était devenue identique à celle des plantes témoins (Kovacik *et al*, 2007). En revanche pour observer une réponse au niveau métabolique, la cascade de réponses est plus longue, et quelques jours sont nécessaires (Andreu *et al*, 2001; Yamunarani *et al*, 2004). La synthèse de métabolites peut être localisée ou systémique, d'où l'importance d'étudier les différents compartiments de la plante. Il serait donc intéressant de distinguer davantage de sous ensembles en prenant en compte l'âge des organes et leur activité de croissance, aussi bien pour les parties végétatives que génératives (Wilkins R. T.,

1997; Stout *et al*, 1998). Dans les fruits, l'évolution temporelle mais également spatiale des molécules n'est pas établie. Il a été observé que la synthèse et les teneurs en composés phénoliques totaux étaient importants au tout début de la formation des cerises et des poires, puis ces concentrations diminuaient avec le temps. Ces observations ont été corrélées avec l'activité enzymatique de la PAL (Melin *et al*, 1977; Billot *et al*, 1978). Chez la tomate, le stade de maturation du fruit est également important. L'acide chlorogénique est accumulé dans les fruits verts, puis il se dégraderait au profit d'autres composés qui apparaissent lors de la maturation du fruit (Fleuriet, 1976). Ainsi s'il existe une synthèse des composés phénoliques dans les fruits, l'hypothèse d'un transfert de ces composés des feuilles vers les fruits n'a cependant jamais été réfutée. Au cours de notre expérimentation, les teneurs en polyphénols dans les fruits n'ont pas été affectées par la période de carence qui avait eu lieu beaucoup plus tôt dans le cycle de la plante. Les premières récoltes de fruits ont eu lieu plus d'un mois après le retour sur le milieu riche, ce qui est long en comparaison de la durée du cycle de culture de microtom qui peut être effectué en 70 à 90 jours.

Les teneurs en composés phénoliques dans les limbes ont été modifiées par une carence en azote, mais la matière fraîche produite l'a été davantage. Par conséquent les concentrations en polyphénols par plant n'ont pas été significativement augmentées par le traitement (Tableau 19). Cette dilution des concentrations en polyphénols avait déjà été observée (Wilkens R. T., 1997). Par conséquent ces expérimentations ont montré qu'il existait un bénéfice partiel sur l'accumulation des composés phénoliques après une période de carence suivie d'un retour à une alimentation normale.

C/ Conclusions et perspectives

Nous avons observé qu'une carence ponctuelle en azote induisait un ralentissement du développement de la plante ainsi qu'une augmentation des teneurs en polyphénols dans les limbes. De plus il semble que la plante conserve une trace de cette carence, au travers de modifications du métabolisme secondaire. En effet après une période de retour sur un milieu riche, les plantes carencées présentent toujours des concentrations en composés phénoliques plus importantes que les plantes témoins, et leur synthèse semble avoir été stimulée. Par contre, à l'échelle de la plante ces modifications du métabolisme secondaire ne sont que partielles puisque cette absence d'azote a des conséquences néfastes au niveau de la biomasse de la plante, qui en plus se répercutent sur la mise à fruit, et sur le rendement de la culture.

Ces résultats sont donc encourageants et seront utiles pour mener d'autres travaux. Par exemple nous avons pu établir qu'une période de carence de dix jours semblait suffisante pour induire les modifications souhaitées du métabolisme de la plante. Suite à un retour de cinq jours avec une alimentation azotée normale, le pourcentage d'azote dans la plante a presque rejoint celui des plants témoins. Ainsi le limbe semble être un organe très réactif et si les effets d'une carence se manifestent rapidement, ils sont également rapidement compensés. Nous pourrions donc envisager des prélèvements intermédiaires pour pouvoir décrire plus précisément ces évolutions. En comparant les résultats obtenus lors de l'expérimentation A et B, il ne semble pas nécessaire d'utiliser une plus longue période de carence. Il faut également noter qu'après 19 jours de carence, la diminution de la biomasse a été irréversible et le développement des plants a pris du retard. Or le but à atteindre est d'améliorer la résistance de la plante sans pour autant affecter la qualité de la production, en termes de rendement et de composition des fruits.

Mis à part la durée du stress, d'autres paramètres pourraient être également étudiés pour atteindre nos objectifs. Parmi eux la fréquence des épisodes de carence au cours du cycle de culture ainsi que le moment de leur réalisation.

Les mécanismes de défense des plantes contre les pathogènes, se traduisent par la réalisation de plusieurs phénomènes successifs. Après la reconnaissance du pathogène, une réponse locale est mise en place (Réponse Hypersensible), puis une réponse globale est élaborée à l'échelle de la plante (Réponse Acquise Systémique) qui lui confère une protection de longue durée contre les attaques ultérieures. On pourrait donc imaginer un comportement similaire chez la plante mais pour une réponse à un stress abiotique, comme une carence en éléments minéraux. Par exemple des mécanismes, tels que la stimulation de la synthèse d'enzymes, mis en place lors du premier épisode de carence, pourraient induire une réponse plus intense, *ie* une augmentation des teneurs en polyphénols plus importante lors d'un autre épisode de carence. Au contraire, ces mécanismes mis en place pourraient avoir rendu la plante plus tolérante à la carence et les modifications de son métabolisme pourraient être moins marquées. Il serait donc intéressant de quantifier les teneurs en polyphénols dans la plante après plusieurs épisodes de carence en azote.

Un autre paramètre important à définir, est le stade phénologique de la plante le plus approprié pour appliquer une période de carence sans que le rendement en fruits ne soit affecté.

Par ailleurs les composés phénoliques sont également présents dans les fruits de tomate, ainsi d'autres perspectives sont à envisager. Il a été observé que les flavonoïdes et les dérivés hydroxycinnamique intervenaient dans la résistance contre les pathogènes des fruits et légumes après leur récolte (Ruelas *et al*, 2006; Treutter, 2006). Le rôle anti fongique des composés phénoliques, pourrait donc également jouer un rôle important pour la conservation des fruits, après leur récolte. En plus des propriétés anti parasitaires des composés phénoliques, leur rôle dans la valeur nutritionnelle des fruits a également été démontré (Tomas-Barberan et Gil, 2008). Il est donc important de connaître l'impact de la fertilisation azotée sur la composition des fruits de tomates. Ce sera l'objet du chapitre suivant dont l'objectif est de **quantifier les répercussions d'une diminution de la nutrition azotée sur la qualité du fruit de tomate, et notamment sur les teneurs en polyphénols.**

Chapitre V : Impact de la nutrition azotée sur les fruits de tomate

Dans les chapitres précédents, nous nous sommes intéressés à l'évolution des teneurs en composés phénoliques dans les parties végétatives de la tomate. Nous nous sommes donc focalisés sur les propriétés anti-parasitaires des composés phénoliques. Dans ce chapitre nous allons étudier l'évolution des teneurs en composés phénoliques dans les fruits de tomate et donc aborder d'autres propriétés majeures de ces composés : leur valeur santé.

L'azote (N) est l'un des principaux éléments nécessaires à la croissance des plantes, il est donc appliqué aux cultures dans de grandes quantités. L'utilisation massive des engrais azotés dans le passé s'est répercutée sur la qualité du sol et de l'eau qui ont subi une forte pollution. Ce problème a été pris en considération et les pratiques de fertilisation sont en cours de révision pour limiter la pollution et les coûts engendrés par les engrais (Calvet, 1990). Actuellement les recommandations d'apport en azote pour la production en serre de tomates sur laine de roche sont d'environ 10 ou 13 mM à 15 mM (Letard *et al*, 1995; Peet et Welles, 2005), en fonction du stade de croissance et du pays de culture. Toutefois, ces recommandations peuvent être améliorées. Dumas *et al*. (1993), ont montré que 6 mM NO_3^- dans la solution nutritive étaient suffisants pour la croissance des jeunes plants de tomates de la plantation jusqu'au début de la floraison (Dumas Y. *et al*, 1993). Des études complémentaires ont démontré que l'apport d'azote était positivement corrélé au rendement en fruits, mais jusqu'à un certain seuil au-dessus duquel la fertilisation des plantes n'augmentait pas le rendement (Guidi *et al*, 1998; Scholberg *et al*, 2000; Le Bot *et al*, 2001). Par ailleurs, une plus grande attention devrait être accordée à la valeur marchande des fruits et donc au rendement commercial au lieu du rendement total. Une étude a déjà montré que le rendement en fruits total avait été modifié en augmentant les apports en azote de 50 à 250 kg/ha, alors que le rendement en fruits commercialisables n'avait pas été modifié (Parisi *et al*, 2006). D'un point de vue environnemental, il semble nécessaire d'optimiser l'efficacité d'utilisation de l'azote par la plante et de limiter les pertes dans l'environnement. Toutefois, les conséquences de la réduction des apports en azote sur la qualité des fruits sont mal connues.

Comme il a été décrit dans la synthèse bibliographique, la notion de qualité des fruits de tomates dépend de l'acteur de la filière. Pour le producteur les critères importants sont relatifs à la conduite de la variété en culture et aux rendements associés. Le distributeur s'intéresse plus à l'aspect du produit et à sa durée de conservation. Enfin pour le consommateur, la qualité est liée à son aspect et depuis peu à l'association saveur-texture-arôme-santé (Kaluzny-Pinon *et al*, 2001).

L'aspect visuel et la fermeté sont des caractéristiques importantes pour le consommateur puisque ce sont les seules disponibles pour évaluer la qualité du fruit lors de l'achat de tomates (Grierson et Kader, 1986). Il a été observé que la couleur du fruit n'était pas affectée par l'apport d'azote (Warner *et al*, 2004; Simonne *et al*, 2007), tandis que la fermeté des fruits pouvait varier (Kaniszewski *et al*, 1987; Albu-Yaron *et al*, 1993; Wang Y T *et al*, 2007). Réduire les apports d'azote pourrait donc avoir un impact limité sur le rendement des cultures et l'aspect visuel du fruit, mais ses effets sur la saveur des fruits de tomate ne sont pas encore clairs. Aziz (1968) a trouvé des teneurs en sucre plus élevées chez les fruits récoltés sur les plantes cultivées sous de faible approvisionnement en N (1 mM) par rapport aux fruits récoltés sur des plantes ayant reçu des niveaux d'azote plus élevés (12,9 et 15,8 mM)(Aziz, 1968). Simonne et al. (2007) ont observé une diminution de l'acidité titrable lorsque les apports d'azote étaient augmentés de 0 à 392 kg/ha (Simonne *et al*, 2007). Cependant, en augmentant l'apport d'azote de 2,25 à 36 mM, une autre étude a relaté une augmentation des teneurs en sucre, en acide et de plusieurs composés volatils, améliorant la saveur de tomate (Wang Y T *et al*, 2007). Ces différences pourraient être liées au fait que la réduction de l'apport d'azote chez les jeunes plantules, a un fort impact sur le développement végétatif des plantes et, par conséquent, sur l'importation de carbone vers le fruit et sur son métabolisme.

Une plus grande attention est maintenant portée sur les bienfaits de la consommation régulière de fruits et de légumes. Cette valeur santé pouvant être liée à la grande variété de molécules biologiquement actives (fibres, caroténoïdes, composés phénoliques, vitamines) retrouvées chez les fruits et légumes, qui contribuent à leur qualité nutritionnelle (Rice-Evans *et al*, 1997; Giovannucci E, 1999; Tomas-Barberan et Gil, 2008). Des études menées sur des feuilles (tomate, tabac) ont démontré que l'apport d'azote a des effets très divers sur les métabolismes primaire (Scheible W. R. *et al*, 1997; Stitt, 1999; Wang Y. H. *et al*, 2001; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005) et secondaire (Scheible W R *et al*, 2004; Fritz *et al*, 2006). Par contre, seules quelques études sont disponibles sur l'impact de l'apport d'azote sur le contenu en antioxydant des fruits, et les résultats sont controversés (Awad et De Jager, 2002; Colla *et al*, 2003; Dumas Y *et al*, 2003; Delgado *et al*, 2004). Plus particulièrement seule l'équipe de Stewart, (2001) a étudié l'influence de la nutrition azotée sur les teneurs en polyphénols dans les fruits de tomate. Ils ont mis en évidence de faibles variations des teneurs en flavonoïdes (Stewart *et al*, 2001).

Ainsi les expérimentations présentées dans ce chapitre, ont pour but **de mesurer l'impact de la nutrition azotée sur la qualité du fruit de tomate, en considérant les points**

de vue du producteur et du consommateur. Des tomates ont été cultivées sur un cycle complet, en respectant les pratiques agricoles actuelles sous serre avec le cv Clotilde et dans des conditions expérimentales constantes avec le cv Microtom. Lors de cette première culture les paramètres de production ainsi que les qualités organoleptiques et nutritionnelles ont été davantage caractérisées, les résultats ont été discutés en prenant en compte les conditions climatiques pendant les cultures. En se plaçant dans des conditions réelles de production nous voulions mesurer **la faisabilité d'un tel changement de pratique** et ses conséquences pour le producteur. Puis dans un deuxième temps en se plaçant dans des conditions de lumière et de température constantes nous avons pour objectif **d'acquérir des connaissances fondamentales** sur l'évolution des composés phénoliques en réponse à une diminution de la nutrition azotée. De plus cette dernière expérimentation a été réalisée avec un cultivar différent. **Un autre objectif est donc de comparer la composition des fruits, et l'évolution des polyphénols en fonction de la nutrition azotée.**

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans Journal of Agricultural and Food Chemistry, Annexe 2

		Plantation à F2	F2 - F4	A partir de F4
CE (mS.cm-1)		3,5	3,0	2,4
pH		5,7	5,7	5,7
		meq/l		
NO ₃ ⁻	N12	25	18	12
	N6	25	12	6
	N4	25	8	4
Cl ⁻	N12	2	4-5	3
	N6	2	10-11	9
	N4	2	13 -14	11
H ₂ PO ₄ ⁻		2	2	1,8
SO ₄ ²⁻		6	6	4,6
HCO ₃ ⁻		0,5	0,5	0,5
NH ₄ ⁺		1,5	1,5	0,1
K ⁺		7,5	9	6,4
Na ⁺		0,6	0,6	0,9
Ca ₂ ⁺		12	10,5	11
Mg ₂ ⁺		4	4	3,6

Tableau 21 : Composition en macro-éléments (mM L-1) des trois solutions nutritives utilisées pour étudier l'impact de la nutrition azotée sur la qualité des fruits de la variété Clotilde. Ces données correspondent à la composition moyenne des solutions apportées aux plantes entre janvier et juillet.

I Matériels et méthodes

A/ Culture effectuée sous serre avec le cv Clotilde

a) Description du dispositif de culture sur pain de laine de roche

Des graines de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv Clotilde) ont été semées (automne 2004), sous serre au Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (Bellegarde, dans le Gard), sur des cylindres de laine de roche (20x27mm) et recouvertes de vermiculite. Après 8 jours, les plantules ont été transférées sur des cubes de laine de roche (65x75x75mm) et enfin après 1 mois, les plants au stade 3-4 feuilles ont été repiqués sur des pains de laine de roche, à raison de 2 plantes par sac (100x15x25). La culture a été effectuée dans 3 compartiments de 240m² chacun, la densité de plantation était de 2,5 plants / m². La culture a été faite en respectant les pratiques actuelles des producteurs. Les rameaux axillaires ont été supprimés, un effeuillage était effectué tous les 15 jours, la charge en fruits a été fixée à 5 fruits par grappe et les plants étaient abaissés régulièrement (Figure 12B).

Le suivi phytosanitaire a été effectué en lutte intégrée en introduisant des *Macrolophus* (Koppert, France) pour lutter notamment contre les aleurodes.

b) Préparation des solutions nutritives

Les solutions nutritives (SN) contenant 4, 6 et 12mM NO₃⁻, ont été préparées à partir d'eau déionisée et de mélanges commerciaux pour obtenir la composition minérale suivante au moment de l'apport (Tableau 21). Pour compenser la diminution des apports en NO₃⁻, et maintenir un ratio cation/anion constant, du chlorure (Cl⁻) a été ajouté à la SN. Les microéléments ont été fournis par une solution d'Oligonia (Agro-nutrition, France) formule T36 (0.04ml/l), et le fer sous forme Fe-EDTA par une solution de Plantin Fer 250 (0.8mg/l). Le pH a été ajusté à 5,7 et la conductivité était de 2,4 mS cm⁻¹. Les solutions nutritives ont été apportées par un système de goutte à goutte au niveau de chaque plante, et un taux de drainage de 30% a été maintenu.

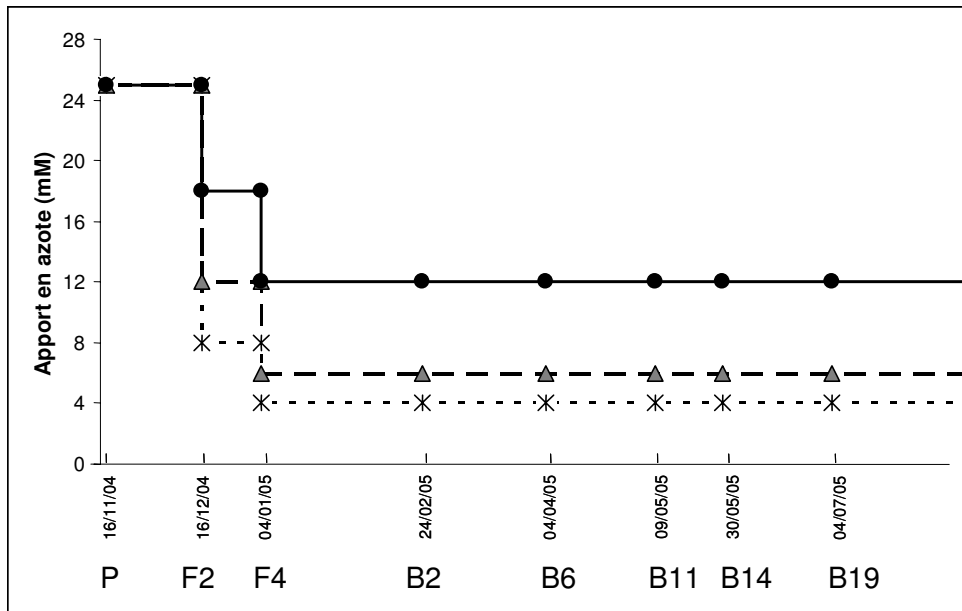


Figure 33 : Itinéraire cultural depuis la plantation (P) en novembre jusqu'à la dernière récolte en juillet, bouquet 19 (B19). A partir de la floraison du 2ème bouquet (F2), 3 niveaux d'azote ont été apportés aux plantes. A la floraison du 4ème bouquet (F4), les SN contenaient 4, 6 et 12 mM NO_3^- . Les étoiles représentent le milieu contenant 4mM, les triangles 6mM et les ronds 12mM.

c) Conditions de culture

Au cours de l'expérimentation, 3 solutions nutritives (SN) complètes ont été utilisées pour irriguer les plants, en tenant compte de leur stade de développement. Les apports en azote ont été modulés progressivement (Figure 33) pour arriver à une concentration de 12mM NO_3^- classiquement utilisée en culture et deux niveaux plus faibles mais non limitant pour la croissance de la plante : 6 et 4mM NO_3^- . La première solution utilisée du semis jusqu'à la floraison du 2ème bouquet (notée F2, 16 décembre 2004) était la même pour les trois traitements, et contenait 25 mM NO_3^- . A partir de F2 jusqu'à la floraison du 4ème bouquet (F4, 4 janvier 2005), les apports azotés ont été différenciés, des solutions contenant 18, 12 et 8mM NO_3^- ont été utilisées. Puis, de F4 jusqu'à la fin de la culture les plants ont été arrosés avec une troisième solution contenant les 3 niveaux d'azote choisis pour l'expérimentation : 12, 6 et 4 mM NO_3^- (appelé par la suite N12, N6, N4). Les 3 traitements azotés ont été répétés dans chaque compartiment.

La température moyenne mesurée entre le 16 novembre et le 31 juillet était de 21,6°C de jour et 16,9°C la nuit, avec respectivement une humidité relative de 76% et 82.7%. Il n'y a pas eu d'effet du compartiment sur les conditions climatiques. La température de l'air a été mesurée toutes les minutes, et des valeurs moyennes ont été calculées pour la période entre l'anthèse et la récolte de chaque bouquet. La température maximale correspond à la moyenne des températures maximales journalières mesurées entre l'anthèse et la récolte du bouquet considéré. L'intensité lumineuse (W.m^{-2}) a été mesurée au dessus des plants sous la serre pendant le développement des fruits (Pyranometer, Kipp and Zonen, Le Plessis Trevisé, France).

d) Caractérisation du microclimat du fruit

L'effet de la nutrition azotée sur la lumière qui arrive aux fruits a été étudié en mesurant la fraction de trouée (gap fraction) au niveau des fruits, tous les deux bouquets, depuis le sommet jusqu'à la base des plants. Le rayonnement arrivant aux fruits est estimé par des photos hémisphériques, prises le 7 avril 2005 au niveau des fruits et orientée vers le ciel. A cette date, au sommet des plants, le seizième bouquet était au stade anthèse, et à la base, les fruits du bouquet 6 avaient été récoltés 3jours plus tôt. Dix photographies hémisphériques ont été prises par traitement, l'objectif étant positionné au niveau du premier fruit des bouquets 6, 8, 10, 12 et 14 (Nikon, 4500, fisheye lens). Pour chaque photo, la fraction de trouée a été

Dates de récoltes	Bouquet	Température de l'air moyenne en °C	Température maximale moyenne en °C	Rayonnement moyen en W/m ²
24-févr	2	17 ±0,9	22 ±1,7	746 ±304
4-avr	6	18 ±0,8	24 ±2,5	1220 ±470
9-mai	11	18 ±1,2	25 ±3,2	1327 ±456
30-mai	14	19 ±1,5	26 ±3,3	1242 ±438
4-juil	19	22 ±2,5	29 ±3,2	1317 ±252

Tableau 22 : Conditions climatiques pendant le développement des fruits de l'anthèse à la récolte pour chaque bouquet. Les données sont issues d'une station météo placée dans chaque compartiment, les températures (°C) ont été relevées toutes les minutes, une moyenne a été calculée pour la période de développement des fruits afin d'obtenir une température moyenne de l'air. La température maximale correspond à la moyenne des Tmax journalières de l'anthèse jusqu'à la récolte. L'intensité lumineuse (W.m⁻²) a été mesurée au dessus des plants sous la serre pendant le développement des fruits. Les données sont des moyennes ± ET.

estimée en utilisant le logiciel Can-Eye (http://www.avignon.inra.fr/can_eye). Ce logiciel permet le calcul de la fraction de trouée à partir des images en couleurs, en séparant les éléments verts (la végétation), des trouées (*ie* les autres éléments présents que ça soit le ciel, ou la structure de la serre). Le pourcentage de pixels mixtes (végétation et ciel confondus) était inférieur à 3%. La fraction de trouée bidirectionnelle a été estimée sur une gamme d'angles zénithaux allant de 0 à 60° avec une résolution angulaire de 2.5° et sur les angles azimutaux entre 0 et 360° avec une résolution de 5°. La fraction de trouée a ensuite été intégrée sur les directions azimutales et zénithales, pour obtenir une valeur moyenne de fraction de trouée pour chaque photo réalisée à une position de fruit donnée et pour un traitement donné. Une analyse de variance sur ces intégrations a permis de déterminer l'impact de la position des fruits et de la nutrition azotée.

e) Récolte, échantillonnage, préparation des échantillons et mesure physique

La croissance des plants a été quantifiée sur 6 plants par mois et par traitement (2 par compartiments) en pesant la quantité la matière sèche produite par les parties aériennes. Les limbes, rachis, tiges, pédoncules et fruits ont été isolés et séchés dans une étuve à 80°C pendant 1 semaine. La matière sèche des fruits a été calculée sur un échantillon par différence de poids avant et après la lyophilisation. Les feuilles issues de l'effeuillage, et les récoltes intermédiaires ont été prises en considération.

Lors de la culture les fruits étaient récoltés deux fois par semaine de février à juillet. Quatre lots de six plants par compartiment et par traitement ont été constitués pour calculer les rendements de la culture, en kg.m⁻². Le rendement commercial correspond au poids total des fruits pouvant être commercialisé, alors que le rendement en grappe correspond au poids des fruits pouvant être vendu en type grappe.

Cinq récoltes ont été conservées pour les analyses biochimiques, environ une par mois. Chaque récolte correspond à un ensemble de fruits récoltés sur des bouquets précis : 2, 6, 11, 14 et 19 (nommé B2 à B19) respectivement récoltés le 2 février, 4 avril, 9 mai, 30 mai et 4 juillet (Figure 33). Les conditions climatiques moyennes pour chaque bouquet récolté (depuis l'anthèse jusqu'à la récolte) sont présentées dans le tableau 22.

A chacune de ces récoltes, 3 lots de 10 fruits au stade orange-rouge (7-8 OCDE), ont été échantillonnés. Les paramètres physiques des fruits à la récolte (couleur externe, fermeté,

et poids moyen) ont été mesurés. La couleur des fruits a été déterminée à l'aide d'un colorimètre (Minolta Chromameter CR300, Minolta, France SA) qui exprime la couleur sous forme chiffrée à l'aide de 3 paramètres : L^*a^*b . L correspond à la luminosité du fruit, a est un indice de coloration variant du vert au rouge et b un indice de coloration variant du bleu au jaune. Deux relevés de fermeté par fruit ont été effectués, sur deux côtés opposés et à mi-hauteur des parties proximales et distales, avec un duromètre (durofel, COPA-technologie SA, St Etienne du Grès, France), muni d'une sonde de 5mm de diamètre. La fermeté est comprise entre 0 (mou) et 100 (dur). Puis les fruits sont coupés en quatre et deux quartiers opposés ont été congelés dans l'azote liquide et conservés au congélateur à - 80 avant d'être broyés dans l'azote liquide, puis lyophilisés. Une fois les échantillons lyophilisés, les teneurs MS ont été déterminés, et la composition en polyphénols, en carbone et azote totaux ont été analysés.

f) Analyses statistiques

Les différents paramètres ont été comparés en réalisant une analyse de variance à deux facteurs en considérant l'apport en azote, la date de récolte et les interactions entre ces deux facteurs. Les analyses statistiques ont été effectuées sous SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC) ou avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France), au seuil $\alpha=5\%$. Les tests de comparaison de moyenne correspondaient au test de Newman and Keuls.

B/ Culture effectuée en phytotron avec le cv Microtom

a) Conditions de culture

Deux cultures hydroponiques en conteneurs ont été réalisées à Nancy en phytotron, avec le cv Microtom. Les graines ont germé en terre puis, les plants ont été transférés en hydroponie au stade 2-3 feuilles (environ 1mois après le semis). Le descriptif du système de culture, et la composition des solutions nutritives ont été détaillés dans les chapitre III et IV.

La photopériode était de 14h, la température comprise entre 23-25°C de jour et 18-20°C la nuit, et l'humidité relative de 75% de jour et 70% la nuit. Les rayonnements photosynthétiquement actifs (PAR) moyens étaient compris entre 250 et 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La première culture a été réalisée durant l'été 2006 dans des conteneurs de 20L qui comprenaient 5 plants. Puis la deuxième année, été 2007, des conteneurs de 2L contenant 1

plant ont été utilisées (Figure 12D). Lors de cette deuxième expérimentation les plants ont été taillés à 7 bouquets floraux d'environ 3 fruits, afin de limiter la compétition pour le carbone et d'homogénéiser le calibre des fruits.

Dès le passage en hydroponie, 4 solutions nutritives ont été apportées aux plants : une solution riche 7mM NO_3^- , deux intermédiaires 3 et 1mM NO_3^- , et une solution limitante 0,5mM NO_3^- pour la croissance des plantes.

b) Récolte et échantillonnage

Les fruits ont été récoltés au stade rouge (8-9 OCDE) au fur et à mesure de la culture. Les premières récoltes ont eu lieu 8 semaines après le passage en hydroponie, et les fruits ont été récoltés pendant environ 1 mois. Une récolte correspondait à un lot de fruits au même stade de maturation, récoltés sur une même plante. Par conséquent les récoltes ne correspondaient pas à un nombre de jours de culture, ni à un nombre précis de fruits.

Au moment de la récolte, les fruits ont été comptés, pesés, nettoyés à l'eau distillée, puis plongés dans l'azote liquide où ils ont été broyés dans un mortier (pour permettre une lyophilisation correcte), puis conservés à -20°C avant d'être lyophilisés. Après la lyophilisation la matière sèche a été pesée, puis les échantillons ont été broyés au broyeur à bille pour permettre la quantification des teneurs en polyphénols, ainsi que celles du carbone et de l'azote. Le rendement en fruit frais a été déterminé à partir de la masse (en gramme) de fruits récoltés pour un même niveau de fertilisation et par plante.

c) Analyses statistiques

Les traitements statistiques des données ont été effectués sous SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC) ou avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France). Des analyses de variance sur les concentrations moyennes ont été faites en fonction du niveau d'azote apporté, de la date de récolte et des interactions entre ces deux facteurs. Pour les valeurs significatives ($\alpha=5\%$), des comparaisons multiples a posteriori ont été menées à l'aide du test de Tukey.

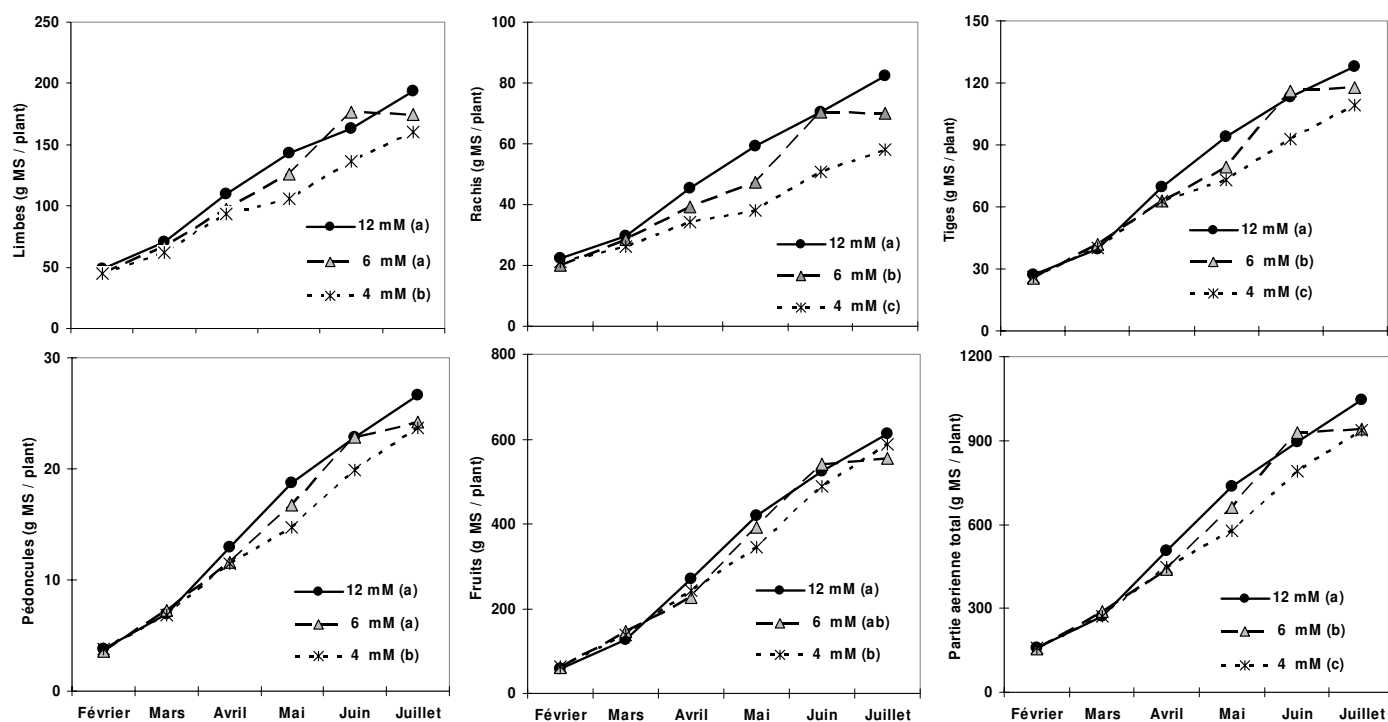


Figure 34 : Accumulation de matière sèche dans les limbes, rachis, tiges, pédoncules, fruits et l'ensemble des parties aériennes, entre février et juillet, selon la nutrition azotée (4, 6 et 12 mM NO_3^-). Les valeurs sont des moyennes obtenues en récoltant 6 plantes par mois et par traitement. L'effet de la date de récolte, de la nutrition azotée et de leur interaction a été déterminé par une analyse de variance. L'effet de la date de récolte et du traitement azoté a toujours été significatif ($P < 0,001$), le test a posteriori de Newman-Keuls a été utilisé, les lettres différentes sur chaque graphique indiquent les différences ($\alpha 5\%$) entre les traitements azotés.

Azote (NO_3^-)	%MS alloué par partie par rapport à la MS total				
	limbes	petioles	rafles	fruits	tiges
12 mM	22,4	9,6	2,5	51,6	13,9
6 mM	21,8	9,0	2,5	52,9	13,7
4 mM	20,8	8,3	2,5	54,8	13,6

Tableau 23 : Pourcentage de matière sèche alloué respectivement aux limbes, pétioles, rafles, fruits et tiges par rapport à la matière sèche totale de la plante sur toute la durée de culture. Les données sont des moyennes des prélèvements mensuels, effectuées entre février et juillet.

II Effet de la nutrition azotée sur la qualité visuelle, gustative et nutritionnelle de la tomate cv Clotilde.

A/ Impact de la nutrition azotée sur le développement des plantes et le rayonnement arrivant aux fruits

La matière sèche produite par les parties aériennes sur tout le cycle de culture, a été significativement réduite lorsque les apports en azote ont été réduits de 12 à 4 mM de NO_3^- (Figure 34). A la fin de l'expérimentation, en juillet, le plus faible apport d'azote (4 mM) conduit à une diminution de 10% de la matière sèche aérienne par rapport à 12 mM. Cela est dû à une diminution de la masse sèche végétative, en particulier les rachis (-29%), les limbes (-17%) et les tiges (-15%). La masse sèche des pédoncules a également été réduite de 11%, alors que la masse de fruits a été réduite de seulement 4%.

Le fruit est l'organe de la plante qui représente le plus de MS, et le pourcentage de matière sèche alloué au fruit a été d'autant plus important que la nutrition azotée était faible (Tableau 23). En parallèle le pourcentage de MS des limbes, tiges, et pétioles, par rapport à la MS totale des plantes a diminué.

Ces changements dans l'accumulation de masse sèche dans les parties aériennes ont également provoqué des changements au niveau de l'éclairement des fruits, qui a été évalué par la mesure de la fraction de trouée (Figure 35). La pénétration de la lumière a diminué, depuis le sommet jusqu'à la base des plantes. En effet, la fraction de trouée au niveau du bouquet 14, en haut des plantes, est plus importante que pour le bouquet 6 placé à la base des plantes. De plus, la diminution des apports en azote a eu un impact significatif sur l'évolution de la fraction de trouée. En effet, la diminution de la nutrition azotée a induit une augmentation de la pénétration de la lumière (fraction de trouée plus importante) pour les fruits jeunes (B14), en croissance (B10 et B12) et en maturation (B6 et B8).

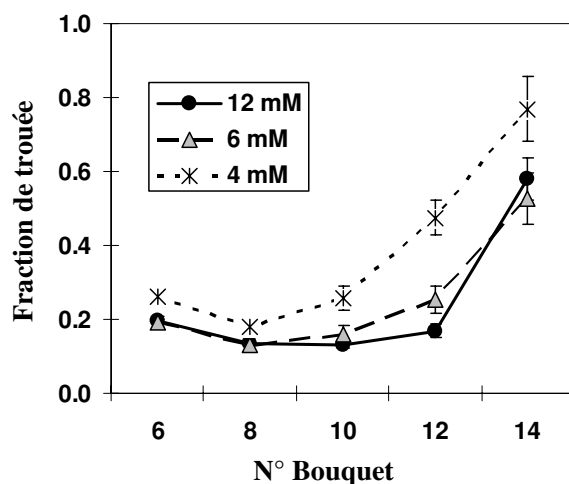


Figure 35 : Fractions de trouée pour chaque numéro de bouquet, *ie* la pénétration de la lumière à travers le feuillage jusqu'au fruit, suivant les milieux azotés. Les valeurs sont des moyennes \pm ET, calculées avec des photographies hémisphériques et interprétées par le logiciel Can-Eye.

Mois de récolte	Rendement		
	Azote (NO_3^-)	grappe ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	Rendement commercial ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)
Février	12 mM	0,900 e	1,072 d
	6 mM	1,089 e	1,271 d
	4 mM	1,013 e	1,182 d
Mars	12 mM	3,592 d	4,096 c
	6 mM	3,282 d	3,825 c
	4 mM	3,396 d	3,793 c
Avril	12 mM	3,585 d	4,154 c
	6 mM	3,658 d	4,156 c
	4 mM	3,391 d	4,000 c
Mai	12 mM	6,730 a	6,960 a
	6 mM	6,802 a	6,900 a
	4 mM	5,810 bc	5,943 b
Juin	12 mM	5,609 bc	6,119 b
	6 mM	5,643 bc	5,982 b
	4 mM	6,085 ab	6,349 ab
Juillet	12 mM	4,993 c	5,504 b
	6 mM	5,303 bc	5,642 b
	4 mM	4,199 d	4,542 c
Effet azote		(*)	*
Effet bouquet		***	***
Interaction		(*)	*

Tableau 24 : Rendements (kg/m^2) en grappe et commercial calculés mensuellement entre février et juillet pour les trois milieux azotés. Les valeurs sont des moyennes, calculées sur des fruits récoltés deux fois par semaine entre février et juillet. NS, non significatif, *ie* $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0.05$) selon le test de Newman-Keuls.

B/ Impact de la nutrition azotée sur les rendements de la culture et les caractéristiques des fruits

Tous ces paramètres présentent de fortes variations suivant la date de récolte. La diminution des apports en azote a induit une diminution significative du rendement commercial, d'environ 7.5% sur l'ensemble de la culture (Tableau 24). Le rendement en grappe a été plus faiblement affecté ($P < 0.1$), sur toute la culture ce rendement a été d'environ 25 kg.m⁻². Il faut noter que ces différences significatives suivant les apports en azote n'apparaissent qu'en fin du cycle de culture. De plus nous n'avons pas observé de différences significatives entre les plantes recevant 6 ou 12mM de NO₃⁻.

La couleur des fruits n'a pas été modifiée par les apports en azote, seules les dates de récoltes ont eu un effet significatif (Tableau 25). Par contre par la nutrition azotée a eu un effet significatif sur la fermeté, le poids moyen et les teneurs en MS des fruits. La diminution des apports en azote a induit une diminution du poids moyen et de la fermeté des fruits, des différences significatives ont pu être observées respectivement pour les bouquets 11 et 19 suivant le test de Newman-Keuls. A l'inverse, les teneurs en matière sèche ont été augmentées lorsque l'apport d'azote a été réduit (4 mM) comparativement à 6 ou 12 mM, et ce de façon significative dans le bouquet 14 (tableau 25).

Date de récolte	Bouquet	Azote (NO ₃ ⁻)	Poids moyen des fruits (g)		% MS fruit		Fermeté (DURO)		Couleur : L		Couleur : A		Couleur : B	
24-fev	2	12 mM	121,43	de	4,96	bc	81,11	a	40,30	a	18,07	d	17,83	d
		6 mM	113,92	e	5,03	bc	79,78	ab	40,31	a	17,88	d	17,95	d
		4 mM	114,20	e	5,38	ab	79,03	abc	39,63	abc	17,43	de	17,14	d
4-avr	6	12 mM	133,35	bcd	4,60	cd	80,24	ab	38,82	cd	16,85	de	17,88	d
		6 mM	140,81	ab	4,75	cd	78,03	abcd	38,53	d	16,02	e	17,46	d
		4 mM	139,19	abc	5,10	bc	80,40	ab	38,49	d	13,97	f	17,17	d
9-mai	11	12 mM	150,65	a	5,00	bc	78,20	abcd	38,79	cd	17,30	de	19,46	c
		6 mM	134,73	bcd	4,98	bc	76,24	cde	39,04	cd	18,18	d	19,96	bc
		4 mM	130,71	bcd	5,34	ab	77,26	bcd	39,30	bcd	18,52	d	20,08	bc
30-mai	14	12 mM	140,20	ab	5,05	bc	75,58	def	38,83	cd	19,76	c	19,90	bc
		6 mM	141,97	ab	5,08	bc	74,07	efg	38,71	d	19,93	c	20,27	bc
		4 mM	134,57	bcd	5,56	a	73,30	fg	38,94	cd	20,19	c	20,83	b
4-juil	19	12 mM	128,36	bcd	4,66	cd	71,68	g	40,23	a	21,82	a	22,73	a
		6 mM	129,16	bcd	4,34	d	67,26	h	39,97	ab	22,12	b	22,46	a
		4 mM	123,06	cde	4,38	d	67,41	h	40,33	a	23,77	b	23,02	a
Effet azote			*		***		***		NS		NS		NS	
Effet bouquet			***		***		***		***		***		***	
Interaction			*		*		(*)		NS		***		*	

Tableau 25 : Caractéristiques du fruit : poids moyen (g), teneur en matière sèche (g MS pour 100g MF), fermeté, et couleur suivant les milieux de culture et les dates de récolte. Les valeurs sont des moyennes. Le poids moyen, la fermeté et la couleur ont été déterminées sur les fruits récoltés sur les bouquets B2, 6, 11, 14 et 19; et la teneur en matière sèche sur des fruits récoltés entre février et juillet. NS, non significatif, ie $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives ($P < 0.05$) selon un test de Newman-Keuls.

Bouquet	Azote (NO ₃ ⁻)	%N	%C	C/N	
2	12 mM	2,242	39,495	a	17,71
	6 mM	2,185	39,426	a	18,23
	4 mM	1,973	39,644	a	20,14
6	12 mM	1,830	38,746	a	21,36
	6 mM	1,673	39,082	a	23,45
	4 mM	1,479	39,761	a	28,33
11	12 mM	1,936	39,006	a	22,12
	6 mM	1,945	39,470	a	23,37
	4 mM	1,601	40,598	a	25,63
14	12 mM	2,016	39,517	a	21,97
	6 mM	1,397	39,892	a	31,07
	4 mM	1,600	40,452	a	26,86
19	12 mM	1,700	39,418	a	24,67
	6 mM	1,296	39,503	a	34,15
	4 mM	1,885	39,626	a	39,47
Effet azote		NS	*	NS	
Effet bouquet		NS	NS	NS	
Interaction		NS	NS	NS	

Tableau 26 : Composition en azote (%N), carbone (%C) totaux et ratio C/N des fruits cv Clotilde cultivés sur trois milieux azotés (4, 6 et 12mM NO₃⁻). Les valeurs sont des moyennes pour 100g MS. NS, non significatif, ie P > 0.1. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives (P<0.05) selon un test de Newman Keuls.

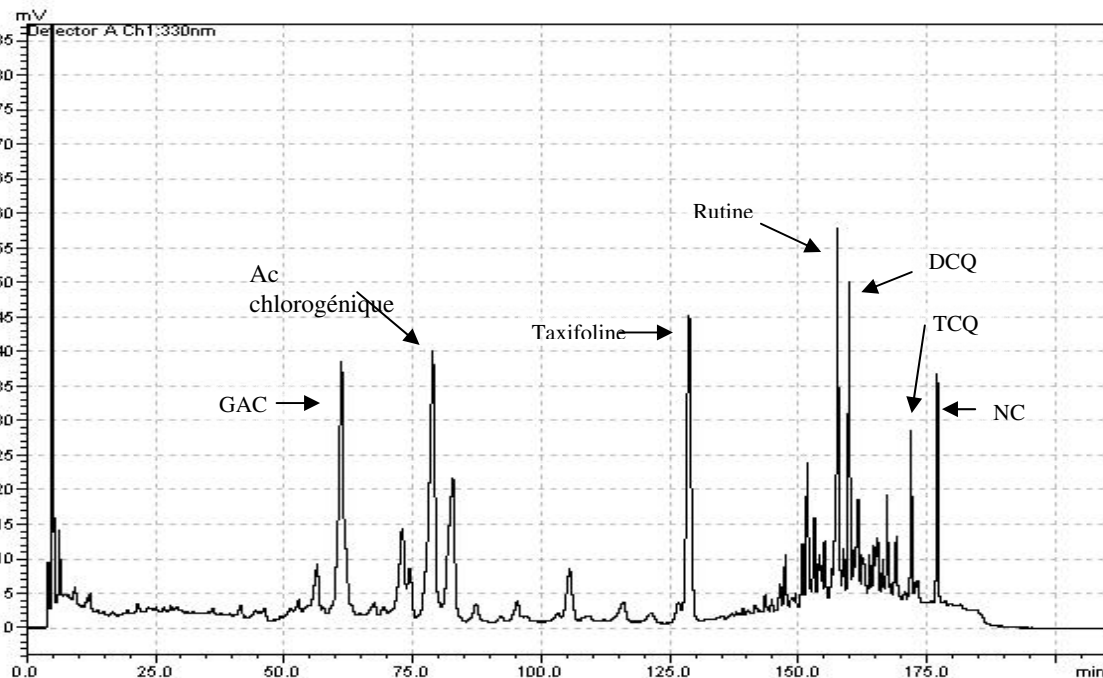


Figure 36 : Chromatogramme HPLC, d'un extrait de fruit de la variété Clotilde, à la longueur d'ondes 330nm. Les composés représentés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique, la taxifoline (étalon interne), la rutine, des acides di et tricafeoylquinique (DCQ et TCQ), et la naringine chalcone (NC).

Bouquet	Azote (NO ₃ ⁻)	GAC	Rutine	Chloro	DCQ	TCQ	NC
2	12 mM	0,167 e	0,188 abc	0,204 cde	0,097 bcd	0,087 a	0,082 bc
	6 mM	0,178 de	0,175 abc	0,196 cde	0,094 bcd	0,084 a	0,115 a
	4 mM	0,183 de	0,135 c	0,154 e	0,088 cd	0,085 a	0,084 b
6	12 mM	0,176 de	0,166 bc	0,185 de	0,093 d	0,085 a	0,094 e
	6 mM	0,214 de	0,137 c	0,152 e	0,073 d	0,091 a	0,058 de
	4 mM	0,259 d	0,176 abc	0,125 e	0,107 bcd	0,079 a	0,057 de
11	12 mM	0,366 c	0,134 c	0,285 bc	0,080 d	0,069 a	0,055 e
	6 mM	0,345 c	0,123 c	0,246 bcd	0,089 cd	0,073 a	0,055 e
	4 mM	0,415 bc	0,148 c	0,316 b	0,098 bcd	0,080 a	0,061 cde
14	12 mM	0,456 b	0,149 c	0,416 a	0,077 d	0,075 a	0,062 bcde
	6 mM	0,528 a	0,149 c	0,392 a	0,081 d	0,077 a	0,071 bcde
	4 mM	0,572 a	0,267 ab	0,432 a	0,099 bcd	0,081 a	0,079 bcd
19	12 mM	0,150 e	0,236 abc	0,204 cde	0,124 b	0,083 a	0,082 bc
	6 mM	0,177 de	0,241 abc	0,210 cde	0,121 bc	0,078 a	0,070 bcde
	4 mM	0,164 e	0,294 a	0,269 bc	0,158 a	0,091 a	0,069 bcde
Effet azote		**	*	NS	***	NS	*
Effet bouquet		***	***	***	***	NS	***
Interaction		NS	*	(*)	NS	NS	**

Tableau 27 : Concentrations (mg/g MS) en composés phénoliques dans les fruits de tomate en fonction des milieux de culture (4, 6 et 12mM NO₃⁻) et des bouquets récoltés B2, 6, 11, 14 et 19. Les dérivés hydroxycinnamiques et la NC sont exprimés en équivalent d'acide chlorogénique (mg d'acide chlorogénique par g de MS), la rutine est exprimée en mg rutine par g de MS. Les composés quantifiés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique, la rutine, des acides di et tricafeylquinique (DCQ et TCQ), et la naringenine chalcone (NC). NS, non significatif ; (*), P < 0.1; *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives (P<0.05) selon un test de Newman-Keuls.

C/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote

La nutrition azotée n'a pas significativement influencé les teneurs en N des fruits, qui sont faibles, environ 2% (Tableau 26). Les teneurs en carbone, environ 40%, ont été légèrement plus importantes pour les fruits récoltés sur le milieu 4mM. De la même façon, le ratio C/N était plus important, mais de façon non significative, chez les fruits récoltés sur les plantes ayant poussé sur le milieu le plus pauvre en azote.

Les fruits de tomate contiennent une grande diversité de composés phénoliques, chez la variété Clotilde, les composés majoritaires sont un glucoside de l'acide caféique, l'acide chlorogénique, la rutine, deux dérivés de l'acide caféique (DCQ et TCQ) et la naringénine chalcone (Figure 36).

L'effet des apports en azote a été moins important que l'effet du bouquet sur l'évolution des teneurs en composés phénoliques, et de façon surprenante peu d'interactions ont été observées (Tableau 27). Le GAC, la rutine et l'acide chlorogénique étaient les composés phénoliques les plus abondants dans les fruits de Clotilde (Figure 36). Leur concentration a varié au cours de la saison, les teneurs en CAG et en acide chlorogénique ont été maximales dans le 14^{ème} bouquet (respectivement 0,5 et 0,4 mg /g MS), tandis que la teneur en rutine a été maximale dans le bouquet 19 (un peu moins de 0,3 mg /g MS). Les fruits récoltés sur les plantes cultivées avec le plus faible apport d'azote ont eu tendance à avoir des concentrations plus importantes en composés phénoliques. Cependant l'impact de la nutrition azotée n'a pas été significatif pour le premier bouquet récolté. Par la suite, les teneurs en rutine, en naringénine chalcone, en acide chlorogénique et des dérivés d'acide caféique (CAG, DCQ et TCQ) ont augmenté en réduisant les apports en azote. Nous avons observé un effet significatif de la diminution des apports en azote pour le CAG et la rutine dans le bouquet 14 et pour le DCQ dans le bouquet 19.

D/ Conclusions

Lors de cette étude nous avons observé un effet bénéfique d'une diminution modérée de la nutrition azotée : de 12 à 6mM NO_3^- , sur la qualité fruit. Pour le producteur, la diminution des apports d'azote n'a pas engendré de perte de rendement et les fruits étaient de même calibre. Pour le consommateur, la qualité visuelle n'a pas été affectée puisque la couleur et dans une moindre mesure la fermeté n'ont pas été modifiées. Le contenu en polyphénols a été affecté par la nutrition azotée, les concentrations des composés pour un bouquet particulier tendent à être plus importante lors d'apports en azote plus faible. Cependant nous n'avons pas mis en évidence des augmentations régulières et significatives.

Pour des apports en azote plus faible nous avons observé une augmentation des teneurs en MS des fruits et de façon générale une modification de la répartition de la MS au bénéfice des fruits. En effet le développement végétatif de la plante a été diminué, ce qui a eu pour conséquence entre autres, d'augmenter la fraction de trouée et donc l'arrivée de lumière au niveau des fruits. Ainsi le microclimat au niveau du fruit a pu être modifié par le niveau de fertilisation. De plus les analyses statistiques ont révélé un effet du bouquet *ie* la date de récolte, parfois plus important que le traitement azoté, notamment sur les teneurs en polyphénols. Deux paramètres peuvent expliquer cet effet bouquet : l'âge de la plante, et les conditions climatiques qui ont pu différer lors du développement de ces bouquets.

Il semble donc pertinent d'effectuer d'autres expérimentations en conditions de lumière et de température constantes (en phytotron), pour s'affranchir des conditions de culture et isoler l'effet de la nutrition azotée. Nous avons vu dans la bibliographie qu'il existait des variations des contenus en polyphénols relatives aux génotypes. Nous avons donc également voulu étudier le comportement d'un autre cultivar, Microtom, face à une diminution des apports en azote.



Figure 37 : Plants de Microtom cultivés (en 2007) depuis 15 jours en hydroponie, sur des milieux contenant, de gauche à droite, 0,5, 1, 3 et 7 mM NO_3^- .

Microtom 2007				
Azote (NO_3^-)	nb fruits	rdt FR	poids moy	%MS
7 mM	20,2	107,1	5,30	8,82
3 mM	18,4	103,8	5,64	8,78
1 mM	20,6	107,5	5,22	8,94
0,5 mM	17,4	82,3	4,73	8,72
Effet azote	NS	NS	NS	NS

Tableau 28 : Nombre moyen de fruits par plant, rendement en fruits rouges (en g/plant), poids moyen (g), et pourcentage de MS des fruits, suivant la nutrition azotée (7, 3, 1 et 0.5mM) lors de la culture hydroponique de Microtom en phytotron en 2007. Les valeurs sont des moyennes calculées sur toute la période de culture pour 5 plantes par milieux. NS, non significatif.

III Impact de la nutrition azotée en conditions contrôlées sur le cv Microtom

Dans le cadre de cette étude, des plants de tomate cv Microtom ont été cultivées sur le système de culture hydroponique en conteneur, en phytotron. Quatre niveaux de fertilisation azotée ont été fournis aux plants : 0.5, 1, 3 et 7mM. Les fruits rouges ont été analysés, leur récolte ayant été effectuée au fur et à mesure de la culture.

Cette expérimentation a été menée deux années de suite, les résultats ayant été similaires les résultats de la deuxième expérimentation (été 2007) sont détaillés, ceux de la première (été 2006) sont fournis dans l'annexe 5.

A/ Impact de la nutrition azotée sur la croissance des plantes

Lors de la première culture (été 2006), la floraison et la mise à fruit ont été plus précoces sur le milieu le plus pauvre (0.5mM). Par contre lors de la deuxième culture, la floraison a d'abord été observée sur le milieu riche contenant 7mM NO_3^- , suivie de près par les autres milieux. Pour les deux cultures, les récoltes ont eu lieu en premier sur le milieu à 0,5 mM, et peu de jours après de façon indifférente suivant les milieux.

Les différences de développement végétatif ont été observables après environ 15 jours de culture (Figure 37). Les plantes cultivées sur le milieu à 7 mM sont plus grandes et plus fournies en feuilles que les plantes des milieux contenant 3mM et 1mM, la différence étant particulièrement importante avec le milieu à 0,5mM dont les plantes étaient aussi plus cassantes.

Il faut noter que Microtom présente une croissance déterminée et un port buissonnant, qui a été plus marqué lors de la première année de culture les plantes disposant alors de moins d'espace pour se développer. En outre la succession et l'organisation des grappes de fruits ne suivent pas un schéma architectural régulier.

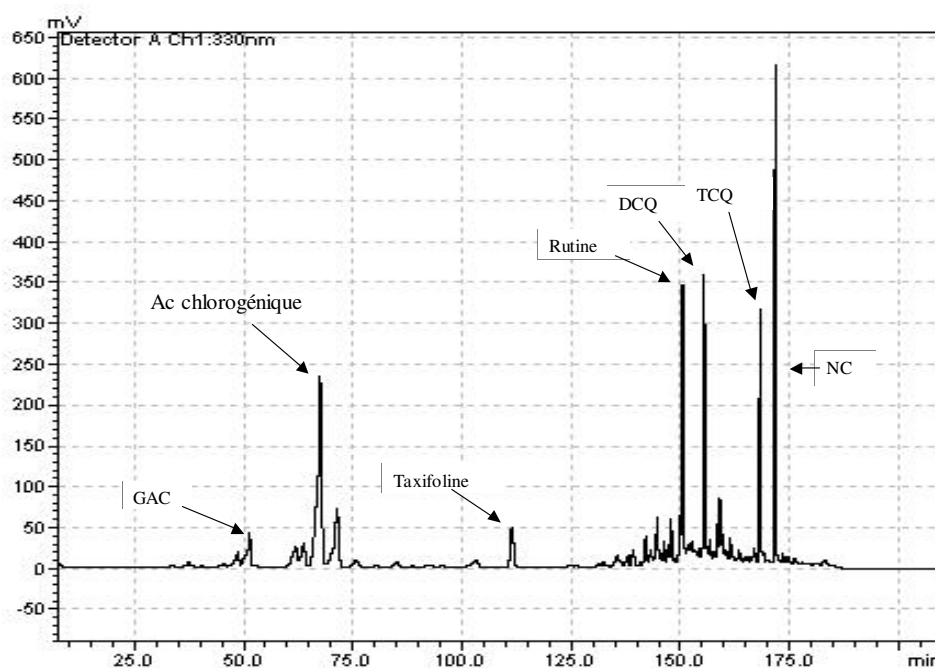


Figure 38 : Chromatogramme HPLC, d'un extrait de fruit rouge de la variété Microtom (culture de 2006), à la longueur d'ondes 330nm. Les composés représentés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique, la taxifoline (étalon interne), la rutine, des dérivés de l'acide caféique (DCQ, TCQ), et la naringenine chalcone (NC).

Récolte	Azote (NO_3^-)	%N	%C	C/N
R1	7 mM	2,21	42,75	19,53
	3 mM	2,06	43,08	21,04
	1 mM	2,28	43,02	19,05
	0,5 mM	2,41	41,99	17,45
R4	7 mM	2,18	41,61	19,13
	3 mM	2,13	42,39	20,38
	1 mM	2,36	42,20	17,91
	0,5 mM	2,01	42,71	21,79
Effet azote		NS	NS	NS
Effet récolte		NS	NS	NS
interaction		NS	NS	NS

Tableau 29 : Composition en azote (%N), carbone (%C) totaux et ratio C/N dans les fruits de Microtom (2007) en fonction de la nutrition azotée (0,5, 1, 3 et 7mM NO_3^-) pour les récoltes 1 et 4. Les valeurs sont des moyennes pour 100gMS. NS, non significatif.

B/ Impact de la nutrition azotée sur les rendements de la culture et les caractéristiques des fruits

La réduction des apports azotés de 7 à 0,5 mM de NO_3^- n'a pas eu d'effet significatif sur le rendement en fruits rouges, le poids moyen des fruits, et leur teneur en MS pour les deux cultures (Tableau 28). Il faut tout de même noter que le rendement et le nombre de fruits a été plus faible pour les plantes cultivées sur le milieu à 0,5mM.

Visuellement, il n'a pas été observé de différence de couleur entre les fruits.

Le poids moyen des fruits et leur teneur en MS ont été plus importants en 2007 qu'en 2006 ; mais inversement le nombre de fruits récolté a été plus faible (Annexe 5 et Tableau 28).

C/ Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en composés phénoliques, en carbone et azote

L'augmentation des apports en azote dans la solution nutritive ne s'est pas répercutée sur la teneur en azote ou en carbone des fruits, ni sur le ratio C/N (Tableau 29). Les teneurs en azote et en carbone étaient respectivement d'environ 2,2 % et 42,5 %.

Les principaux composés phénoliques observés dans les fruits du cv Microtom ont été la rutine et la naringénine chalcone (Figure38) respectivement quantifiées à 4,4 et 6,4mg/g MS. Les concentrations en acide chlorogénique ont été comprises entre 0,3 et 1 mg/g MS.

En 2007, l'effet de la date de récolte a été globalement non significatif, comme celui de l'azote, et peu d'interactions entre ces deux facteurs ont été révélées (Tableau 30). Cependant la nutrition azotée a eu un effet significatif à 10% sur les teneurs en rutine et acide chlorogénique. Cet effet a été plus important en 2006 en affectant significativement les teneurs en NC et en DCQ, et celle de la rutine à 10%.

Pour les deux cultures, nous n'avons pas mis en évidence d'évolution particulière des composés phénoliques en réponse à la nutrition azotée (Tableau 30, annexe 5). En 2007, lors de la première récolte les teneurs en CAG, Chloro, Rutine et NC ont été légèrement plus importante sur le milieu pauvre en azote, cette tendance a été conservée pour la rutine pour les autres récoltes mais variables pour les autres composés (Tableau 30).

Récolte	Azote (NO ₃ ⁻)	CAG	Chloro	Rutine	NC
R1	7 mM	0,094 a	0,384 c	1,366 a	3,018 ab
	3 mM	0,089 a	0,401 bc	1,132 a	2,604 ab
	1 mM	0,108 a	0,498 abc	1,292 a	3,311 ab
	0,5 mM	0,109 a	0,551 abc	1,410 a	4,067 ab
R2	7 mM	0,119 a	0,777 ab	1,271 a	3,458 ab
	3 mM	0,130 a	0,507 abc	1,189 a	6,089 a
	1 mM	0,118 a	0,481 abc	1,097 a	3,010 ab
	0,5 mM	0,099 a	0,401 bc	1,676 a	2,288 b
R3	7 mM	0,138 a	0,599 abc	1,009 a	2,708 ab
	3 mM	0,112 a	0,598 abc	1,026 a	4,353 ab
	1 mM	0,115 a	0,614 abc	0,951 a	3,341 ab
	0,5 mM	0,098 a	0,300 c	1,192 a	3,616 ab
R4	7 mM	0,140 a	0,550 abc	1,277 a	4,159 ab
	3 mM	0,120 a	0,488 abc	1,338 a	2,418 ab
	1 mM	0,129 a	0,807 a	0,941 a	3,884 ab
	0,5 mM	0,088 a	0,618 abc	1,790 a	3,125 ab
Effet azote		NS	(*)	(*)	NS
Effet récolte		NS	(*)	NS	NS
Interaction		NS	**	NS	*

Tableau 30 : Concentrations (mg/g MS) en composés phénoliques dans les fruits de tomate cv Microtom (2007) en fonction des milieux de culture (0,5, 1, 3 et 7mM NO₃⁻) pour les récoltes 1, 2, 3 et 4. Les dérivés hydroxycinnamiques et la NC sont exprimés en équivalent d'acide chlorogénique (mg d'acide chlorogénique par g de MS), la rutine est exprimée en mg rutine par g de MS. Les composés quantifiés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique (Chloro), la rutine, et la naringenine chalcone (NC). NS, non significatif ; (*), P < 0.1; *, P < 0.05; **, P < 0.01. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives (P<0.05) selon un test de Tukey.

D/ Conclusions

La diminution de la fertilisation azotée sur ce cultivar ornemental (Microtom) s'est répercutée sur la croissance des plantes, les plantes poussant sur le milieu à 0,5mM étant plus fragiles et petites. La floraison et la production de fruits ont également été modifiées mais pas le rendement ni le poids moyen des fruits.

Sous ces conditions constantes de lumière et de température, nous n'avons pas observé d'effet important de la date de récolte, contrairement à ce qui avait été observé lors de la culture sous serre. Par contre nous n'avons pas mis en évidence une évolution significative des composés phénoliques, ni des teneurs en C et N des fruits, en réponse à la nutrition azotée. Ces résultats peuvent sembler surprenant à la vue des précédents résultats où l'effet de la nutrition azotée avait été plus marqué. Ils peuvent cependant s'expliquer par les conditions de culture et le cultivar utilisé, ces points seront abordés dans la discussion.

IV Discussion

A/ Effet sur le rendement et la qualité visuelle des fruits

Ces expérimentations ont montré que la fertilisation azotée pouvait être diminuée, de 7 à 0,5 mM en culture hydroponique ou de 12 à 4 mM de NO_3^- en pain de laine de roche sans provoquer d'importants changements dans le rendement. De plus comme cela avait déjà été observé par Warner et al. (2004), la qualité visuelle des fruits (couleur externe) n'a pas été significativement modifiée par la réduction des apports d'azote (Warner *et al*, 2004). Par contre dans notre étude la fermeté a été diminuée. Ainsi la réduction de la fertilisation azotée, tout en maintenant les pratiques culturales habituellement utilisées par les producteurs, semble améliorer les bénéfices des producteurs en limitant les intrants azotés sans affecter le rendement et la qualité extérieure des fruits. Cependant, l'impact de cette pratique n'a jamais été pleinement étudié sur la composition en métabolites secondaires des fruits.

B/ Effet sur la composition en polyphénols des fruits

a) Composition en polyphénols des deux cultivars : Clotilde et Microtom

Lors de notre étude, avec chaque cultivar, la diminution des apports en azote n'a pas induit de modification importante, de la composition qualitative en polyphénols, comme l'apparition d'une nouvelle molécule. Par ailleurs les profils d'élution des molécules obtenus en chromatographie liquide ont été semblables entre ces deux cultivars (Figure 36 et 38). Toutefois nous n'avons identifié que les pics majeurs de ces chromatogrammes et les analyses n'ont été faites qu'à une seule longueur d'onde (330nm). Or les fruits de tomate renferment plusieurs dizaines de composés phénoliques, aux structures, et donc aux caractéristiques d'absorbance, très variées (Moco *et al*, 2006). Il est donc vraisemblable que des différences qualitatives existent entre ces deux cultivars.

Nous avons par contre observé des différences quantitatives entre les cv Clotilde et Microtom. Les concentrations des composés étudiés ont été nettement plus importantes dans les fruits du cv Microtom. Par exemple les concentrations en rutine et en naringénine chalcone

étaient environ 10 fois plus importante, et celle de l'acide chlorogénique environ 3 fois plus importante.

Clotilde est une variété indéterminée qui produit des tomates de type grappe d'environ 100 g alors que Microtom est une variété ornementale dont les fruits sont petits, d'environ 6g. Il a déjà été démontré que les facteurs génétiques étaient déterminants dans la composition chimique des fruits, aussi bien pour le contenu qualitatif que quantitatif en composés phénoliques (Tomas-Barberan et Espin, 2001) et que les tomates de petite taille, comme les tomates cerises étaient plus riches en polyphénols (Hollman et Arts, 2000; Stewart *et al*, 2000; Raffo *et al*, 2002). Cependant dans notre étude cette amplitude peut avoir d'autres explications comme les attaques d'insectes subis par le cultivar Microtom. Ce point sera détaillé ultérieurement.

b) Importance de la lumière et de la température

Lors de la première expérimentation menée sous serre, nous avons vu un effet des conditions extérieures sur la qualité gustative et nutritionnelle des fruits. Le contenu phénolique variait d'une récolte à l'autre, en accord avec les études précédentes relatant un fort impact de la saison (Slimestad et Verheul, 2005; Raffo *et al*, 2006; Toor *et al*, 2006) ainsi que l'influence des conditions de croissance (Dumas Y *et al*, 2003; Dorais *et al*, 2008). Par ailleurs, nous n'avons pas observé une évolution nette des composés phénoliques du fruit en réponse à une diminution des apports en azote, bien que les teneurs de certains composés aient augmenté (GAC, Chloro, Rutine). De la même façon Stewart *et al*. (2001) n'ont pas observé d'accumulation des flavonols dans les fruits de tomate en réponse à une diminution de la nutrition azotée (Stewart *et al*, 2001). Ainsi l'effet de la date de récolte et donc des conditions de lumière et température semble être plus déterminant que l'effet de la nutrition azotée sur les concentrations en composés phénoliques dans les fruits.

Par ailleurs, en modifiant la fertilisation azotée, le microclimat des fruits a été modifié, notamment le rayonnement. En effet, nous avons observé que la croissance végétative a été plus fortement touchée par la réduction d'azote que le développement des fruits. L'augmentation de la fraction de trouée mesurée au niveau des fruits a confirmé l'augmentation du rayonnement reçu par les fruits (ainsi que l'augmentation de la température en raison de l'augmentation du rayonnement infrarouge). Par conséquent, sous de faibles apports en azote, l'augmentation du rayonnement incident et de la température au niveau du fruit sont susceptibles de déclencher des changements dans la composition de fruits. Comme

il a été décrit dans la bibliographie, l'activité ou la synthèse de certaines enzymes-clefs de la voie de biosynthèse des composés phénoliques sont stimulées par la lumière. Par exemple, la transcription de la chalcone synthase (CHS) impliquée au début de la synthèse des flavonoïdes, est stimulée par la lumière (Feinbaum et Ausubel, 1988). Il faut noter que la longueur d'onde de la lumière peut également intervenir. En effet, il a été observé que la lumière rouge stimulait la formation des flavonoïdes (Hunt et Baker, 1980), et que la lumière bleue permettait la sur-expression de la CHS chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* (Lin *et al.*, 1996). Il faut également rappeler que les flavonoïdes comme la rutine agissent comme protecteur contre les UV (Parr et Bolwell, 2000).

La réalisation de cultures en phytotron présentait donc l'avantage de s'affranchir de l'effet de la date de récolte (*ie* de la saison) en se plaçant dans des conditions constantes de lumière et de température. Cependant, même en conditions contrôlées, le développement végétatif des plants a été affecté, nous pouvons donc en conclure que le microclimat des fruits a tout de même été modifié.

c) Etat sanitaire des plantes

Au cours des expérimentations en phytotron, un autre paramètre pourrait avoir modifié les profils et les concentrations en polyphénols : la pression parasitaire. En effet, à partir de la mise à fruit, des aleurodes ont attaqué les cultures. Ainsi en 2006 les plantes ont été sérieusement endommagées, et moins en 2007 l'état sanitaire des plants a été plus tolérable. Lors de la deuxième culture les DCQ et TCQ n'ont pas pu être détectés et quantifiés. De plus, nous avons observé des concentrations en rutine et en naringénine chalcone nettement plus importante pour ces cultures. Or les composés phénoliques, et notamment les flavonoïdes pourraient être impliqués dans la résistance des plantes contre les herbivores (Johnson K S et Felton, 2001; Treutter, 2006). Nous pouvons donc supposer que ces interactions entre la limitation en azote et l'attaque biotique soient à l'origine des différences qualitatives et quantitatives observées sur les espèces chimiques présentes dans les fruits.

d) Considération sur le modèle Microtom

Microtom est une plante ornementale à croissance déterminée. Ces caractéristiques ont posé quelques problèmes pour sa conduite en expérimentation. En effet la croissance des plantes étant moins régulière que celle des variétés utilisées en production, des problèmes

d'homogénéité des plants ont été observés, toutes les plantes n'ont pas eu la même vigueur après le passage en hydroponie, ni la même vitesse ou la même architecture de croissance au cours du cycle de culture. En 2007, les plants transférés en hydroponie étaient plus petits (feuilles et racines) qu'en 2006, la reprise de culture a donc pu être d'autant plus difficile sur le milieu pauvre, ce qui pourrait expliquer l'ordre des floraisons différent selon le milieu de culture. De plus en 2007 les plants avaient plus d'espace pour se développer, ce qui pourrait expliquer leurs ramifications plus nombreuses, et leur aspect moins « buissonnant ».

La croissance déterminée de Microtom, et le fait que l'ordre d'émission des fruits sur la grappe et l'ordre de maturation ne soient pas les mêmes, a également été un problème pour les récoltes. Ainsi notre méthode de récolte n'est pas optimale, il serait bien de récolter un même nombre de fruits par lot, et de prendre en considération des données sur la date de formation des fruits (date anthèse), et leur position sur la grappe. Les variétés à croissance indéterminée établissent des bouquets floraux toutes les trois paires de feuilles par exemple, la maturation des fruits est décalée dans le temps et les fruits peuvent être récoltés sur un bouquet précis, et même choisis en fonction de leur position sur la grappe. La position des fruits à son importance, il a par exemple été démontré que le premier fruit de la grappe peut être considéré comme particulier notamment par sa taille et sa force de puit plus importantes (Bangerth et Ho, 1984). Par contre la différence observée sur le nombre de fruits récoltés entre les deux cultures de Microtom (Annexe 5 et Tableau 28) peut s'expliquer par le fait qu'en 2007 les grappes ont été taillées, afin de limiter la compétition pour le carbone entre les fruits, et homogénéiser les calibres de fruits. C'est aussi pour cette raison que le poids moyen des fruits a été plus important en 2007.

C/ Le fruit organe particulier et protégé

Plusieurs travaux, ainsi que nos propres résultats (Chapitre III et IV), ont mis en évidence une augmentation des teneurs en composés phénoliques, des dérivés hydroxycinnamiques comme l'acide chlorogénique ou des flavonoïdes comme la rutine, dans les feuilles de tomates, en réponse à une diminution des apports en azote (Wilkins R T *et al*, 1996; Stout *et al*, 1998). Sur des jeunes feuilles de tabac, Fritz *et al*. (2006) ont obtenu des concentrations en acide chlorogénique et en rutine respectivement 4 et 10 fois plus importantes en cultivant des plantes sur un milieu contenant 0,2 mM contre 12 mM NO₃⁻ (Fritz *et al*, 2006). Comme nous l'avons évoqué dans la synthèse bibliographique, ces

augmentations sont corrélées à l'induction de gènes codant pour des enzymes clés de la voie de biosynthèse des phenylpropanoïdes (PAL, 4CL, CHS, DFR) (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995; Fritz *et al*, 2006). L'amplitude de variation du contenu en composés phénoliques observée dans notre étude sur les fruits, semble être très faible par rapport aux données précédentes sur les feuilles. La diminution des apports en nitrate semble déclencher un signal chez la plante qui conduit à une régulation complexe du métabolisme azoté dans la feuille (Scheible W. R. *et al*, 1997; Stitt, 1999; Wang Y. H. *et al*, 2001; Urbanczyk-Wochniak et Fernie, 2005), mais peut-être pas dans le fruit. Il ne fait aucun doute que l'azote joue un rôle important sur la synthèse des polyphénols, mais les fruits de tomate semblent être moins affectés et moins réactifs que les feuilles par la nutrition d'azotée, peut-être parce que le fruit est un organe très protégé. En effet, la distribution de la matière sèche dans les fruits semble être une priorité dans le développement de la plante lors d'apport d'azote réduit. Le pourcentage de MS alloué aux fruits a augmenté avec la diminution de la nutrition azotée, aux dépens des limbes, tiges et pétioles. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus sur des tomates après une suppression d'apport azoté, l'activité des organes sources avait été plus affectée que celle des organes puits (Kanai *et al*, 2008). Cette réponse plus faible observée, pourrait également être due au niveau d'azote utilisé dans notre expérimentation. En effet, pour la culture de Clotilde, le traitement azoté le plus faible (4 mM) n'a pas mis la plante dans un état de carence en azote. Les plus faibles traitements azotés pour les expérimentations menées sur feuilles plaçaient les plantes en situation de carence complète ou contenaient seulement 0.2 ou 1mM NO_3^- (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995; Wilkens R T *et al*, 1996; Fritz *et al*, 2006)

D/ Effet bénéfique de la diminution des apports en azote pour la qualité gustative et nutritionnelle du fruit de tomate

La culture de Clotilde a permis de mettre en évidence une augmentation de la qualité gustative des fruits en diminuant la fertilisation azotée (Annexe 2). En effet, il a été observé une augmentation des teneurs en sucre, ce qui est en accord avec les données d'Aziz (1968), et à une diminution significative de la teneur en acide total (Aziz, 1968). Ceci est en accord avec l'étude de Simonne et al. (2007) qui a également trouvé une diminution de 10% de l'acidité titrable en réponse à une réduction des apports d'azote (Simonne *et al*, 2007). Le ratio sucre sur acide a donc été augmenté ce qui est un indicateur de la qualité gustative des fruits.

Les effets observés en diminuant les apports en azote pourraient être dus à l'augmentation du rayonnement et de la température du fruit, combinée à un effet spécifique de la diminution des apports d'azote sur le métabolisme primaire du fruit. En effet, Carrara *et al.* (2001) ont montré que les tomates ont une activité photosynthétique significative depuis le stade immature jusqu'à la fin de la maturation du fruit (Carrara *et al.*, 2001). Ainsi l'augmentation de l'éclairement des fruits augmente probablement la photosynthèse des fruits et donc leur teneur en sucre. De plus, Walker et Ho (1977) ont indiqué que chauffer les fruits de 25 à 35 °C augmentait l'importation de carbone et les teneurs en hexose du fruit (Walker et Ho, 1977). Le fait que l'augmentation de l'éclairement du fruit déclenche une augmentation de la température du fruit pourrait également expliquer la diminution des teneurs en acide observée. Gautier *et al.* (2008) ont observé une diminution de l'acidité lorsque la température des fruits augmentait de 21 à 26 °C (Gautier *et al.*, 2008).

Le contenu d'autres micronutriments a également été étudié pour la culture du cultivar Clotilde (Annexe 2). La diminution de la fertilisation azotée a induit une légère augmentation des teneurs en acide ascorbique (11%), et ces concentrations ont augmenté au cours de la saison. Cette observation est en accord avec d'autres travaux (Kaniszewski *et al.*, 1987; Mozafar, 1993; Dumas Y *et al.*, 2003), et renforce l'hypothèse d'une accumulation de la vitamine C grâce un à effet indirect de la nutrition azotée qui réduit la croissance végétative et augmente la lumière arrivant au fruit. L'effet de la nutrition azotée sur les teneurs en lycopène et en β -carotène n'a pas été évident. Nous avons observé une augmentation des teneurs en β -carotène mais une diminution des teneurs en lycopène. Là encore les conditions environnementales jouent un rôle important sur l'accumulation de ces composés. En effet il a été démontré que l'augmentation de la lumière stimulait la synthèse des caroténoïdes (Dumas Y *et al.*, 2003) mais qu'une température du fruit supérieure à 30°C inhibait la synthèse de lycopène et de β -carotène (Tomes, 1963; Dumas Y *et al.*, 2003). Ce qui pourrait expliquer la diminution des teneurs en lycopène, mais les teneurs en β -carotène n'ont pas varié. Ce type d'évolution contrastée entre ces composés a déjà été observé lors d'étude sur l'effet de la température (Dumas Y *et al.*, 2003; Gautier *et al.*, 2008).

V Conclusion

Ces résultats suggèrent que la réduction modérée des apports en azote peut être utilisée par les producteurs pour améliorer la qualité gustative des fruits sans affecter le rendement. Cette diminution de la fertilisation, semble s'accompagner d'une augmentation du rayonnement arrivant aux fruits. Ce qui pourrait provoquer une amélioration de la qualité gustative et nutritionnelle des fruits en augmentant respectivement le contenu en sucre et en diminuant celui des acides, ainsi que les contenus en antioxydants dans le fruit, tels que l'acide ascorbique et le β -carotène et, dans une moindre mesure, les composés phénoliques.

Ces deux séries d'expérimentations ont mis en évidence l'importance des conditions de culture des plantes (biotiques et abiotiques) qui régissent les teneurs en polyphénols. Nous avons voulu dans un dernier chapitre, souligner l'importance de l'environnement de culture et notamment des conditions de lumière et de température qui peuvent modifier la composition des limbes comme des fruits. Nous avons également souvent évoqué l'importance de l'âge des plants dans le déterminisme des concentrations en polyphénols. Lors de ce dernier chapitre nous aborderons donc également la cinétique d'accumulations des composés phénoliques à l'échelle de la plante et du fruit, pour mettre en évidence cet autre facteur de variation du contenu en polyphénols.

**Chapitre VI : Effet du stade de
développement et des conditions climatiques
sur les teneurs en polyphénols dans les
limbes et les fruits de tomate**

Comme nous l'avons évoqué lors de la synthèse bibliographique, les concentrations en composés phénoliques sont influencées par le stade de développement de l'organe mais aussi par de nombreux facteurs environnementaux et culturels, comme le rayonnement, la température, ou la composition des solutions nutritives. Les cultures de tomates sont majoritairement effectuées sous abris en tunnel ou sous serre. Sous ces infrastructures, les apports nutritifs sont contrôlés mais les facteurs environnementaux ne peuvent pas être strictement régulés.

Dans le chapitre précédent nous avons étudié l'impact d'une diminution des apports en azote sur la qualité des fruits. A cette occasion nous avons remarqué que la composition des fruits semblait davantage modifiée par les conditions climatiques (lors de la culture sous serre, cv Clotilde), ou en réponse à un stress biotique (lors des cultures en phytotron, cv Microtm), que par les apports en nitrate. Il semble donc pertinent de prendre en considération ces différents facteurs qui interagissent entre eux, afin de hiérarchiser leur impact et de déterminer l'intérêt d'un changement de pratique culturale.

Dans ce dernier chapitre, nous avons voulu souligner la complexité de l'étude du contenu en polyphénols. En effet leur accumulation évolue au cours du développement de la plante, ou de la maturation du fruit. De plus, lors des cultures, de nombreux facteurs peuvent modifier leurs concentrations. Nous avons plus particulièrement étudié l'impact du rayonnement et de la température sur les concentrations des polyphénols majeurs de la tomate.

Dans un premier temps nous avons regardé comment **s'accumulaient les composés phénoliques dans les feuilles au cours du développement de la plante**, en cherchant à déterminer quels étaient les facteurs qui conditionnaient cette évolution. Puis nous avons comparé les teneurs en polyphénols dans des limbes de tomates cultivés à deux saisons différentes. Dans un deuxième temps nous avons étudié **l'accumulation des composés au fur et à mesure de la maturation des fruits**, puis nous avons considéré l'évolution du contenu en polyphénols **dans les fruits au cours de la saison** et enfin nous nous sommes intéressés à **l'impact du rayonnement et de la température** sur la composition de fruits après leur récolte.

Compte tenu du caractère souvent préliminaire de ces données, les résultats seront discutés brièvement au moment de leur présentation.

I Matériel et Méthodes

A/ Influence du stade de développement de la plante et de la saison sur les teneurs en composés phénoliques dans les feuilles.

a) Conditions de culture relatives à l'évolution de l'accumulation des composés phénoliques au cours de la croissance des plantes, et effet de la température et du rayonnement.

Dans ce chapitre nous avons exploité à nouveau les récoltes de l'expérimentation décrite dans le chapitre III (culture NFT de tomate cv Rondello, récoltes 14, 18, 21 et 25 jours après le semis) mais les résultats ont été interprétés pour décrire les conditions d'accumulation des composés dans le temps et discutés par rapport aux conditions climatiques. Les détails de la culture ont donc été présentés dans le chapitre III. Pour cette partie nous avons utilisé les données obtenues pour les plantes cultivées avec 3 mM de nitrate. Ce niveau de fertilisation azotée a été considéré suffisant pour la croissance et le développement de plante sur le système de culture NFT mis en place à Avignon, il a donc été choisi comme référence.

b) Conditions de culture et d'échantillonnage pour mettre en évidence l'influence de la saison de culture

Dans le chapitre III, nous avons exposé les résultats d'une expérimentation menée à l'automne 2000 (septembre-octobre), sous serre à Avignon, où des plants du cv Rondello étaient cultivés sur 7 milieux azotés différents (0.05 à 15 mM NO₃⁻). Une autre culture de tomate du cultivar Rondello a été effectuée sur ce même dispositif mais au printemps 2000 (février-mars). Nous disposons donc de deux cultures qui ont été effectuées sur le même système, dans la même serre, et avec les mêmes types de solution nutritive mais à des périodes de l'année différentes : **culture 1 à l'automne / culture 2 au printemps.**

Six ou sept plantes, respectivement pour les cultures 1 et 2 ont été récoltées par niveau d'azote. Au moment de la récolte, chaque plante a été séparée en 3 parties : limbes, tiges et racines. Pour chaque plante, des paramètres morphologiques ont été mesurés comme la surface des feuilles et la masse fraîche. Puis pour les analyses biochimiques (dosage des polyphénols, des acides organiques, et des hydrates de carbone), les plantes ont été rassemblées dans un même échantillon, il n'y a donc pas eu de répétition. Les conditions de

culture et de récolte ont été préalablement détaillées dans le chapitre III. Les modalités d'extraction des composés phénoliques sont présentées dans le tableau 3, le dosage des acides organiques et des hydrates de carbone est abordé dans l'annexe 3.

Dans ce chapitre nous avons choisi de comparer la composition des limbes récoltés 25 jours après le semis pour ces deux cultures, pour les niveaux d'azote 0.3, 3, 7 et 15mM, de façon à se placer dans une large gamme d'apport azoté, tout en restant des conditions envisageables d'un point de vue agronomique.

c) Analyses statistiques et analyses des résultats

Les paramètres de croissance (surface foliaire et MS) ont été comparés en réalisant une analyse de variance à deux facteurs en considérant l'apport en azote, la période de culture et les interactions entre ces deux facteurs. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XL Stat2007 (Addinsoft, France), au seuil $\alpha=5\%$. Le test de comparaison de moyenne de Tukey a été utilisé.

Une matrice de corrélation avec les données des concentrations en polyphénols, différents paramètres de croissance (MS, surface foliaire), les contenus en azote, carbone, carbohydrate, acide organique, et les conditions climatiques (suivant plusieurs découpages temporels) a été effectuée afin d'étudier les corrélations entre ces variables.

Les pourcentages de variation entre les deux cultures ont été calculés de la façon suivante : $(\text{valeur culture 2} - \text{culture 1}) / \text{culture 1}$.

Les pourcentages de variation calculés entre les valeurs entre traitements azotés ont été calculés de la façon suivante : $(\text{valeur la plus faible} - \text{plus élevée}) / \text{plus élevée}$.

B/ Influence du stade de maturité des fruits, de la température et du rayonnement lors de la maturations des fruits, et de la saison de culture sur les teneurs en composés phénoliques

a) Conditions de culture et de récolte des fruits

Pour cette expérimentation des tomates cerise cultivar Cervil, ont été cultivées à l'INRA d'Avignon sous serre entre les mois de janvier et de mai 2004. Les plants ont été cultivés sur un mélange de tourbe (P3 Tref, Tref EGO Substrates B.V., Moerdijk, Hollande) dans des pots

	lumière	obscurité
Lumière arrivant au fruit en $\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$	195	5
Température des fruits en $^{\circ}\text{C}$	27,1	27,6
	32,5	32,5
<i>% variation T</i>	-17	-15

Tableau 31 : Conditions de lumière ($\mu\text{mol.m}^{-1}.\text{s}^{-2}$) et de température ($^{\circ}\text{C}$) au niveau des fruits, lors de leur maturation pendant 6 jours après leur récolte au stade vert.

de 4L. La fertilisation a été effectuée selon les pratiques commerciales actuelles, en respectant les besoins des plants (croissance végétative, floraison). Un système de goutteurs a été employé et le drainage maintenu à 20-30%. La température a été réglée à 17°C la nuit et entre 19 et 24°C en journée. Les plants ont été tuteurés, un espace de 40cm entre les pots et de 50cm entre les rangs a été adopté pour obtenir une densité de 4,5 plantes par m². La protection des cultures a été effectuée suivant les pratiques commerciales, (introduction de *Macrolophus*, Koppert, France, comme auxiliaire pour lutter contre les aleurodes). Les plants ont été taillés régulièrement, et la fructification a été réglée à 12 fruits par grappe (Cervil produisant des grappes d'environ 20 fruits) pour limiter l'hétérogénéité de taille entre les fruits. Les conditions de culture ont été décrites dans l'article associé : (Gautier *et al*, 2008)(Annexe 1).

Les fruits de Cervil ont été récoltés à différents stades de maturité. Nous avons choisi d'étudier les teneurs en composés phénoliques pour quatre stades sur les onze définis par l'OCDE : Vert immature, vert légèrement orangé (noté stade tournant), orange marbré à orange foncé (noté rouge immature), rouge mature à surmature. Pour chaque stade, la composition des fruits a été déterminée sur 3 échantillons. Un échantillon correspondait à un lot de 15 fruits. Les modalités d'extraction des composés phénoliques sont présentées dans le tableau 3.

b) Conditions expérimentales pour étudier l'effet de la température et de la lumière lors de la maturation des fruits

Des fruits du cv Cervil, au stade vert mature ont été détachés de la plante, puis placés en chambre de culture pour étudier l'impact de différentes modalités de maturation.

Pendant 6 jours, des fruits ont été placés à 27°C en présence ou en absence de lumière et d'autres à 32°C avec les mêmes modalités d'éclairage (Tableau 31).

Les fruits étaient disposés sur des plateaux, à 1,5m des lampes (HQI, Osram, France), l'intensité lumineuse a été mesurée à hauteur des fruits avec des capteurs Li-190SB (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). La température des fruits a été mesurée toutes les minutes sur quatre fruits par traitement. Des thermocouples en cuivre/constantan très fins (0.2mm) étaient introduits au milieu des fruits. Les données relevées ont ensuite été moyennées toutes les 15minutes et enregistrées par une centrale d'acquisition (Delta-T DL2e, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, U.K.).

A la fin du traitement les fruits ont été plongés dans l'azote liquide et conservés au congélateur à -80°C avant d'être broyés dans l'azote liquide, puis lyophilisés. Les teneurs en composés phénoliques des 3 échantillons de fruits pour chaque modalité, et de 3 échantillons de fruits au stade initial à la récolte (verts matures) ont été déterminées. Les composés phénoliques ont été analysés sur 15 échantillons : 3 échantillons de témoins (fruits au stade initial), et 3 échantillons pour chacune des 4 modalités. Les modalités d'extraction des composés phénoliques sont présentées dans le tableau 3.

c) Analyse de la composition des fruits au cours d'une saison de culture

La culture du cv Clotilde, présentée dans le chapitre V, menée depuis le mois de février jusqu'en juillet sous serre en respectant les pratiques actuelles de production, a été exploitée pour mettre en évidence l'importance des variations du contenu en polyphénols au cours de la saison. Les conditions de culture et de récolte de cette expérimentation ont été décrites lors du chapitre V.

d) Analyses statistiques

Le contenu en composés phénoliques a été comparé en réalisant une analyse de variance à deux facteurs en considérant la température, la lumière et les interactions entre ces deux facteurs. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC) au seuil $\alpha=5\%$. Le test de comparaison de moyenne de Newman and Keuls, a été utilisé.

Les pourcentages de variation calculés entre les valeurs extrêmes pour chaque facteur considéré (azote ou date de récolte) ont été calculés de la façon suivante : (valeur la plus faible - plus élevée) / plus élevée.

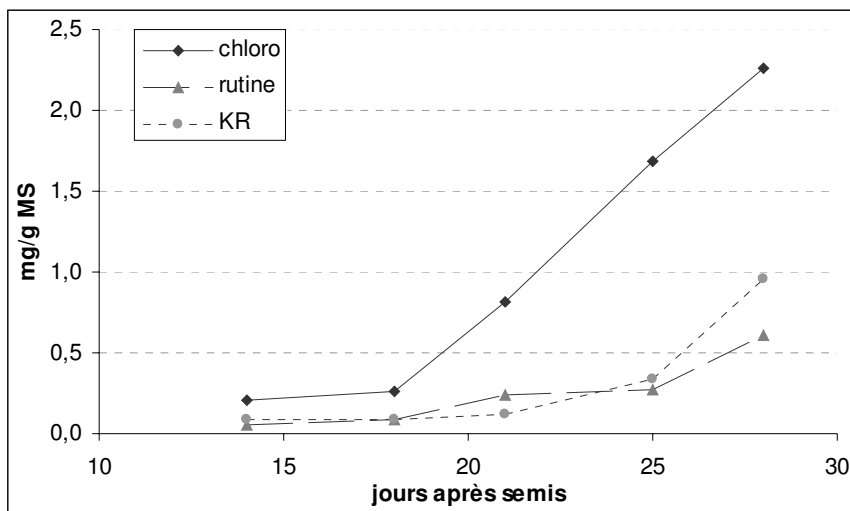


Figure 39 : Evolution des concentrations (mg/g MS) en acide chlorogénique (chloro), rutine et kaempférol rutinoside (KR) dans les limbes, en fonction du nombre de jours après le semis. Les plants ont été cultivés sur le système NFT avec une solution nutritive complète qui contenait 3mM de nitrate.

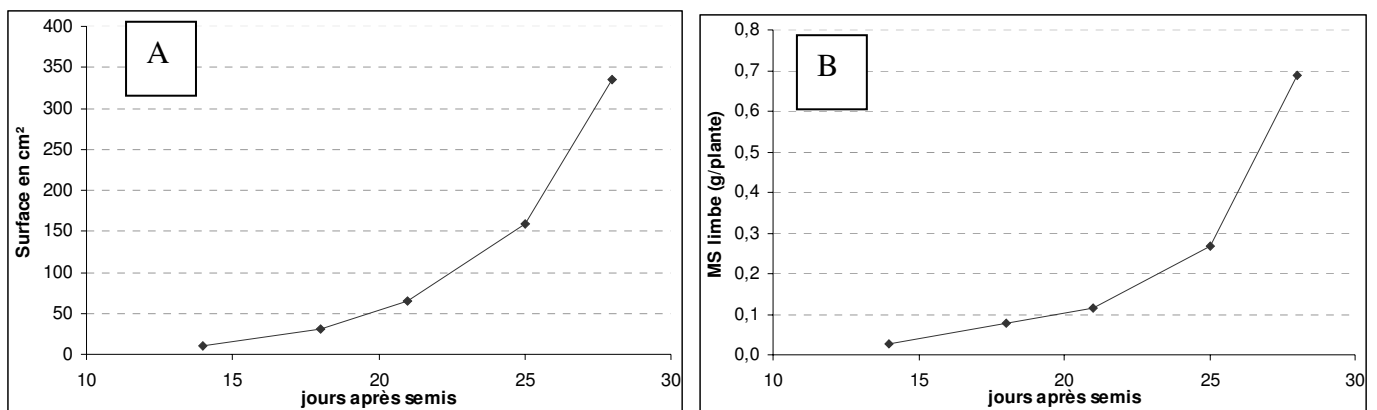


Figure 40 : Evolution (A) de la surface foliaire totale des limbes (cm²/plante) et (B) de la MS de limbe par plante (g/plante) en fonction du nombre de jours après le semis. Les plants ont été cultivés sur le système NFT avec une solution nutritive complète qui contenait 3mM de nitrate.

II Résultats et Discussion

A/ Evolution du contenu en composés phénoliques dans les limbes, au cours du développement de la plante

L'évolution du contenu en composés phénoliques a été suivie dans des limbes de plantes cv Rondello cultivées avec une solution nutritive complète contenant 3mM de NO_3^- et récoltées entre 14 et 28 jours après le semis (Figure 39). L'augmentation des concentrations en acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside n'est pas linéaire dans le temps. Les concentrations en acide chlorogénique augmentent nettement entre 18 et 21 jours après le semis, pour le KR cette augmentation est plus tardive, entre 21 et 25 jours après le semis, enfin les concentrations en rutine augmentent plus progressivement dans le temps. Cette évolution exponentielle des concentrations en acide chlorogénique pourrait être liée à la croissance de la plante puisque sur la même période la surface foliaire et l'accumulation de MS des limbes (Figure 40 A et B) suivent la même évolution. De plus ces variables MS et surface foliaire sont très fortement corrélées avec les concentrations des différents composés phénoliques quantifiés ici ($R^2 \geq 0.9$) (Tableau 32).

Lors de nos expérimentations les dosages des polyphénols ont été effectués sur l'ensemble des limbes de la plante, or comme nous venons de le signaler, le contenu en polyphénols évolue dans ce compartiment en fonction du temps (figure 39). Il semble donc important de se placer dans des conditions d'âge et de croissance identiques. Il paraît donc également pertinent de considérer le stade de développement des feuilles et de constituer des sous échantillons, en distinguant les feuilles en croissance des feuilles matures par exemple.

Nous avons observé que les concentrations en polyphénols étaient peu corrélées aux concentrations en azote et nitrate des limbes (Tableau 32). Par contre, elles sont davantage corrélées au contenu en carbone, notamment aux sucres solubles. Nous avons déjà observé dans le chapitre III, que les concentrations en sucres, et en particulier en hexose, et en polyphénols présentaient des courbes de réponse similaires : une augmentation de leur concentration en réponse à une diminution des apports en nitrate. Cette évolution est cohérente avec les hypothèses de la GDBH qui prédisent une même évolution pour les molécules carbonées en général, en fonction des ressources du milieu.

	Chloro	Rutine	KR
Surface	0,92	0,95	0,97
MS limbe	0,86	0,95	0,99
% N	0,14	0,01	0,14
NO₃⁻	0,17	0,17	0,42
% C	0,6	0,81	0,76
Sucre sol	0,41	0,69	0,45
Acide org	0,26	0,22	0,07
Chloro		0,87	0,81
Rutine	0,87		0,92
KR	0,81	0,92	

Tableau 32 : Coefficients déterminations obtenus entre les concentrations en polyphénols (mg/g MS) et la surface des limbes (cm²/plante), la MS de limbe (g/plante), les contenus en azote et carbone totaux (g/100g MS), et le nitrate (g/100g MS). Les corrélations ont été effectuées à partir des données collectées pour les plantes cultivées avec 3mM NO₃⁻, et récoltées aux 5 dates de récoltes (14, 18, 21,25 et 28 jours).

	Chloro	Rutine	KR
Rayonnement cumulé total	0,8	0,78	0,62
1ère moitié	0,96	0,9	0,8
2ème moitié	0,15	0,19	0,08
7 jours avant	0,92	0,44	0,27
Température air cumulée totale	0,93	0,84	0,7
1ère moitié	0,93	0,86	0,75
2ème moitié	0,92	0,8	0,64
7 jours avant	0,26	0,05	0,02
Température solution cumulée totale	0,92	0,83	0,69
1ère moitié	0,93	0,86	0,75
2ème moitié	0,9	0,78	0,61
7 jours avant	0,74	0,57	0,45

Tableau 33 : Coefficients de déterminations obtenus entre les concentrations en polyphénols (mg/g MS) et les conditions de rayonnement et de température au cours de la culture. Les corrélations ont été effectuées à partir des données collectées pour les plantes cultivées avec 3mM NO₃⁻, et récoltées aux 5 dates de récoltes (14, 18, 21,25 et 28 jours).

Les concentrations des différents polyphénols quantifiés ici sont fortement corrélées entre elles ($R^2 > 0.8$). Cette dernière observation semble indiquer que la voie de synthèse des polyphénols est stimulée dans sa globalité, ou au moins jusqu'à la formation des flavonoïdes. Il pourrait être intéressant de doser également des composés terminaux comme des tanins ou des anthocyanes, qui n'évoluent pas forcément comme les phénylpropanoïdes face aux conditions de culture (Haukioja *et al*, 1998; Koricheva *et al*, 1998; Lillo *et al*, 2008). Il pourrait également être intéressant de faire des dosages totaux de polyphénols pour avoir une idée globale de la modification du métabolisme des polyphénols.

Il a été démontré que les teneurs en polyphénols étaient influencées par les conditions climatiques lors de la culture des plantes (Dumas Y *et al*, 2003). Nous avons donc dans un premier temps étudié l'influence des conditions climatiques sur cette culture, puis dans un deuxième temps, comparé les teneurs en composés phénoliques obtenus au cours de deux cultures menées à des saisons différentes.

B/ Importance de l'environnement de culture

a) Importance des conditions climatiques au cours de la première culture

Les récoltes espacées dans le temps (cf Chapitre III) nous ont permis d'étudier l'influence des conditions climatiques sur les teneurs en polyphénols des limbes lors de cette culture. Nous avons observé que les concentrations des trois molécules quantifiées, l'acide chlorogénique, la rutine et le kaempférol rutinoside, étaient corrélées positivement aux cumuls du rayonnement, des températures de l'air et des solutions sur l'ensemble de la période de culture (Tableau 33). Par la suite nous avons essayé de préciser quelle était la période la plus influente sur la concentration finale en polyphénols. Pour ce faire nous avons calculé les conditions climatiques moyennes au cours de la première et de la deuxième moitié du développement de la plante, ainsi que les conditions climatiques moyennes 7 jours avant la récolte. Il en ressort que les températures aussi bien de l'air que des solutions nutritives, sont corrélées positivement ($R^2 > 0.8$) aux teneurs en polyphénols sur l'ensemble de la période de développement, et non pas spécifiquement sur les 7 derniers jours avant la récolte. Pour ce qui est du rayonnement, les premiers jours de culture semblent déterminant pour les concentrations en polyphénols (Tableau 33).

		nitrate en solution				
	Culture	15 mM	7 mM	3 mM	0,3 mM	% variation N
rutine (mg/g MS)	1	0,324	0,258	0,270	0,328	-21
	2	0,480	0,650	0,602	0,778	-38
	% variation culture	+48	+152	+123	+137	
chloro (mg/g MS)	1	1,322	1,459	1,681	1,732	-24
	2	2,557	2,530	2,654	2,921	-13
	% variation culture	+93	+73	+58	+69	
KR (mg/g MS)	1	0,349	0,339	0,362	0,380	-11
	2	0,407	0,526	0,467	0,578	-29
	% variation culture	+17	+55	+29	+52	

Tableau 34 : Concentrations en acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside dans les limbes, en fonction des apports en nitrate et de la culture. La culture 1 correspond à la culture d'automne, et la culture 2 à celle de printemps. Les pourcentages de variation entre les cultures et entre les niveaux d'azote sont indiqués.

		Surface	MS_L	MS tot
Culture 1	0,3	156,61 ab	0,27 b	0,46 bc
	3	158,14 ab	0,27 b	0,44 c
	7	198,23 a	0,32 ab	0,54 abc
	15	197,06 a	0,33 ab	0,56 abc
Culture 2	0,3	133,13 b	0,32 ab	0,52 abc
	3	149,37 b	0,37 a	0,60 ab
	7	151,71 ab	0,37 a	0,59 abc
	15	174,64 ab	0,40 a	0,65 a
Effet culture		**	***	***
Effet azote		**	*	**
Interaction		NS	NS	NS

Tableau 35 : Surface foliaire (cm²/plante), MS des limbes et MS totale produites en fonction du niveau de nitrate des solutions nutritives et de la culture considérés. Les lettres différentes par colonne indiquent des différences significatives suivant le test de Tukey. NS non significatif, * P<0.5, ** P<0.01.

Il semblerait également que les concentrations en acide chlorogénique soient bien corrélées au rayonnement reçu lors de la dernière semaine avant la récolte mais, de façon surprenante, pas la rutine ou le kaempférol rutinoside.

Il faut préciser que nos relevés climatiques ne sont pas assez contrastés pour aller plus loin dans les interprétations. En revanche il est certain que la lumière et la température jouent un rôle primordial dans l'accumulation des composés phénoliques. En effet, différentes études ont montré que les enzymes clefs de la voie de biosynthèse des polyphénols étaient sensibles à ces conditions (Macheix *et al*, 2005). Il serait donc intéressant de rechercher plus précisément à quel moment du développement de la plante les conditions climatiques ont le plus d'influence sur le contenu en polyphénols.

b) Effet de la saison sur la croissance et la composition des limbes

Dans cette partie nous avons comparé les concentrations en polyphénols (acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside) obtenues 25 jours après le semis, lors de deux cultures menées sur le même système de culture NFT à Avignon, la première effectuée à l'automne (notée culture 1, cf Chap III) et la seconde au printemps (notée culture 2).

Nous avons observé des profils d'élution HPLC comparables (résultats non montrés), ce qui était attendu puisque nous avons utilisé le même cultivar (Rondello). Cette similitude indique que les plantes n'ont pas été amenées à synthétiser de molécules différentes entre les cultures, ce qui aurait indiqué une réaction à un stimulus particulier.

En revanche nous avons obtenu des différences notables entre les concentrations des polyphénols quantifiés entre ces deux cultures (Tableau 34). En effet lors de la deuxième culture (printemps) les concentrations en polyphénols ont toujours été plus importantes que lors de la première culture. Par exemple sur le milieu à 3mM les concentrations en acide chlorogénique ont été multipliées par 2.2, celle de la rutine par 1.6, et celles du KR par 1.3 pour la culture de printemps. Ces variations exprimées en quantité de composés dans les limbes par plante (g/plante), sont encore plus importantes (résultats non montrés).

Ces différences de concentration en composés phénoliques pourraient s'expliquer par des différences de croissance des plantes (Tableau 35). En effet la surface foliaire, et la biomasse produite ont été significativement plus faibles lors de la 2ème culture (Tableau 36). Néanmoins, les concentrations en composés phénoliques ont augmenté lors de cette 2ème culture, ce qui va à l'encontre de la corrélation observée précédemment entre la surface

		nitrate en solution				
	Culture	15 mM	7 mM	3 mM	0,3 mM	% variation N
MS tot (g)	1	0,56	0,54	0,44	0,46	-21
	2	0,65	0,59	0,60	0,52	-20
	<i>% variation culture</i>	+16	+10	+34	+14	
MS_L (g/plant)	1	0,33	0,32	0,27	0,27	-18
	2	0,40	0,37	0,37	0,32	-20
	<i>% variation culture</i>	+24	+14	+40	+19	
Surf (cm²)	1	197,1	198,2	158,1	156,6	-21
	2	174,6	151,7	149,4	133,1	-24
	<i>% variation culture</i>	-11	-23	-6	-15	

Tableau 36 : MS totale (gramme), MS de limbe (gramme/plante), et surface foliaire (cm²/plante) en fonction des apports en nitrate et de la culture. La culture 1 correspond à la culture d'automne, et la culture 2 à celle de printemps. Les pourcentages de variation entre les cultures et entre les niveaux d'azote sont indiqués.

	Rayonnement moyen			T moy air
	<i>total</i>	<i>4-18 JAS</i>	<i>19-24 JAS</i>	<i>totale</i>
Culture 1	13,54	16,86	5,24	21,60
Culture 2	12,04	12,01	12,13	20,63
<i>% variation</i>	-11	-29	+131	-5

Tableau 37 : Rayonnement moyen journalier (mole.m⁻².j⁻¹), et température moyenne de l'air (°C) pendant les deux cultures. Le rayonnement a été subdivisé en deux périodes : 4 à 18 jours après le semis et 19 à 24 jours après le semis.

foliaire et les concentrations en polyphénols. Il semble donc que la différence de développement des plants ne soit pas la seule explication justifiant les concentrations en polyphénols plus importantes lors de la deuxième culture (printemps vs automne). Ces cultures ayant été effectuées à deux périodes différentes nous nous sommes intéressés aux conditions climatiques. Or de façon surprenante sur l'ensemble de ces cultures les conditions climatiques moyennes n'ont pas été très différentes (Tableau 37), le rayonnement ayant diminué de 10% et la température de 5% entre la culture 1 et 2. Par contre une semaine avant la récolte des plantes analysées le rayonnement a nettement diminué au cours de la 1ère culture (Figure 41). Nous avons vu précédemment que les concentrations en acide chlorogénique pouvaient être corrélées positivement au rayonnement dans les derniers jours avant la récolte. Même si nous n'avons pas fait cette observation pour les flavonoïdes, il faut rappeler que ces composés interviennent dans la protection contre les UV. Cette différence de rayonnement perçue sur les derniers jours de culture pourrait également expliquer les différentes concentrations en polyphénols observées entre ces deux cultures. L'équipe de Raffo (2006) avait également observé des variations saisonnières de contenu en polyphénols, dans les fruits, sans pour autant avoir pu mettre en évidence de corrélation avec le rayonnement ou la température (Raffo *et al*, 2006). Il faut ajouter que d'autres paramètres climatiques pourraient intervenir et modifier le contenu en polyphénols, comme l'humidité relative, ou la photopériode.

D'une manière générale, on observe que les variations de teneurs en composés phénoliques, engendrées par la saison de culture ont été nettement plus importantes, entre +30 et +150%, que les variations observées en modifiant les apports en azote de l'ordre de -20% entre les valeurs extrêmes (Tableau 34). Pour les données liées à la biomasse des plantes cet écart est moins important (Tableau 36). Ces observations indiquent que les effets de l'environnement climatique, même s'ils ne sont pas explicites, ont été plus importants que la modification de la nutrition minérale sur le contenu en polyphénols.

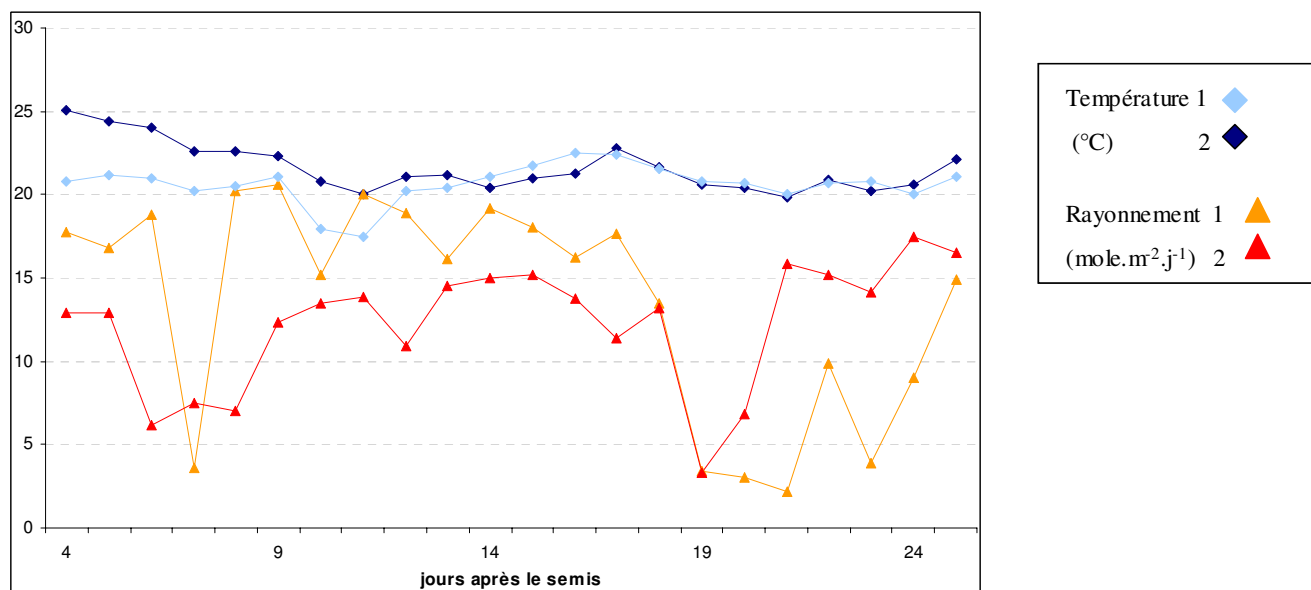


Figure 41 : Evolution des températures ($^{\circ}\text{C}$) et du rayonnement ($\text{mole.m}^2.\text{j}^{-1}$) journaliers moyens au cours des deux cultures. La culture 1 correspond à la culture d'automne, et la culture 2 à celle de printemps.

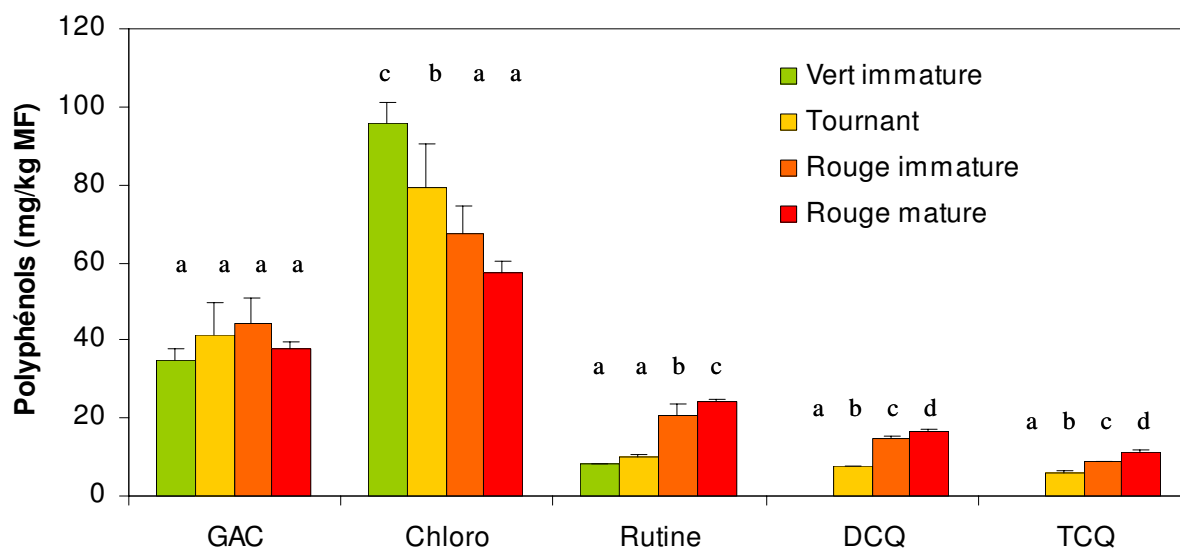


Figure 42 : Concentrations en polyphénols en fonction du stade de maturation des fruits. Les composés quantifiés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique, la rutine, et les acides di et tri caféoylquiniques. La rutine est exprimée en mg de rutine/kg de MF, les autres composés sont exprimés en équivalent de mg d'acide chlorogénique/kg de MF. Les valeurs sont des moyennes calculées sur 3 fruits \pm ET.

C/ Evolution du contenu en polyphénols des fruits, au cours de leur maturation

Le contenu en composés phénoliques évolue significativement au fur et à mesure de la maturation des fruits (Figure 42 et annexe 1). L'augmentation globale de ces composés au cours de la maturation du fruit a été reportée à plusieurs reprises (Hunt et Baker, 1980; Fleuriet et Macheix, 1981; Winter et Herrmann, 1986).

Le changement le plus remarquable est la diminution des concentrations en acide chlorogénique depuis les fruits verts jusqu'aux fruits rouges. Il est vraisemblable que cette diminution soit liée à l'augmentation par la suite des concentrations de dérivés de l'acide caféique comme les acides di et tri caféoylquiniques.

Nous avons observé une légère augmentation des concentrations en rutine entre les stades vert et rouge. Cependant la littérature fait plutôt état de teneurs maximales dans les fruits verts puis une diminution des concentrations au profit d'autres dérivés de la quercétine (Fleuriet, 1976; Buta et Spaulding, 1997).

D/ Importance des conditions climatiques

a) Evolution du contenu en composés phénoliques au cours de la saison

Au cours de l'expérimentation présentée dans le chapitre V (cv Clotilde), les fruits ont été récoltés sur plusieurs mois, entre février et juillet. Par conséquent, les conditions de rayonnement et de températures lors de la formation et la maturation des fruits n'ont pas été les mêmes. Nous avons observé entre février et juillet une augmentation progressive des températures et un rayonnement plus important à partir du mois de février puis fluctuant durant le reste de la période de culture (Tableau 38). Nous avons mis en avant, au delà d'un effet de la nutrition azotée, un effet hautement significatif de la date de la récolte (Tableau 27). Le tableau 39 indique la dispersion observée entre les différents niveaux de fertilisation azotée au sein d'un même bouquet. Le tableau 40 indique les pourcentages de variation calculés au cours de la saison pour un même niveau d'azote. On constate que les variations observées entre bouquets sont nettement plus importantes, souvent 2 fois plus importantes, que celle engendrées par la nutrition azotée.

Dates de récoltes	Bouquet	Température de l'air moyenne en °C	Température maximale moyenne en °C	Rayonnement moyen en W/m ²
24-févr	2	17 ±0,9	22 ±1,7	746 ±304
4-avr	6	18 ±0,8	24 ±2,5	1220 ±470
9-mai	11	18 ±1,2	25 ±3,2	1327 ±456
30-mai	14	19 ±1,5	26 ±3,3	1242 ±438
4-juil	19	22 ±2,5	29 ±3,2	1317 ±252
% variation		-21	-22	-44

Tableau 38 : Conditions climatiques pendant le développement des fruits de l'anthèse à la récolte pour chaque bouquet. Les données sont issues d'une station météo placée dans chaque compartiment, les températures (°C) ont été relevées toutes les minutes, une moyenne a été calculée pour la période de développement des fruits afin d'obtenir une température moyenne de l'air. La température maximale correspond à la moyenne des Tmax journalières de l'anthèse jusqu'à la récolte. L'intensité lumineuse (W m⁻²) a été mesurée au dessus des plants sous la serre pendant le développement des fruits. Les données sont des moyennes ± ET.

Bouquet	GAC	Rutine	Chloro	DCQ	TCQ	NC
2	-9	-28	-25	-10	-4	-28
6	-32	-22	-32	-31	-13	-38
11	-17	-17	-22	-19	-14	-10
14	-20	-44	-9	-23	-7	-22
19	-15	-20	-24	-23	-14	-16

Tableau 39 : Pourcentages de variation des concentrations en polyphénols liés aux traitements azotés (4, 6 ou 12mM), au sein d'un même bouquet. Ils ont été calculés à partir du tableau 27, de la façon suivante : pour un même bouquet, (valeur plus faible - plus élevée)/valeur la plus élevée. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), la rutine, l'acide chlorogénique (chloro), les acides di et tri caféoylquiniques (DCQ et TCQ), et la naringénine chalcone (NC).

Azote	GAC	Rutine	Chloro	DCQ	TCQ	NC
12 mM	-67	-43	-56	-38	-21	-42
6 mM	-66	-49	-61	-40	-13	-52
4 mM	-71	-54	-71	-44	-12	-32

Tableau 40 : Pourcentages de variation des concentrations en polyphénols liés au numéro de bouquet, pour un même niveau d'azote. Ils ont été calculés à partir du tableau 27 de la façon suivante : pour un même niveau d'azote, (valeur plus faible - plus élevée)/valeur la plus élevée. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), la rutine, l'acide chlorogénique (chloro), les acides di et tri caféoylquiniques (DCQ et TCQ), et la naringénine chalcone (NC).

En analysant le tableau des conditions climatiques depuis l'anthèse jusqu'à la récolte des fruits (Tableau 38), on peut voir qu'entre juillet et février la température a diminué de 20% et le rayonnement de 40%. Lorsque nous avons étudié les corrélations entre les conditions de température, de rayonnement et les concentrations en polyphénols (résultats non montrés), il est ressorti que l'acide chlorogénique et le glucoside de l'acide caféique étaient corrélés positivement avec la température moyenne, et la somme des températures calculées sur l'ensemble de la culture ($R \approx +0.8, +0.9$), mais pas avec le rayonnement. En revanche, la naringénine chalcone était corrélée négativement avec le rayonnement moyen et la somme du rayonnement calculée sur l'ensemble de la culture ($R \approx -0.8$). En parallèle, nous n'avons observé aucune corrélation pour la rutine dont le contenu avait pourtant été affecté au cours de la saison de culture. En plus des travaux de l'équipe de Raffo (2006) évoqués précédemment, l'équipe de Riga (2008) a observé que le contenu en composés phénoliques étaient plus fortement corrélé au cumul des températures qu'à celui du rayonnement (Raffo *et al*, 2006; Riga *et al*, 2008). Nos résultats sont en accord avec ces deux études puisque nous avons observé un effet important de la température, le rayonnement semblant également intervenir. Les corrélations avec le climat sont variables en fonction des composés et difficiles à mettre en évidence en conditions de culture sous serre.

b) Evolution du contenu en composés phénoliques sur des fruits détachés, en fonction des conditions de lumière et de rayonnement

Au cours de cette expérimentation les fruits ont été détachés de la plante et placés dans différentes conditions de rayonnement (lumière ou obscurité) et de température (27 ou 32°C) (Tableau 31). Après 6 jours de maturation l'évolution générale du contenu en composés phénoliques a été conforme à nos précédentes observations, à savoir une diminution des teneurs en acide chlorogénique mais une augmentation des autres composés quantifiés.

Nous avons observé des effets significatifs de la lumière et de la température variables suivant les molécules considérées, mais pas d'interaction entre ces facteurs. La lumière a eu pour effet d'augmenter les teneurs en rutine de 37 et 42% par rapport aux fruits placés à l'obscurité respectivement à 27 et 32°C (Tableau 41). L'effet de la lumière semble donc plus marqué sous des températures élevées. Les fruits placés à l'obscurité ont également présenté légèrement moins de TCQ et de DCQ. En revanche les teneurs en GAC ont été plus importantes (30% à 27°C) dans ces conditions mais de façon non significative.

	GAC	Chloro	Rutine	DCQ	TCQ
Témoins vert	58,9a	211,3b	37,7a	6,4a	4,8a
Lumière, 27°C	50a	121,8a	77,2b	24,8c	17,5c
Obscurité, 27°C	64,9a	119a	48,3b	22c	15,5c
Lumière, 32°C	67,9a	108,8a	107,7a	21c	13,8bc
Obscurité, 32°C	68,8a	115,3a	62,1b	17,1b	10,7b
Effet lumière	NS	NS	**	*	*
Effet température	*	NS	*	**	**
Interaction	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau 41 : Evolution des concentrations en polyphénols dans des fruits récoltés au stade vert et placés pendant 6 jours dans des conditions de maturation différentes de lumière et d'obscurité, et de température 27 ou 32°C. Les composés quantifiés sont un glucoside de l'acide caféique (GAC), la rutine, l'acide chlorogénique (chloro), les acides di et tri caféoylquiniques (DCQ et TCQ). La rutine est exprimée en mg de rutine/kg de MF, les autres composés sont exprimés en équivalent de mg d'acide chlorogénique/kg de MF. NS non significatif, * P<0.5, ** P<0.01.

L'augmentation de la température de 27 à 32°C a induit une diminution des teneurs en DCQ et TCQ (environ 20%) mais une augmentation des teneurs en rutine et GAC (Tableau 41).

L'absence d'effet significatif sur les concentrations en acide chlorogénique pourrait être liée au témoin utilisé, et semble indiquer que la dégradation de l'acide chlorogénique dépend plus du stade de maturation du fruit que des conditions climatiques. En effet nous avons vu précédemment que les teneurs en acide chlorogénique étaient nettement plus importantes dans les fruits verts ; ainsi l'impact des conditions de maturation a pu être masqué simplement par l'évolution temporelle de la composition du fruit.

III Conclusion

Dans les feuilles l'accumulation des composés étudiés se fait progressivement dans le temps et de façon quasiment exponentielle pour l'acide chlorogénique. Dans les fruits en revanche, ce composé est majoritaire au stade vert puis diminue lors de la maturation. Les autres composés comme la rutine, ou des dérivés de l'acide caféique (CAG, DCQ, TCQ) s'accumulent lors de la maturation du fruit.

Nous avons observé dans les feuilles comme dans les fruits des variations des concentrations en polyphénols suivant la période (effet saison) de la culture. Ces variations relatives à la saison ont été plus importantes que les variations engendrées par une modification de la nutrition azotée. En effet, dans les fruits, une diminution des apports en azote n'induit pas de franche modification du contenu en polyphénols. Par contre, au cours de la saison de culture, les concentrations de certains composés peuvent être multipliées par deux. Dans les limbes en comparant deux cultures sur quelques niveaux d'azote, menées à des périodes différentes, nous avons également observé des différences de concentration très marquées et surtout plus importantes que celles engendrées par la nutrition azotée.

Les conditions climatiques peuvent être légitimement supposées responsables de ces différences observées au cours de la saison sur feuilles comme sur fruits. En outre nous avons caractérisé l'importance des conditions de lumière et de température lors de la maturation des fruits après leur récolte. Mais les concentrations en polyphénols n'ont pas toujours été fortement corrélées aux conditions climatiques, et semblent dépendre de l'expérimentation et des molécules considérées. Il faut noter également que d'autres facteurs environnementaux,

évoqués lors de la synthèse bibliographique, peuvent modifier les concentrations en polyphénols et n'ont pas été considérés ici.

Il ressort de ces différentes expérimentations que de nombreux facteurs régissent et interagissent pour définir le contenu en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec le travail d'Hamilton *et al.* (2001), qui met en évidence que ces variations phénotypiques de modifications du contenu en polyphénols, sont dues au génotype étudié, à l'environnement de culture, et à l'interaction entre ces deux facteurs ($P = G + E + G \times E$), d'où la complexité de caractériser leur évolution (Hamilton *et al.*, 2001).

Conclusions générales et perspectives

Mon travail de thèse a constitué le commencement d'une nouvelle thématique de recherche pour mon équipe d'accueil à Nancy, autour de l'impact de l'environnement sur la qualité des produits végétaux. Nous avons choisi de débiter par l'étude de l'effet de la nutrition azotée car l'azote est un élément essentiel pour la croissance des plantes mais paradoxalement peu de travaux existaient sur les effets de la nutrition azotée sur le métabolisme secondaire chez des espèces agronomiques. Quelques études indiquaient une stimulation des principales enzymes de la voie de biosynthèse des polyphénols dans les feuilles, et même une augmentation du contenu en polyphénols dans les feuilles de plusieurs végétaux. En revanche bien que l'importance des polyphénols dans la qualité nutritionnelle de la tomate fût démontrée, ainsi que la valeur santé de la consommation de ce fruit, peu de travaux cherchaient à décrire l'importance de ce facteur sur la qualité du fruit de tomate.

Le but de mon travail de thèse a donc été d'évaluer l'effet de la nutrition azotée sur les teneurs en polyphénols chez la tomate.

Nous avons commencé par l'étude de la nutrition azotée sur la composition des parties végétatives de la tomate en focalisant plus particulièrement notre étude sur les limbes. Nous avons mis en évidence une réactivité importante des composés phénoliques étudiés en réponse à la diminution des apports en azote. Le contenu en acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside a été augmenté chez des jeunes plants de tomates en situation de limitation en azote, ce qui en accord avec les prédictions de la GDBH (théorie de l'équilibre entre les mécanismes de croissance et différenciation). Nous avons établi des courbes de réponses à l'azote qui se décomposent en deux phases : une phase importante de modification des concentrations jusqu'à un niveau d'azote seuil qui délimite une zone de nutrition azotée limitante pour la croissance de la plante, et au-delà de ce seuil une phase d'évolution des concentrations plus faible. Le temps de mise en place d'une telle réponse est dépendant du système de culture. Il a fallu environ une vingtaine de jours pour observer ces courbes de réponse au niveau des limbes.

Dans ce même organe, nous avons mis en évidence qu'après une phase de carence ponctuelle d'une dizaine de jours, les concentrations en polyphénols étaient accrues par rapport à des plantes n'ayant pas subi de carence. Mais l'observation la plus intéressante réside dans le fait que l'effet de cette carence ponctuelle semble perdurer dans le temps. En effet même après 1 semaine de culture sur un milieu riche, les plantes ayant subi la carence présentent toujours davantage de composés phénoliques. Cet aspect de « bénéfique » pour la plante mérite d'être encore étudié, en appliquant par exemple plusieurs séries de carence. Il

sera également important de connaître les répercussions engendrées au niveau du rendement et de la composition des fruits.

L'impact de la nutrition azotée sur la composition des fruits demeure moins explicite, cet organe semblant être peu atteint par les modifications du milieu nutritif. Nous avons bien observé un effet significatif d'une diminution des apports en azote sur le contenu en composés phénoliques, cependant nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation marquée de ces composés en fonction du traitement azoté. En effet, les concentrations quantifiées dans les fruits n'ont pas toutes évoluées de la même façon, et surtout en modifiant les apports en azote, la croissance végétative de la plante a été modifiée ce qui a eu pour conséquence de modifier le microclimat au niveau des fruits. Or il a déjà été démontré que les conditions de lumière et température étaient des facteurs déterminant des concentrations en polyphénols.

Nous avons pu mettre en évidence une augmentation des concentrations en polyphénols dans les limbes de tomate lors de conditions limitantes et de carence en azote. Ces caractéristiques pourraient être exploitées pour renforcer la résistance des plantes aux différentes agressions rencontrées lors des cultures. Par contre, sur fruits, les modifications ont été plus faibles et moins régulières. La nutrition azotée ne semble pas être le paramètre le plus simple à exploiter pour augmenter le contenu en polyphénols particulièrement dans les fruits. En effet lors de la culture sur un cycle complet de tomate, nous avons observé qu'une diminution des apports en azote provoquait une modification du développement végétatif de la plante, ce qui induit d'autres sources de variation (microclimat du fruit) qui vont interagir avec le facteur principal, et qui ne seront pas contrôlées. De plus au regard de la littérature, et de nos observations, l'effet de la saison de culture, principalement dû à des conditions de rayonnement, de température (Riga *et al*, 2008) peut engendrer une modification importante de la composition des fruits (Slimestad et Verheul, 2005).

Durant ce travail de thèse nous avons utilisé plusieurs systèmes de cultures, et mené des études sur plusieurs cultivars. Le système de culture hydroponique est parfaitement adapté pour étudier l'influence de la composition minérale des solutions nutritives, et particulièrement s'il permet un ajustement continu des solutions (NFT). Ces premiers travaux ont également permis d'établir des bases de méthodologie notamment pour la caractérisation et l'identification des composés phénoliques présents chez la tomate. Au vue des travaux menés dans d'autres domaines, comme en génomique, nous avons voulu utiliser le cultivar Microtom comme plante modèle. En effet ce cultivar présente plusieurs caractéristiques intéressantes, dont un cycle de culture court et un encombrement minime. Cependant j'émets

de fortes réserves sur l'intérêt de continuer les travaux de l'équipe avec ce cultivar. En effet, nous avons évoqué à plusieurs reprises l'importance de la croissance des plantes, et de l'âge des feuilles. Donc, à moins de travailler sur un niveau de feuilles précis, la croissance déterminée de cette plante me semble être une limite à son utilisation. De plus l'architecture de ce cultivar me semble peu propice pour l'étude de la qualité des fruits. Enfin ce cultivar présente une sensibilité à la température. En effet des fruits parthénocarpiques peuvent être formés, notamment si les conditions de température sont trop faibles le matin. Nous avons rencontré des difficultés à conduire ce cultivar sous serre, en particulier lorsqu'il est soumis à des températures trop élevées ($>30^{\circ}\text{C}$). En conséquence, les résultats d'une expérimentation n'ont pas pu être exploités.

Dans ce travail nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'effet de l'environnement (E) sur les concentrations en polyphénols. Or ces concentrations sont également soumises à un déterminisme génétique (G) important, auquel s'ajoutent les interactions avec l'environnement (GxE) (Hamilton *et al*, 2001). Il serait intéressant de considérer plus précisément le rôle du génotype et de ses interactions avec l'environnement (GxE). Les plateformes de phénotypage en développement dans la recherche agronomique actuelle, sont des outils adaptés pour avoir accès à ces informations.

Par ailleurs j'ai également commencé quelques travaux à l'échelle cellulaire et moléculaire. J'ai effectué des cultures de cellules sur différents milieux azotés pour étudier notamment l'activité de la Phenylalanine Amonia Lyase. Nous avons également commencé à caractériser les isoformes de cette enzyme et leurs potentielles implications pour des réactions différentes. Ces travaux sont toujours en cours et me semblent pertinents pour mieux caractériser et décrire l'activité de cette enzyme, qui est la première enzyme de la voie de biosynthèse des polyphénols.

Des approches de fluxomiques sont en cours de réalisation dans l'équipe. Ces travaux permettront d'accéder à des connaissances sur la dynamique des réactions enzymatiques, et sur les transferts de composés phénoliques entre organes. En effet les différentes expérimentations présentées dans ce document ont souligné la complexité d'étudier ces composés dont les concentrations évoluent en fonction de la phénologie de plante, et qui sont sensibles à de nombreux paramètres environnementaux. Nous avons évoqué à plusieurs reprises dans ces chapitres, la nécessité d'avoir davantage de connaissances sur le transfert de ces composés et cela à plusieurs niveaux, notamment des feuilles vers les fruits. La caractérisation de la formation de ces composés, et de leur transfert représente pour moi, une

étape importante dans la compréhension de l'évolution du contenu en polyphénols de la tomate en fonction de son environnement.

Références Bibliographiques

- Abbeyes H, Chadefaud M, Ferre Y, Feldmann J, Gaussen H, Grasse P P, Leredde M C, Ozenda P, Prevot A R, (1963). Botanique Anatomie Cycles évolutifs systématique, Masson et Cie.
- Adamowicz S, Le Bot J, (2008). "Altering young tomato plant growth by nitrate and CO₂ preserves the proportionate relation linking long-term organic-nitrogen accumulation to intercepted radiation." *New Phytologist* 180: 663-672.
- Aherne S A, O'Brien N M, (2002). "Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism." *Nutrition* 18(1): 75-81.
- Ahmad A, Fatemeh H, Mahnaz A, Hameidreza S, (2006). "Effects of nitrogen sources and levels on growth and alkaloid content of periwinkle." *Asian Journal of Plant Sciences* 5(2): 271-276.
- Albu-Yaron A, Feigin A, Rylski I, (1993). "The quality of tomato for canning as affected by combined chloride, nitrate and osmotic potential of the nutrient solution." *Plant Foods for Human Nutrition* 43: 201-210.
- Andreu A, Oliva C, Distel S, Daleo G, (2001). "Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*." *Potato Research* 44: 1-9.
- Atherton J C, Rudich J, (1986). The tomato crop : a scientific basis for improvement. London, Chapman and Hall. 661.
- Awad M A, De Jager A, (2002). "Relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in *Elstar* apple skin." *Scientia Horticulturae* 92: 265-276.
- Aziz A B, (1968). "Seasonal changes in the physical and chemical composition of tomato fruits as affected by nitrogen levels." *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 68(7): 1-6.
- Bangerth F, Ho L C, (1984). "Fruit position and fruit set sequence in a truss as factors determining final size of tomato fruits." *Annals of Botany* 53: 315-319.
- Barto E K, Cipollini D, (2005). "Testing the optimal defense theory and the growth-differentiation balance hypothesis in *Arabidopsis thaliana*." *Oecologia* 146(2): 169-178.
- Bauer S, Schulte E, Thier H P, (2004). "Composition of the surface wax from tomato. II. Quantification of the components at the ripe red stage and during ripening." *European Food Research and Technology* 219(5): 487-491.
- Bazzano L A, (2008). Epidemiologic evidence for the effect of fruit and vegetables on cardiovascular diseases, diabetes and obesity. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F AGil, M I. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. 6: 119-144.
- Bell-Lelong D A, Cusumano J C, Meyer K, Chapple C, (1997). "Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment." *Plant Physiology* 113(3): 729-738.
- Benard C, Gautier H, Bourgaud F, Grasselly D, Navez B, Caris-Veyrat C, Weiss M, Genard M, (2009). "Effects of Low Nitrogen Supply on Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruit Yield and Quality with Special Emphasis on Sugars, Acids, Ascorbate, Carotenoids, and Phenolic Compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(10): 4112-4123.
- Bernards M A, Ellis B E, (1991). "Phenylalanine Ammonia-Lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*." *Plant Physiology* 97: 1494-1500.
- Berrino F, Villarini A, (2008). Fruit and vegetables and cancer. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F AGil, M I.

- Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. **4**: 75-94.
- Billot J, Hartmann C, Macheix J J, Rateau J, (1978). "Les composés phénoliques au cours de la croissance de la poire Passe-Crassane." *Physiologie Végétale* 16(4): 693-714.
- Blanc D, (1986). "The influence of cultural practices on the quality of production in protected cultivation with special references to tomato production." *Acta Horticulturae* 191: 85-98.
- Bongue-Bartelsman M, Phillips D A, (1995). "Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes on the flavonoid biosynthetic pathway of tomato." *Plant Physiology and Biochemistry* 33(5): 539-546.
- Bovy A, De Vos R, Kemper M, Schijlen E, Almenar Pertejo M, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeyen M, Hughes S, Santos-Buelga C, Van Tunen A, (2002). "High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*." *The Plant Cell* 14: 2509-2526.
- Brugière N, Suzuki A, Hirel B, (1997). Assimilation de l'ammonium. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 422.
- Bryant J P, Chapin F S, Klein D R, (1983). "Carbon Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory." *Oikos* 40(3): 357-368.
- Buta J G, Spaulding D W, (1997). "Endogenous Levels of Phenolics in Tomato Fruit during Growth and Maturation." *Journal of plant Growth Regulation* 16(1): 43-46.
- Calvet R, (1990). International Symposium: Nitrates-Agriculture-Eau. Nitrates-Agriculture-Eau, Paris La Défense, INRA.
- Carpena O, Zornoza P, Mataix J, (1982). "Incidence of P, Mn and B deficiencies on the levels of the whole and individual flavonoid groups in tomato leaves." *Journal of Plant Nutrition* 5(10): 1197-1208.
- Carrara S, Pardossi A, Soldatini G F, Tognoni F, Guidi L, (2001). "Photosynthetic activity of ripening tomato fruit." *Photosynthetica* 39(1): 75-78.
- Cartelat A, Cerovic Z G, Goulas Y, Meyer S, Lelarge C, Prioul J L, Barbottin A, Jeuffroy M H, Gate P, Agati G, Moya I, (2005). "Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.)." *Field Crops Research* 91: 35-49.
- Chaillou S, Lamaze T, (1997). Nutrition ammoniacale des plantes. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 422.
- Cheynier V, Sarni-Manchado P, (2006). Structures phénoliques et goût. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier: 398.
- Cipollini M L, Paulk E, Cipollini D F, (2002). "Effect of nitrogen and water treatments on leaf chemistry in horsenettle (*Solanum carolinense*), and relationship to herbivory by flea beetles (*Epitrix* SPP.) and tobacco hornworm (*Manduca sexta*)." *Journal of Chemical Ecology* 28(12): 2377-2398.
- Coley P D, Bryant J P, Chapin F S, (1985). "Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense." *Science* 230(4728): 895-899.
- Colla G, Battistelli A, Moscatello S, Proietti S, Saccardo F, (2003). "Yield and fruit quality of processing tomato hybrids as affected by nitrogen fertigation rates." *Italus Hortus* 10(6): 34-42.
- Cork S J, Krockenberger A K, (1991). "Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigation on *Eucalyptus* leaves." *Journal of Chemical Ecology* 17: 123-134.
- Crosby K, (2008). Agronomy and the nutritional quality of vegetables. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F A Gil, M I.

- Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. **15**: 392-411.
- Crouzet J, (2006). Structures phénoliques et arômes. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. Paris, Tec&Doc. **3**: 55-88.
- Crozier A, Lean M E J, McDonald M S, Black C, (1997). "Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 590-595.
- Dangles O, Dufour C, (2006). Flavonoïd-protein interactions. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Andersen, O MMarkham, K R, CRC Press. **9**: 443-470.
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M, (1998). "Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation." *Current Opinion in Plant Biology* 1: 235-239.
- De Broglie L A, Guérout D, (2005). Tomates d'hier et d'aujourd'hui. Paris, Hoëbeke. 143.
- Degioanni B, (1997). La tomate. Paris, Hatier. 96.
- Delgado R, Martin P, Del Alamo M, Gonzales M R, (2004). "Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 623-630.
- Desjardin Y, (2008). Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F AGil, M I. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. **9**: 201-247.
- Dorais M, Ehret D L, Papadopoulous A P, (2008). "Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer." *Phytochemistry Reviews*.
- Dreccer M F, (2006). "Nitrogen use at the leaf and canopy level: A framework to improve crop N use efficiency." *Journal of Crop Improvement* 15(2): 97-125.
- Dumas Y, Dadomo M, Di Lucca G, Grolier P, (2003). "Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 369-382.
- Dumas Y, Suniaga Quijada J, Bonafous M, (1993). Influence of nitrogen availability on growth and development of tomato plants until fruit-setting. Optimization of plant nutrition: refereed papers from the Eighth International Colloquium for the Optimization of Plant Nutrition, 31 August-8 September 1992, Lisbon, Portugal.
- Errebhi M, Wilcox G E, (1990). "Tomato growth and nutrient uptake pattern as influenced by nitrogen form ratio." *Journal of Plant Nutrition* 13(8): 1031-1043.
- Fajer E D, Bowers M D, Bazzaz F A, (1992). "The effect of nutrients and enriched CO₂ environments on production of carbon-based allelochemicals in Plantago: test of the carbon/nutrient balance hypothesis." *American Naturalist* 140(4): 707-723.
- Faure J D, Meyer C, Caboche M, (1997). Assimilation du nitrate : nitrate et nitrite réductase. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 422.
- Feinbaum R L, Ausubel F M, (1988). "Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene." *Molecular and Cellular Ciology*: 1985-1992.
- Ferrario S, Foyer C H, Morot-Gaudry J F, (1997). Coordination entre métabolismes azoté, photosynthétique et respiratoire. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 235-259.
- Fleuriet A, (1976). "Evolution des composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation des fruits de tomates " cerise " (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*)." *Fruits* 31(2): 117-126.
- Fleuriet A, Macheix J J, (1976). "Effets des conditions anaérobies sur les composés phénoliques de fruits de Tomates " Cerise "." *Physiologie Végétale* 14(3): 407-414.

- Fleuriet A, Macheix J J, (1981). "Quinyl ester and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit." *Phytochemistry* 20(4): 667-671.
- Flores F B, Oosterhaven J, Martinez-Madrid M C, Romojaro F, (2005). "Possible regulatory role of phenylalanine ammonia-lyase in the production of anthocyanins in asparagus (*Asparagus officinalis* L)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85(6): 925-930.
- Flors V, Miralles C, Cerezo M, Gonzales-Bosch C, Garcia-Agustin P, (2001). "Effect of a novel chemical mixture on senescence processes and plant-fungus interaction in solanaceae plants." *J. Agric. Food Chem.* 49: 2569-2575.
- Forde B G, (2000). "Nitrate transporters in plants: structure, fonction and regulation." *Biochemica and Biophysica Acta* 1465: 219-235.
- Friedman M, (2002). "Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 5751-5780.
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M, (2006). "Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism." *The Plant Journal* 46: 533-548.
- Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Pfeiffer F, Reich M, Buret M, Bourgaud F, Poëssel J L, Caris-Veyrat C, Génard M, (2008). "How does tomato quality (sugar, acid and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature and irradiance?" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1241-1250.
- Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot M J, (2005). "Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1370-1373.
- Giovannucci E, (1999). "Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer : review of the epidemiologic literature." *Journal of the national cancer institute* 91(4): 317-331.
- Giovannucci E, (2007). "Does prostate-specific antigen screening influence the results of studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer risk?" *Journal of the National Cancer Institute* 99(14): 1060-1062.
- Gomez L, Rubio E, Auge M, (2002). "A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(4): 360-369.
- Gomez L, Rubio E, Lescourret F, (2003). "Critical study of a procedure for the assay of starch in ligneous plants." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83(11): 1114-1123.
- Gould K S, Lister C, (2006). Flavonoïd functions in plants. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. Andersen, O M Markham, K R, CRC Press. **8**: 397-441.
- Gowri G, Paiva N L, Dixon R A, (1991). "Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants." *Plant Molecular Biology* 17: 415-429.
- Grasselly D, Navez B, Letard M, (2000). Tomate, pour un produit de qualité. 112.
- Grierson D, Kader A A, (1986). Fruit ripening and quality. The tomato crop : a scientific basis for improvement. Atherton, J C Rudich, J. London, Chapman and Hall. **6**: 241-280.
- Grignon C, Thibaud J B, Lamaze T, (1997). Transport du nitrate par la racine. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 422.
- Grusak M A, DellaPenna D, (1999). "Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 133-161.
- Guichard S. (1999). "Flux hydriques, croissance et qualité du fruit de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en conditions estivales sous serre." *Université aix Marseille III*: 118.

- Guidi L, Loreface G, Pardossi A, Malorgio F, Tognoni F, Soldatini G F, (1998). "Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency." *Biologia Plantarum* 40(2): 235-244.
- Guignard J L, (2000). *Biochimie Végétale*. 274.
- Hamilton J G, Zangerl A R, H D E, Berenbaum M R, (2001). "The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall." *Ecology Letters* 4: 86-95.
- Haukioja E, Ossipov V, Koricheva J, Honkanen T, Larsson S, Lempa K, (1998). "Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization?" *Chemoecology* 8: 133-139.
- Herms D A, Mattson W J, (1992). "The dilemma of plants: to grow or defend." *Quarterly Review of Biology* 67(3): 283-335.
- Hertog M G L, Hollman P C H, Venema D P, (1992). "Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1591-1598.
- Hoffland E, Dicke M, Van Tintelen W, Dijkman H, Van Beusichem M L, (2000). "Nitrogen availability and defense of tomato against two-spotted spider mite." *Journal of Chemical Ecology* 26(12): 2697-2711.
- Hollman P C H, (2001). "Evidence for health benefits of plant phenols local or systemic effects?" *Journal of the science of Food and agriculture* 81: 842-852.
- Hollman P C H, Arts I C W, (2000). "Flavonols, flavones and flavanols-nature occurrence and dietary burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1080-1093.
- Hunt G M, Baker E A, (1980). "Phenolic constituents of tomato fruit cuticles." *Phytochemistry* 19(7): 1415-1419.
- Jaganath I B, Crozier A, (2008). Overview of health-promoting compounds in fruit and vegetables. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F A Gil, M I. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. 1: 3-54.
- Johnson I T, (2008). Fruit and vegetables and cancer. clinical evidence for biological activity of fruit and vegetable phytochemicals. Tomas-Barberan, F A Gil, M I. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. 11: 279-297.
- Johnson K S, (2005). "Plant phenolics as radical scavengers in the context of insect (*Manduca sexta*) hemolymph and midgut fluid." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 10120-10126.
- Johnson K S, Felton G W, (2001). "Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco." *Journal of Chemical Ecology* 27(12): 2579-2597.
- Judd W S, Cambell C S., A. K E, P S, (2002). Botanique Systématique Une Perspective Phylogénétique Paris, De Boeck Université. 467.
- Kaluzny-Pinon L, Letard M, Zambujo C, (2001). "La tomate se concentre sur le gout." *Culture Légumière* 61: 25-31.
- Kanai S, Adu-Gymfi J, Lei K, Ito J, Ohkura K, Moghaieb R E A, El-Shemy H, Mohapatra R, Saneoka H, Fujita K, (2008). "N-deficiency damps out circadian rhythmic changes of stem diameter dynamics in tomato plant." *Plant Science* 174: 183-191.
- Kanaze F I, Gabrieli C, Kokkalou E, Georgarakis M, Niopas I, (2003). "Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33(2): 243-249.

- Kaniszewski S, Elkner K, Rumpel J, (1987). "Effect of nitrogen fertilization and irrigation on yield, nitrogen status in plants and quality of fruits of direct seeded tomatoes." *Acta Horticulturae* 200: 195-202.
- Kavanaugh C J, Trumbo P R, Ellwood K C, (2007). "The U.S. food and drug administration's evidence-based review for qualified health claims: Tomatoes, lycopene, and cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 99(14): 1074-1085.
- Khavari-Nejad R A, Mostofi Y, (1998). "Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars." *Photosynthetica* 35(1): 151-154.
- Khelil A, Menu T, Ricard B, (2007). "Adaptative response to salt involving carbohydrate metabolism in leaves of a salt-sensitive tomato cultivar." *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 551-559.
- Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M, (1994). "The flavonoïd biosynthetic pathway in plants : function and evolution." *BioEssays* 16(2): 123-132.
- Koricheva J, Larsson S, Haukioja E, Keinanen M, (1998). "Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis." *Oikos* 83(2): 212-226.
- Kovacik J, Backor M, (2007). "Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants." *Plant and Soil* 297(1/2): 255-265.
- Kovacik J, Klejdus B, Backor M, Repečak M, (2007). "Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes." *Plant Science* 172(2): 393-399.
- Kozukue N, Han J, Lee K, Friedman M, (2004). "Dehydrotomatine and alpha -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(7): 2079-2083.
- Krause M, Galensa R, (1992). "Bestimmung von naringenin und naringenin-chalkon in tomatenschalen mit RP-HPLC nach festphasenextraktion." *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 194: 29-32.
- Kroon P A, Clifford M N, Crozier A, Day A J, Donovan J L, Manach C, Williamson G, (2004). "How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?" *American Journal of Clinical Nutrition* 80(1): 15-21.
- Larsson S, Wiren A, Lundgren L, Ericsson T, (1986). "Effects of light and nutrient stress on leaf chemistry in *salix dasyclados* and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera)." *Oikos* 47(2): 205-210.
- Lawlor D W, (2002). "Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: Mechanisms are the key to understanding production systems." *Journal of Experimental Botany* 53(370): 773-787.
- Le Bot J, Jeannequin B, Fabre R, (2001). "Impact of N-deprivation on the yield and nitrogen budget of rockwool grown tomatoes." *Agronomie* 21: 341-350.
- Letard M, Erard P, Jeannequin B, (1995). Maitrise de l'irrigation fertilisante : Tomate sous serre et abris en sol et hors sol. Paris, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. 127.
- Leyva A, Jarillo J A, Salinas J, Martinez-Zapater J M, (1995). "Low temperature induces the accumulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone Synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner." *Plant Physiology* 108: 39-46.
- Lillo C, Lea U S, Ruoff P, (2008). "Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway." *Plant, Cell and Environment* 31(5): 587-601.

- Lin C, Ahmad M, Cashmore A R, (1996). "Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development." *The Plant Journal* 10(5): 893-902.
- Liu R H, (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer, Washington DC, July 15-16, 2004.
- Loomis W E, (1932). "Growth-Differentiation Balance vs. Carbohydrate-Nitrogen Ratio." *Proceedings of the American Society* 29: 240-245.
- Lopez-Andreu F J, Esteban R M, Molla E, Carpena O, (1988). "Effect of nutrition on tomato fruit quality.II.Carotenoids, ascorbic acid, pectic substances and flavonoids." *Anales de Edafologica y Agrobiologia* 47(7-8): 1191-1198.
- Lüttge U, Kluge M, Bauer G, (2002). Nutrition minérale des plantes. Botanique. Tec&Doc, P, Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G.: 604.
- Macheix J J, Fleuriet A, Jay-Allemand C, (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Presses Polytechniques et Unuversitaires Romandes. 192.
- Madsen E, (1974). "The effect of CO₂-concentration on the occurrence of a number of acids from citric acid cycle in tomato leaves." *Physiologia Plantarum* 32(1): 10-13.
- Maher E A, Bate N J, Ni W, Elkind Y, Dixon R A, Lamb C J, (1994). "Increase disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products." *Plant Biology* 91: 7802-7806.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L, (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* 79(5): 727-747.
- Manthey J A, (2000). "Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation." *Microcirculation* 7(6): S29-S34.
- Margna U, (1977). "Control at the level of substrate supply_an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cell." *Phytochemistry* 16: 419-426.
- Marti E, Gisbert C, Bishop G J, Dixon M S, Garcia-Martinez J L, (2006). "Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom." *Journal of Experimental Botany* 57(9): 2037-2047.
- Martinez-Valverde I, Periago M J, Provan G, Chesson A, (2002). "Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato." *Journal of the Science of Food and agriculture* 82: 323-330.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A, (1997). "A new model system for tomato genetics." *Plant Journal* 12(6): 1465-1472.
- Melin C, Moulet A M, Dupin J, Hartmann C, (1977). "Phenylalanine ammoniaque lyase et composés phénoliques au cours de la maturation de la cerise." *Phytochemistry* 16: 75-78.
- Merkle T, Frohnmeyer H, Schulze-Lefert P, Dangl J L, Hahlbrock K, Schäfer E, (1994). "Analysis of the parsley chalcone-synthase promoter in response to different light qualities." *Planta* 193: 275-282.
- Meyer S, Reeb C, Bosdeveix R, (2008). Botanique, biologie et physiologie végétale, 2ème ed. Paris, Maloine. 490.
- Mikanowski L, Mikanowski P, (1999). Tomate. Paris, edition du chêne-Hachette. 192.
- Mittelstraß K, Treutter D, Pleßl M, Heller W, Elstner E F, Heiser L, (2006). "Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*." *Plant Biology* 8: 653-661.

- Moco S, Bino R J, Vorst O, Verhoeven H A, De Groot J, Van Beek T A, Vervoort J, De Vos C H R, (2006). "A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato." *Plant Physiology* 141(1205-1218).
- Moco S, Capanoglu E, Tikunov Y, Bino R J, Boyacioglu D, Hall R D, Vervoort J, De Vos C H R, (2007). "Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit." *Journal of Experimental Botany* 58(15/16): 4131-4146.
- Mondal K, Sharma N S, Malhotra S P, Dhawan K, Singh R, (2004). "Oxidative stress and antioxidant systems in tomato fruits during storage." *Journal of Food Biochemistry* 27(6): 515-527.
- Mori T, Sakurai M, Sakuta M, (2001). "Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*." *Plant Science* 160: 355-360.
- Mortain-Bertrand A, Stammitti L, Telef N, Colardelle P, Brouquisse R, Rolin D, Gallusci P, (2008). "Effects of exogenous glucose on carotenoid accumulation in tomato leaves." *Physiologia Plantarum* 134: 246-256.
- Mozafar A, (1993). "Nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: A review." *Journal of Plant Nutrition* 16(12): 2479-2506.
- Muir S R, Collins G J, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos C H R, Van Tunen A J, Verhoeven M E, (2001). "Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols." *Nature Biotechnology* 19: 470-474.
- Muzika R M, (1993). "Terpenes and phenolics in response to nitrogen fertilization: a test of the carbon/nutrient balance hypothesis." *Chemoecology* 4(1): 3-7.
- Naczek M, Shahidi F, (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." *Journal of Chromatography A* 1054(1-2): 95-111.
- Naczek M, Shahidi F, Sullivan A, (1992). "Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems." *Food Chemistry* 45(1): 51-54.
- Napoli C A, Fahy D, Wang H Y, Taylor L P, (1999). "*white anther*: A petunia mutant that abolishes pollen flavonol accumulation, induces male sterility, and is complemented by a chalcone synthase transgene." *Plant Physiology* 120(2): 615-622.
- Niggeweg R, Michael A, Martin C, (2004). "Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid." *Nature Biotechnology* 22(6): 746-754.
- Nowacki E, Jurzysta M, Gorski P, Nowacka D, Waller G R, (1976). "Effect of nitrogen nutrition on alkaloid metabolism in plants." *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 169(3): 231-240.
- Ohnmeiss T E, Baldwin I T, (2000). "Optimal Defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense." *Ecology* 81(7): 1765-1783.
- Palmer S J, Berridge D M, McDonald A J S, Davies W J, (1996). "Control of leaf expansion in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by nitrogen nutrition." *Journal of Experimental Botany* 47(296): 359-368.
- Parisi M, Giordano I, Pentangelo A, D'Onofrio B, Villari G, (2006). "Effects of different levels of nitrogen fertilisation on yield and fruit quality in processing tomato." *Acta Horticulturae* 700: 129-132.
- Parr A J, Bolwell G P, (2000). "Review : Phenols in the plant and in the man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 985-1012.
- Pecaut P, Philouze J, (1968). "Les variétés de tomate cultivées en France." *PHM* 87: 4959-4973.
- Peet M M, Welles G, (2005). Greenhouse Tomato Production. Tomatoes. Heuvelink, E. Wallingford, UK, CABI Publishing: 257-304.

- Penalosa J M, Sarro M J, Revilla E, Carpena R, Cadahia C, (1989). "Influence of phosphorus supply on tomato plant nutrition." *Journal of Plant Nutrition* 12(5): 647-657.
- Penuelas J, Estiarte M, (1998). "Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function?" *Trends in Ecology & Evolution* 13(1): 20-24.
- Péron J Y, (2006). Références Production Légumière 2ème édition. Paris, Lavoisier. 613.
- Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G, (2006). "Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes." *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 11-19.
- Raffo A, Leonardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giuffrida F, Quaglia G, (2002). "Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv Naomi F1) harvested at different ripening stages." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22): 6550-6556.
- Razal R A, Ellis S, Singh S, Lewis N G, Towers G H, (1996). "Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism." *Phytochemistry* 41(1): 31-35.
- Reichardt P B, Chapin F S, Bryant J P, Mattes B R, Clausen T P, (1991). "Carbon/nutrient balance as a predictor of plant defense in alaska balsam poplar: potential importance of metabolite turnover." *Oecologia* 88(3): 401-406.
- Renaud V, (2003). Tomate. Tous les légumes courants, rares ou méconnus cultivables sous nos climats. Ulmer. Paris, Ulmer: 135-137.
- Renaud V, (2006). Les tomates qui ont du goût. Paris, Eugen Ulmer. 95.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G, (1997). "Antioxidant properties of phenolic compounds." *Trends in Plant Science* 2(4): 152-159.
- Riga P, Anza M, Garbisu C, (2008). "Tomato quality is more dependent on temperature than on photosynthetically active radiation." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 156-166.
- Rivero R M, Ruiz J M, Garcia P C, Lopez-Lefebvre L R, Sanchez E, Romero L, (2001). "Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants." *Plant Science* 160: 315-321.
- Ruelas C, Tiznado-Hernandez M E, Sanchez-Estrada A, Robles-Burgueno M R, Troncoso-Rojas R, (2006). "Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit." *Journal of Phytopathology* 154(4): 236-244.
- Ruiz J M, Bretones G, Baghour M, Ragala L, Belakbir A, Romero L, (1998). "Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves." *Phytochemistry* 48(2): 269-272.
- Sanchez-Moreno C, Cano M P, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granada F, Martin A, (2003). "Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans." *American Journal of Clinical Nutrition* 78(3): 454-460.
- Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H, (1999). "Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds : implications for the anti-tumor-protector effect of vegetables." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 397-402.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L, (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(4): 287-306.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C, (2002). "Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56(6): 276-282.

- Scheible W R, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M, (1997). "Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco." *Plant Cell* 9(5): 783-798.
- Scheible W R, Lauerer M, Schulze E D, Caboche M, Stitt M, (1997). "Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco." *The Plant Journal* 11(4): 671-691.
- Scheible W R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi M K, Stitt M, (2004). "Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen." *Plant Physiology* 136: 2483-2499.
- Scholberg J, McNeal B L, Boote K J, Jones J W, Locascio S J, Olson S M, (2000). "Nitrogen stress effects on growth and nitrogen accumulation by field-grown tomato." *Agronomy Journal* 92: 159-167.
- Schumann E, (1996). Tomates, Chantecler, Belgique. 79.
- Scott J W, Harbaugh B K, (1989). "Micro-tom. A miniature dwarf tomato." *Circular-Florida, Agricultural Experiment Station S-370*: 6pp.
- Shadle G L, Wesley V S, Korth K L, Chen F, Lamb C, Dixon R A, (2003). "Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase." *Phytochemistry* 64: 153-161.
- Siddiqi M Y, Kronzucker H J, Britto D T, Glass A D M, (1998). "Growth of a tomato crop at reduced nutrient concentrations as a strategy to limit eutrophication." *Journal of Plant Nutrition* 21(9): 1879-1895.
- Simonne A H, Fuzeré J M, Simonne E, Hochmuth R C, Marshall M R, (2007). "Effects of nitrogen rates on chemical composition of yellow grape tomato grown in a subtropical climate." *Journal of Plant Nutrition* 30: 927-935.
- Singh M, Ramassamy C, (2008). Beneficial effects of phenolic compounds from fruit and vegetables in neurodegenerative diseases. Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Tomas-Barberan, F AGil, M I. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. 7: 145-181.
- Sionneau P, Chapellet-Lopez J, (2004). Ces aliments qui nous soignent, La diététique alimentaire chinoise. Paris, La Maisnie-Tredaniel. 586.
- Slimestad R, Verheul M J, (2005). "Seasonal variation in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3114-3119.
- Soto-Zamora G, Yahia E M, Brecht J K, Gerdana A, (2004). "Effects of the post harvested hot air treatments on the quality and antioxidant levels in tomato fruit." *Scientia Horticulturae* 84: 284-296.
- Sreevalli Y, Kulkarni R N, Baskaran K, Chandrashekara R S, (2004). "Increasing the content of leaf and root alkaloids of high-alkaloid-content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization." *Industrial Crops and Products* 19(2): 191-195.
- Stamp N, (2003). "Theory of plant defensive level: example of process and pitfalls in development of ecological theory." *Oikos* 102(3): 672-678.
- Stamp N, (2004). "Can the growth-differentiation balance hypothesis be tested rigorously?" *Oikos* 107(2): 439-448.
- Stewart A J, Bozonnet S, Muller W, Jenkins G I, Lean M E J, Crozier A, (2000). "Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2663-2669.

- Stewart A J, Chapman W, Jenkins G I, Graham I, Martin T, Crozier A, (2001). "The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues." *Plant, Cell and Environment* 24: 1189-1197.
- Stitt M, (1999). "Nitrate regulation of metabolism and growth." *Current Opinion in Plant Biology* 2: 178-186.
- Stout M J, Brovont R A, Duffey S S, (1998). "Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*." *Journal of Chemical Ecology* 24(6): 945-963.
- Tischner R, Kaiser W, (2007). Nitrate assimilation in plants. Biology of the Nitrogen Cycle. Bothe, H, Ferguson, S J, Newton. Amsterdam, Elsevier B.V: 427.
- Tomas-Barberan F A, Espin J C, (2001). "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables." *Journal of the Science of Food and agriculture* 81: 853-876.
- Tomas-Barberan F A, Gil M I, (2008). Improving the health-promoting properties of fruit and vegetable products. Cambridge, UK., New York, USA, Woodhead publishing limited, CRC press. 560.
- Tomes M, (1963). "Temperature Inhibition of Carotene Synthesis in Tomato." *Botanical Gazette* 124: 180.
- Toor R K, Savage G P, Heeb A, (2006). "Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes." *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 20-27.
- Toor R K, Savage G P, Lister C E, (2006). "Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes." *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 1-10.
- Touraine B, Gojon A, (1997). Intégration de l'absorption du nitrate dans la plante. Assimilation de l'azote chez les plantes. Morot-Gaudry, J F, INRA, Paris: 422.
- Treutter D, (2006). "Significance of flavonoids in plant resistance: a review." *Environment and Chemistry Letter* 4: 147-157.
- Urbanczyk-Wochniak E, Fernie A R, (2005). "Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants." *Journal of Experimental Botany* 56(410): 309-321.
- Vendrell M, (2003). "Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene." *IOS Press*: 235-236.
- Vercambre G, Adamowicz S, (1996). "Measuring nitrate concentration in nutrient solutions in the presence of polyethylene glycol through UV spectrometry." *Agronomie* 16(2): 73-87.
- Walker A J, Ho L C, (1977). "Carbon translocation in the tomato: effects of fruit temperature on carbon metabolism and the rate of translocation." *Annals of Botany* 41(174): 825-832.
- Walton N J, Brown D E, (1999). Chemicals from plants : Perspectives on secondary products. London, World Scientific. 425.
- Wang S Y, Bunce J A, Maas J L, (2003). "Elevated carbon dioxide increases contents of antioxidant compounds in field-grown strawberries." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(15): 4315-4320.
- Wang Y H, Garvin D F, Kochian L V, (2001). "Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition." *Plant Physiology* 127(1): 345-359.

- Wang Y T, Huang S W, Liu R L, Jin J Y, (2007). "Effects of nitrogen application on flavor compounds of cherry tomato fruits." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 461-468.
- Warner J, Zhang T, Hao X, (2004). "Effects of nitrogen fertilization on fruit yields and quality of processing tomatoes." *Canadian Journal of Plant Science* 84(3): 865-871.
- Wilkins R T, (1997). "Limitations of evaluating the growth-differentiation balance hypothesis with only two levels of light and water." *Ecoscience* 4(3): 319-326.
- Wilkins R T, Spoerke J M, Stamp N E, (1996). "Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability." *Ecology* 77(1): 247-258.
- Williams R J, Spencer J P E, Rice-Evans C, (2004). "Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?" *Free Radical Biology and Medicine* 36(7): 838-849.
- Winkel B S J, (2004). "Metabolic channeling in plants." *Annual Review of Plant Biology* 55: 85-107.
- Winter M, Herrmann K, (1986). "Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34: 616-620.
- Wu B H, Genard M, Lescouret F, Gomez L, Li S H, (2002). "Influence of assimilate and water supply on seasonal variation of acids in peach (cv Suncrest)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(15): 1829-1836.
- Yamunarani K, Jaganathan R, Bhaskaran R, Govindaraju P, Velazhahan R, (2004). "Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes." *Acta Physiologiae Plantarum* 26(3): 281-290.
- Yao K, De Luca V, Brisson N, (1995). "Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*." *The Plant Cell* 7: 1787-1799.
- Zornoza P, Esteban R M, (1984). "Flavonoids content of tomato plants for the study of the nutritional status." *Plant and Soil* 82(2): 269-271.

Liste des Figures et Tableaux

Liste des figures :

Figure 1 : (A) Fleur de tomate à cinq pétales soudés, en anthèse. (C) Carte postale (Roger Phillips, Nouvelles Images SA) illustrant la diversité des formes, tailles et couleurs des fruits de tomate. (B) Schéma d'un fruit en coupe transversale représentant les différentes parties de la baie.....	16
Figure 2 : (A) Plant de tomate cerise (cv Cervil), à croissance indéterminée, cultivé en pot sous serre. (B) Plant de tomate nain (cv Red Robin) à croissance déterminée, cultivé en pot.....	16
Figure 3 : Composition moyenne de la matière sèche du fruit de tomate (adaptée de Davis et Hobson 1981).....	20
Figure 4 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des polyphénols végétaux. ...	26
Figure 5 : Illustration d'un mécanisme d'action des polyphénols : la donation d'hydrogène.	30
Figure 6 : Représentation des différentes phases de prolifération du cancer et des potentiels lieux d'action des polyphénols végétaux.	30
Figure 7 : Exemples de composés phénoliques identifiés chez la tomate.....	34
Figure 8 : Schéma simplifié de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium dans une cellule photosynthétique.	40
Figure 9 : Régulation coordonnée des métabolismes carboné et azoté par le nitrate.....	44
Figure 10 : Représentation du phénomène de recyclage de l'azote faisant intervenir les métabolismes primaire et secondaire..	46
Figure 11 : Représentation théorique selon la GDBH du taux d'assimilation du CO ₂ (Net Assimilation Rate), du taux de croissance relatif (Relative Growth Rate) et du taux de synthèse des métabolites secondaires, en fonction de la nutrition azotée.....	50
Figure 12 : (A) Plant de tomate (cv Rondello) en culture NFT sous serre à Avignon ; (B) Plant de tomate (cv Clotilde) cultivé sous serre en hydroponie sur laine de roche ; (C) Plant de tomate (cv Microtom) en culture NFT sous serre à Avignon ; (D) Plant de tomate (cv Microtom) en culture hydroponie en conteneurs, en phytotron à Nancy.....	58
Figure 13 : Quantité de polyphénols, en unité arbitraire, extraits selon les 3 solvants utilisés : éthanol, acétone et méthanol à 70%..	62
Figure 14 : Quantité de polyphénols obtenus, suivant deux méthodes d'extraction : une extraction avec 30min d'agitation ou 3 extractions avec 5minutes d'agitation..	62

Figure 15 : Quantité de polyphénols (unité d'absorbance), obtenus dans chaque fraction de l'extraction en 3 fois 5 minutes d'agitation.....	64
Figure 16 : Quantité de polyphénols isolée dans des fruits de tomate extraits avec 5 ou 10 ml de solvant.....	64
Figure 17 : Quantité de polyphénols (unité arbitraire) obtenue dans les limbes, suivant deux méthodes d'extraction : 3 fois 5minutes ou une fois 30min d'agitation..	66
Figure 18 : Représentation du gradient d'élution de la méthode longue (230 minutes), % de méthanol en fonction du temps.	70
Figure 19 : Représentation du gradient d'élution de la méthode courte (120 minutes), % de méthanol en fonction du temps.	70
Figure 20 : Chromatogramme HPLC de fruit de tomate rouge (cv Microtom), enregistré à la longueur d'onde $\lambda=330\text{nm}$, et les spectres d'absorbance dans l'UV des molécules identifiées.	72
Figure 21 : Représentation théorique des résultats obtenus.	83
Figure 22 : Chromatogrammes obtenus par HPLC à une longueur d'onde de 330nm, de racine, tige et limbe de tomate cv Rondello.	90
Figure 23 : Effet de la nutrition azotée après 25 jours de culture sur les teneurs en azote réduit et azote total (A), en nitrate (B) (g/100gMS) sur la surface des limbes (C) (en cm^2), ainsi que sur les teneurs en composés phénoliques : acide chlorogénique (D), rutine (E), kaempférol rutinoside (F) (mg/gMS)	94
Figure 24 : Concentrations en acide chlorogénique (mg/gMS), dans des limbes de tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis..	98
Figure 25 : Evolution des concentrations en acide chlorogénique (mg/plante) au sein des plantes, dans des limbes de tomates récoltées 14, 18, 21 (A) et 25 (B) jours après le semis.....	101
Figure 26 : Evolution des matières fraîches (MF) des limbes tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture..	102
Figure 27 : Evolution des concentrations en acide chlorogénique (mg/gMS), dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture.	104
Figure 28 : Evolution des teneurs en acide chlorogénique (A), rutine (B) et kaempférol rutinoside (C) en mg/plante, dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture.	105
Figure 29 : Représentation simplifiée du protocole expérimental utilisé pour étudier l'effet d'une carence azotée ponctuelle chez la tomate.....	118

Figure 30 : Evolution du nombre de fleurs et de la masse fraîche des limbes, tiges et racines, au cours des expérimentations A (prélèvement à 10 et 15 jours) et B (prélèvement à 19 et 24 jours).....	124
Figure 31 : Répartition de la matière fraîche dans les plants de tomate après 10 jours de carence ou de culture sur un milieu riche.....	126
Figure 32 : Evolution des teneurs en composés phénoliques (acide chlorogénique et rutine en mg/g MS) et des teneurs en azote et carbone total (g/100gMS), pour les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours)..	129
Figure 33 : Itinéraire cultural depuis la plantation (P) en novembre jusqu'à la dernière récolte en juillet, bouquet 19 (B19).....	144
Figure 34 : Accumulation de matière sèche dans les limbes, rachis, tiges, pédoncules, fruits et l'ensemble des parties aériennes, entre février et juillet, selon la nutrition azotée (4, 6 et 12 mM NO ₃ ⁻).....	150
Figure 35 : Fractions de trouée pour chaque numéro de bouquet, <i>ie</i> la pénétration de la lumière à travers le feuillage jusqu'au fruit, suivant les milieux azotés.	152
Figure 36 : Chromatogramme HPLC, d'un extrait de fruit de la variété Clotilde, à la longueur d'ondes 330nm..	155
Figure 37 : Plants de Microtom cultivés (en 2007) depuis 15 jours en hydroponie, sur des milieux contenant, de gauche à droite, 0,5, 1, 3 et 7 mM NO ₃ ⁻	160
Figure 38 : Chromatogramme HPLC, d'un extrait de fruit rouge de la variété Microtom (culture de 2006), à la longueur d'ondes 330nm.....	162
Figure 39 : Evolution des concentrations (mg/g MS) en acide chlorogénique (chloro), rutine et kaempférol rutinoside (KR) dans les limbes, en fonction du nombre de jours après le semis.....	182
Figure 40 : Evolution (A) de la surface foliaire totale des limbes (cm ² /plante) et (B) de la MS de limbe par plante (g/plante) en fonction du nombre de jours après le semis.	182
Figure 41 : Evolution des températures (°C) et du rayonnement (mole.m ⁻² .j ⁻¹) journaliers moyens au cours des deux cultures..	190
Figure 42 : Concentrations en polyphénols en fonction du stade de maturation des fruits....	190

Liste des tableaux :

Tableau 1: Composition du fruit de tomate. Les données sont en grammes pour 100g de matière fraîche consommable.....	20
Tableau 2 : Exemple de composition de solution nutritive en milliéquivalent par litre, suivant le dispositif de culture, en flux continu (Nutrient Film Technique) ou sur un substrat organique.....	24
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des méthodes d'extraction utilisées selon le chapitre, et des rendements obtenus.....	68
Tableau 4 : Composition des solutions nutritives utilisées en cultures hydroponiques suivant les teneurs en nitrate du milieu.....	80
Tableau 5 : Composition de la solution d'oligoélément apportée lors des cultures hydroponiques à Nancy.....	84
Tableau 6 : (A) Quantité de matière fraîche produite par plante, en gramme après 25 jours de culture, en fonction des traitements azotée (mM NO ₃ ⁻ en solution). (B) Distribution relative de la biomasse fraîche totale entre les différents organes, après 25 jours de culture, en fonction des traitements azotée (mM NO ₃ ⁻ en solution).....	88
Tableau 7 : Effet de la nutrition azotée sur les concentrations en composés phénoliques, et les teneurs en carbone et azote totaux, dans les racines (A), tiges (B) et limbes (C). Les concentrations en polyphénols sont en mg/gMS, et les teneurs en carbone et azote totaux en gramme pour 100g de MS.....	92
Tableau 8 : Paramètres relatifs aux régressions par parties, calculées pour analyser l'effet de la nutrition azotée sur les teneurs en nitrate, en azote réduit et total, ainsi que sur la surface des limbes, les teneurs en composés phénoliques (acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside).....	92
Tableau 9 : Teneurs en N et C totaux (g/ 100 gMS) dans les limbes, et MF de limbe produite (en g/plant), pour des tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis.....	96
Tableau 10 : Concentrations en mg/gMS d'acide chlorogénique (Chloro), de rutine et de kaempférol rutinoside (KR), dans des limbes de tomates récoltées 14, 18 et 21 jours après le semis.....	96
Tableau 11 : Rapport entre deux prélèvements de la matière sèche produite, des teneurs en acide chlorogénique (Chloro en mg par plante) et de la somme Chloro, Rutine, KR (Tot, en équivalent d'acide chlorogénique par plante).....	98

Tableau 12 : Teneurs en N et C totaux (g/ 100 gMS) dans des limbes, et MF (en g/plant) de limbe, pour des tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture. Les valeurs sont des moyennes calculées sur 4 plantes.....	102
Tableau 13 : Concentrations en mg/g MS d'acide chlorogénique (Chloro), de rutine et de kaempférol rutinoside (KR), dans des limbes de tomates récoltées après 4, 8, 13, 16 et 20 jours de culture.....	104
Tableau 14 : Impact d'une carence azotée (expé A : 10 jours ; expé B : 19 jours) et d'un retour sur le milieu riche (5 jours) sur le nombre de fleurs, le poids de matière fraîche des limbes, tiges et racines..	122
Tableau 15 : Equations des régressions obtenues, pour représenter l'évolution du nombre de fleurs et de la masse fraîche des limbes, tiges et racines au cours du temps, selon les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours).....	124
Tableau 16 : Nombre, poids total (g) et poids moyen (g/fruit), et pourcentage de MS (g pour 100g MF) des fruits récoltés lors de l'expérimentation B entre le 26 juillet et le 13 août	126
Tableau 17 : Impact d'une carence azotée (expé A : 10 jours ; expé B : 19 jours) et d'un retour sur le milieu riche (5 jours) sur les concentrations en acide chlorogénique et en rutine (mg/g MS), les teneurs en azote total et carbone total (g/100gMS) dans les limbes... ..	126
Tableau 18 : Equations des régressions obtenues, pour représenter l'évolution des teneurs en composés phénoliques et en N et C total, selon les expérimentations A (entre 10 et 15 jours) et B (entre 19 et 24 jours).	129
Tableau 19 : Teneurs en acide chlorogénique (Chloro), et en rutine en mg/gMS, et teneurs en azote total et carbone total en g/100gMS dans les fruits de tomate récoltés entre le 26 juillet et le 13 août pour l'expérimentation B..	130
Tableau 20 : Teneurs en acide chlorogénique et en rutine dans les limbes en mg par plant, après la période de retour sur le milieu riche, au cours des expérimentations A (10 jours de carence) et B (19 jours de carence).	130
Tableau 21 : Composition en macro-éléments (mM.L-1) des trois solutions nutritives utilisées pour étudier l'impact de la nutrition azotée sur la qualité des fruits de la variété Clotilde.	142
Tableau 22 : Conditions climatiques pendant le développement des fruits de l'anthèse à la récolte pour chaque bouquet..	146

Tableau 23 : Pourcentage de matière sèche alloué respectivement aux limbes, pétioles, rafles, fruits et tiges par rapport à la matière sèche totale de la plante sur toute la durée de culture.....	150
Tableau 24 : Rendements (kg/m ²) en grappe et commercial calculés mensuellement entre février et juillet pour les trois milieux azotés.....	152
Tableau 25 : Caractéristiques du fruit : poids moyen (g), teneur en matière sèche (g MS pour 100g MF), fermeté, et couleur suivant les milieux de culture et les dates de récolte. Les valeurs sont des moyennes..	154
Tableau 26 : Composition en azote (%N), carbone (%C) totaux et ratio C/N des fruits cv Clotilde cultivés sur trois milieux azotés (4, 6 et 12mM NO ₃ ⁻).	155
Tableau 27 : Concentrations (mg/g MS) en composés phénoliques dans les fruits de tomate en fonction des milieux de culture (4, 6 et 12mM NO ₃ ⁻) et des bouquets récoltés B2, 6, 11, 14 et 19..	156
Tableau 28 : Nombre moyen de fruits par plant, rendement en fruits rouges (en g/plant), poids moyen (g), et pourcentage de MS des fruits, suivant la nutrition azotée (7, 3, 1 et 0.5mM) lors de la culture hydroponique de Microtom en phytotron en 2007.	160
Tableau 29 : Composition en azote (%N), carbone (%C) totaux et ratio C/N dans les fruits de Microtom (2007) en fonction de la nutrition azotée (0,5, 1, 3 et 7mM NO ₃ ⁻) pour les récoltes 1 et 4.....	162
Tableau 30 : Concentrations (mg/g MS) en composés phénoliques dans les fruits de tomate cv Microtom (2007) en fonction des milieux de culture (0,5, 1, 3 et 7mM NO ₃ ⁻) pour les récoltes 1, 2, 3 et 4.....	164
Tableau 31 : Conditions de lumière (μmol.m ⁻¹ .s ⁻²) et de température (°C) au niveau des fruits, lors de leur maturation pendant 6 jours après leur récolte au stade vert.	178
Tableau 32 : Coefficients de déterminations obtenus entre les concentrations en polyphénols (ms/g MS) et la surface des limbes (cm ² /plante), la MS de limbe (g/plante), les contenus en azote et carbone totaux (g/100g MS), et le nitrate (g/100g MS).....	184
Tableau 33 : Coefficients de déterminations obtenus entre les concentrations en polyphénols (ms/g MS) et les conditions de rayonnement et de température au cours de la culture..	184
Tableau 34 : Concentrations en acide chlorogénique, rutine et kaempférol rutinoside dans les limbes, en fonction des apports en nitrate et de la culture. La culture 1 correspond à la culture d'automne, et la culture 2 à celle de printemps.....	186
Tableau 35 : Surface foliaire (cm ² /plante), MS des limbe et MS totale produite en fonction du niveau de nitrate des solutions nutritives et de la culture considérés.....	186

Tableau 36 : MS totale (gramme), MS de limbe (gramme/plante), et surface foliaire (cm ² /plante) en fonction des apports en nitrate et de la culture..	188
Tableau 37 : Rayonnement moyen journalier (mole.m ⁻² .j ⁻¹), et température moyenne de l'air (°C) pendant les deux cultures. Le rayonnement a été subdivisé en deux périodes : 4 à 18 jours après le semis et 19 à 24 jours après le semis.	188
Tableau 38 : Conditions climatiques pendant le développement des fruits de l'anthèse à la récolte pour chaque bouquet.	192
Tableau 39 : Pourcentages de variation des concentrations en polyphénols liés aux traitements azotée (4, 6 ou 12 mM), au sein d'un même bouquet..	192
Tableau 40 : Pourcentages de variation des concentrations en polyphénols liés au nuèero de bouquet, pour un même niveau d'azote..	192
Tableau 41 : Evolution des concentrations en polyphénols dans des fruits récoltés au stade vert et placé pendant 6 jours dans des conditions de maturation différentes de lumière et d'obscurité, et de température 27 ou 32°C.....	194

Annexes

Annexe 1 : Evolution de la qualité du fruit de tomate (sucres, acides, qualité nutritionnelle) en fonction du stade de maturité des fruits et des conditions de lumière et de température. (Gautier *et al*, 2008)

How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance?

HÉLÈNE GAUTIER,^{*,†} VICKY DIAKOU-VERDIN,[†] CAMILLE BÉNARD,[§]
 MARYSE REICH,[#] MICHEL BURET,[#] FRÉDÉRIC BOURGAUD,[§] JEAN LUC POËSSEL,[⊥]
 CATHERINE CARIS-VEYRAT,[#] AND MICHEL GÉNARD[†]

INRA, UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Domaine St. Paul, Site Agroparc, F-84914 Avignon, France, ENSAIA, UMR1121 Agronomie et Environnement, 2 Avenue Forêt de Haye, F-54500 Vandoeuvre, France, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon, F-84000 Avignon, France, and INRA, UR1052 Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint-Maurice, F-84143 Montfavet, France

The objective of this study was to understand the respective impact of ripening stage, temperature, and irradiance on seasonal variations of tomato fruit quality. During ripening, concentrations in reducing sugars, carotenes, ascorbate, rutin, and caffeic acid derivatives increased, whereas those in titratable acidity, chlorophylls, and chlorogenic acid content decreased. Fruit temperature and irradiance affected final fruit composition. Sugars and acids (linked to fruit gustative quality) were not considerably modified, but secondary metabolites with antioxidant properties were very sensitive to fruit environment. Increased fruit irradiance enhanced ascorbate, lycopene, β -carotene, rutin, and caffeic acid derivative concentrations and the disappearance of oxidized ascorbate and chlorophylls. Increasing the temperature from 21 to 26 °C reduced total carotene content without affecting lycopene content. A further temperature increase from 27 to 32 °C reduced ascorbate, lycopene, and its precursor's content, but enhanced rutin, caffeic acid derivatives, and glucoside contents. The regulation by light and temperature of the biosynthesis pathways of secondary metabolites is discussed.

KEYWORDS: Ascorbate; carotene; fruit temperature; irradiance; phenolics; *Solanum lycopersicum*; sugars; tomato

INTRODUCTION

Fresh tomatoes are produced year-round in the greenhouse under contrasting environmental conditions, triggering seasonal variations in their gustative and nutritional quality (1–5). Fruit gustative quality fluctuates with the sugar/acid ratio, which generally increases during summer and decreases during winter. Little is known about the environmental regulation of tomato metabolites that are responsible for variations in fruit nutritional quality (6). Tomato contains carotenes (mostly lycopene and β -carotene, a precursor of vitamin A), vitamin C, in its reduced form, ascorbic acid (AA) and its oxidized form, dehydroascorbic acid (DHA), and several phenolic compounds such as flavonoids (quercetin and kaempferol derivatives including rutin, and

naringenin chalcone) and hydroxycinnamic acid derivatives [caffeic, ferulic and *p*-coumaric acid derivatives including chlorogenic acid (7)]. Several factors can affect these antioxidant concentrations, such as the ripening stage, cultivation practices (water availability, mineral nutrients), and climatic environment (mostly light and temperature (8)). Antioxidants play an important role by scavenging oxygen-active species generated during ripening (9), under excessive radiation (10) and cold or heat stress (11). Ascorbic acid and some phenolics tend to accumulate from the green to midripe stage, whereas the total carotenes increase constantly during the ripening process (8). Seasonal changes in phenolic contents (12) or ascorbate (13) have generally been related to light environment, probably due to their role in photoprotection (14). The soluble phenol content of plants grown under high light is approximately double the content of low-light plants (12). Similarly, transferring plants from shade to sunshine leads to increases of 66% of the ascorbic acid content of ripe fruits (15). However, ascorbate may also decrease with increased fruit solar exposure, probably due to increased ascorbic acid degradation with elevated temperatures (16). The effects of temperature on phenolics and ascorbate have not yet been properly assessed (8). Carotene biosynthesis is

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33 (0)4.32.72.23.45; fax 33 (0)4.32.72.22.82; e-mail gautier@avignon.inra.fr].

[†] INRA, UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles.

[§] ENSAIA, UMR1121 Agronomie et Environnement.

[#] UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA.

[⊥] INRA, UR1052 Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes.

affected by temperature (17), but β -carotene and lycopene show differential sensitivity; temperatures above 32 °C specifically inhibit lycopene accumulation (18). Increased fruit irradiance (19) leads to carotene accumulation at conducive temperatures.

Consequently, secondary metabolites are likely to vary with ripening stage and fruit environment. Nevertheless, it is difficult to correlate fruit composition and fruit environment. Fruit temperature can considerably differ from air temperature because it depends on fruit irradiance, fruit size, and transpiration. Consequently, the impact of increased irradiance can be misunderstood if the temperature impact is not properly taken into account. The experimental environment should therefore be carefully monitored because strong climatic heterogeneities (both irradiance and temperature) may exist among fruits within a plant due to differential exposure to radiation.

Using off-vine fruit ripening provides a convenient tool to study these environmental regulations. This is due to the fact that tomato fruit contains its own photoreceptors (20) and is able to ripen when harvested after the mature green stage. Moreover, during off-vine fruit ripening, both fruit temperature and irradiance can be monitored and separately modulated to determine their specific effects on primary and secondary metabolites.

The present study thus aimed to discriminate the impact during ripening of a range of temperatures and/or fruit irradiances on the gustative and nutritional qualities of cherry tomato fruit. Our objectives were to determine (1) how fruit quality was affected by changing fruit environment during ripening, (2) whether or not the accumulation of secondary metabolites during the ripening process was further enhanced by light and temperature conditions, and (3) the regulatory steps of these secondary metabolites pathways by light and temperature, with special emphasis on the carotene biosynthesis pathway.

MATERIALS AND METHODS

Growth Conditions. Cherry tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Cervil) were grown in a greenhouse in Avignon (southern France, 44° N). On January 23, 2004, seeds were sown in pots (30 × 20 cm) containing potting soil (H21 Tref, Tref EGO Substrates B.V., Moerdijk, The Netherlands), and seedlings were transplanted on February 3 in 7 cm diameter pots containing the same substrate. Plants with five growing leaves were transplanted on February 25 in 4 L pots containing potting soil (P3 Tref, Tref EGO Substrates B.V.) in a multispan Venlo-type greenhouse, N–S oriented. The plants were arranged in N–S-oriented double rows of 39 plants, which created a density of 2.9 plants m⁻² in half a (5.9 × 30.3 m²) compartment of a multispan, Venlo-type, N–S-oriented greenhouse. Plant nutrition and chemical pest and disease control were in accordance with commercial practices. Water was supplied to the plants using a drip irrigation system to replenish potential evapotranspiration as calculated from the Penman–Monteith equation and to maintain 20–30% drainage. Biological crop protection against whitefly was provided by growing *Macrolophus* (mirical, Koppert, France) throughout the plant growing period. Flowers were mechanically pollinated every 2 days. Inflorescences were each pruned to 12 flowers after anthesis to obtain 12 fruits per truss and limit fruit size heterogeneity among trusses. All plant side shoots were removed as they appeared. Old leaves were removed every 20 days, up to the youngest orange truss (color index 3–4, OCDE).

Experiment 1. Experiment 1 was performed to determine the time course of changes in sugars, acids, and secondary metabolites during ripening as fruit external coloration changes from green immature to red. Vine-ripened tomatoes were harvested at different ripening stages on truss 2 and divided into seven classes of fruits (from A to G, **Figure 1**) according to external fruit coloration. At each ripening stage, fruits were randomly chosen to create three batches of 15 fruits and subjected to physical and chemical analyses to determine the influence of ripening stage on fruit quality.

Experiments 2 and 3. In experiments 2 and 3, different temperatures and light regimens were applied during off-vine ripening of mature green fruits to determine their impact on fruit quality.

Mature green fruits were harvested and divided into 13 batches, corresponding to the control (mature green fruit at harvest, **Figure 1**) and the 12 treatments described in **Table 1**. These can be summarized as follows: two light regimens (D, darkness, PAR < 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; or L, irradiation, PAR = 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); two temperatures (21 and 26 °C for experiment 2 or 27 and 32 °C for experiment 3); three ripening times (3, 6, and 8 days for experiment 2 or 1, 3, and 6 days for experiment 3, which ended earlier to avoid over-ripening of fruits).

Each replicate treatment consisted of 15 fruits, plus 4 fruits for fruit temperature measurement by thermocouples that were not further analyzed. Two growth chambers were used to control fruit temperature environment. Fruits were placed individually on trays on a table located 1.5 m from the light source (HQI, Osram, France). The light was left on, and irradiance was measured at the fruit level with Li-190SB quantum sensors (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE; **Table 1**). Fruit temperature was measured every minute on four fruits per treatment with very thin thermocouples (0.2 mm copper/constantan) inserted in the middle of the fruit, then averaged, and stored every 30 min on a delta logger (Delta-T DL2e, Delta-T Devices Ltd, Cambridge, U.K.; **Table 1**).

Fruit Analyses. The physical and chemical analyses were performed as previously described (21). The fruits were first evaluated individually for physical traits, including fresh weight (FW). External color was characterized near the pistil scar, the peduncular scar, and at the equatorial zone by a Minolta Chroma meter (CR 300, Minolta, France SA) using the Hunter color coordinates *L*, *a*, and *b*; (*L* = lightness, *a* ranging from green to red, *b* ranging from blue to yellow). Changes in fruit coloration at the three locations show similar patterns, and no heterogeneous fruit coloration was observed; therefore, only measurements near the pistil scar were retained. Fruits were then frozen in a ventilated freezer at –30 °C and stored at –80 °C until they were ground in liquid N₂ and submitted to various biochemical analyses. Dry matter (DM) content was estimated on a sample fraction by the difference in weight before and after lyophilization. Reducing sugar content was measured by colorimetry (with neocuproin), after extraction by boiled water (22), by measurement at 460 nm with a colorimeter (Technologie Diffusion, France); titratable acidity was analyzed, after extraction by boiled water, by pH end point at pH 8.1. The pH and refraction index were measured on fruit juice obtained after filtering of unfrozen sample fractions.

In the first experiment, pigments were extracted with acetone and petroleum ether; chlorophylls, β -carotene, and lycopene contents were quantified by spectrophotometry (23) with a Shimadzu UV-1605 spectrophotometer. A more precise and complete quantification including different carotene precursors was made in experiments 2 and 3 at harvest and after 6 ripening days under controlled conditions. Carotenes were extracted from 10 g of frozen tomato powder with 100 mL of solvent mixture (hexane/acetone/ethanol, 2:1:1, v/v/v). The mixture was stirred for 30 min in the dark. Water was added (20 mL), and the hexanic phase containing the carotenes was extracted, washed three times with water (3 × 20 mL), filtered on anhydrous sodium sulfate, and evaporated under vacuum. The dry extract was dissolved in 250 μL of methylene chloride/methanol/*tert*-butylmethyl ether (50:25:25, v/v/v) in order to be analyzed by HPLC [HP1050 apparatus equipped with a diode array detector (24)]. The calibration curves for β -carotene (Sigma) and lycopene (extracted from tomato oleoresin kindly provided by Naturex, Avignon, France) were obtained from dilution series of a standard solution. Lycopene content was expressed in milligrams of lycopene per kilogram of FW; other carotenes were expressed as equivalents of β -carotene in milligrams of β -carotene per kilogram of FW. The repeatability of the method was assessed with three replicate analyses of a frozen powder obtained from tomato fruit.

Vitamin C content was determined using the method of Deutsch and Weeks (25), as automated by Egberg et al. (26), with a fluorometer (fluorometer 6200, Jenway). Total and oxidized ascorbate forms were obtained when coal-based activated carbon (Norit, Le Blanc Mesnil, France) was either added or not, respectively, before fluorometric measurement.

Classes	Fruit external coloration	Corresponding pictures
A	"Immature green": corresponding to fruit n+2 where fruit n is at the green mature stage (n corresponds to flower appearance order on the truss).	1
B	"Mature green": green external coloration or very beginning of yellow spot.	2
C	"Breaker stage": green with orange locular tissue and orange spots	3-4
D	Orange dominant with green parts	5
E	Orange to deep orange.	6,7
F	Red	8,9
G	Deep red.	10,11

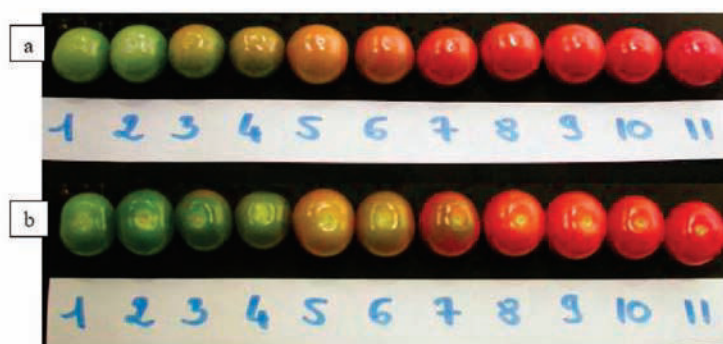


Figure 1. Distribution of vine-ripened tomato fruits into seven classes (from A to G) according to external fruit coloration (a, peduncular zone; b, pistillar zone).

Table 1. Fruit Microclimate and Sampling Dates during off-Vine Experiments

off-vine experiment	experiment 2		experiment 3	
	irradiated fruits	shaded fruits	irradiated fruits	shaded fruits
irradiance at fruit level ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	210	<5	195	<5
fruit temperature ($^{\circ}\text{C}$)	21.2 25.8	20.9 25.6	27.1 32.5	27.6 32.5
sampling dates (days after mature green stage)	3	3	1	1
	6	6	3	3
	8	8	6	6

Phenolic compounds were analyzed at harvest (experiments 1 and 3) and after 6 ripening days under controlled conditions (experiment 3). The extraction method employed (27) was modified as follows. All steps were carried out under cold conditions (4°C): in a cold chamber or on ice. One hundred and twenty-five milligrams of DM was extracted three times with 2.5 mL of 70% cold (-20°C) aqueous ethanol. Fifty microliters of taxifolin (2 mg mL^{-1} methanol, Extrasynthèse, Lyon, France) was added as an internal standard. The mixture was blended for 1 min and homogenized for 15 min the first time and then for 5 min twice. After centrifugation, supernatants were pooled to constitute the raw extract. The extract (total volume = 7.5 mL) was evaporated to dryness under vacuum. The residue was dissolved in 0.5 mL of methanol and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter (Minisart RC 4, Sartorius) prior to injection ($20 \mu\text{L}$) into the HPLC apparatus. Extractions were made in triplicate. Samples were analyzed using a Beckman System

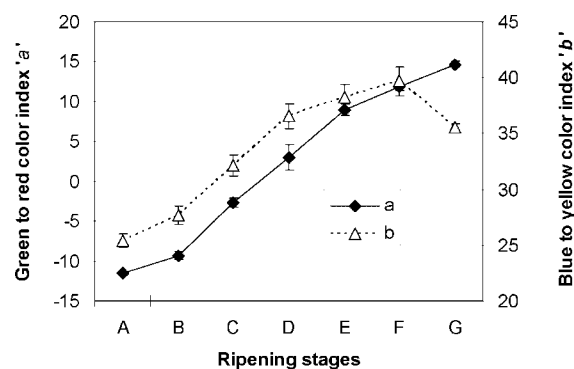


Figure 2. Changes in tomato fruit coloration during ripening. Data are means (\pm confident interval at 95%) of chromameter measurements of 90 fruits near the pistil scar.

Gold instrument consisting of an autosampler 508 and a diode array detector (module 168, screening = 240–350 nm), set at 330 and 280 nm for the quantifications. Chromatographic separations were performed on a Lichrospher RP-18 end-capped column ($4 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Merck, Darmstadt, Germany) fitted with a Lichrospher RP-18 guard column ($5 \mu\text{m}$, Merck). The mobile phase was a binary solvent system consisting of (A) water adjusted to pH 2.6 with orthophosphoric acid and (B) methanol. The gradient (from 3 to 60% of B in 180 min) was eluted at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} at room temperature. All compounds were correctly separated, and quantification was based on peak area, referred to as a standard curve. Rutin content was expressed in milligrams of rutin per kilogram of FW; other compounds were expressed as the equivalent of chlorogenic acid in milligrams of

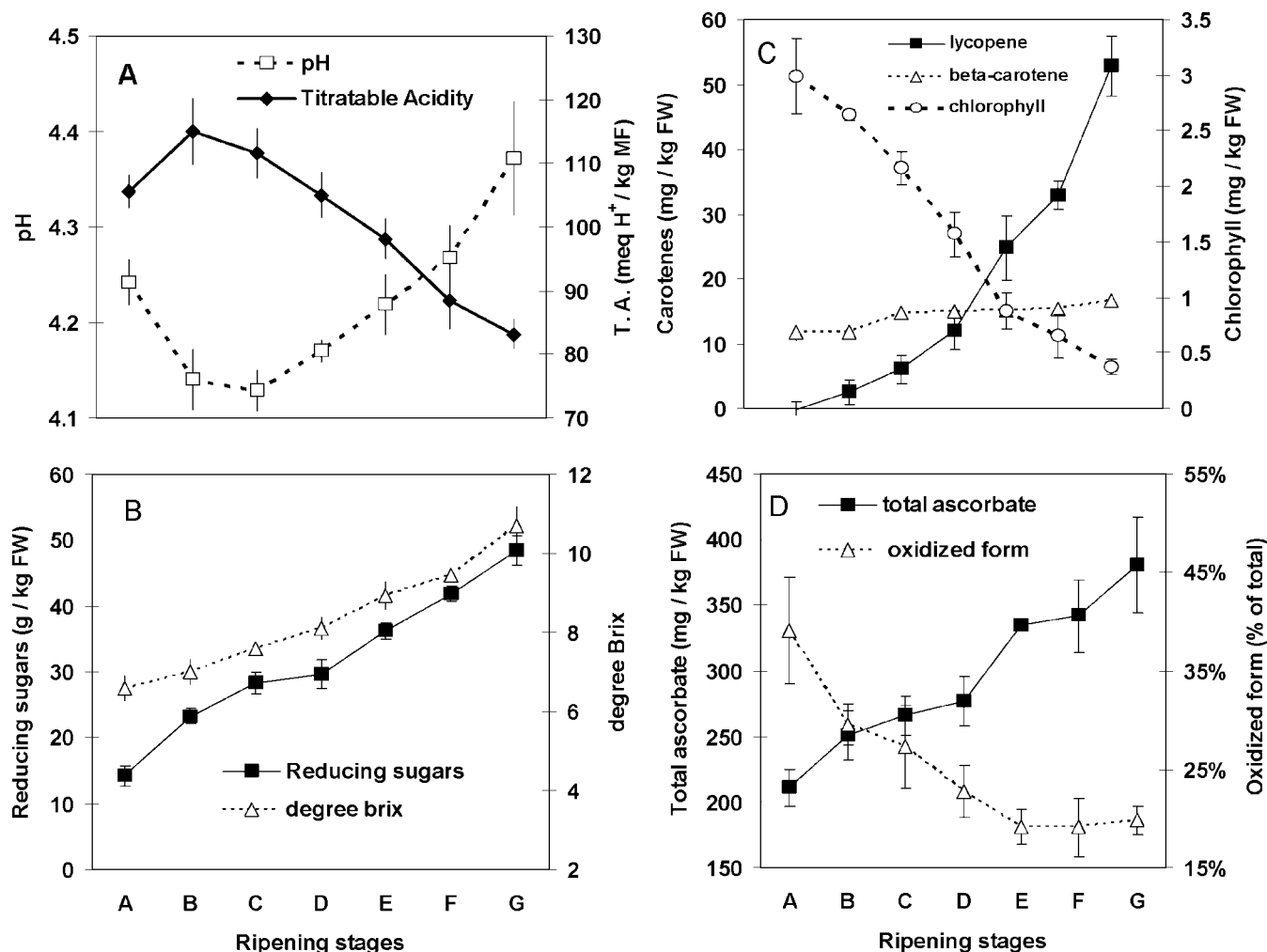


Figure 3. Changes in tomato fruit biochemical composition during ripening: **A**, pH and titratable acidity; **B**, reducing sugars and degrees Brix; **C**, carotenes and chlorophylls; **D**, ascorbate. Data are means (\pm standard deviation, SD) of six batches of 15 fruits.

chlorogenic acid per kilogram of FW. Rutin and chlorogenic acid standards were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). Caffeic derivative compounds were identified by their absorption spectrum in UV (maximum of absorption at 325 nm, see **Figure 4**).

Statistical Analyses. The results of experiment 1 were subjected to one-way analysis of variance considering the factor "ripening stage" (XLstat, version 2007.1, Addinsoft, France). In experiments 2 and 3, the significant effects of temperature, light, ripening time, and the interaction between them were determined from a repeated measures analysis of variance using the GLM procedure from the SAS statistical package (SAS Institute, Inc., Cary, NC). The α level was set at 0.05. Treatment means and standard errors are shown on the curves.

In experiments 2 and 3, fruit contents in different secondary metabolites during ripening were compared after 6 ripening days using a two-way analysis of variance considering the effects of temperature, light, and the interaction between them.

RESULTS

During ripening (experiment 1), both color indices, *a* (which goes from green to red) and *b* (which goes from blue to yellow), increased (**Figure 2**). Titratable acidity (TA) was maximal in mature green fruit (stage B, **Figure 3A**) at 115 mequiv H⁺ kg⁻¹ of FW, then decreased during ripening, and was minimal in deep red fruit (stage G) at 83 mequiv of H⁺ kg⁻¹ of FW. The pH of tomato fruit juice followed a mirror-like curve with a minimal value at the green mature and breaker stages (B and C) and a maximal value at stage G (deep red fruit). Reducing

sugars and the refractometric index (expressed in °Brix) concomitantly increased during on-vine fruit ripening (**Figure 3B**) by 3.4- and 1.6-fold, respectively, compared to immature green fruit. During fruit ripening, chlorophyll content decreased and carotene content increased because chloroplasts are transformed into chromoplasts. Immature green fruit (stage A) contained no lycopene. It did, however, contain 11.7 mg of β -carotene kg⁻¹ of FW, which represents around two-thirds of its final concentration (**Figure 3C**). Deep red fruit contained the greatest amount of both lycopene (52.8 mg kg⁻¹ of FW) and β -carotene (16.7 mg kg⁻¹ of FW). Total ascorbate content increased throughout fruit ripening from 211 mg at the green immature stage to 380 mg kg⁻¹ of FW in deep red fruit (**Figure 3D**). This was mostly due to reduced ascorbate form accumulation (data not shown). In contrast, the oxidized form rapidly decreased from 39% in green immature fruits to 20% of total ascorbate in orange and red fruits (**Figure 3D**).

In deep red tomato, chlorogenic acid, rutin, and a caffeic acid glucoside (CAG) were identified from their absorption spectra (**Figure 4**), plus two caffeic acid derivatives (CAD1, CAD2), which showed absorption spectra close to the chlorogenic acid spectrum (see maximum absorbance and spectrum shape, **Figure 4**). For immature green tomato, chlorogenic acid represented the major peak of the chromatogram at 330 nm, which decreased during ripening (**Figure 4**; **Table 3**). In contrast, the contents of rutin,

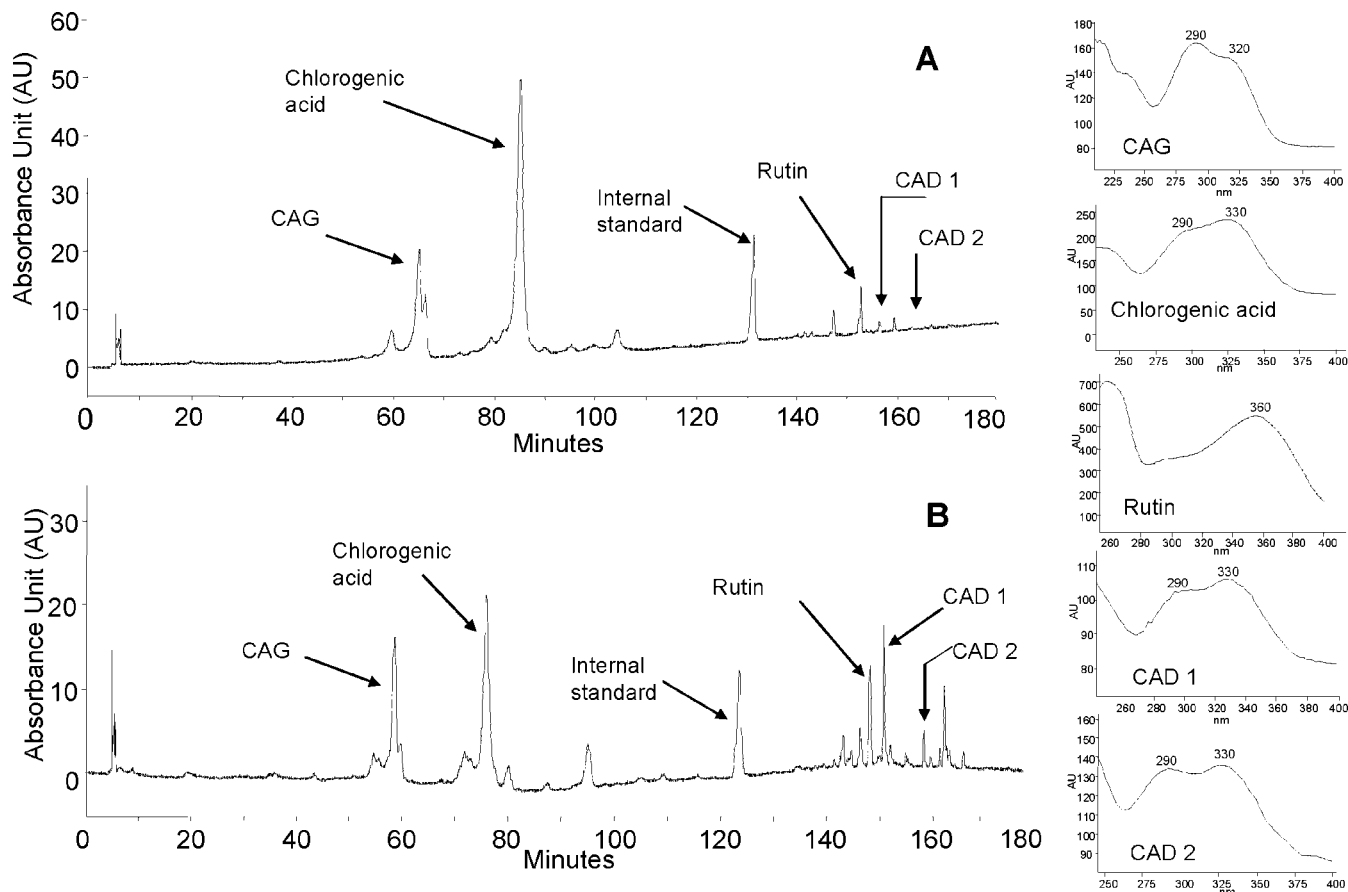


Figure 4. Chromatogram and UV spectra of phenolics found in immature green (A) and deep red (B) cherry tomatoes. Detection was at 330 nm.

Table 2. Impact of Light and Temperature for Six Ripening Days on Carotenoid Content Compared to Initial Fruit Content (Green Mature Fruit)^a

	phytoene	phytofluene	ξ -carotene	neurosporene	lycopene	γ -carotene	β -carotene	total carotenes
Second Experiment								
green mature stage	0.9a	0.6a	0.0a	0.0a	0.5a	0.0a	1.9a	3.9a
light, 21 °C	18.1c	10.8c	2.9b	1.4c	44.8c	1.0c	9.2c	88.1c
dark, 21 °C	10.8b	7.2b	2.4b	0.9b	29.7b	0.9bc	8.1bc	60.2b
light, 26 °C	11.8b	7.0b	2.3b	1.1b	41.3c	0.8bc	7.8bc	72.1bc
dark, 26 °C	8.1b	5.2b	2.2b	0.7b	35.1b	0.7b	6.1b	58.2b
light effect	***	***	***	***	***	***	***	***
temperature effect	*	**	NS	*	NS	*	*	NS
light \times temperature effect	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Third Experiment								
green mature stage	0.3a	0.5a	0.0a	0.0a	0.4a	0.0a	1.7a	2.8a
light, 27 °C	14.4d	11.1c	4.2c	3.3c	35.7e	3.0b	9.2c	81.0e
dark, 27 °C	11.1c	8.6b	4.4c	2.9bc	22.0c	2.6b	7.1b	58.7c
light, 32 °C	10.2bc	8.6b	3.2b	2.7bc	30.3d	2.9b	10.2c	68.1d
dark, 32 °C	8.3b	7.0b	3.0b	2.4b	17.0b	2.6b	6.8b	47.2b
light effect	**	**	NS	NS	***	*	**	***
temperature effect	***	**	***	*	**	NS	NS	**
light \times temperature effect	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^a Carotene contents are expressed as equivalents of β -carotene in milligrams of β -carotene per kilogram of fresh weight (FW), except for lycopene, which is expressed as milligrams of lycopene per kilogram of FW. For each experiment, a two-way analysis of variance was made considering light, temperature, and the interaction between them. NS, not significant, i.e., $P > 0.1$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Means were compared using an SNK test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences.

caffeic acid derivatives (CAD1 and CAD2), and CAG increased during ripening between immature green to deep red fruit.

During experiment 2, increasing fruit irradiance enhanced red fruit coloration and chlorophyll degradation (Figure 5A–D). Small differences were also observed depending on temperature: increasing fruit temperature from 21 to 26 °C enhanced red fruit coloration and chlorophyll degradation, but it was no more significant after 6 ripening days. In contrast, increasing fruit

temperature from 27 to 32 °C reduced red fruit coloration and chlorophyll degradation.

Reducing sugars rapidly increased during off-vine ripening (Figure 5E,F), in agreement with observations made during on-vine ripening (Figure 3), and light and temperature had no significant effects on final sugar content. Sucrose content did not vary with temperature, irradiance, or ripening duration (data not shown). Titratable acidity decreased during off-vine fruit

Table 3. Changes in Phenolic Contents of Tomato Fruits during On-Vine Ripening from Immature Green to Deep Red Fruit (Experiment 1) and during Green Mature Fruit Ripening at Different Fruit Temperatures and Light Exposures (Experiment 3)^a

	chlorogenic				
	CAG	acid	rutin	CAD1	CAD2
First Experiment					
immature stage	34.9a	95.7c	8.4a	0a	0a
breaker stage	37.7a	79.0b	10.2a	7.7b	5.8b
orange	41.4a	67.1a	20.9b	14.9c	8.6c
deep red	44.5a	57.3a	24.2c	16.6d	11.0d
stage effect	*	***	***	***	***
Third Experiment					
green mature stage	58.9a	211.3b	37.7a	6.4a	4.8a
light, 27 °C	50.0a	121.8a	77.2b	24.8c	17.5c
dark, 27 °C	64.9a	119.0a	48.3b	22.0c	15.5c
light, 32 °C	67.9a	108.8a	107.7c	21.0c	13.8bc
dark, 32 °C	68.8a	115.3a	62.1b	17.1b	10.7b
light effect	NS	NS	**	*	*
temperature effect	*	NS	*	**	**
light × temperature effect	NS	NS	NS	NS	NS

^a Phenolic contents are expressed as equivalents of chlorogenic acid in milligrams of chlorogenic acid per kilogram of fresh weight (FW), except for rutin content, which is expressed as milligrams of rutin per kilogram of FW. Data are means ± SD. Compounds studied: caffeic acid glucoside (CAG), chlorogenic acid, rutin, and caffeic acid derivatives (CAD1 and 2). For each experiment, a two-way analysis of variance was made considering light, temperature, and the interaction between them. NS, not significant, i.e., $P > 0.1$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Means were compared using an SNK test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences.

ripening (Figure 5G,H) as was previously shown for fruits that ripened on the vine (Figure 3). Ripening at 26 °C compared to 21 °C led to a decrease in TA. This effect was stronger on shaded fruits than on irradiated ones. However, increasing fruit temperature from 27 to 32 °C had no effect. At 21 °C, irradiance led to the reduction in titratable acidity, compared to darkness.

Total ascorbate content increased during off-vine ripening (Figure 6A,B), in agreement with on-vine observations (Figure 3D). Ascorbate increased most in irradiated fruits (Figure 6A,B). Increasing fruit temperature to 32 °C reduced total ascorbate accumulation for irradiated and shaded fruits (Figure 6B). The ratio between oxidized and total ascorbate decreased during ripening (Figure 6C,D), in agreement with on-vine ripening (Figure 3D). This decrease was quicker for irradiated fruit at 26, 27, and 32 °C (Figure 6C,D); however, after 6 ripening days, the oxidized ascorbate ratio was similar, regardless of light and temperature (Figure 6C,D).

During the second and third experiments, increasing fruit irradiance during ripening significantly increased total carotene content by 45 and 42% at 21 and 32 °C, respectively, and by 26% for intermediate temperatures (Table 2). Carotene content decreased when temperature increased from 27 to 32 °C (third experiment). The highest carotene content was found for fruits kept at 21 °C under light (88 mg kg⁻¹ of FW) and the lowest for fruits kept at 32 °C under darkness (47 mg kg⁻¹ of FW). Regardless of the experiment, phytoene, phytofluene, lycopene, γ -carotene, and β -carotene contents significantly increased with irradiance (Table 2). In the third experiment, neurosporene and ζ -carotene were not sensitive to fruit irradiance.

Fruit ripening at 26 °C compared to ripening at 21 °C reduced β -carotene and precursor content, except for lycopene and ζ -carotene (Table 2). Increasing ripening temperature from 27 to 32 °C reduced lycopene precursor content and lycopene but neither β - nor γ -carotene content.

Phenolic contents showed a similar evolution during on-vine (first experiment) and off-vine ripening (third experiment): chlorogenic acid content decreased, and rutin, CAD1, and CAD2 increased (Table 3), except that the increase in CAG was not significant in experiment 3 compared to experiment 1. Darkness lowered rutin accumulation because shaded fruit had 34–54% less rutin than irradiated ones. In addition, fruit exposed to darkness had less CAD (12–27%), regardless of the temperature, whereas caffeic acid glucoside (CAG) content tended to increase (20–40%). Increasing fruit temperature from 27 to 32 °C reduced CAD content (to 18% in irradiated fruits or to 26% in shaded fruits) but enhanced CAG content (from 9 to 27%) and rutin content of irradiated fruits (by 40%).

DISCUSSION

Changes in Primary and Secondary Metabolites during Ripening. Tomato fruit content in primary metabolites was subject to considerable changes during ripening. Titratable acidity strongly decreased, probably due to reduced malic and citric acid content from the breaker to the deep red stage (5). Concomitantly, reducing sugars increased due to starch degradation and glucose and fructose accumulation (28). Secondary metabolites also showed strong variations during fruit ripening. Total ascorbate, lycopene, β -carotene, rutin, and caffeic acid derivatives reached maximum levels in the deep red tomatoes. In contrast, chlorogenic acid content decreased to 60% of the content of mature green fruit during fruit ripening. This considerable decrease in chlorogenic acid is in agreement with previous works (29–31). In addition, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is a key enzyme involved in the phenylpropanoid pathway, and its activity was reported to decrease during fruit ripening (32), without being a limiting factor for the synthesis of phenolic compounds. The present results on the decreasing content of chlorogenic acid are consistent with a possible decrease in PAL activity and the use of chlorogenic acid as a precursor of other phenolics. Chlorogenic acid may be further catabolized to produce other phenolics such as caffeic acid derivatives (CAD1 and CAD2) or caffeic acid glucoside (CAG), which accumulate during ripening.

During ripening, increased AA content and redox status were also observed by Jimenez et al. (9), in combination with increased enzymatic activities involved in the antioxidative system. This confirmed that ascorbate plays a key antioxidant role during fruit ripening.

Carotene content increased from 14- to 28-fold during ripening, mainly due to the accumulation of lycopene and, to a lesser extent, phytoene, phytofluene, and β -carotene. This was in agreement with the regulation of carotene biosynthesis described in ripening tomato fruits (33) and summarized in Figure 7. During ripening, expression of several genes coding for proteins involved in carotenogenesis is modified; in particular, mRNA levels of Psy-1 and Pds increased and mRNAs of lycopene cyclases disappeared (33), triggering the accumulation of lycopene and, to a lesser extent, β -carotene.

Light Responses during Fruit Ripening. In the present study, fruit irradiance during ripening did not affect final fruit hexose content, despite a higher transient rate of reducing sugars accumulation for irradiated fruits. This accumulation was probably not due to increased fruit photosynthesis because there was no difference in final fruit sugar content. Moreover, fruit sugar accumulation was probably very low at the mature green stage due to the start of chlorophyll degradation (Figure 5C,D) and the low fruit photosynthesis capability because sucrose synthase activity was reduced at the end of fruit expansion (34).

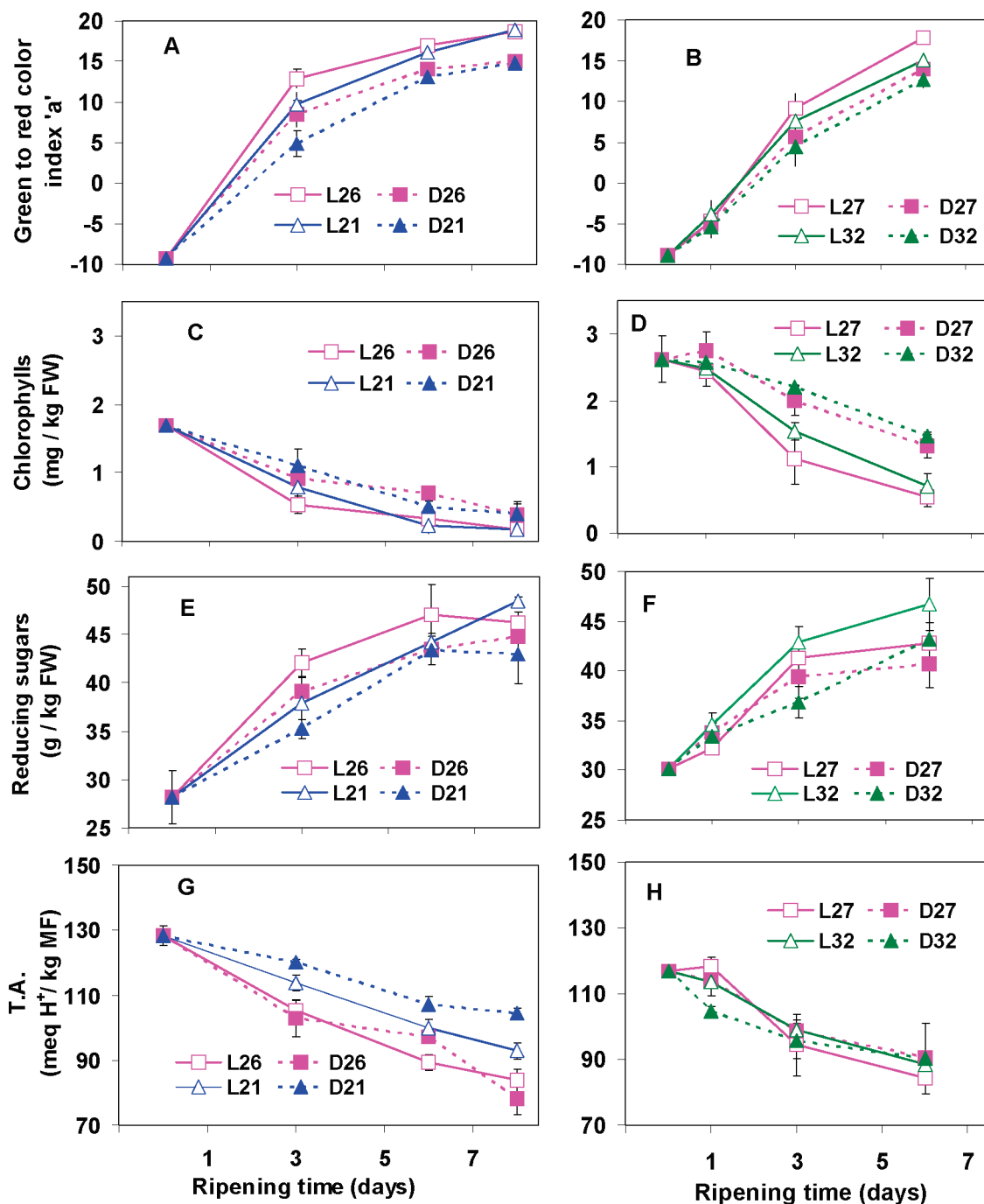


Figure 5. Impact of light and temperature during off-vine fruit ripening on external fruit coloration (A, B), chlorophyll content (C, D), reducing sugars (E, F) and titratable acidity (TA; G, H). Data are means (\pm SD) of measurements made on three batches of 15 fruits. A, C, E, G, second experiment; B, D, F, H, third experiment. L, irradiated fruits (open symbols); D, shaded fruits (solid symbols); 21, 26, 27, 32, fruit temperature expressed in $^{\circ}$ C.

Light treatment during ripening did not affect fruit carbon source, but it is interesting to speculate that light could influence the transcription of fruit ripening genes or enzymatic activities related to primary or secondary metabolism (35).

The present enhancement of carotene accumulation with irradiance is in agreement with the reduced lycopene and β -carotene content observed under selective fruit shading (36) and confirms that carotene content of tomato fruit depends on the light intercepted by the fruit itself. Tomato fruits possess different photoreceptors (phytochromes and a blue light photoreceptor, also called cryptochrome), which have been involved in the regulation of carotene biosynthesis. It is well established that the phytochrome regulates light-induced lycopene accumulation (20) because red light enhances the first step of

carotenogenesis by modulating the phytoene synthase (PSY) activity, which is an important control step of carotene biosynthesis (37). Ascorbate content decreased with fruit shading during ripening, in agreement with the data reported by Venter (13) or El-Gizawy et al. (38) of reduced fruit ascorbate content following plant shading. This confirms that light reaching the fruit itself during ripening significantly increases fruit total ascorbate content (13). This could be due to a lower ascorbic acid oxidation under increased irradiance or to enhanced ascorbate synthesis. The latter has been described in *Arabidopsis* leaves, where increasing light enhanced ascorbic acid synthesis by stimulating L-galactose dehydrogenase activity (39). In our study, increased ascorbate content was primarily due to an increase of the reduced ascorbate form. However, different

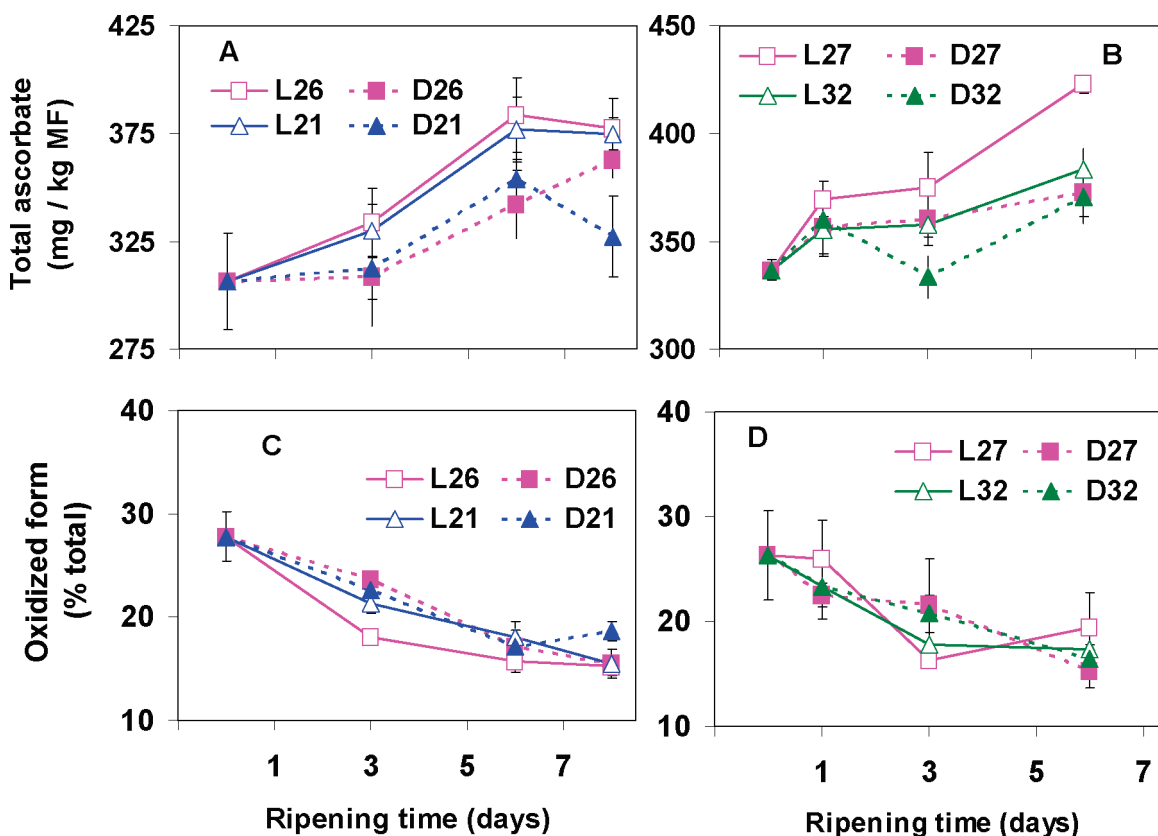


Figure 6. Impact of light and temperature during off-vine fruit ripening on total ascorbate content (A, B) and oxidized ascorbate ratio (C, D). Data are means (\pm SD) of measurements made on three batches of 15 fruits. A, C, second experiment; B, D, third experiment. L, irradiated fruits (open symbols); D, shaded fruits (solid symbols); 21, 26, 27, 32, fruit temperature expressed in $^{\circ}$ C.

enzymes involved in ascorbate recycling (ascorbate peroxidase, dehydroascorbate reductase, and monodehydroascorbate reductase) showed stronger activity with increased light exposure (16), consequently regulating the equilibrium between reduced and oxidized ascorbate forms.

We observed that rutin content was increased by 40% for irradiated fruits (Table 3); this is consistent with Wilkens et al. (12), who found that the concentration of rutin was twice as high for tomato plants growing in high- compared to low-light environments. It has been shown that the general phenolic pathway is strongly affected by light. As an example, chalcone synthase (CHS), a key enzyme catalyzing flavonoid synthesis (i.e., rutin) is up-regulated by light at the transcription level (40). In addition, light spectral quality can play a role in phenolic accumulation: red light via phytochrome (29) and blue light via cryptochrome (41) up-regulate the expression of CHS and, consequently, the formation of flavonoids (29).

Temperature Responses during Fruit Ripening. Increased fruit temperature did not affect final hexose content, but when increased from 21 to 26 $^{\circ}$ C, it reduced TA up to 25%. This could be linked to decreased vacuolar malic acid accumulation as Lobit et al. (42) predicted a 50% decrease in malate accumulation when temperatures increased from 15 to 25 $^{\circ}$ C. Consequently, increasing temperature may improve fruit gustative quality because it increases the fruit sugar acid ratio.

Secondary metabolites were also sensitive to increased temperature. The inhibition of carotene accumulation with increased temperature may explain the seasonal decrease in carotene content observed by Rosales et al. (43). In the latter case, defective pigmentations of the fruit were observed when temperature and radiation peaked. Our study allows for the

discrimination of radiation and temperature effects and shows that increasing fruit radiation by itself did not inhibit carotene synthesis but promoted it instead.

A strong reduction in lycopene precursor content (mostly phytoene, phytofluene, and neurosporene) was observed when temperatures increased from 21 to 26 $^{\circ}$ C or from 27 to 32 $^{\circ}$ C (Table 2 and Figure 7). Increasing fruit temperature from 21 to 26 $^{\circ}$ C had no effect on lycopene content and reduced β -carotene content. In contrast, increasing fruit temperature from 27 to 32 $^{\circ}$ C had no effect on β - and γ -carotene, but it strongly reduced precursor contents such as those of phytoene, phytofluene, ζ -carotene, lycopene, and, to a lesser extent, neurosporene. These data corroborate that lycopene synthesis was inhibited above 32 $^{\circ}$ C, whereas β -carotene synthesis was not (18), but they also reveal that the accumulation of some carotenes was already inhibited at 26 $^{\circ}$ C compared to 21 $^{\circ}$ C. During fruit ripening, the lycopene β -cyclase is down-regulated at the breaker stage so that lycopene starts to accumulate, and a residual lycopene cyclase activity could be responsible for increased β -carotene (44). The fact that β -carotene content was not reduced, whereas total carotene content was reduced up to 24% at 32 $^{\circ}$ C, could be linked to the reactivation of the lycopene β -cyclase by increased temperature or to a lower catabolism of β -carotene. Consequently, the lowest temperature studied at 21 $^{\circ}$ C was the most conducive for carotene accumulation; this was probably due to either a higher rate of carotene synthesis via PSY activation or a lower carotene catabolism.

Fruit ascorbate content was found not to be very sensitive to temperature increases from 21 to 26 $^{\circ}$ C, despite a slightly lower content observed after 8 ripening days in darkness at 21 $^{\circ}$ C (Figure 6A); however, increasing fruit temperature from 27 to

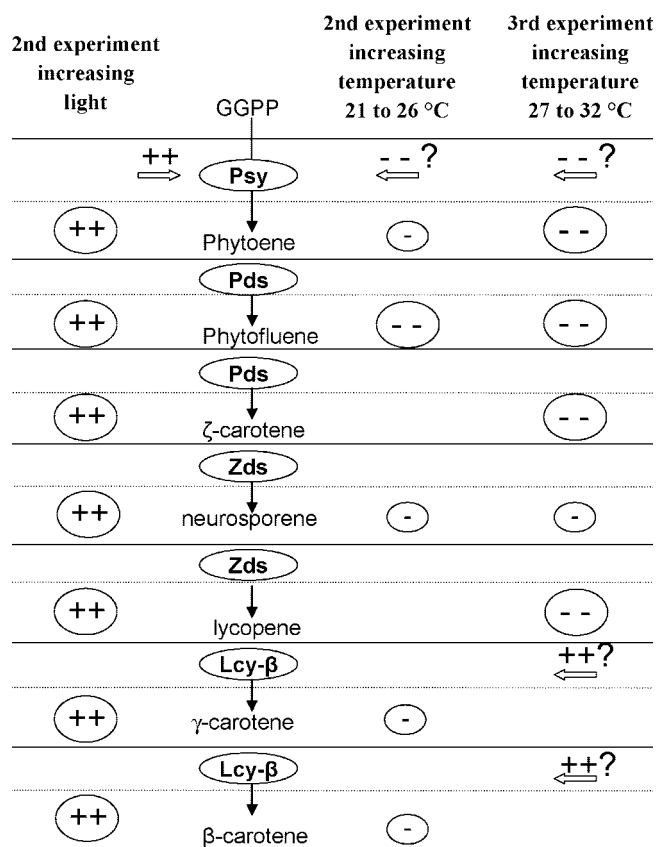


Figure 7. Schematic effect of light and temperature on lycopene and β -carotene metabolism. Horizontal arrows indicate hypothetical changes in gene expression. Plus or minus signs indicate significant changes in carotenoid content: (++) or (--) , significant at $P < 0.01$; (-) , significant at $P < 0.1$. GGPP, geranylgeranyl-pyrophosphate; Psy, phytoene synthase; Pds, phytoene desaturase; Zds, ζ -carotene desaturase; Lcy- β , lycopene β -cyclase.

32 °C inhibited ascorbate accumulation (**Figure 6B**). Ascorbate content resulted from ascorbate synthesis, recycling, and degradation, but temperature regulation of these different steps is poorly understood. Rosales et al. (43) reported increased oxidation of reduced ascorbate as a result of temperature and irradiance increase during the summer. In the present study, the discrimination between light and temperature effects shows that increasing irradiance promoted ascorbate accumulation, whereas increasing fruit temperature (to 32 °C) limited its accumulation. Therefore, increased temperature could reduce ascorbate synthesis and/or favor ascorbate degradation due to oxidation. The present study did not show any clear effect of temperature on the recycling between oxidized and reduced forms, except a transient reduction in the oxidized form (**Figure 6B**).

Rutin and caffeic acid glucoside are the only phenolic compounds studied the contents of which were significantly improved when fruit temperature was increased from 27 to 32 °C (**Table 3**). This observation is fully consistent with that of Rivero et al. (11), who found a 2-fold increase in total phenols for plants grown at temperatures under 35 °C instead of 25 °C.

In conclusion, the present study confirms that fruit quality is strongly modified during fruit ripening: both primary and secondary metabolite contents showed wide variations. Acid content decreases in combination with increased sugar content so that fruit gustative quality improves during fruit ripening. Some secondary metabolites such as chlorogenic acid decreased during fruit ripening, whereas lycopene and ascorbate strongly accumulated after the green mature stage. Thus, considerable

differences in both gustative and nutritional quality should be expected according to fruit ripening stage.

Changing fruit temperature and irradiance during ripening had only a small effect on primary metabolites. Fruit irradiance by itself did not affect sugar or acid content. In contrast, increasing fruit temperature from 21 to 26 °C was effective for improving the fruit sugar acid ratio because sugar content was transiently increased and titratable acidity was reduced. Changing fruit temperature and irradiance earlier during fruit development may have a stronger impact on primary metabolites. Indeed, Rosales et al. (45) observed lower sucrose content and higher hexose content linked to higher sucrolytic activity in fruits developing under high irradiative and temperature conditions. This could be linked to the effect of temperature and irradiance on phloem flux earlier during fruit development. In the present experiment, temperature and irradiance were modified at the end of fruit development during ripening, when fruit growth had almost stopped and fruit had already accumulated large amounts of carbohydrates.

Changes in fruit environment were more effective on secondary metabolites. Fruit irradiance during ripening stimulates the synthesis of lycopene, β -carotene, ascorbate, and flavonoids known for their antioxidant or photoprotective activity (such as rutin). Increased fruit temperature had contrasting effects on the accumulation of secondary metabolites. Rutin content was considerably increased (+40%) at 32 °C, but lycopene and ascorbate contents were reduced and, consequently, fruit nutritional quality could be altered. Increasing fruit temperature from 21 to 26 °C or from 27 to 32 °C reduced several carotene contents; this could have been due to a down-regulation of the phytoene synthase gene (PSY), which plays a key regulatory role in carotene biosynthesis (**Figure 7**), or to the enhancement of carotene catabolism. Thus, limiting increased fruit temperature during the summer could be useful for improving lycopene and ascorbate content, but this would subsequently reduce the rutin content.

Because fruit temperature and fruit irradiance are closely correlated, a compromise must be found between increased fruit irradiance and increased fruit temperature to monitor fruit antioxidant contents. Before harvest, plant density or leaf area could be modulated according to the season to optimize fruit irradiance and fruit temperature and, consequently, fruit antioxidant content at harvest. The present study underlines different hypotheses of up- or down-regulation of genes involved in carotene, ascorbate, or phenolic pathways by light or temperature. It will be interesting to confirm these hypotheses in a subsequent study and establish threshold response curves to the environment.

ACKNOWLEDGMENT

We thank E. Caroti and F. Pfeiffer for technical assistance.

LITERATURE CITED

- (1) Anza, M.; Riga, P.; Garbisu, C. Effects of variety and growth season on the organoleptic and nutritional quality of hydroponically grown tomato. *J. Food Qual.* **2006**, *29*, 16–37.
- (2) Toor, R. K.; Savage, G. P.; Lister, C. E. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 1–10.
- (3) Raffo, A.; Malfa, G. L.; Fogliano, V.; Maiani, G.; Quaglia, G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 11–19.
- (4) Grierson, D.; Kader, A. A. Fruit ripening and quality; physiology and biochemistry of ripening. In *The Tomato Crop, a Scientific*

- Basis for Improvement*; Atherton, J. G., Rudich, J., Eds.; Chapman and Hall: London, U.K., 1986; pp 241–259.
- (5) Davies, J. N.; Hobson, G. E. The constituents of tomato fruit – the influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1981**, *15*, 205–280.
 - (6) Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 860–863.
 - (7) Moco, S.; Bino, R. J.; Vorst, O.; Verhoeven, H. A.; de Groot, J.; van Beek, T. A.; Vervoort, J.; de Vos, J. H. R. A liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205–1218.
 - (8) Dumas, Y.; Dadomo, M.; Di Lucca, G.; Grolier, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 369–382.
 - (9) Jimenez, A.; Creissen, G.; Kular, B.; Firmin, J.; Robinson, S.; Verhoeven, M.; Mullineaux, P. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **2002**, *214*, 751–758.
 - (10) Smirnoff, N. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos. Trans. R. Soc. London, B* **2000**, *355*, 1455–1464.
 - (11) Rivero, R. M.; Ruiz, J. M.; Garcia, P. C.; Lopez-Lefebvre, L. R.; Sanchez, E.; Romero, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* **2001**, *160*, 315–321.
 - (12) Wilkens, R. T.; Spoerke, J. M.; Stamp, N. E. Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology* **1996**, *77*, 247–258.
 - (13) Venter, F. Solar radiation and vitamin C content of tomato fruits. *Acta Hortic.* **1977**, *58*, 121–127.
 - (14) Toor, R. K.; Savage, G. P. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 487–494.
 - (15) Somers, G. F.; Kelly, W. C.; Hamner, K. C. Influence of nitrate supply upon the ascorbic content of tomatoes. *Am. J. Bot.* **1951**, *38*, 472–475.
 - (16) Torres, C. A.; Andrews, P. K.; Davies, N. M. Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1933–1947.
 - (17) Türk, R.; Seniz, V.; Ozdemir, N.; Zuzen, M. A. Changes in the chlorophyll carotenoid and lycopene contents of tomatoes in relation to temperature. *Acta Hortic.* **1994**, *368*, 856–862.
 - (18) Baqar, M. R.; Lee, T. H. Interaction of CPTA and high temperature on carotenoid synthesis in tomato fruit. *Z. Pflanzenphysiol.* **1978**, *88*, 431–435.
 - (19) McCollum, J. P. Effect of light on the formation of carotenoids in tomato fruits. *Food Res.* **1954**, *19*, 182–189.
 - (20) Alba, R.; Cordonnier-Pratt, M. M.; Pratt, L. H. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 363–370.
 - (21) Saliba-Colombani, V.; Causse, M.; Langlois, D.; Philouze, J.; Buret, M. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theor. Appl. Genet.* **2001**, *102*, 259–272.
 - (22) Bittner, D.; Manning, J. Automated neocuproin glucose method: critical factors and normal values. *Automation in Analytical Chemistry*; Technicon: Emeryville, CA, 1967; pp 1–6.
 - (23) Lime, B. J.; Griffiths, F. P.; O'Connor, R. T.; Heinzelman, D. C.; McCall, E. R. Spectrophotometric methods for determining pigmentation – β -carotene and lycopene – in Ruby red grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* **1957**, *5*, 941–944.
 - (24) Caris-Veyrat, C.; Schmid, A.; Carail, M.; Böhm, V. Cleavage products of lycopene produced by in vitro oxidations: characterization and mechanisms of formation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7318–7325.
 - (25) Deutsch, M. J.; Weeks, C. E. Microfluorometric assay for vitamin C. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1965**, *48*, 1248–1256.
 - (26) Egberg, D. C.; Potter, R. H.; Geroff, J. C. Semi-automated method for the fluorometric determination of total vitamin C in food products. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1977**, *60*, 126–131.
 - (27) Fleuriot, A. Evolution des composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation des fruits de tomates “cerise” (*Lycopersicum esculentum* var. *cerasiforme*). *Fruits* **1976**, *31*, 117–126.
 - (28) Ho, L. C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annu. Rev. Plant Phys.* **1988**, *39*, 355–378.
 - (29) Hunt, G. M.; Baker, E. A. Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1415–1419.
 - (30) Fleuriot, A.; Macheix, J. J. Quinyl ester and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 667–671.
 - (31) Winter, M.; Herrmann, K. Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 616–620.
 - (32) Fleuriot, A.; Macheix, J. J. Tissue compartmentation of phenylpropanoid metabolism in tomatoes during growth and maturation. *Phytochemistry* **1985**, *24* (5), 929–932.
 - (33) Bramley, P. M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 2107–2113.
 - (34) Smillie, R.; Hetherington, S.; Davies, W. Photosynthetic activity of the calyx, green shoulder, pericarp, and locular parenchyma of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* **1999**, *50* (334), 707–718.
 - (35) Adams-Phillips, L.; Barry, C.; Giovannoni, J. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 331–338.
 - (36) Gautier, H.; Rocci, A.; Buret, M.; Grasselly, D.; Dumas, Y.; Causse, M. Effect of photoselective filters on the physical and chemical traits of vine ripened tomato fruits. *Can. J. Plant Sci.* **2005**, *85*, 439–446.
 - (37) Schofield, A.; Paliyath, G. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43*, 1052–1060.
 - (38) El-Gizawy, A. M.; Abdallah, M. M. F.; Gomaa, H. M.; Mahamed, S. S. Effect of different shading levels on tomato plants. 2. Yield and fruit quality. *Acta Hortic.* **1993**, *323*, 349–354.
 - (39) Gatzek, S.; Wheeler, G. L.; Smirnoff, N. 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.* **2002**, *30*, 541–553.
 - (40) Feinbaum, R. L.; Ausubel, F. M. Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* **1988**, 1985–1992.
 - (41) Lin, C.; Ahmad, M.; Cashmore, A. R. *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.* **1996**, *10*, 893–902.
 - (42) Lobit, P.; Génard, M.; Soing, P.; Habib, R. Modelling malic acid accumulation in fruits: relationships with inorganic acids, potassium, and temperature. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1471–1483.
 - (43) Rosales, M. A.; Ruiz, J. M.; Hernández, J.; Soriano, T.; Castilla, N.; Romero, L. Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 1545–1551.
 - (44) Pecker, I.; Gabbay, R.; Cunningham, F. X.; Hirschberg, J. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene b-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *30*, 807–819.
 - (45) Rosales, M. A.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Castellano, R.; Castilla, N.; Ruiz, J. M.; Romero, L. Sucrolytic activities in cherry tomato fruits in relation to temperature and solar radiation. *Sci. Hortic.* **2007**, *113*, 244–249.

Received for review July 23, 2007. Revised manuscript received December 11, 2007. Accepted December 21, 2007. This work was supported by INRA and region PACA (Provence Alpes Côte d'Azur: projet 2004_05706) and region Lorraine (Ph.D. grant to C. B.).

Annexe 2 : Impact de faibles apports en azote sur le rendement et la qualité des fruits de tomate : étude du contenu en sucre, en acide, en acide ascorbique, en caroténoïdes et en composés phénoliques. (Benard *et al*, 2009)

Effects of Low Nitrogen Supply on Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruit Yield and Quality with Special Emphasis on Sugars, Acids, Ascorbate, Carotenoids, and Phenolic Compounds

CAMILLE BÉNARD,^{†,‡} HÉLÈNE GAUTIER,^{*,§,‡} FRÉDÉRIC BOURGAUD,[†] DOMINIQUE GRASSELLY,[#] BRIGITTE NAVEZ,[#] CATHERINE CARIS-VEYRAT,[⊥] MARIE WEISS,^{||} AND MICHEL GÉNARD[§]

[†] UMR 1121 Nancy Université—INRA, Laboratoire Agronomie et Environnement Nancy-Colmar, 2 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France, [§] INRA UR 1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Domaine St Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France, [#] Ctifl (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes), Centre Ctifl de Saint-Rémy-de-Provence, Route de Mollégès, 13210 Saint Rémy de Provence, France, [⊥] INRA UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon, F-84000 Avignon, France, ^{||} INRA UMR 1114 INRA-UAPV Environnement Méditerranéen et Modélisation des Agro-Hydrosystèmes EMMAH, Bât. Climat, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France. [‡]These authors contributed equally to this work.

The objective of this study was to determine the impact of lowering nitrogen supply from 12 to 6 or 4 mM NO₃⁻ on tomato fruit yield and quality during the growing season. Lowering nitrogen supply had a low impact on fruit commercial yield (-7.5%), but it reduced plant vegetative growth and increased fruit dry matter content, improving consequently fruit quality. Fruit quality was improved due to lower acid (10–16%) and increased soluble sugar content (5–17%). The content of some phenolic compounds (rutin, a caffeic acid glycoside, and a caffeic acid derivate) and total ascorbic acid tended to be higher in fruit with the lowest nitrogen supply, but differences were significant in only a few cases (trusses). With regard to carotenoids, data did not show significant and univocal differences related to different levels of nitrogen supply. Thus, reducing nitrogen fertilization limited environmental pollution, on the one hand, and may improve, on the other hand, both growers' profits, by limiting nitrogen inputs, and fruit quality for consumers, by increasing tomato sugars content. It was concluded that primary and secondary metabolites could be affected as a result of a specific response to low nitrogen, combined with a lower degree of vegetative development, increasing fruit irradiance, and therefore modifying fruit composition.

KEYWORDS: Acids; ascorbate; carotene; flavonoids; fruit irradiance; fruit quality; gap fraction; nitrogen; polyphenolics; *Solanum lycopersicum*; sugars; tomato

INTRODUCTION

Nitrogen (N) is one of the main nutrients required for plant growth and is therefore applied to crops in large amounts to ensure big yields. Nitrogen fertilizer was often used in excess in the past; as a consequence, soil and water were subject to heavy pollution. This problem has now been addressed, and fertilizing practices are being revised to limit pollution and fertilizer costs (1). Until recently, nitrogen recommendations for tomato greenhouse production on rockwool were approximately 10 or 13–15 mM (2, 3) depending on the growth stage and the country. However, those recommendations can be improved. Dumas et al. (4) showed that 6 mM NO₃⁻ in

nutritive solution was sufficient to optimize young tomato growth from seedlings to early bloom. Complementary studies demonstrated that nitrogen supply was positively correlated to fruit yield, up to a threshold value above which the overfeeding of plants did not increase yield (5–7). Additionally, the impact on marketable fruit yield should be considered instead of the impact on total fruit yield. A previous study had already demonstrated that total fruit yield was affected by increasing nitrogen supply from 50 to 250 kg/ha, whereas the marketable fruit yield was not (8). From an environmental point of view, it thus seems necessary to optimize nitrogen use efficiency by the plant and to limit its loss in the environment. However, the consequences of reducing nitrogen supply on fruit quality are poorly known.

Visual appearance and firmness are the only traits available to the consumer for assessing fruit quality when buying

*Author to whom correspondence should be addressed [telephone +33 (0)4 32 72 23 45; fax +33 (0)4 32 72 24 32; e-mail helene.gautier@avignon.inra.fr].

tomato (9). Fruit color was reported to be unaffected by nitrogen supply (10, 11), whereas fruit firmness varied (12–14). Reducing nitrogen supply could thus have a limited impact on crop yield and the visual appearance of the fruit, but its effects on tomato fruit quality are still not clear. Aziz (15) found higher sugar content in fruits harvested from plants grown under low N supply (1 mM) compared to fruits harvested from plants receiving higher nitrogen levels (12.9 and 15.8 mM). Simonne et al. (10) reported decreased titratable acidity when the nitrogen supply was increased from 0 to 392 kg ha⁻¹. However, increasing the nitrogen supply from 2.25 to 36 mM was reported to increase sugar and acid contents, thus improving tomato quality (14). These differences might be linked to the fact that lowering the nitrogen supply in young plantlets has a strong impact on plant vegetative development and, consequently, carbon import to the fruit and fruit metabolism. Thus, the impact of reducing nitrogen supply probably depends on the developmental stage of the plant.

More attention is now focused on promoting the health benefits of the regular consumption of fruits and vegetables because fruits contain a wide assortment of antioxidant molecules (carotenoids, phenolics compounds, and ascorbate) that contribute to fruit nutritional quality. Nevertheless, the role of tomato consumption in cancer or cardiovascular disease is difficult to establish and needs more investigations. To date, the number of clinical studies is limited, and the results are sometimes contradictory (16–23).

Only a few studies are available on the impact of nitrogen supply on fruit antioxidant content (24, 25), and more information is needed. Studies on leaves have revealed that nitrogen supply has wide-ranging effects on primary (26–28) and secondary (29, 30) metabolism. Tomato leaf polyphenolic compounds were shown to increase in response to low nitrogen supply (31, 32), but no significant variations were observed in tomato fruit (33). A decrease in ascorbic acid content in tomato fruit was reported in several studies when the nitrogen supply was increased (24, 34). On the other hand, β -carotene content seemed to increase with increased nitrogen supply; however, the impact of nitrogen supply on lycopene content is more controversial (24, 25). Nitrogen supply could affect fruit primary and secondary metabolism. It could also affect plant vegetative development, triggering changes in fruit irradiance and, consequently, fruit metabolism, as was

suspected for increased ascorbate content under low nitrogen supply (24).

In the present study, we focused on the impact of lowering the nitrogen supply on fruit compounds. To do so, nitrogen treatments were initiated 2 months after sowing and continued until the last harvest. The aim of this study was to determine the impact of lowering the nitrogen supply during fruit development on the yield and quality of greenhouse-grown tomato fruits, with special emphasis on the fruit visual aspect and fruit content of primary and secondary metabolites. This study was carried out over a whole cultural cycle while maintaining the normal practices used by growers. The hypothesis of an indirect effect of nitrogen supply on vegetative growth was tested by following the growth of the different plant organs. In addition, the fruit microclimate was characterized by the gap fraction to determine whether or not nitrogen supply had an impact on fruit irradiance. Changes in primary and secondary metabolites are discussed in relation to previous data on the effects of nitrogen supply or changes in fruit microclimate.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Nitrogen Treatments, and Growth Conditions. The tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv. Clotilde, Syngenta Seeds SAS, France) were grown in a greenhouse at the Ctifl Research Station (Bellegarde, southern France, 43° 45' N). On October 23, 2004, seeds were sown on rockwool rolls covered with vermiculite (20 × 27 mm, Grodan BV, Roermond, The Netherlands). After 8 days, seedlings were transferred to larger rockwool cubes (65 × 75 × 75 mm) and, finally, on November 28, 2004, plants with three–four true leaves were transplanted onto rockwool blocks (two plants per block, 100 × 15 × 25, Grodan BV). Planting took place in three modules of a glasshouse of 240 m² each, with a planting density of 2.5 plants/m².

Throughout plant development, three complete types of solutions were used to fertilize plants depending on the plant developmental stage (Figure 1). The final nitrate concentrations were 12 mM (a standard level in greenhouse production in 2005 when the experiment was realized) and two lower levels, 6 and 4 mM, in order to evaluate the consequences of reduced nitrate inputs and determine the optimal range of nitrate input. The first nutrient solutions, used from sowing to flowering of the second trusses (F2, December 16, 2004), were similar for the three treatments and contained 25 mM NO₃⁻. From F2 to the flowering of the fourth truss (F4, January 4, 2005), three

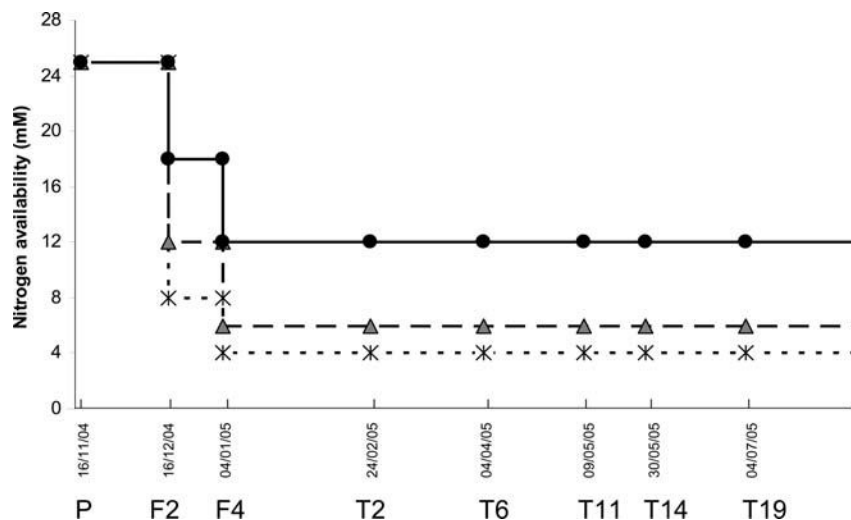


Figure 1. Cultural practices from planting (P) in November to the last harvest in July for truss 19 (T19). As of the flowering of the second truss (F2), three nitrogen levels were applied, and as of the flowering of the fourth truss (F4), 4, 6, and 12 mM NO₃⁻ were available for plants (stars, 4 mM; triangles, 6 mM; circles, 12 mM).

Table 1. Content in Macroelements of the Three Different Nutrient Solutions Used To Study the Impact of Nitrogen on Tomato Fruit Quality^a

	nitrogen treatments		
	12 mM	6 mM	4 mM
pH	5.74	5.75	5.84
CE (mS cm ⁻¹)	2.4	2.4	2.4
HCO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	0.5	0.5	0.5
Cl ⁻ (mmol L ⁻¹)	3.0	8.9	11.2
SO ₄ ²⁻ (mmol L ⁻¹)	2.1	2.5	2.3
NO ₃ ⁻ (mmol L ⁻¹)	12.4	6.4	4.1
H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol L ⁻¹)	1.8	1.9	1.7
Ca ²⁺ (mmol L ⁻¹)	5.6	5.3	5.5
Mg ²⁺ (mmol L ⁻¹)	1.6	2.0	1.8
Na ⁺ (mmol L ⁻¹)	0.9	1.0	1.0
K ⁺ (mmol L ⁻¹)	6.3	6.7	6.2
NH ₄ ⁺ (mmol L ⁻¹)	0.1	0.1	0.1

^aData correspond to the average composition applied to the plants from January to July.

Table 2. Climate during Fruit Development from Anthesis to Harvest for Each Truss Analyzed^a

harvest date	truss	mean air temperature (°C)	maximal air temperature (°C)	global radiation (W/m ²)
Feb 24	2	17.4 ± 0.9	22.4 ± 1.7	746 ± 304
April 4	6	17.5 ± 0.8	23.9 ± 2.5	1220 ± 470
May 9	11	18.4 ± 1.2	25.0 ± 3.2	1327 ± 456
May 30	14	19.3 ± 1.5	25.6 ± 3.3	1242 ± 438
July 4	19	21.9 ± 2.5	28.7 ± 3.2	1317 ± 252

^aData were collected from meteorological stations within each glasshouse module; temperature (°C) was measured every minute and averaged over the fruit developmental period to obtain the mean air temperature. Maximal air temperature corresponded to the average of daily maximal temperatures from anthesis to harvest. Global radiation (W/m²) was measured above the plants inside the glasshouse during fruit development. Data are means ± SD.

nitrogen levels were applied: 18, 12, and 8 mM. Then, from F4 until the end of growth, the plants were supplied with a third type of nutrient solution to reach the desired concentrations of 12, 6, and 4 mM NO₃⁻ (referred to as 12, 6, and 4 mM) at the root level. The three nitrogen treatments were repeated in each glasshouse module. Nutrient solutions were prepared from deionized water and a commercial mixture to obtain the desired mineral composition (Table 1). To maintain a constant cation/anion ratio, chloride was provided at 3, 9, and 11 mmol L⁻¹, respectively, for the 12, 6, and 4 mM media. Trace elements were provided by Olignon (Agronutrition, France), formula T36 (0.04 mL/L), and Fe-EDTA was provided by Plantin Fer 250 (0.8 mg/L); the pH was adjusted to 5.7, and electrical conductivity was 2.4 mS/cm. The solutions were supplied using a drip irrigation system to maintain at least 30% drainage. Chemical pest and disease controls were in accordance with commercial practices. All plant side shoots were removed as they appeared; old leaves were removed every 15 days. Fruit load was set at five fruits per truss.

The mean air temperature measured from November 16 to July 31 was 21.6 °C during the day and 16.9 °C during the night, with relative humidities of 76 and 82.7%, respectively. There was no effect of the glasshouse module on the climatic conditions (data not shown). The mean climate during fruit development (from anthesis to fruit harvest) for each harvested truss is presented in Table 2. Air temperature was measured every minute and averaged from anthesis until harvest. Maximum air temperature corresponded to the average of daily maximum temperatures from anthesis until harvest. Global radiation (W/m²) was measured above the plants (Pyranometer, Kipp and Zonen, Le Plessis Trevisé, France) inside the glasshouse.

Characterization of Fruit Microclimate. The impact of nitrogen supply on fruit irradiance was investigated by measuring light transmittance from the top to the bottom of the canopy every two trusses. Light reaching the upper hemisphere of the fruits was estimated from upward-looking hemispherical photographs on April 7. At this date, the 16th truss (T16) of the plant was at anthesis at the top of the canopy, and the fruits of T6 had been harvested 3 days earlier. Ten upward-looking hemispherical photographs were taken per treatment with the hemispherical lens positioned at the first fruit of trusses 6, 8, 10, 12, and 14 (Nikon, 4500, fisheye lens). For each truss number and nitrogen supply, the gap fractions, that is, the transmittance of light through the canopy, considering the vegetation elements as opaque, was estimated using Can-Eye software [http://www.avignon.inra.fr/can_eye (35)]. This software makes it possible to compute the gap fraction from the color images by separating the green elements (i.e., vegetation) from the gaps (i.e., other elements present in the images such as the sky and the greenhouse structures). The percentage of mixed pixels was < 3%. The bidirectional gap fraction was estimated over a range of zenith angles (0–60°) with a zenith angular resolution of 2.5° and an azimuth angle angular resolution of 5° (for azimuth ranging between 0 and 360°) (see Supporting Information). The gap fraction was then integrated over the azimuth and zenith directions and subjected to an analysis of variance to determine the impact of the fruit position and the nitrogen supply.

Fruit and Plant Sampling, Physical Trait Measurement, and Sample Preparation. We decided to compare different fruit harvests to follow the impact of lowering nitrogen on a long-term basis, from February to July. Every month, red ripe fruits were harvested: each harvest corresponded to a different truss number, T2, T6, T11, T14, and T19, harvested on February 2, April 4, May 9, May 30, and July 4, 2005, respectively.

Physical traits (external coloration, firmness, and mean weight) were measured on 20 ripe fruits per module and per treatment (60 fruits per treatment). External color was characterized using the Hunter Laboratory color space on the fruit equatorial perimeter with a chromameter (Minolta Chromameter CR300, Minolta, France SA): *L* corresponds to lightness, *a* ranges from green to red, and *b* ranges from blue to yellow. Two firmness readings per fruit were made on the fruit equatorial perimeter with a penetrometer (Durofel, COPA-Technologie SA, St Etienne du Grès, France), using a 5 mm diameter probe. The index varied from firm (100) to soft (0).

Sugar and acid contents were determined on six subsamples (6 × 10 fruits) per treatment (using two of the opposite fourths). Means shown under Results thus correspond to the average of six independent samplings, extractions, and analyses. Antioxidant content was determined on three subsamples of 10 fruits per treatment. Antioxidant results thus corresponded to the mean of three independent samples (of 10 fruits) per treatment. Two of the opposite fourths were immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -80 °C until they were blended together in liquid nitrogen to determine antioxidant content (polyphenolic compounds, ascorbate, and carotenoids). An aliquot of the frozen powder was lyophilized prior to the polyphenolic analysis.

From February to July, plant growth was characterized from above ground dry weight measurements on six plants per month and per treatment (two plants per glasshouse module). Laminae, rachis, stems, peduncles, and fruits were isolated and put in an oven set at 80 °C for 1 week before being weighed to determine their dry mass (DM). The fruit DM content was estimated on a sample fraction by the difference in weight before and after lyophilization. Leaves removed during regular defoliation and regularly harvested fruits from these plants were also oven-dried, and their weight was added to lamina, rachis, or fruit dry weight.

Four plots of six plants were designed per glasshouse module and per treatment to calculate tomato crop yield. Fruits were harvested twice a week from February to July. The commercial

yield corresponds to the total fruit weight that can be sold, and the cluster yield to the weight of tomatoes that can only be sold as cluster-type tomatoes.

Chemical Analyses. Sugar and acid contents were determined by HPLC, in the same run. Tomatoes were ground in a Warring blender; the homogenate was then centrifuged at 14000 rpm (5 °C) for 5 min. The supernatant was recovered and diluted 20 times with water. Prior to injection, the extract was filtered through a cellulose acetate filter, and 10 μ L of extract was injected into the HPLC. Samples were analyzed using a Varian ProStar instrument consisting of a Varian ProStar 401 autosampler linked to a Varian ProStar 330 UV detector, set at 210 nm for acid quantification, and to a Varian ProStar 350 RI refractive index detector for sugar quantification. Chromatographic separations were performed at 30 °C on a cation exchange column (7.8 \times 300 mm, Transgenomic, San Jose, CA), fitted with a guard column (ICSep ICE-GC-801/C, Transgenomic). The mobile phase consisted of sulfuric acid (20 mN H₂SO₄) at a flow rate of 0.4 mL/min for 15 min. Quantification was based on peak area, referred to as a standard curve. Compounds were expressed as milligrams per gram of DW. Standards were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France).

Phenolic compounds were analyzed using the method of Fleuriet (36) and modified as follows (see also ref 37). All steps were carried out under cold conditions, either in a cold chamber or on ice. One hundred and twenty-five milligrams of dried tomato powder was extracted with 5 mL of 70% cold (−20 °C) aqueous ethanol. Fifty microliters of taxifolin (2 mg/mL methanol, Extrasynthèse, Lyon, France) was added as an internal standard. The mixture was blended for 1 min and homogenized for 30 min. After centrifugation, the supernatant was evaporated to dryness under vacuum. The residue was dissolved in a mixture of methanol (700 μ L) and water (300 μ L); prior to

injection (20 μ L) into the HPLC apparatus, the extract was purified by 5 min of centrifugation at 1000 rpm. The HPLC apparatus and analytical conditions were previously described in Gautier et al. (37). Rutin content was expressed as milligrams of rutin per gram of DW; other compounds (caffeic derivative compounds and naringenin chalcone) were expressed as equivalents of chlorogenic acid (mg of chlorogenic acid/g of DW). Rutin and chlorogenic acid standards were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). Caffeic derivative compounds (CAG, caffeic acid glycoside; CAD1, -2, caffeic acid derivatives) and naringenin chalcone (NC) were identified by their absorption spectra (Figure 2).

A spectrofluorometric technique was used to assay vitamin C content from 5 g of frozen powder ground from tomato fruit using the method of Deutsch and Weeks (38) and automated by Edberg et al. (39) with a fluorometer (Jenway model 6200 fluorometer, Felsted, U.K.). The method relies on the complexing of oxidized vitamin C with phenylenediamine to produce a fluorescent quinoxaline and was previously described (37, 40).

Pigments were extracted with acetone and petroleum ether, and the contents of lycopene and β -carotene were estimated from the absorbance measurement at 503 and 451 nm, respectively, with a Shimadzu, UV-1605 spectrophotometer according to the method of Lime et al. (41).

Statistical Analyses. Fruit traits (yield, color, weight, firmness, fruit composition) were subjected to a two-way analysis of variance considering the effects of “nitrogen supply”, “date of harvest”, and the interaction between them using the XLSTAT statistical software (XLSTAT, Addinsoft, France). Mean comparison was performed with a Newman–Keuls test ($\alpha = 5\%$). The least significant difference (LSD) was calculated, and significant differences according to Newman–Keuls test are indicated by different letters in the tables and figures.

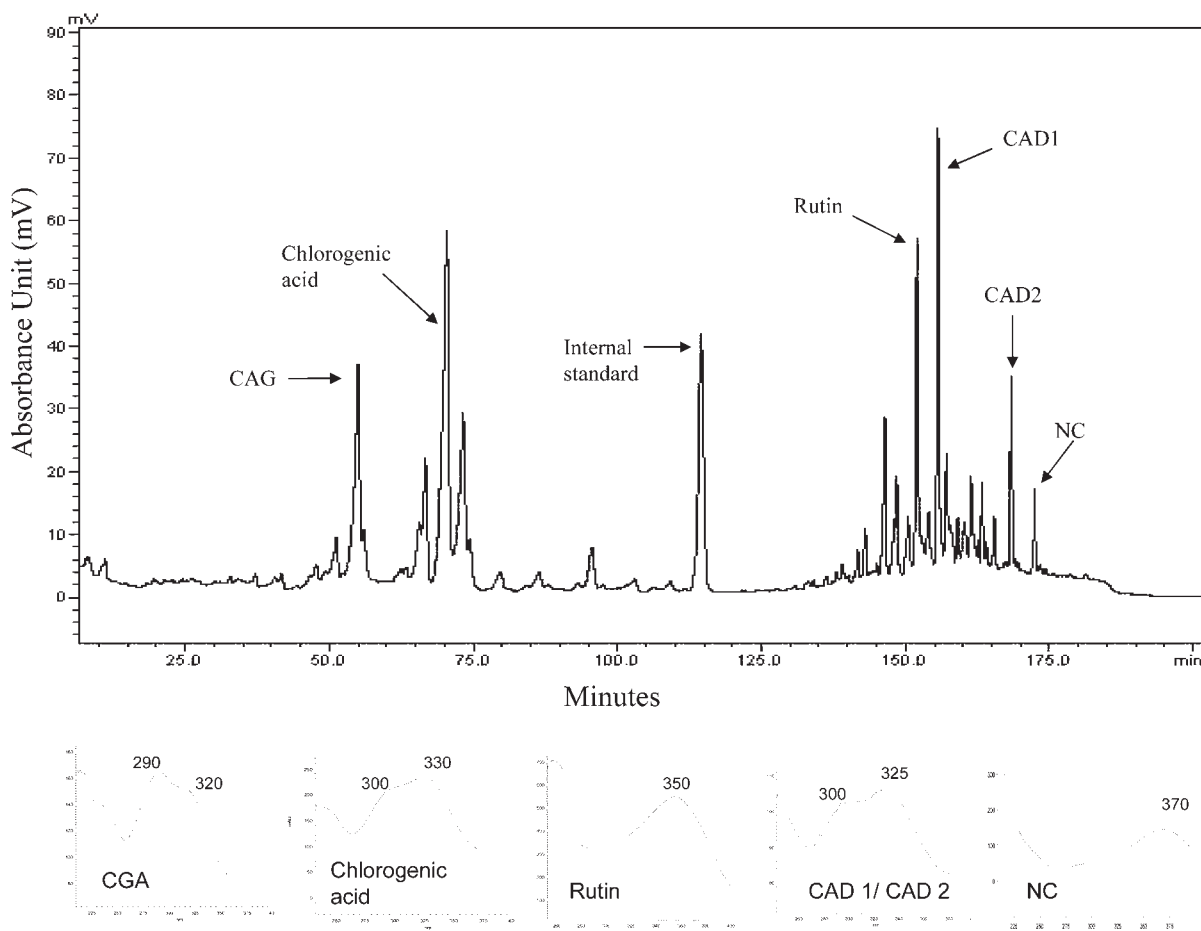


Figure 2. Chromatogram and UV spectra of phenolics found in deep red tomatoes. Detection was at 330 nm.

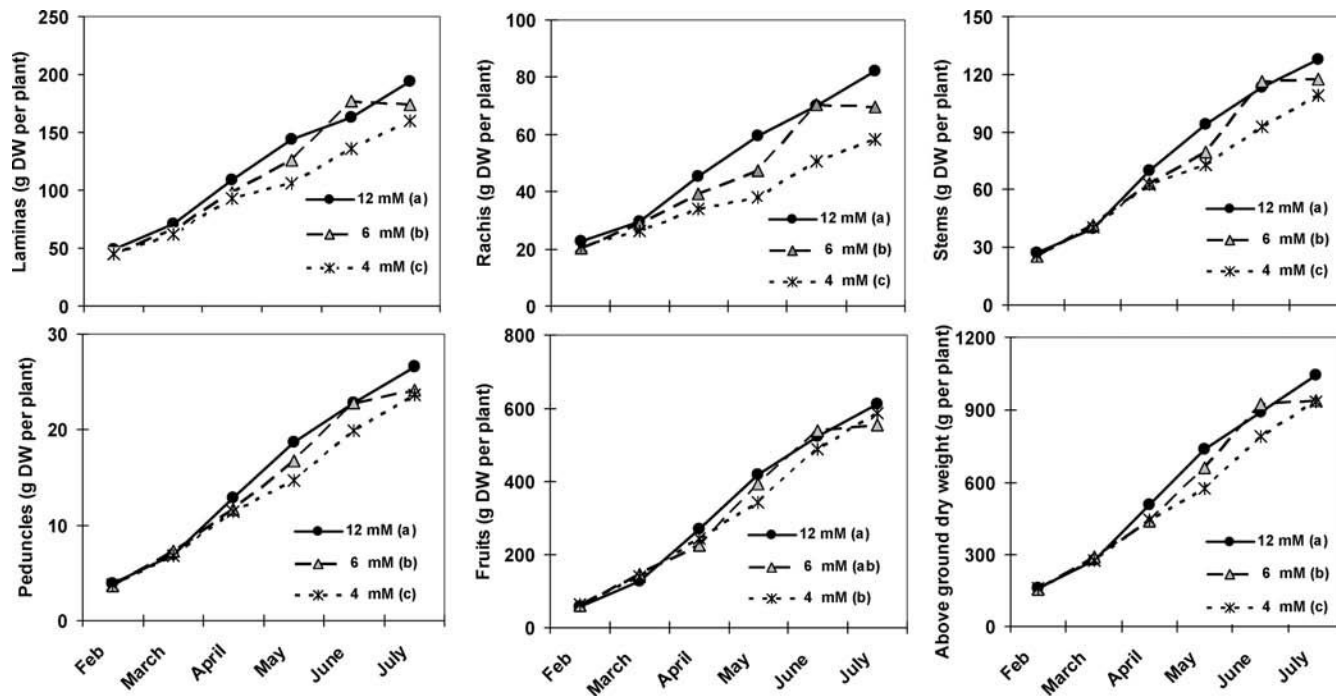


Figure 3. Impact of nitrogen supply on the increase in the dry mass (DM) of laminas, rachis, stems, peduncles, and fruits and aerial dry mass from February until July. Six plants were harvested per date and per treatment. The impact of the time and of the nitrogen supply was assessed by a two-way analysis of variance. Time and nitrogen availability were always highly significant ($P < 0.001$), and the difference among treatments was assessed by a Newman–Keuls test: different letters indicate significant differences at 5% between nitrogen supplies.

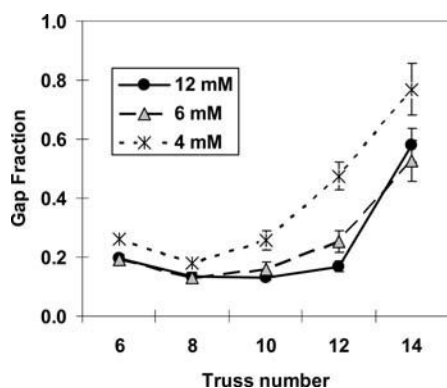


Figure 4. Impact of nitrogen supply on fruit microclimate. For each truss number and nitrogen supply, the gap fraction, that is, the transmittance of light through the canopy to the fruit, was investigated from upward-looking hemispherical photographs and estimated using Can-Eye software. Data are mean \pm SD (see Supporting Information).

The visualization of the impact of reducing nitrogen supply on fruit composition was obtained by performing a principal component analysis on fruit composition data at different dates of harvest using XLSTAT statistical software.

RESULTS

Impact of Nitrogen Supply on Plant Dry Weight and Fruit Irradiance. Plant aboveground dry weight significantly decreased when nitrogen supply was reduced from 12 to 4 mM NO_3^- (Figure 3). In July, the lower nitrogen supply (4 mM) led to a 10% decrease in plant dry mass, compared to 12 mM. This was due to decreased vegetative dry mass, especially rachis (−29%), laminas (−17%), and stems (−15%). The peduncle dry mass was also reduced by 11%, whereas the fruit dry mass was reduced by only 4%.

These changes in dry mass also induced changes in fruit irradiance, according to the measurement of the gap fraction

(Figure 4). Light transmittance decreased from the top to the bottom of the canopy, but lowering nitrogen levels had a significant impact on the gap fraction profile; it increased light transmittance in younger (T14), expanding (T10 and T12), and ripening fruits (T6 and T8).

Impact of Nitrogen Supply on Fruit Yields and Fruit Traits. The present data showed strong seasonal variations (Tables 3 and 4). The reduction in nitrogen supply from 12 to 4 mM NO_3^- slightly reduced commercial fruit yield by 7.5% (Table 3), but the cluster yield was poorly affected ($P < 0.1$) and was around 25 kg/m². A transient decrease was observed for the 4 mM nitrogen treatment in May, which was reversed in June, but a significant decrease was observed only in July (6 months after the beginning of lowering nitrogen) when the temperatures were no longer optimal for tomato growth. Thus, in the present study, lowering nitrogen did not have a strong impact on fruit yield. Similarly, fruit external color was not modified regardless of the nitrogen supply (Table 4). In contrast, fruit weight slightly decreased (significant in only T11) as fruit firmness (significant in only T19). In addition, fruit dry matter content increased when nitrogen supply was reduced (Table 4, significant in only T14 considering the Newman–Keuls test).

Sugars and Organic Acids Content. Both nitrogen supply and truss number had an impact on fruit sugar and acid contents, with a significant interaction between them except for sucrose, citric acid, and total acid (Table 5).

Sucrose content did not significantly vary with the nitrogen supply but decreased during the season (from T2 to T19). In contrast, glucose and fructose contents increased from T2 to T19. Moreover, reducing nitrogen supply (4 mM) also increased hexose content, especially in fruits from T2 to T11, whereas it was no longer significant in fruits harvested later. Consequently, total soluble sugars increased when the nitrogen supply was reduced, and the maximum increase of 18% (from 260 to 306 mg/g of DW) was observed on T6.

Table 3. Impact of Nitrogen Supply on Fruit Yields^a

	N (mM)	cluster yield (kg/m ²)	commercial yield (kg/m ²)
February	12	0.900 e	1.072 d
	6	1.089 e	1.271 d
	4	1.013 e	1.182 d
March	12	3.592 d	4.096 c
	6	3.282 d	3.825 c
	4	3.396 d	3.793 c
April	12	3.585 d	4.154 c
	6	3.658 d	4.156 c
	4	3.391 d	4.000 c
May	12	3.730 a	6.960 a
	6	6.802 a	6.900 a
	4	5.810 bc	5.943 b
June	12	5.609 bc	6.119 b
	6	5.643 bc	5.982 b
	4	6.085 ab	9.349 ab
July	12	4.993 c	5.504 b
	6	5.303bc	5.642 b
	4	4.199 d	4.542 c
LSD		0.72	0.62
nitrogen		(*)	*
truss		***	***
nitrogen × truss		(*)	*

^aYields were calculated from fruits harvested twice a week from February to July. LSD, least significant difference; NS, not significant, i.e., $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$. Means were compared using a Newman–Keuls test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences ($P < 0.05$).

Nitrogen effect on malic acid was weaker than the truss effect (which was especially due to its very low content in T2); malic acid content was only significantly reduced in T19 under the lower nitrogen supply (4 mM). Citric acid content significantly decreased under the lower nitrogen supply and during the season (with higher value in T2). Consequently, total acid content decreased by 10–16% under the lower nitrogen supply. The ratio between sugar and acid contents (a quality trait highly correlated to the sensing of fruit gustative quality by consumer) significantly increased during the season and even more when the nitrogen supply was reduced.

Phenolic Compounds, Carotenoids, and Ascorbate Content. For the antioxidant compounds, the effect of nitrogen supply was less significant than the truss effect and, surprisingly, interactions were not often observed (Table 6).

In deep red tomato, chlorogenic acid, rutin, a caffeic acid glucoside (CAG), two caffeic acid derivatives (CAD1, CAD2), and naringenin chalcone were the major compounds detected (Figure 2). CAG, rutin, and chlorogenic acid were the most abundant phenolic compounds observed in Clotilde fruit, and their content varied during the season. CAG and chlorogenic acid content were at their peak in T14 (0.5 and 0.4 mg/g of DW, respectively), whereas rutin content was at its maximum in T19 (slightly lower than 0.3 mg/g of DW). The impact of nitrogen supply on phenolic compounds was not significant for the first truss harvested; significant effects of lowering nitrogen could be observed on only T14 or T19 but only for some phenolic compounds. According to the

results of the Newman–Keuls test, significant increases were observed for rutin only on T14, for chlorogenic acid only on T19 (but with overlapping of groupings), for CAG only on T14, and for CAD1 only on T19, whereas for CAD2 and naringenin chalcone no significant differences between nitrogen treatments were observed. Consequently, fruits harvested on plants grown with the lowest nitrogen supply tend to have the highest phenolic content.

Carotene (b-car, β -carotene; lyc, lycopene) content increased during the growing period, but it decreased later, with T14 having significantly higher β -carotene and lycopene contents (0.3 and 1.0 mg/g of DW, respectively). Reducing the nitrogen supply had a poorly significant effect on carotene levels (significant at $P < 0.05$ for β -carotene and at $P < 0.1$ for lycopene). Moreover, results of the Newman–Keuls test show a significant reduction of lycopene content only in T14 and a poorly significant increase (with overlapping of groupings) of β -carotene content only in T19.

Total ascorbate content increased by 28% from T6 to T19 (from 2.6 to 3.3 mg/g of DW). The oxidized ascorbate content decreased from T2 to T11 and then increased. The global effect of nitrogen levels was not significant on the oxidized ascorbate and was significant at $P < 0.05$ for total and reduced ascorbate; nevertheless, lowering the nitrogen supply on total ascorbate level was not a clearly significant effect ($0.05 < P < 0.1$) despite the tendency observed in some trusses of an increase in ascorbate content when the nitrogen supply is lowered. Consequently, the ascorbate redox ratio (reduced ascorbate per total ascorbate content) was only significantly increased when the nitrogen supply was lowered in T2 and T11.

Synthetic View of the Impact of Nitrogen Supply on Fruit Composition. The impact of nitrogen supply on fruit composition was visualized by performing a principal component analysis (PCA) on primary and secondary compounds data (Figure 5). T2, T6, and T19 were clearly differentiated on the PCA plane, whereas T11 and T14 were not. The first component of the PCA, which explained 32% of the variability, coincided with the separation of the three nitrogen treatments within each truss; the higher abscissa corresponded to the lower nitrogen treatment and the lower abscissa to the higher nitrogen treatments (Figure 5A). The impact of nitrogen was the most pronounced on the T6. T2 and T19 were well separated by the x -axis: fruits on T2 contained more citric acid and sucrose but less glucose and fructose; they therefore had a lower sugar/acid ratio compared to fruits on T19 (Figure 5B). Consequently, PC1 discriminated changes in primary compounds (sugars and acids). In contrast, PC2 (which explained 24% of the variability) was correlated to antioxidant content; positive ordinates were correlated to increased phenolic compounds such as CAD1, rutin, and CAD2, but reduced CAG content, and to a lower ascorbate redox state. Antioxidant content was dependent on the truss number: T2 and T19 had positive ordinates, whereas T11 and T14 had negative ordinates, and T6 was intermediate.

DISCUSSION

Within the framework of changing cultural practices, the present experiment, carried out in a greenhouse while maintaining the normal practices used by growers, confirmed that nitrogen supply may be reduced from 12 to 4 mM NO_3^- without any significant changes in the commercial yield. As already observed by Warner et al. (11), fruit visual quality

Table 4. Impact of Nitrogen Supply on Fruit Parameters: Fruit Weight, Dry Matter Content (Grams of Dry Weight per 100 g of Fresh Weight), Firmness, and Color (*L*, *a*, *b* Indices)^a

harvest date	truss	N availability (mM)	fruit wt (g)	fruit DM (%)	firmness	color		
						<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Feb 24	2	12	121.43 de	4.96 bc	81.11 a	40.30 a	18.07 d	17.83 d
		6	113.92 e	5.03 bc	79.78 ab	40.31 a	17.88 d	17.95 d
		4	114.20 e	5.38 ab	79.03 abc	39.63 abc	17.43 de	17.14 d
April 4	6	12	133.35 bcd	4.60 cd	80.24 ab	38.82 cd	16.85 de	17.88 d
		6	140.81 ad	4.75 cd	78.03 abcd	38.53 d	16.02 e	17.46 d
		4	139.19 adc	5.10 bc	80.40 ab	38.49 d	13.97 f	17.17 d
May 9	11	12	150.65 a	5.00 bc	78.20 abcd	38.79 cd	17.30 de	19.46 c
		6	134.73 bcd	4.98 bc	76.24 cde	39.04 cd	18.18 d	19.96 bc
		4	130.71 bcd	5.34 ab	77.26 bcd	39.30 bcd	18.52 d	20.08 bc
May 30	14	12	140.20 ab	5.05 bc	75.58 def	38.83 cd	19.76 c	19.90 bc
		6	141.97 ab	5.08 bc	74.06 efg	38.71 d	19.93 c	20.27 bc
		4	134.57 bcd	5.56 a	73.30 fg	38.94 cd	20.19 c	20.83 b
July 4	19	12	128.36 bcd	4.66 cd	71.68 g	40.23 a	21.82 a	22.73 a
		6	129.16 bcd	4.34 d	67.26 h	39.97 ab	22.12 b	22.46 a
		4	123.06 cde	4.38 d	67.41 h	40.33 a	23.77 b	23.02 a
LSD			10.42	0.32	2.09	0.59	1.23	0.82
nitrogen			*	***	***	NS	NS	NS
truss			***	***	***	***	***	***
nitrogen × truss			*	*	(*)	NS	***	*

^a Fruit traits were determined on fruits harvested on T2, T6, T11, T14, and T19. LSD, least significant difference; NS, not significant, i.e., $P > 0.1$; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Means were compared using a Newman–Keuls test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences.

Table 5. Impact of Nitrogen Availability and Harvest Date on Tomato Fruit Sugar and Acid Contents^a

harvest date	truss	N availability (mM)	sucrose	glucose	fructose	citric acid	malic acid	total sugar	total acid	sugar/acid
Feb 24	2	12	6.3 a	97.4 f	126.4 f	52.4 a	6.3 d	230.1 e	58.7 bcd	3.92 f
		6	6.1 a	100.4 f	131.7 ef	49.5 ab	6.0 d	238.2 e	55.5 def	4.3 e
		4	5.8 a	109.6 f	141.1 de	46.6 bc	6.2 d	256.5 d	52.9 efg	4.87 cd
April 4	6	12	6.4 a	114.8 de	139.4 de	50.1 ab	10.0 abc	260.6 d	60.0 abc	4.34 e
		6	5.8 a	120.3 cd	145.3 cd	43.9 cd	9.6 bc	271.4 cd	53.5 efg	5.07 cd
		4	5.9 a	136.6 ab	163.5 a	41.7 d	9.3 c	306.0 a	51.0 g	6.0 a
May 9	11	12	4.4 b	123.5 c	142.4 d	48.6 ab	9.5 bc	270.3 cd	58.1 bcd	4.68 e
		6	4.4 b	128.2 bc	148.8 bcd	46.7 bc	9.4 bc	281.5 bc	56.1 cdef	5.03 cd
		4	4.3 b	138.6 a	163.1 a	42.5 d	9.9 abc	306.0 a	52.4 fg	5.85 a
May 30	14	12	4.4 b	134.8 ab	153.0 abc	51.0 a	10.0 abc	292.2 ab	61.0 ab	4.79 cd
		6	4.2 b	138.5 a	157.2 ab	46.4 cd	10.4 ab	299.9 ab	56.8 cde	5.28 bc
		4	4.2 b	140.0 a	161.9 a	44.7 cd	9.9 abc	306.1 a	54.7 defg	5.61 ab
July 4	19	12	4.4 b	141.2 a	163.2 a	51.9 a	10.7 a	308.7 a	62.6 a	4.93 de
		6	3.5 bc	133.4 ab	158.1 ab	48.8 ab	10.0 abc	295.1 ab	58.7 bcd	5.03 cde
		4	2.9 b	136.3 ab	165.1 a	43.3 cd	9.2 c	304.3 a	52.6 fg	5.8 ab
LSD			0.7	6.7	8.0	2.5	0.6	14.6	2.7	0.3
nitrogen			**	***	***	***	*	***	***	***
truss			***	***	***	***	***	***	***	***
nitrogen × truss			NS	***	**	NS	**	***	NS	**

^a Compounds are expressed in mg/g of DW. Fruit was harvested on trusses 2, 6, 11, 14, and 19, respectively, from February to July. LSD, least significant difference; NS, not significant, i.e., $P > 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Data are means, compared using a Newman–Keuls test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences.

(fruit external color and firmness) was not significantly modified by reduced nitrogen supply. Reducing nitrogen thus appears to improve growers' profits by limiting nitrogen

inputs without affecting fruit yield and external quality. Nevertheless, the impact of this practice has never been fully studied on fruit composition. As a result, the present study

Table 6. Impact of Nitrogen Availability and Harvest Date on Tomato Micronutrient Content^a

harvest date	truss	N availability (mM)	CAG	rutin	chloro	CAD1	CAD2	NC	beta	lyc	T-AsA	ox-AsA	r-AsA	redox
Feb 24	2	12	0.167 e	0.188 abc	0.204 cde	0.097 bcd	0.087 a	0.082 bc	0.186 c	0.883 bcd	2.810 ab	0.414 a	2.396 ab	0.852 e
		6	0.178 de	0.175 abc	0.196 cde	0.094 bcd	0.084 a	0.115 a	0.215 bc	0.996 ab	2.954 ab	0.395 a	2.559 ab	0.867 de
		4	0.183 de	0.135 c	0.154 e	0.088 cd	0.085 a	0.084 b	0.199 bc	0.980 ab	2.698 ab	0.299 b	2.399 ab	0.889 cd
April 4	6	12	0.199 de	0.166 bc	0.185 de	0.075 d	0.071 a	0.050 e	0.179 c	0.630 e	2.471 b	0.262 bc	2.209 b	0.894 bcd
		6	0.214 de	0.137 c	0.152 e	0.073 d	0.091 a	0.058 de	0.181 c	0.662 e	2.558	0.277 bc	2.281 ab	0.891 cd
		4	0.259 d	0.176 abc	0.125 e	0.107 bcd	0.079 a	0.057 de	0.208 bc	0.631 e	2.780 ab	0.266 bc	2.514 ab	0.904 bcd
May 9	11	12	0.366 c	0.134 c	0.285 bc	0.080 d	0.069 a	0.055 e	0.213 bc	0.904 bcd	2.507 ab	0.173 c	2.334 ab	0.929 b
		6	0.345 c	0.123 c	0.246 bcd	0.089 cd	0.073 a	0.055 e	0.235 b	0.901 bcd	3.030 ab	0.088 d	2.942 ab	0.972 a
		4	0.415 bc	0.148 c	0.316 b	0.098 bcd	0.080 a	0.061 cde	0.209 bc	0.767 cde	3.232 ab	0.049 d	3.183 a	0.985 a
May 30	14	12	0.456 b	0.149 c	0.416 a	0.077 d	0.075 a	0.062 bcde	0.302 a	1.132 a	2.629 ab	0.233 bc	2.396 ab	0.912 b
		6	0.528 a	0.149 c	0.392 a	0.081 d	0.077 a	0.071 bcde	0.302 a	1.024 ab	2.631 ab	0.228 bc	2.403	0.912 b
		4	0.572 a	0.267 ab	0.432 a	0.099 bcd	0.081 a	0.079 bcd	0.300 a	0.926 bc	3.039 ab	0.294 b	2.745 ab	0.903 bcd
July 4	19	12	0.150 e	0.236 abc	0.204 cde	0.124 b	0.083 a	0.082 bc	0.181 c	0.721 de	3.142 ab	0.399 a	2.743 ab	0.873 cde
		6	0.177 de	0.241 abc	0.210 cee	0.121 bc	0.078 a	0.070 bcde	0.209 bc	0.761 cde	3.333 ab	0.408 a	2.926 ab	0.877 cde
		4	0.165 e	0.294 a	0.269 bc	0.158 a	0.091 a	0.069 bcde	0.203 bc	0.732 de	3.498 a	0.428 a	3.070 ab	0.877 cde
LSD			0.059	0.067	0.059	0.022	0.016	0.014	0.025	0.125	0.569	0.076	0.537	0.024
nitrogen			**	*	NS	***	NS	*	*	(*)	*	NS	*	**
truss			***	***	***	***	NS	***	***	***	**	***	**	***
nitrogen × truss			NS	*	(*)	NS	NS	*	NS	(*)	NS	*	NS	*

^a Fruit was harvested from trusses 2, 6, 11, 14, and 19, respectively, from February to July. Phenolics are expressed as equivalents of chlorogenic acid (chloro) in mg of chlorogenic acid per g of dry weight (DW), except for rutin content, which is expressed as mg of rutin per g of DW; carotenoids are expressed in mg/g of DW. Compounds studied: caffeic acid glucoside (CAG), chlorogenic acid, rutin, caffeic acid derivatives (CAD1 and 2), naringenin chalcone (NC), β -carotene (beta), lycopene (lyc), total ascorbate (T-AsA), the oxidized ascorbate form (Ox-AsA), the reduced form (r-AsA), and the ratio of reduced form to total ascorbate (redox). LSD, least significant difference; NS, not significant; (*), $P < 0.1$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Data are means, compared using a Newman–Keuls test with a confidence interval of 95%. Different letters per column indicate significant differences.

aims to determine the positive and negative impacts on fruit content in sugars, acids, ascorbate, phenolic compounds, and carotenoids.

The present experiment showed increased fruit sugar content under reduced nitrogen supply, in agreement with data reported by Aziz (15), and a significant decrease in total acid content. This is in agreement with the study of Simonne et al. (10), who also found a 10% decrease in titratable acidity in response to reduced nitrogen supply. In addition, changes in leaf sugar content have been reported on tomato leaves when plants were submitted to saturated, replete, or deficient media (27): the levels of sucrose, glucose, and fructose increased, and the levels of citrate, isocitrate, fumarate, and malate significantly decreased when plants were grown on the deficient medium. Consequently, the present data suggested that both tomato leaves and fruits may respond in a similar way to lower nitrogen levels: by increasing sugars and decreasing acids.

Nitrogen effects could be linked to changes in fruit microclimate. We observed that the vegetative growth was more significantly affected by lowering nitrogen than the reproductive growth. This was in agreement with results on tomato obtained after N withdrawal, for which source activity appeared to be more affected than sink activity (42). Thus, the distribution of dry matter to the fruit appeared to remain the first priority in the plant's development when the nitrogen supply was reduced. The increased gap fraction measured at the fruit level confirmed increased fruit irradiance (and fruit temperature also due to increased infrared radiation). Therefore, under low nitrogen supply, increased fruit irradiance combined with increased fruit temperature is likely to trigger changes in fruit composition. The impact of fruit microclimate

has been previously reported by monitoring fruit temperature during fruit development (43) and fruit irradiance and temperature during ripening (37). Walker and Ho (43) reported that heating fruits from 25 to 35 °C increased carbon import and hexose content. On the other hand, increased fruit irradiance probably increases fruit photosynthesis and fruit sugar content. Carrara et al. (44) showed that tomato fruit had a consistent photosynthetic activity. Thus, increased fruit irradiance under low nitrogen supply may contribute to increased sugar content. The fact that increased fruit irradiance triggers increased fruit temperature may also explain the observed decreased acid content. Gautier et al. (37) observed a decrease in titratable acidity when fruit temperature increased from 21 to 26 °C. Consequently, the observed impact of lowering the nitrogen supply could be due to increased fruit irradiance and fruit temperature combined with a specific effect of decreased nitrogen supply on fruit primary metabolism.

The impact of lowering nitrogen on ascorbate and secondary metabolites was less pronounced. Lowering nitrogen levels had an impact on fruit ascorbate content, triggering a slight increase (from 11 to 29%) in total ascorbate; our finding was consistent with previous studies (13, 24, 34). For example, Simone et al. (10) reported a 25% decrease in ascorbate content when nitrogen supply was increased from 0 to 392 kg/ha. Increased ascorbate content could be related to increased fruit irradiance, as was previously suggested (24). The present study supports this hypothesis because it provides measurements of fruit irradiance expressed as gap fraction and clearly shows that reducing nitrogen modified the fruit microclimate by increasing fruit irradiance.

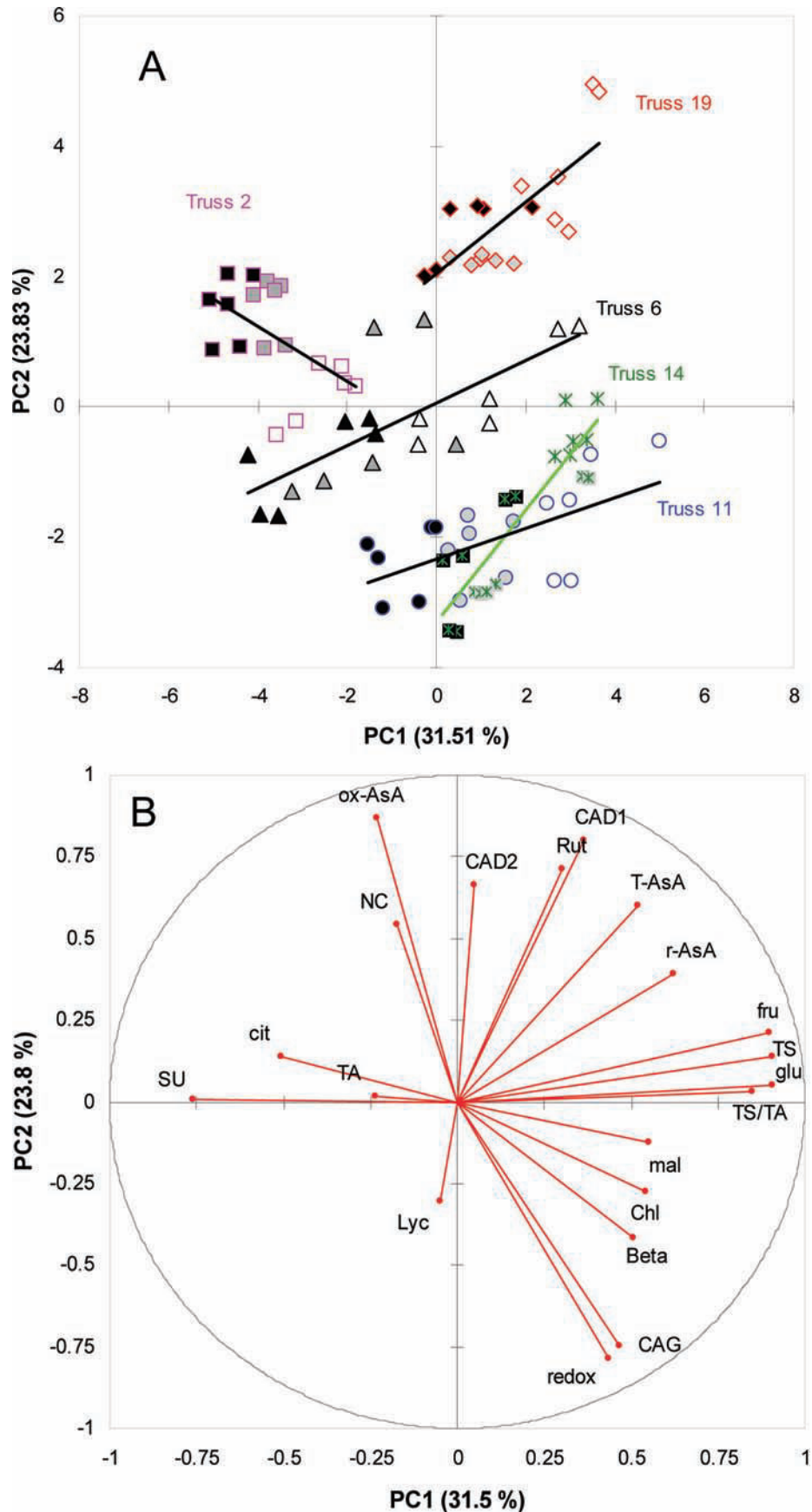


Figure 5. Principal component analysis (first principal component, PC1, versus second principal component, PC2) of the mature tomato fruit composition of trusses 2, 6, 11, 14, and 19 (T2, T6, T11, T14, and T19) harvested on plant receiving three different nitrogen levels 19 days after the flowering of T2 (open symbols, 4 mM NO₃⁻; gray symbols, 6 mM NO₃⁻; black symbols, 12 mM NO₃⁻; squares, T2; triangles, T6; circles, T11; crosses, T14; diamonds, T19). PCA plot of the samples (**A**) and of the compounds analyzed (**B**) with an explained variance of 31.5% over PC1 and 23.8% over PC2. Compounds studied: SU, sucrose; glu, glucose; fru, fructose; TS, total soluble sugars; mal, malate; cit, citrate; TA, total acids; TS/TA, ratio TS/TA; CAG, caffeic acid glucoside; Chl, chlorogenic acid; Rut, rutin; CAD1 and 2, caffeic acid derivatives; NC, naringenin chalcone; Beta, β -carotene; Lyc, ycopene; T-AsA, total ascorbate; ox-AsA, oxidized ascorbate; r-AsA, reduced ascorbate; redox, ratio r-AsA/T-AsA.

The present data confirmed the seasonal effect on carotene content in tomato fruit. β -Carotene content increased from February (harvest of T2) until the end of May (harvest of T14) and was correlated to increased temperature ($r = 0.82$, data not shown). Lycopene content also increased from the beginning of April (T6) until the end of May (T14) and was correlated to temperature ($r = 0.85$). However, at the beginning of July, both β -carotene and lycopene contents decreased; this may be due to the inhibition of the carotenogenesis pathway because of excessive temperatures (the maximum air temperature throughout the development of T19 was slightly lower than 29 °C). Tomes (45) had in fact shown that fruit temperature above 30 °C had an inhibitory effect on lycopene and β -carotene accumulation. The impact of lowering nitrogen on carotenes was not as obvious, except for the decrease in lycopene content observed in T14 under 4 mM. The same tendency was also observed in T11, whereas β -carotene was not significantly modified. This type of differential response between β -carotene and lycopene was previously described under increased fruit temperature (24, 37). Moreover, the weak response to lowering nitrogen could be linked to the combination of (i) the response to increased irradiance that stimulates carotene synthesis and (ii) the response to a threshold temperature that does the reverse (inhibition of carotene synthesis). The combination of these opposite responses may explain why contradictory results have been reported in experiments designed to determine the impact of reducing nitrogen supply (24).

The phenolic content also showed variations from one harvest to another, in agreement with previous studies that reported a strong seasonal impact (46–48) and the influence of growth conditions (24, 49). Regarding the levels of phenolics, the content of naringenin chalcone was relatively low when compared with other published data (47, 48). This could be due partly to the different cultivars examined and to the use of a nonoptimal wavelength for detection of naringenin chalcone in the present study. On the other hand, we did not observe a general increase in phenolic compounds in response to reduced nitrogen supply, despite the fact that some compounds tended to increase. Stewart et al. (33) did not observe a consistent effect of reducing nitrogen nutrition on flavonol accumulation in tomato fruit either. In contrast, increased phenolic compounds had already been observed in response to reduced nitrogen supply in tomato leaves (32). On young tobacco leaves, Fritz et al. (30) observed a 4-fold increase in chlorogenic acid content and a 10-fold increase in rutin content. These increases are correlated to the stimulation of some key enzymes of the phenolic pathway. In response to reduced nitrogen supply, the induction of many enzymes of the phenylpropanoid pathway has been reported, including phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and 4-coumarate: Coa ligase (4CL) in tobacco leaves (30) and enzymes involved in the flavonoid pathway such as chalcone synthase (CHS) and dihydroflavonol-4-reductase (DFR) in tomato leaves (50). The range of variation observed in this study on phenolic content seemed to be very small in comparison to previous data on leaves. There is no doubt that nitrogen plays an important role in polyphenolic synthesis, but tomato fruit seemed to be less affected and less reactive than leaves to nitrogen supply, perhaps because the fruit is a highly protected organ. The reduced nitrate supply may trigger a signal in the plant that leads to a complex regulation of nitrogen metabolism in the leaf (26, 29), but maybe not in the fruit. The weaker response observed could also be due to the

nitrogen level applied in the present experiment. A nitrogen supply of 4 mM did not put the plant in a state of nitrogen deficiency.

Nevertheless, rutin content increased when the nitrogen supply was lowered, which may be due to the putative role of rutin as a UV protector located in tomato peel (51). The increase in the concentration of this compound could be the result of an increase in both fruit irradiance and temperature. Further studies are needed to investigate changes in polyphenolic content in response to nitrogen supply on different organs within a plant. Nevertheless, the present data corroborated the fact that lowering nitrogen supply had no detrimental effect on fruit phenolic content and even tended to favor slight increases in these molecules.

Consequently, the present results suggest that moderate reduction in nitrogen supply can be used to improve fruit sugar content without affecting tomato fruit yield. Similarly, a moderate reduction in the nitrogen supply combined with increased fruit irradiance can be used to improve fruit nutritional quality by increasing the content of antioxidants in fruit, such as ascorbate and β -carotene, and, to a lesser extent, fruit phenolic compounds.

ABBREVIATIONS USED

CAD1, -2, caffeic acid derivatives; CAG, caffeic acid glucoside; DM, dry mass.

ACKNOWLEDGMENT

We thank C. Courbet for providing analyses of hemispherical photographs, L. Rosso for plant management, and M. Callier for technical support.

Supporting Information Available: Supporting information available showing the impact of nitrogen and truss position on the Bidirectional gap fraction (transmittance of light through the canopy to the fruit) as an indicator of the change in fruit microclimate triggered by lowering nitrogen. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LITERATURE CITED

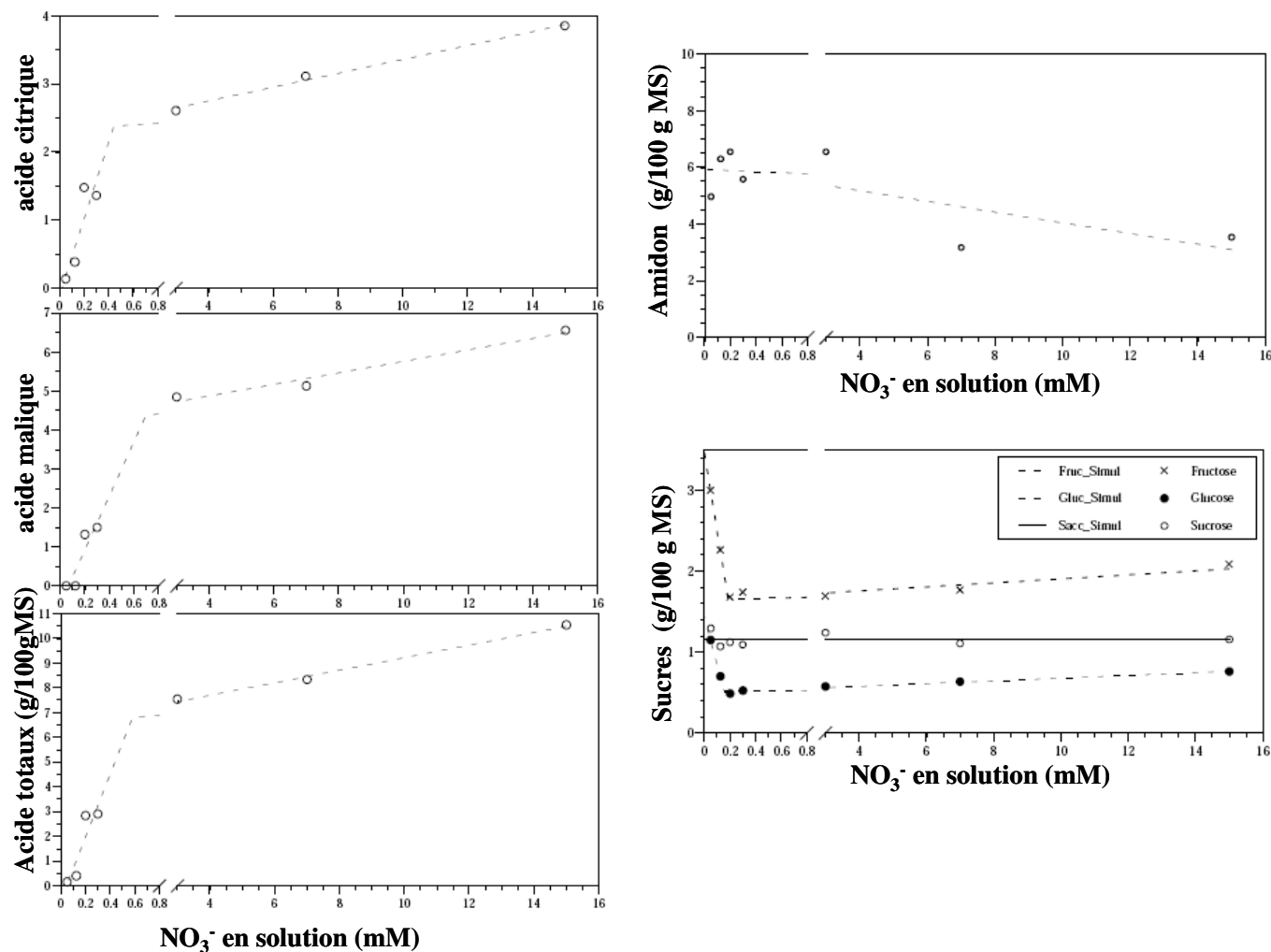
- (1) Calvet, R. In *International Symposium: Nitrates-Agriculture-Eau*; Calvet, R., Ed.; INRA: Paris La Défense, France, 1990.
- (2) Letard, M.; Erard, P.; Jeannequin, B., *Maitrise de l'irrigation fertilisante: Tomate sous serre et abris en sol et hors sol*; Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes: Paris, France, 1995; pp 217.
- (3) Peet, M. M.; Welles, G. Greenhouse tomato production. In *Tomatoes*; Heuvelink, E., Ed.; CABI Publishing: Wallingford, U.K., 2005; pp 257–304.
- (4) Dumas, Y.; Suniaga Quijada, J.; Bonafous, M. In Influence of nitrogen availability on growth and development of tomato plants until fruit-setting, *Optimization of Plant Nutrition*, Frago, M. A. C., van Beusichem, M. L., Eds.; Kluwer Academic Publishers: the Netherlands, 1993; pp 235–241.
- (5) Scholberg, J.; McNeal, B. L.; Boote, K. J.; Jones, J. W.; Locascio, S. J.; Olson, S. M. Nitrogen stress effects on growth and nitrogen accumulation by field-grown tomato. *Agron. J.* **2000**, *92*, 159–167.
- (6) Guidi, L.; Lorefice, G.; Pardossi, A.; Malorgio; Tognoni; Soldatini Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biol. Plant.* **1998**, *40* (2), 235–244.
- (7) Le Bot, J.; Jeannequin, B.; Fabre, R. Impact of N-deprivation on the yield and nitrogen budget of rockwool grown tomatoes. *Agronomie* **2001**, *21*, 341–350.

- (8) Parisi, M.; Giordano, I.; Pentangelo, A.; D'Onofrio, B.; Villari, G. Effects of different levels of nitrogen fertilisation on yield and fruit quality in processing tomato. *Acta Hort.* **2006**, *700*, 129–132.
- (9) Grierson, D.; Kader, A. A., Fruit ripening and quality. In *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*; Atherton, J. C., Rudich, J., Eds.; Chapman and Hall: London, U.K., 1986.
- (10) Simonne, A. H.; Fuzeré, J. M.; Simonne, E.; Hochmuth, R. C.; Marshall, M. R. Effects of nitrogen rates on chemical composition of yellow grape tomato grown in a subtropical climate. *J. Plant Nutr.* **2007**, *30*, 927–935.
- (11) Warner, J.; Zhang, T.; Hao, X. Effects of nitrogen fertilization on fruit yields and quality of processing tomatoes. *Can. J. Plant Sci.* **2004**, *84* (3), 865–871.
- (12) Albu-Yaron, A.; Feigin, A.; Rylski, I. The quality of tomato for canning as affected by combined chloride, nitrate and osmotic potential of the nutrient solution. *Plant Foods Hum. Nutr.* **1993**, *43*, 201–210.
- (13) Kaniszewski, S.; Elkner, K.; Rumpel, J. Effect of nitrogen fertilization and irrigation on yield, nitrogen status in plants and quality of fruits of direct seeded tomatoes. *Acta Hort.* **1987**, *200*, 195–202.
- (14) Wang, Y. T.; Huang, S. W.; Liu, R. L.; Jin, J. Y. Effects of nitrogen application on flavor compounds of cherry tomato fruits. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2007**, *170*, 461–468.
- (15) Aziz, A. B. Seasonal changes in the physical and chemical composition of tomato fruits as affected by nitrogen levels. *Meded. Landbouw. Wageningen* **1968**, *68* (7), 1–6.
- (16) Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 860–863.
- (17) Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2* (4), 152–159.
- (18) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79* (5), 727–747.
- (19) Berrino, F.; Villarini, A. Fruit and vegetables and cancer. In *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*; Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I., Eds.; Woodhead Publishing Limited, CRC Press: Cambridge, U.K., 2008; pp 75–94.
- (20) Bazzano, L. A. Epidemiologic evidence for the effect of fruit and vegetables on cardiovascular diseases, diabetes and obesity. In *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*; Tomas-Barberan, F. A., Gil, M. I., Eds.; Woodhead Publishing Limited, CRC Press: Cambridge, U.K., 2008; pp 119–144.
- (21) Giovannucci, E. Does prostate-specific antigen screening influence the results of studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer risk?. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99* (14), 1060–1062.
- (22) Kavanaugh, C. J.; Trumbo, P. R.; Ellwood, K. C. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99* (14), 1074–1085.
- (23) Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, *45* (4), 287–306.
- (24) Dumas, Y.; Dadomo, M.; Di Lucca, G.; Grolier, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 369–382.
- (25) Colla, G.; Battistelli, A.; Moscatello, S.; Proietti, S.; Saccardo, F. Yield and fruit quality of processing tomato hybrids as affected by nitrogen fertigation rates. *Italus Hortus* **2003**, *10* (6), 34–42.
- (26) Stitt, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol* **1999**, *2*, 178–186.
- (27) Urbanczyk-Wochniak, E.; Fernie, A. R. Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J. Exp. Bot.* **2005**, *56* (410), 309–321.
- (28) Wang, Y.-H.; Garvin, D. F.; Kochian, L. V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. *Plant Physiol.* **2001**, *127* (1), 345–359.
- (29) Scheible, W. R.; Gonzalez-Fontes, A.; Lauerer, M.; Muller-Rober, B.; Caboche, M.; Stitt, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **1997**, *9* (5), 783–798.
- (30) Fritz, C.; Palacios-Rojas, N.; Feil, R.; Stitt, M. Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **2006**, *46*, 533–548.
- (31) Wilkens, R. T.; Spoerke, J. M.; Stamp, N. E. Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology* **1996**, *77* (1), 247–258.
- (32) Stout, M. J.; Brovont, R. A.; Duffey, S. S. Effect of nitrogen availability on expression of constitutive and inducible chemical defenses in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *J. Chem. Ecol.* **1998**, *24* (6), 945–963.
- (33) Stewart, A. J.; Chapman, W.; Jenkins, G. I.; Graham, I.; Martin, T.; Crozier, A. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* **2001**, *24*, 1189–1197.
- (34) Mozafar, A. Nitrogen fertilizers and the amount of vitamins in plants: a review. *J. Plant Nutr.* **1993**, *16* (12), 2479–2506.
- (35) Demarez, V.; Duthoit, S.; Baret, F.; Weiss, M.; Dedieu, G. Estimation of leaf area and clumping indexes of crops with hemispherical photographs. *Agric. For. Meteorol.* **2008**, *148* (4), 644–655.
- (36) Fleuriot, A. Evolution des composés phénoliques au cours de la croissance et de la maturation des fruits de tomates "cerise" (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). *Fruits* **1976**, *31* (2), 117–126.
- (37) Gautier, H.; Diakou-Verdin, V.; Bénard, C.; Reich, M.; Buret, M.; Bourgaud, F.; Poessel, J. L.; Caris-Veyrat, C.; Génard, M. How does tomato quality (sugar, acid and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance?. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1241–1250.
- (38) Deutsch, M.; Weeks, C. Microfluorometric assay for vitamin C. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1965**, *48*, 1248–1256.
- (39) Egberg, D.; Potter, R.; Geroff, J. Semi-automated method for the fluorometric determination of total vitamin C in food products. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1977**, *60*, 126–131.
- (40) Stevens, R.; Garchery, C.; Carretero, Y.; Causse, M. Technique for rapid, small-scale analysis of vitamin C levels in fruit and application to a tomato mutant collection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6159–6165.
- (41) Lime, B.; Griffiths, F.; O'Connor, R.; Heinzelman, D.; McCall, E. Spectrophotometric methods for determining pigmentation— β -carotene and lycopene—in Ruby Red grapefruit. *J. Agric. Food Chem.* **1957**, *5*, 941–944.
- (42) Kanai, S.; Adu-Gymfi, J.; Lei, K.; Ito, J.; Ohkura, K.; Moghaieb, R. E. A.; El-Shemy, H.; Mohapatra, R.; Mohapatra, P. K.; Saneoka, H.; Fujita, K. N-deficiency damps out circadian rhythmic changes of stem diameter dynamics in tomato plant. *Plant Sci.* **2008**, *174* (2), 183–191.
- (43) Walker, A. J.; Ho, L. C. Carbon translocation in the tomato: effects of fruit temperature on carbon metabolism and the rate of translocation. *Ann. Bot.* **1977**, *41* (174), 825–832.
- (44) Carrara, S.; Pardossi, A.; Soldatini, G. F.; Tognoni, F.; Guidi, L. Photosynthetic activity of ripening tomato fruit. *Photosynthetica* **2001**, *39* (1), 75–78.
- (45) Tomes, M. L. Temperature inhibition of carotene synthesis in tomato. *Bot. Gaz.* **1963**, *124* (3), 180.
- (46) Toor, R. K.; Savage, G. P.; Lister, C. E. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 1–10.
- (47) Slimestad, R.; Verheul, M. J. Seasonal variation in the level of plant constituents in greenhouse production of

- cherry tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3114–3119.
- (48) Raffo, A.; La Malfa, G.; Fogliano, V.; Maiani, G.; Quaglia, G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 11–19.
- (49) Dorais, M.; Ehret, D.; Papadopoulos, A. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7* (2), 231–250.
- (50) Bongue-Bartelsman, M.; Phillips, D. A. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes on the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.* **1995**, *33* (5), 539–546.
- (51) Parr, A. J.; Bolwell, G. P. Review: Phenols in the plant and in the man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 985–1012.

Received for Review November 21, 2008. Accepted February 25, 2009.
Revised manuscript received February 19, 2009.

Annexe 3 : Impact de la nutrition azotée sur les teneurs en sucres, amidon et acides organiques. Complément du Chapitre III.



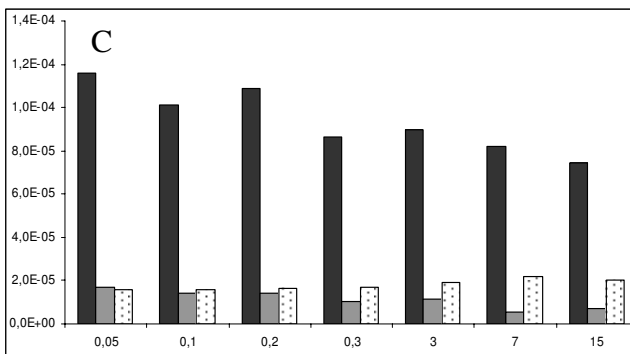
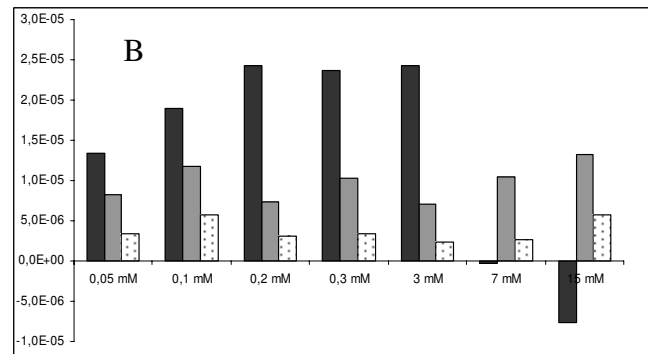
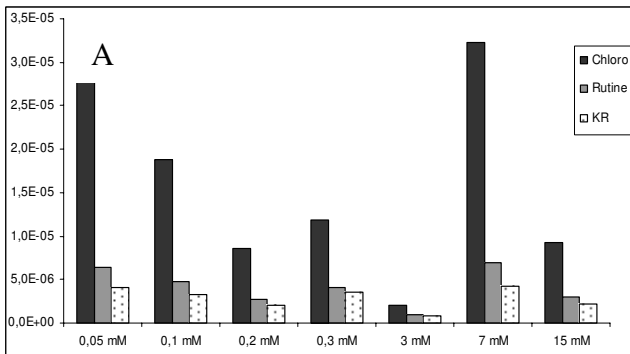
Effet de la nutrition azotée après 25 jours de culture NFT sur les teneurs en acides organiques, en sucres et en amidon (en g/100g MS) dans les limbes de tomate (cv Rondello).

L'amidon a été extrait et dosé suivant la méthode de (Gomez *et al*, 2003). Les sucres solubles et les acides organiques ont été extraits et mesurés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) suivant les méthodes de (Gomez *et al*, 2002; Wu *et al*, 2002).

	Glucose	Fructose	Saccharose	Amidon	Ac citrique	Ac Malique	Acides totaux
<i>b1</i>	1,449*	3,489*	1,158	5,919*	-0,103	-0,469	-0,554
<i>a1</i>	-5,975*	-9,823*	0	-0,188	5,608*	6,951*	12,653*
<i>x0</i>	0,156*	0,186*			0,444*	0,699*	0,584*
<i>a2</i>	0,017*	0,025*			0,102	0,148*	0,253*
<i>a1/a2</i>	351	393			55	47	50

Paramètres relatifs aux régressions par parties calculées pour analyser l'effet de la nutrition azotée sur teneurs en acides organiques, en sucres et en amidon dans les limbes. x_0 correspond au point de rupture, pour $x < x_0$ b_1 est l'ordonnée à l'origine et a_1 la pente de la droite ; et pour $x > x_0$ a_2 correspond à la pente de la 2^{ème} droite, et a_1/a_2 au ratio des 2 pentes. * pour les valeurs significativement différentes de 0 avec IC à 95%

Annexe 4 : Quantités de composés phénoliques synthétisées par jour et par plante : (A) entre 14 et 18 jours ; (B) entre 18 et 21 jours ; (C) entre 21 et 25 jours. Complément du chapitre III.



Annexe 5 : Résultats de l'expérimentation menée en phytotron en 2006, en hydroponie en conteneur, avec cultivar Microtom. Complément du Chapitre V.

Microtom 2006				
Azote (NO₃⁻)	nb fruits	rdt FR	poids moy	%MS
7 mM	38	161,8	4,26	7,10
3 mM	32,4	156,3	4,82	7,03
1 mM	39,4	148,1	3,76	7,62
0,5 mM	22,8	98,1	4,30	6,97
Effet azote	(*)	NS	NS	NS

Nombre moyen de fruits par plant, rendement en fruits rouges (en g/plant), poids moyen (g), et pourcentage de MS des fruits, suivant la nutrition azotée (7, 3, 1 et 0.5mM) lors de la culture hydroponique de Microtom en phytotron en 2006. Les valeurs sont des moyennes calculées sur toute la période de culture pour 5 plantes par milieu. NS, non significatif ; (*), P < 0.1

Récolte	Azote (NO₃⁻)	CAG	Chloro	Rutine	DCQ	TCQ	NC
R1	7 mM	0,137 ab	0,955 a	2,121 a	0,865 a	0,625 ab	3,230 a
	3 mM	0,152 ab	0,622 a	1,975 a	0,465 ab	0,435 ab	3,178 a
	1 mM	0,127 ab	0,462 a	1,692 a	0,436 ab	0,454 ab	2,893 a
	0,5 mM	0,137 ab	0,775 a	2,767 a	0,341 ab	0,277 ab	5,944 a
R2	7 mM	0,133 ab	1,061 a	1,537 a	0,916 a	0,676 ab	3,387 a
	3 mM	0,144 ab	0,721 a	1,919 a	0,476 ab	0,354 ab	2,961 a
	1 mM	0,130 ab	0,577 a	1,739 a	0,520 ab	0,468 ab	1,936 a
	0,5 mM	0,104 b	0,592 a	2,576 a	0,373 ab	0,291 ab	3,909 a
R3	7 mM	0,264 ab	0,910 a	1,367 a	0,343 ab	1,027 a	6,396 a
	3 mM	0,182 ab	0,730 a	2,039 a	0,165 b	0,157 b	0,984 a
	1 mM	0,213 ab	0,716 a	1,812 a	0,229 b	0,210 b	1,538 a
	0,5 mM	0,212 ab	0,621 a	1,929 a	0,165 b	0,160 b	2,012 a
R4	7 mM	0,145 ab	0,567 a	0,925 a	0,198 b	0,200 b	0,643 a
	3 mM	0,156 ab	0,409 a	1,300 a	0,167 b	0,175 b	0,932 a
	1 mM	0,164 ab	0,435 a	1,457 a	0,127 b	0,155 b	1,221 a
	0,5 mM	0,270 a	0,710 a	4,445 a	0,322 ab	0,308 ab	3,782 a
Effet azote	NS	(*)	*	(*)	**	**	
Effet récolte	**	NS	NS	***	(*)	*	
Interaction	NS	NS	NS	NS	NS	(*)	

Concentrations (mg/g MS) en composés phénoliques dans les fruits de tomate cv Microtom (2007) en fonction des milieux de culture (0,5, 1, 3 et 7mM NO₃⁻) pour les récoltes 1, 2, 3 et 4. Les dérivés hydroxycinnamiques et la NC sont exprimés en équivalent d'acide chlorogénique (mg d'acide chlorogénique par g de MS), la rutine est exprimée en mg rutine par g de MS. Les composés quantifiés sont : un glucoside de l'acide caféique (GAC), l'acide chlorogénique (Chloro), la rutine, des acides di et tri-cafeoylquinique et la naringenine chalcone (NC). NS, non significatif ; (*), P < 0.1; *, P < 0.05; **, P < 0.01. Les lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives (P<0.05) selon un test de Tukey.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Marie Josèphe AMIOT-CARLIN, Directeur de Recherche, Université Aix-Marseille I & II,
Marseille**

Monsieur Laurent URBAN, Directeur de Recherche, Centre INRA de Corse, San Giuliano

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame Camille BENARD

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en
polyphénols chez la tomate"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences Agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 16 septembre 2009

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de cultures sur le contenu en polyphénols chez la tomate

Au cours de ce travail de thèse nous avons étudié l'influence des apports en azote nitrique sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Plusieurs dispositifs de culture hors sols ont été utilisés (hydroponie, laine de roche, NFT). Nous avons quantifié les principaux composés phénoliques de la tomate, à savoir : l'acide chlorogénique, la rutine, le kaempférol rutinoside dans les parties végétatives de la plante (limbe, tige et racine), ainsi que des dérivés de l'acide caféique et la naringénine chalcone dans les fruits. Ces composés ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance.

Nous avons observé que les limbes étaient le compartiment le plus sensible aux conditions de nutrition. Nous y avons observé une multiplication par deux des concentrations en polyphénols lors d'une diminution des apports en azote de 15 à 0.05mM NO₃⁻. Nous avons mis en évidence, en établissant des courbes de réponses, que ces augmentations s'effectuaient de façon nettement plus importante dans des conditions de nutrition azotée limitante pour la croissance de la plante. Dix à 20 jours de carence ou de limitation semblent nécessaires pour obtenir une modification du contenu en polyphénols à l'échelle de la plante. Dans les fruits les concentrations en polyphénols ont été modifiées par le niveau de fertilisation azotée, mais nous n'avons pas mis en évidence d'augmentations très significatives.

L'impact d'autres facteurs, comme les conditions climatiques (lumière et température) a également été pris en compte. Nos résultats semblent indiquer que les conditions climatiques régissent le contenu en polyphénols de manière plus importante que la nutrition azotée.

Mots clefs : azote, nitrate, tomate, *Solanum lycopersicon*, polyphénols, acide chlorogénique, rutine, environnement, lumière, température, saison, fruit, feuille.

Effect of nitrogen nutrition and environmental growth conditions on tomato polyphenolics

During my PhD we studied the effects of nitrate supply on tomato polyphenolics content. Several cultural systems were used (hydroponic, rockwool culture, NFT). We quantified the main tomato phenolic compounds: chlorogenic acid, rutine, kaempferol rutinoside in vegetative parts (leaf, stem, root), together with some caffeic acid derivates and naringenine chalcone in fruits. These compounds were analysed by High Performance Liquid Chromatography.

We noticed that leaves were the more responsive compartment of the plant, to the nutrition conditions. We observed a two-fold increase in polyphenolics concentrations when nitrate supply decrease from 15 to 0.05mM. We found, by drawing response curves, that this increase was more important when nitrate supply limited plant growth. Ten to 20 days seem necessary to observe a modification, at the plant level, of polyphenolics content. In tomato fruits, polyphenolics concentrations were modified by the nitrate supply, but we do not observed very significant increases.

The effects of other environmental factors, such as climate conditions (light, temperature) were studied. Our results seem to indicate that climate is more important than nitrogen nutrition for the determination of the polyphenolic compounds concentrations.

Key words: nitrogen, nitrate, tomato, *Solanum lycopersicon*, polyphenolic compounds, chlorogenic acid, rutine, environment, light, temperature, season, fruit, leave.